



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΩΝ ΥΛΩΝ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΩΝ ΜΕΣΩ
ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ**

**Traceability of Fish Foods Raw Materials Through Next Generation
Sequencing (NGS)**



Μήλιου Αικατερίνη του Πέτρου

Λάρισα 2023

Traceability of Fish Foods Raw Materials Through Next Generation Sequencing (NGS)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μούτου Αικατερίνη (Επιβλέπουσα καθηγήτρια)	Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Βασιλειάδης Σωτήριος	Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Παπαδοπούλου Καλλιόπη	Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έλαβε χώρα στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας (ΒΙΟΖ). Με τη διεκπεραίωσή της, λοιπόν, θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν με κάθε τρόπο στην επίτευξή της.

Θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Αικατερίνη Μούτου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου τη συγκεκριμένη εργασία και δίνοντάς μου την ευκαιρία να είμαι μέλος του εργαστηρίου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σωτήριο Βασιλειάδη και την κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου για την προθυμία και τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα Ανδρέα Τσιπουρλιάνο για τη συνεργασία, την υποστήριξη και τη διαρκή καθοδήγηση σε κάθε στάδιο αυτής της εργασίας. Καθοριστική ήταν η συμβολή του στην εκτέλεση της μεθοδολογίας και στην ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Επίσης, ευχαριστώ και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα και τη διάθεση συνεργασίας που χαρακτηρίζουν το εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την αγάπη, την κατανόηση, τη στήριξη και τη συμπαράστασή τους σε κάθε προσπάθεια και βήμα μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1. Θρεπτική αξία ιχθύων για την ανθρώπινη υγεία.....	8
2. Υδατοκαλλιέργειες.....	9
2.1 Γενικά.....	9
2.2 Η υδατοκαλλιέργεια σε παγκόσμια κλίμακα.....	10
2.3 Η υδατοκαλλιέργεια σε Ευρώπη και Μεσόγειο.....	13
2.4 Η υδατοκαλλιέργεια στην Ελλάδα.....	13
3. Διατροφή των ιχθύων στις υδατοκαλλιέργειες.....	14
3.1 Η σημασία της διατροφής στις υδατοκαλλιέργειες.....	14
3.2 Διατροφικές ανάγκες των εκτρεφόμενων οργανισμών.....	15
3.3 Ο ρόλος των ιχθυοτροφών.....	16
3.4 Διαδικασία παραγωγής ιχθυοτροφών.....	17
3.5 Κατηγορίες ιχθυοτροφών.....	18
3.6 Θρεπτικές ουσίες ιχθυοτροφών.....	20
3.6.1 Πρωτεΐνες.....	20
3.6.2 Λιπίδια και λιπαρά οξέα.....	21
3.6.3 Υδατάνθρακες.....	21
3.6.4 Βιταμίνες.....	22
3.6.5 Ανόργανα στοιχεία.....	22
3.7 Μη θρεπτικές ουσίες ιχθυοτροφών.....	22
3.8 Πρώτες ύλες ιχθυοτροφών.....	24
4. Ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια.....	24
4.1 Χρήση υποπροϊόντων για παραγωγή ιχθυάλεурων και ιχθυελαίου.....	27
4.2 Ιχθυάλευρα.....	28
4.3 Ιχθυέλαια.....	29
4.4 Προβληματισμοί από τη χρήση ιχθυάλεурων και ιχθυελαίων.....	29

5. Χρήση εναλλακτικών πρώτων υλών.....	30
5.1 Πρώτες ύλες φυτικής προέλευσης.....	31
5.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρήσης πρώτων υλών φυτικής προέλευσης στις ιχθυοτροφές.....	32
5.3 Πρώτες ύλες ζωικής προέλευσης.....	33
5.3.1 Άλευρα καρκινοειδών.....	33
5.3.2 Άλευρα χερσαίων ζώων.....	33
5.3.3 Εντομάλευρα.....	33
5.4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρήσης πρώτων υλών ζωικής προέλευσης στις ιχθυοτροφές.....	34
5.5 Πρώτες ύλες μικροβιακής προέλευσης.....	34
6. Τεχνολογίες Αλληλούχισης Νέας Γενιάς.....	35
ΣΚΟΠΟΣ.....	38
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	39
1. Δείγματα.....	39
2. Απομόνωση DNA και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA.....	39
3. Προετοιμασία δεδομένων αλληλούχισης μέσω αρχείων FASTQ.....	39
4. Ανάλυση δεδομένων αλληλούχισης.....	41
4.1 Ανάλυση δεδομένων μέσω του DADA2.....	41
4.2 Επεξεργασία και οπτικοποίηση αποτελεσμάτων μέσω του Phyloseq.....	42
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43
1. Ποιοτικός έλεγχος των αρχείων FASTQ.....	43
2. Ανάλυση δεδομένων μέσω του DADA2.....	44
3. Ανάλυση δεδομένων μέσω του Phyloseq.....	46
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κλάδος των υδατοκαλλιεργειών τα τελευταία χρόνια εμφανίζει μία ραγδαία ανάπτυξη, γεγονός που οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην πρόοδο της τεχνολογίας και στην εξέλιξη των μεθόδων παραγωγής. Η πορεία, όμως, των υδατοκαλλιεργειών χρειάζεται να μείνει εξίσου εκθετική και στο μέλλον, καθώς ο τομέας αυτός αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους που δύναται να αντιμετωπίσει τα διαρκώς αυξανόμενα προβλήματα διατροφής του παγκόσμιου πληθυσμού και τα μειωμένα αποθέματα πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης. Για να συνεχίσει η υδατοκαλλιέργεια να παραμένει αποδοτική, πρέπει να δοθεί προτεραιότητα στη διατροφή των υδρόβιων οργανισμών και ειδικότερα στην ποιότητα των ιχθυοτροφών, αλλά και σε καινοτόμες τεχνικές και στρατηγικές διατροφής, με σκοπό την υψηλή ποιότητα των ιχθυοκαλλιεργειών και την προστασία του περιβάλλοντος της εκτροφής. Στο πλαίσιο αυτό, παρόλο που τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια αποτελούν τη βάση της ιχθυοτροφής, η περιορισμένη παροχή αυτών των πρώτων υλών καθιστά απαραίτητη την αυξανόμενη χρήση πρόσθετων πρώτων υλών, όπως φυτικά συστατικά, μικροβιακές πρωτεΐνες και άλευρα εντόμων, για τη διασφάλιση των διατροφικών αναγκών. Προς αυτήν την κατεύθυνση κινείται και η παρούσα εργασία μέσω της προσπάθειας εντοπισμού των πρώτων υλών των ιχθυοτροφών. Για την επίτευξη αυτής της προσπάθειας σημαντική είναι η συμβολή των τεχνολογιών αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS) και συγκεκριμένα η αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου, που χρησιμοποιείται αποτελεσματικά για τον προσδιορισμό της βακτηριακής κοινότητας των τροφών. Έτσι, με την αλληλούχιση και στη συνέχεια με αρωγούς τα προγράμματα DADA2 και Phyloseq, ανιχνεύτηκαν τα βακτήρια που συναντώνται στα οχτώ προς εξέταση δείγματα ιχθυοτροφών, τόσο γνωστής όσο και άγνωστης προέλευσης. Τα βακτήρια αυτά μέσω της βιβλιογραφίας συσχετίστηκαν με πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοτροφές, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως τα δείγματα των ιχθυοτροφών μας περιέχουν θαλάσσια συστατικά, όπως ιχθυάλευρα και ιχθυέλαιο, φυτικές πρώτες ύλες, μικροβιακή πρωτεΐνη και έχουν προβιοτικές ιδιότητες.

ABSTRACT

Over the years, the sector of aquaculture shows a continuous development, which is mostly due to the advancement of technology and the progress of production methods. The course of aquaculture needs to remain equally exponential in the future, as this domain constitutes one of the most important in dealing with the ever-increasing nutrition problems of the world population and reduced availability of proteins of animal origin. In order for aquaculture to remain profitable, priority must be given to the nutrition of aquatic organisms and especially in the quality of fish foods, but also in innovative nutrition techniques and strategies with purpose the high quality of aquaculture and the protection of the farming environment. In this context, even though fishmeal and fish oil constitute the basis of fish food, the limited provision of these raw materials necessitates the increasing use of additional raw materials, such as plant ingredients, microbial proteins and insect meal, to ensure nutritional needs. This is the direction through which this study moves in an attempt to identify the raw materials of fish foods. In order to achieve this goal the contribution of new generation sequencing technologies (NGS) is important, and specifically the sequencing of the 16S rRNA gene, which is effectively used to determine the bacterial community of foods. In this way, by sequencing and then with the help of the DADA2 and Phyloseq programs, the bacteria found in the eight samples of fish foods, that were examined, both of known and unknown origin, were detected. These bacteria were associated with raw materials that were used in fish feeds using published information, which leads to the conclusion that our samples of fish foods contain marine ingredients, such as fishmeal and fish oil, plant raw materials, microbial protein and have probiotic properties.

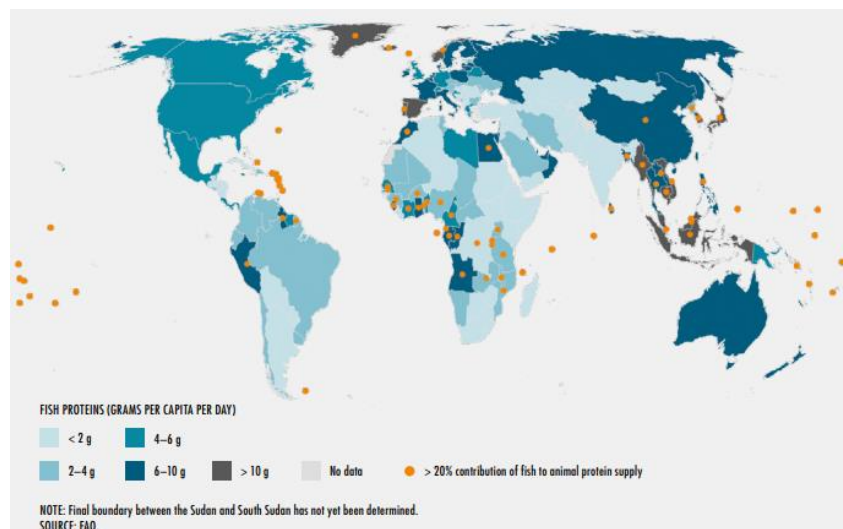
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΙΧΘΥΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ

Η αλληλεπίδραση του ανθρώπου με τα ψάρια έχει μακρά παράδοση με απαρχή τα προϊστορικά χρόνια και ακολουθώντας μία πορεία στην οποία το ψάρι χρησιμοποιείται ως τροφή, ως εμπορικό αγαθό και για θρησκευτικούς σκοπούς (Bone & Moore, 2017). Έτσι, η κατανάλωση ψαριών αποτελεί κομμάτι της πολιτιστικής παράδοσης πολλών ανθρώπων και παρουσιάζει εξαιρετικό διατροφικό προφίλ, όσον αφορά τα οφέλη για την υγεία. Είναι μια καλή πηγή πρωτεϊνών, λιπαρών οξέων, μετάλλων, βιταμινών και βασικών μικροθρεπτικών συστατικών έμμεσα μέσω των εκτρεφόμενων ζώων που τρώμε και άμεσα μέσω της κατανάλωσης σκευασμάτων ιχθυελαίου (FAO, 2021).

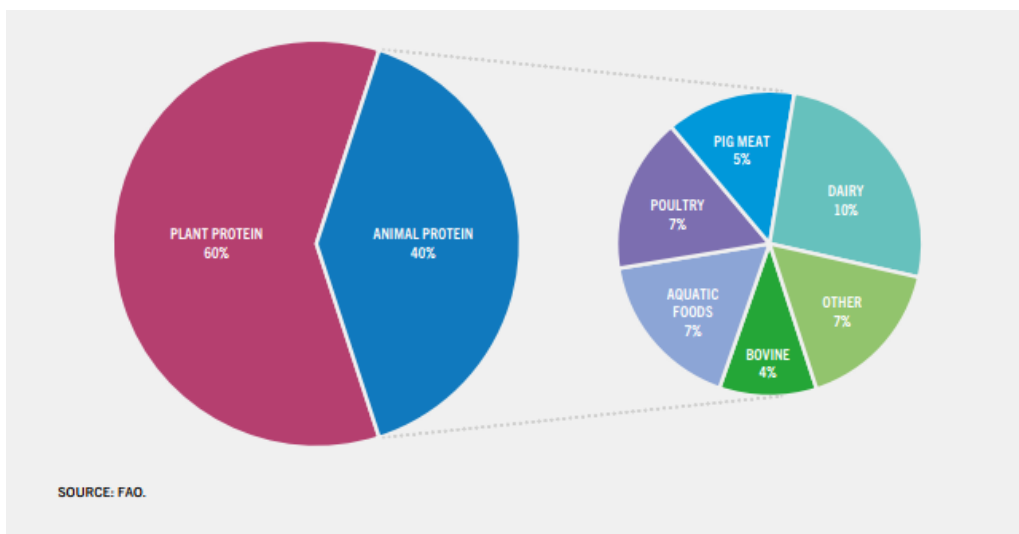
Ειδικότερα, το ψάρι είναι ανώτερη πηγή πρωτεΐνης ζωικής προέλευσης (Εικ. 1) όσον αφορά

την περιεκτικότητα σε ολικές πρωτεΐνες και βασικά αμινοξέα και μπορεί να καλύψει συνολικά για 3,3 δισεκατομμύρια ανθρώπους το 20% της μέσης ημερήσιας πρόσληψης σε πρωτεΐνη (FAO, 2020). Το 2019 (Εικ.2) τα ψάρια αποτελούσαν το 17% της συνολικής ζωικής πρωτεΐνης και το 7% όλων των ειδών πρωτεϊνών που καταναλώνονται σε παγκόσμιο επίπεδο (FAO, 2022).



Εικόνα 1: Συνεισφορά των ιχθύων ως πηγή ζωικής πρωτεΐνης (FAO, 2020)

πρωτεΐνης και το 7% όλων των ειδών πρωτεϊνών που καταναλώνονται σε παγκόσμιο επίπεδο (FAO, 2022).



Εικόνα 2: Συμβολή υδατινών τροφίμων στην προμήθεια ζωικής πρωτεΐνης κατά άτομο (FAO, 2022)

Το άλλο βασικό θρεπτικό συστατικό για την ανθρώπινη υγεία που συναντάται κυρίως στα θαλασσινά είναι τα ωμέγα-3 μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα (σιπενταενοϊκό οξύ – EPA και

εικοσιδυοεξαενοϊκό οξύ - DHA), τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για την υγεία της καρδιάς, τη σωστή ανάπτυξη του εγκεφάλου, την ποιότητα της όρασης και την προγεννητική υγεία (IFFO, 2020).

Μεταξύ άλλων θρεπτικών συστατικών τα ψάρια είναι πλούσια πηγή σιδήρου, που συντελεί στην ανάπτυξη και οξυγόνωση του οργανισμού, ιδιαίτερα στην κατάσταση της εγκυμοσύνης, πηγή ιωδίου που έχει κρίσιμο ρόλο στην παραγωγή των θυρεοειδών ορμονών και στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, και πηγή ασβεστίου και ψευδάργυρου που συμβάλλουν στη φυσιολογική λειτουργία και κατάσταση των μυών και των οστών.

Σε επίπεδο βιταμινών τα ψάρια περιέχουν βιταμίνη D που είναι σημαντική για τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, τη



Εικόνα 3: Θρεπτικά συστατικά ιχθύος (FAO, 2022)

διατήρηση της υγείας των οστών και τη διανοητική ανάπτυξη, βιταμίνη A που είναι χρήσιμη στην παιδική ηλικία, αλλά και μετέπειτα βοηθά στην όραση και συνεισφέρει στην καταπολέμηση των λοιμώξεων, και βιταμίνη B12 που βοηθά στην εγκυμοσύνη και προλαμβάνει γενετικές ανωμαλίες του εγκεφάλου και της σπονδυλικής στήλης (FAO, 2020; FAO, 2022).

Χάριν, λοιπόν, αυτής της θρεπτικής τους αξίας (Εικ. 3) τα ψάρια χαρακτηρίζονται ως μία από τις πιο υγιεινές κατηγορίες τροφίμων στον πλανήτη, που διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στο μετασχηματισμό των συστημάτων τροφής, στην οικονομική ανάπτυξη που προέρχεται από την παραγωγή και το εμπόριο των ψαριών, καθώς και στην καταπολέμηση της επισιτιστικής κρίσης παγκοσμίως (FAO, 2020).

2. ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

2.1 Γενικά

Ο αριθμός των ψαριών που καταναλώνεται ανά άτομο σε παγκόσμια κλίμακα διπλασιάζεται τα τελευταία 50 χρόνια. Βασιζόμενοι αποκλειστικά στην ελεύθερη αλιεία για την κάλυψη αυτών των παγκόσμιων διατροφικών αναγκών σε ψάρι θα επέλθει εντατικοποίηση της αλιείας με κίνδυνο να μειωθεί ή ακόμα και να εξαφανιστεί μέχρι και το 90% του πληθυσμού πολλών ψαριών (Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών, 2008). Η μακροχρόνια βιωσιμότητα της αλιείας και η συνεισφορά της στον εφοδιασμό τροφίμων, όμως, απειλείται επιπλέον από την υπερεκμετάλλευση των ιχθυοαποθεμάτων, τις μεταβολές στο οικοσύστημα και τις διαμάχες για τη διαχείριση των ψαριών (FAO, 2011). Η ιχθυοκαλλιέργεια έρχεται να καλύψει αυτά τα κενά, καθώς αποτελεί την πλέον βιώσιμη λύση, παράγοντας σε παγκόσμιο επίπεδο εκατομμύρια τόνους ψαριών και οστρακοειδών. Έτσι, εξηγείται ο ρυθμός αύξησης της τάξης 6,7% ετησίως που εμφανίζει μεταξύ του 1990 και του 2020 με την ποσότητα ψαριών που παράγονται από την υδατοκαλλιέργεια να είναι σχεδόν ίση με την ποσότητα που συλλέγεται με την αλιεία (IFFO, 2022).

Η υδατοκαλλιέργεια (Εικ. 4) αποτελεί παγκοσμίως ένα από τα ταχύτερα αναπτυσσόμενα συστήματα παραγωγής τροφής, με το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής της να προέρχεται από τις αναπτυσσόμενες χώρες και με την προσδοκία να συνεχίσει να συμβάλλει στην επισιτιστική ασφάλεια και την καταπολέμηση της φτώχειας. Οι περισσότερες πρακτικές υδατοκαλλιέργειας έχουν σημαντικά διατροφικά και κοινωνικά οφέλη και μικρό περιβαλλοντικό κόστος (FAO Fisheries Department, 1997).

Η προσφορά των υδατοκαλλιεργειών σήμερα έγκειται στους παρακάτω τομείς:

- ✓ Παραγωγή τροφίμων για τον άνθρωπο.
- ✓ Παραγωγή προϊόντων για τη βιομηχανία.
- ✓ Παραγωγή δολωμάτων για την αλιεία ιχθύων.
- ✓ Παραγωγή τροφής για τα κατοικίδια.
- ✓ Παραγωγή διακοσμητικών υδρόβιων οργανισμών.
- ✓ Παραγωγή ιχθύων κατάλληλων για τον εμπλουτισμό φυσικών υδάτινων μαζών και την ερασιτεχνική αλιεία (Norman et al., 2019).



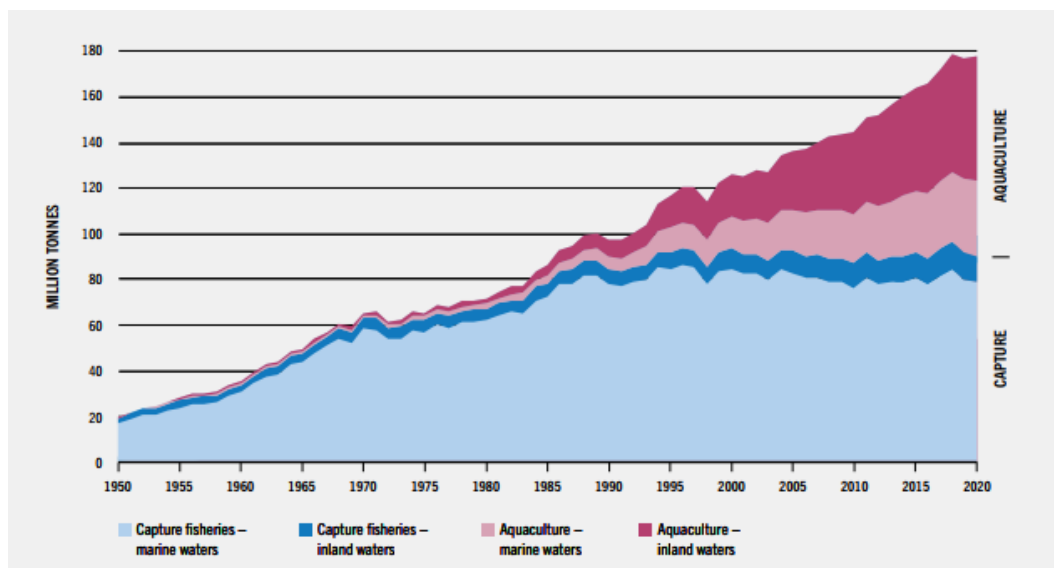
Εικόνα 4: Εγκαταστάσεις υδατοκαλλιέργειας (IFFO, 2020)

Σήμερα, οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην υδατοκαλλιέργεια έχουν εξελιχθεί, η γνώση αυξάνεται, η απόδοση των μονάδων και η ποιότητα βελτιώνεται και το κόστος παραγωγής ελαττώνεται, με αποτέλεσμα να μειώνονται οι απώλειες και οι εταιρείες του κλάδου να επιδιώκουν τη βελτιστοποίηση της παραγωγής τους (Shields, 2001).

2.2 Η υδατοκαλλιέργεια σε παγκόσμια κλίμακα

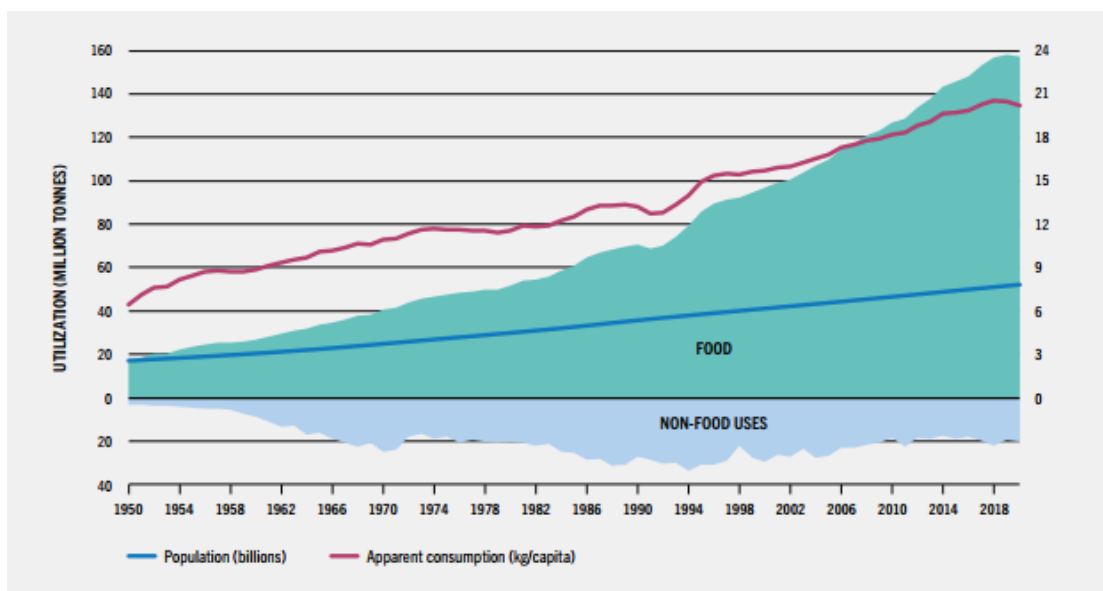
Οι υδατοκαλλιέργειες αναπτύσσονται διεθνώς με πολύ γρήγορους ρυθμούς και σε αυτό συντελεί η αξιοποίηση των χερσαίων εκτάσεων, των θαλάσσιων περιοχών, των σύγχρονων εφαρμογών της βιοτεχνολογίας και της ανάγκης επενδύσεων σε νέους τομείς. Στην Ευρώπη οι υδατοκαλλιέργειες ποικίλουν ως προς τα είδη που εκτρέφονται, αλλά και τους τύπους εκτροφής. Αρχικά, αναπτύχθηκαν οι υδατοκαλλιέργειες στα εσωτερικά νερά και ακολούθησαν τα επόμενα χρόνια οι θαλασσοκαλλιέργειες με την παραγωγή κυρίως σολομού του Ατλαντικού, τσιπούρας και λαβρακιού. Όσον αφορά το σύνολο των ειδών ψαριών, οι κυριότερες χώρες παραγωγής εκτρεφόμενων ψαριών σε παγκόσμιο επίπεδο είναι η Κίνα, με το 67% της παγκόσμιας παραγωγής και ακολουθούν η Ινδία, το Βιετνάμ, η Ταϊλάνδη και η Ινδονησία με κυρίαρχα εκτρεφόμενα είδη τον κυπρίνο και την τιλάπια. Γενικά, υπολογίζεται ότι περισσότερα από 600 υδρόβια είδη καλλιεργούνται σε όλο τον κόσμο στο γλυκό, υφάλμυρο και θαλασσινό νερό και σε μια ποικιλία συστημάτων και εγκαταστάσεων (FAO, 2014).

Το 2020 η παγκόσμια παραγωγή υδρόβιων ζώων υπολογίζεται σε 178 εκατομμύρια τόνους (Εικ. 5), παρουσιάζοντας μία μικρή μείωση από το 2018, που παρήχθησαν οι 179 εκατομμύρια τόνοι, το ρεκόρ όλων των εποχών. Από την υδατοκαλλιέργεια προέρχονται οι 88 εκατομμύρια τόνοι (49%), ενώ από την αλιεία οι 90 εκατομμύρια τόνοι (51%). Από τη συνολική παραγωγή, το 63% συλλέγεται από τα θαλάσσια ύδατα (εκ των οποίων το 70% από αλιεία και το 30% από υδατοκαλλιέργεια) και 37% από τα ύδατα της ενδοχώρας (εκ των οποίων το 83% από την υδατοκαλλιέργεια και το 17% από τη αλιεία).



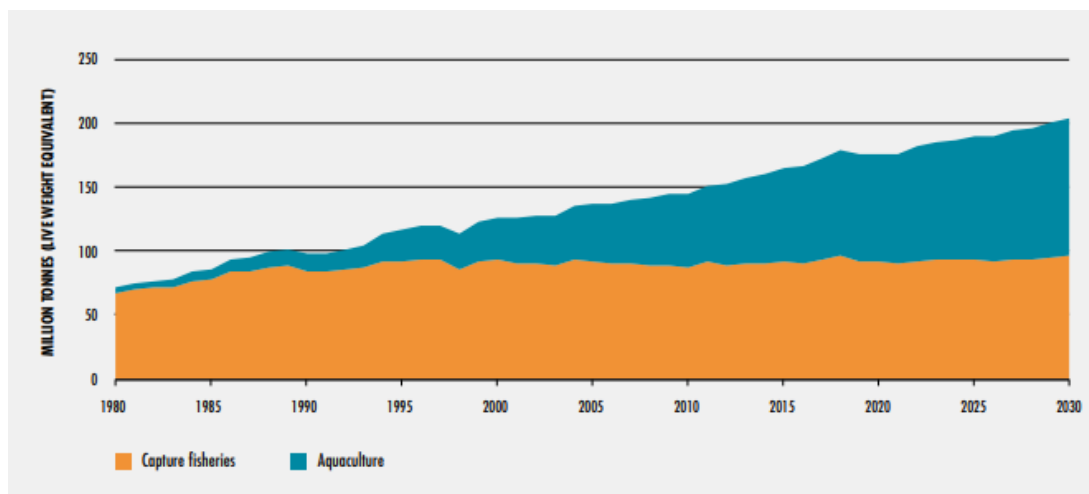
Εικόνα 5: Παγκόσμια παραγωγή αλιείας και υδατοκαλλιεργειών (FAO, 2022)

Από τους 178 εκατομμύρια τόνους υδρόβιων ζώων, πάνω από 157 εκατομμύρια τόνοι (89%) χρησιμοποιούνται για ανθρώπινη κατανάλωση, ενώ οι υπόλοιποι 20 εκατομμύρια τόνοι προορίζονται κυρίως για την παραγωγή ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίου (Εικ. 6). (FAO, 2022)

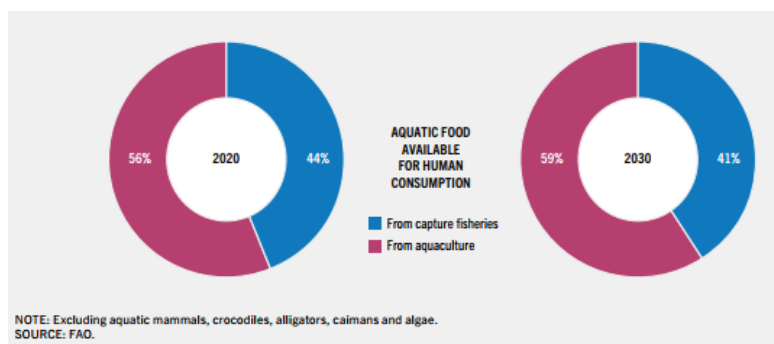


Εικόνα 6: Παγκόσμια παραγωγή αλιείας και υδατοκαλλιεργειας: Αξιοποίηση και φαινομενική κατανάλωση (FAO, 2022)

Έτσι, το 2030 η συνολική παραγωγή υδρόβιων ζώων εκτιμάται ότι θα αυξηθεί σε 204 εκατομμύρια τόνους (Εικ. 7) από 179 εκατομμύρια τόνους που υπολογίζονταν το 2018, δηλαδή θα παρουσιάσει μία αύξηση 15%, με την υδατοκαλλιέργεια να αποτελεί την κινητήρια δύναμη της παραγωγής αυτής (FAO, 2020).



Εικόνα 7: Παγκόσμια αλιεία και παραγωγή υδατοκαλλιέργειών, 1980–2030 (FAO, 2020)



Εικόνα 8: Αυξανόμενος ρόλος υδατοκαλλιέργειών (FAO, 2022)

Αναμένεται, λοιπόν, πως η παραγωγή της υδατοκαλλιέργειας το 2030, θα παρέχει περίπου το 59% των υδρόβιων τροφίμων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση (Εικ. 8), ενώ το 2020 παρείχε το 56% (FAO, 2022).

Όσον αφορά την απασχόληση στην αλιεία και την υδατοκαλλιέργεια, εκτιμάται ότι το 2020 58,5 εκατομμύρια άνθρωποι εργάζονταν στην πρωτογενή παραγωγή και το 35% απασχολούνταν στην υδατοκαλλιέργεια. Συμπεριλαμβανομένων των εργαζομένων του δευτερογενούς τομέα και των εξαρτώμενων κλάδων και δραστηριοτήτων υπολογίζεται ότι περίπου 600 εκατομμύρια άνθρωποι βιοπορίζονται εν μέρει από την αλιεία και την υδατοκαλλιέργεια (FAO, 2022).

Επομένως, είναι σημαντικό οι σύγχρονες προσπάθειες, που αποσκοπούν στη μελλοντική επιτυχία της υδατοκαλλιέργειας τόσο στις αναπτυσσόμενες όσο και στις ανεπτυγμένες χώρες, να αντιμετωπίσουν δεόντως τα πιθανά κοινωνικά και περιβαλλοντικά προβλήματα προκειμένου να διασφαλιστεί ότι η υδατοκαλλιέργεια θα αναπτύσσεται αειφόρα και θα συνεχίζει να έχει ουσιαστική συμβολή στην παγκόσμια επισιτιστική ασφάλεια και διατροφή (FAO, 1997).

2.3 Η υδατοκαλλιέργεια σε Ευρώπη και Μεσόγειο

Πραγματοποιώντας μία ιστορική αναδρομή στις υδατοκαλλιέργειες στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο παρατηρείται πως η ελεγχόμενη εκτροφή ψαριών στην Ευρώπη ξεκινάει περίπου στα 1200 μ.Χ. με ψάρια του γλυκού νερού. Το 1500 μ.Χ. αρχίζει η εκτροφή κυπρίνου στην Ευρώπη, ο οποίος εισάγεται από την Κίνα. Ακολουθεί, το 1882 η εισαγωγή της ιριδίζουσας πέστροφας από τις Η.Π.Α., η οποία υπόκειται σε προσαρμογή στις νέες συνθήκες καλλιέργειας. Από το 1900 και έπειτα, η ολοένα αυξανόμενη ζήτηση σε προϊόντα υψηλής θρεπτικής αξίας σε συνδυασμό με την πρόοδο των βιολογικών επιστημών και της τεχνολογίας, κατέστησαν τις ιχθυοκαλλιέργειες έναν σημαντικό κοινωνικοοικονομικό κλάδο (FAO, 2014).

Σήμερα, οι αιτίες που συνέβαλαν στην ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών στην Ευρώπη και ειδικότερα στη Μεσόγειο είναι οι καλές κλιματικές συνθήκες, οι εθνικές και ευρωπαϊκές επενδύσεις στον κλάδο αυτόν, το καταρτισμένο ανθρώπινο δυναμικό, η σχετική εξάντληση ορισμένων υπερπόντιων αλιευτικών πεδίων, η καθιέρωση των ζωνών αλιείας και της οικονομικής ζώνης των 200 μιλίων από πολλές χώρες, η αύξηση της αγοραστικής δύναμης των καταναλωτών των ευρωπαϊκών χωρών, αλλά και η ενίσχυση της τάσης για υγιεινή διατροφή (Γενική Διεύθυνση Αλιείας, 2022).

Όσον αφορά τις κυριότερες χώρες παραγωγής ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας στην Ευρώπη είναι η Νορβηγία, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Τουρκία, η Ελλάδα, η Ισπανία, η Ιταλία και η Γαλλία. Η Ελλάδα είναι η χώρα με τη μεγαλύτερη παραγωγή ευρύαλων ψαριών, δηλαδή τσιπούρας και λαβρακιού μεταξύ των Μεσογειακών χωρών, ενώ τα δίθυρα μαλάκια κυριαρχούν στην Ισπανία, τη Γαλλία και την Ιταλία. Το Ηνωμένο Βασίλειο, τέλος, παράγει κυρίως σολομό του Ατλαντικού. Συγκεκριμένα, η υδατοκαλλιέργεια στην Ευρωπαϊκή Ένωση επικεντρώνεται στα μύδια σε ποσοστό 39% της συνολικής ποσότητας, στην πέστροφα που αντιστοιχεί στο 15%, στον σολομό στο 14% και στα στρείδια στο 8% (Ernst & Breuer, 2022).

2.4 Η υδατοκαλλιέργεια στην Ελλάδα

Στην ελληνική οικονομία τα τελευταία είκοσι χρόνια η ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί έναν από τους πιο δυναμικά αναπτυσσόμενους κλάδους, ο οποίος ενσωματώνει την υψηλή τεχνολογία, συμβάλλει στη μείωση της υπεραλίευσης, στη μείωση των εισαγωγών ιχθύων, βελτιώνοντας το εμπορικό ισοζύγιο σε επίπεδο εθνικό, αλλά και Ευρωπαϊκής Ένωσης (Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών, 2015).

Η Ελλάδα είναι χώρα με μακρά παράδοση στην παραγωγή ιχθύων υψηλής ποιότητας. Η εντατική εκτροφή ιχθύων στην Ελλάδα αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς τομείς της ζωικής παραγωγής με αξιοσημείωτο ποσοστό εξαγωγών της παραγόμενης ποσότητας με παγκόσμια αναγνώριση. Σήμερα η υδατοκαλλιέργεια καλύπτει πλήρως τις ανάγκες της ελληνικής αγοράς και μεγάλο μέρος του εξωτερικού, με κυριότερες χώρες προορισμού την Ιταλία, την Ισπανία, τη Γαλλία, την Τουρκία, την Αγγλία και την Πορτογαλία. Το λαβράκι και η τσιπούρα αποτελούν τον δεύτερο μεγαλύτερο τομέα εξαγωγών της πρωτογενούς παραγωγής της χώρας, που αντιπροσωπεύει το 65% περίπου της Ευρωπαϊκής και της Μεσογειακής παραγωγής. Στην ανάπτυξη αυτού του κλάδου συμβάλλουν σημαντικά οι κλιματολογικές και γεωμορφολογικές συνθήκες της χώρας, το ανθρώπινο δυναμικό, οι επιδοτήσεις από το κράτος και τα προγράμματα στήριξης της Ευρωπαϊκής Ένωσης και η μείωση των αλιευτικών αποθεμάτων (Perdikaris & Paschos, 2010).

Όσον αφορά τις μονάδες θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας στη χώρα μας, υπολογίζονται σε 336 μονάδες εκτροφής μεσογειακών ειδών, οι οποίες υποστηρίζονται από 38 ιχθυογεννητικούς σταθμούς. Οι θαλασσοκαλλιέργειες δίνουν εντυπωσιακά αποτελέσματα, με την παραγωγή σημαντικού ποσοστού εγχώριου, φρέσκου και φθηνού ψαριού, αλλά και με τη δημιουργία ενός ιδιαίτερου κοινωνικοοικονομικού χώρου, ο οποίος απασχολεί μεγάλο αριθμό εργαζόμενων (Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών, 2015).

Στη χώρα μας, από την αρχή του 2000 η παραγωγή της υδατοκαλλιέργειας ξεπέρασε αυτήν της παραδοσιακής αλιείας. Συγκεκριμένα, τη δεκαετία 1990-2000 η παραγωγή υδατοκαλλιέργειας παρουσίασε εννεαπλάσια αύξηση φτάνοντας τους 95.000 τόνους, ωστόσο από το 2000 αυτός ο ρυθμός ανάπτυξης ελαττώθηκε. Σύμφωνα με τις στατιστικές, το 2012 στην ελληνική παραγωγή αντιστοιχούσε το 65% του ευρωπαϊκού λαβρακιού και της τσιπούρας που παραγόντουσαν από όλες τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Το 2013, η υδατοκαλλιέργεια παράγαγε 144.500 τόνους, από τους οποίους οι 73.000 τόνοι αντιστοιχούσαν σε τσιπούρα, οι 48.600 σε Ευρωπαϊκό λαβράκι και οι 17.500 σε μεσογειακό μύδι (FAO, 2014). Γενικά, το λαβράκι και η τσιπούρα αποτελούν το 95% περίπου της συνολικής παραγωγής στην Ελλάδα, ενώ τα υπόλοιπα είδη, λυθρίνι, φαγκρί, μυλοκόπι, μυτάκι και συκίος, παράγονται σε μικρότερες ποσότητες. Υπάρχει, επίσης, μια σημαντική παραγωγή οστρακοειδών και δίθυρων μαλάκιων, κυρίως μυδιών, με μικρότερη, όμως, οικονομική αξία (Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών, 2015). Όσον αφορά την υδατοκαλλιέργεια της ενδοχώρας, που καλύπτει ένα ποσοστό μικρότερο του 2% της συνολικής παραγωγής ψαριών, η ιριδίζουσα πέστροφα και το ευρωπαϊκό χέλι αποτελούν τα πιο σημαντικά είδη (FAO, 2014).

Για τους παραπάνω λόγους οι υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως μια βιομηχανία πρωτογενούς παραγωγής, που παράγει τρόφιμα υψηλής ποιότητας. Παράλληλα, χρειάζεται να εφαρμοστεί μια εθνική στρατηγική που να εξετάζει την αναντιστοιχία που υπάρχει μεταξύ της θέσης της χώρας στους ηγέτες της ευρωπαϊκής παραγωγής και τον περιορισμένο οικονομικό αντίκτυπο που φαίνεται να έχει η βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών μας (Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών, 2015).

3. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΩΝ ΙΧΘΥΩΝ ΣΤΙΣ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

3.1 Η σημασία της διατροφής στις υδατοκαλλιέργειες

Η θεαματική ανάπτυξη που παρατηρείται στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών τα τελευταία χρόνια παγκοσμίως αναμένεται να συνεχίσει την ανοδική της πορεία και τα επόμενα χρόνια και σε αυτό σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η διατροφή (Hasan, 2001). Η σωστή και ισορροπημένη σίτιση των οργανισμών στα συστήματα των ιχθυοκαλλιεργειών είναι απαραίτητη για την παραγωγή τελικών προϊόντων υψηλής ποιότητας. Καθώς το κόστος της διατροφής αποτελεί το μεγαλύτερο οικονομικό φορτίο στην υδατοκαλλιέργεια, η σίτιση των οργανισμών αποτελεί ιδιαίτερα κρίσιμο παράγοντα για τη βιωσιμότητα της ιχθυοκαλλιέργειας (Norman et al., 2019).

Για την τυποποίηση και παραγωγή τροφών υψηλής ποιότητας πρωταρχική σημασία έχει η επιλογή πρώτων υλών με κριτήρια την πεπτικότητά και τη βιοδιαθεσιμότητά τους σε σχέση με το κόστος τους. Η συνεχής διάθεση στην αγορά υψηλής ποιότητας πρώτων υλών, αλλά και η γνώση των διατροφικών αναγκών των ψαριών επιτρέπει τη δημιουργία συγκεκριμένων

σιτηρεσιών για κάποια είδη, όπως η τσιπούρα, η πέστροφα, το λαβράκι, ο σολομός και το χέλι, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη των εκτροφών (Webster & Lim, 2002).

Οι διατροφικές απαιτήσεις των ψαριών, όπως και όλων των υδρόβιων ζωικών οργανισμών, σε θρεπτικές ουσίες σχετίζονται με την επιβίωση, την ανάπτυξη, την αύξηση, την αναπαραγωγή, την υγεία και όλες τις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Αρκετοί παράγοντες επηρεάζουν τις απαιτήσεις αυτές, όπως η θερμοκρασία του νερού και η περιεκτικότητα του σε οξυγόνο (Hasan, 2001).

Η υδατοκαλλιέργεια, λοιπόν, για να καλύψει αυτές τις ανάγκες χρειάζεται να λαμβάνει υπόψη της μια σειρά ζητημάτων, δηλαδή (Smith et al., 2003):

- ✓ Τις θρεπτικές απαιτήσεις των εκτρεφόμενων ειδών και την ικανοποίησή τους μέσω της εκτροφής και της εφαρμοσμένης διατροφής.
- ✓ Τη διατροφή των ψαριών και των γεννητόρων των εκτρεφόμενων ειδών.
- ✓ Την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος των εκτρεφόμενων ειδών μέσω της διατροφής τους.
- ✓ Τη διατροφική αξία του τελικού προϊόντος και τη σημασία του στην διατροφή του ανθρώπου.
- ✓ Τη διαθεσιμότητα και την προσφορά των διαφόρων συστατικών των ιχθυοτροφών και τη χρησιμοποίησή τους στις ιχθυοτροφές.
- ✓ Τον αυξανόμενο ανταγωνισμό για τα συστατικά ιχθυοτροφών.
- ✓ Την εύρεση και αξιοποίηση εναλλακτικών πρωτεϊνικών πηγών και ελαίων για πιθανή υποκατάσταση ή και αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου και του ιχθυελαίου.

3.2 Διατροφικές ανάγκες των εκτρεφόμενων οργανισμών

Τα ψάρια για να αναπτυχθούν, να αναπαραχθούν και να πραγματοποιήσουν όλες τις φυσιολογικές τους λειτουργίες χρειάζεται να καταναλώσουν πρωτεΐνες (συγκεκριμένα απαραίτητα αμινοξέα), λιπίδια (πολυακόρεστα λιπαρά οξέα), υδατάνθρακες, βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία. Συγκεκριμένα, η φυσική διατροφή κάθε είδους χαρακτηρίζεται από υψηλό επίπεδο πρωτεϊνών, μέτριο επίπεδο λιπιδίων και χαμηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες. Στα εκτροφικά συστήματα που τα ψάρια διατηρούνται σε τεχνητά υδατοκαλλιεργητικά μέσα που απουσιάζει η φυσική τροφή, το σιτηρέσιο που τους χορηγείται θα πρέπει να είναι επαρκές σε όλα αυτά τα θρεπτικά συστατικά. Ιδιαίτερα τα μικρά ψάρια του ιχθυοτροφείου κατά την ανάπτυξή τους χρειάζεται να τρέφονται με σιτηρέσια που μπορεί να περιέχουν συστατικά ζωικής προέλευσης, όπως πρωτεΐνη πτεράλευρου, ιχνοστοιχεία, μακροστοιχεία, βιταμίνες, αντιοξειδωτικά, ενισχυτικά ανάπτυξης και ανοσοενισχυτικά (Hasan, 2001).

Οι διατροφικές ανάγκες μεταξύ των ειδών διαφέρουν αξιοσημείωτα και σε κάθε περίπτωση χρειάζεται να εξετάζεται η σωστή αναλογία πρωτεϊνών, λιπών, υδατανθράκων και άλλων θρεπτικών συστατικών που απαιτούνται από τα διάφορα είδη εκτρεφόμενων ιχθύων κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξής τους. Μεταβολή των ποσοτήτων των παρεχόμενων συστατικών μπορεί να προκαλέσει σημαντικές αλλαγές στη φυσιολογική και ανοσολογική κατάσταση των ιχθύων (Παυλίδης & Σαμαράς, 2019). Επίσης, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η σχέση μεταξύ των διαφόρων θρεπτικών στοιχείων και της υγείας των ψαριών, η αντοχή τους έναντι ασθενειών και διαφόρων στρεσογόνων καταστάσεων, καθώς, επίσης, και η

εμφάνιση, η γεύση, η υφή, η χημική σύνθεση και η θρεπτική αξία του τελικού προϊόντος (Hasan, 2001).

Τα ψάρια σε σχέση με τα άλλα εκτρεφόμενα ζώα εκμεταλλεύονται καλύτερα την τροφή, καθώς είναι ποικιλόθερμα ζώα και δεν καταναλώνουν ενέργεια για να διατηρήσουν τη θερμοκρασία του σώματός τους. Έτσι, παρατηρούνται σημαντικές θρεπτικές διαφορές μεταξύ των ψαριών και των άλλων ζωικών οργανισμών. Ειδικότερα, οι ενεργειακές απαιτήσεις στα ψάρια είναι μικρότερες από αυτές των χερσαίων ομοιόθερμων ζώων, με αποτέλεσμα τα ψάρια να παρουσιάζουν μεγαλύτερο συντελεστή απόδοσης ενέργειας προς την ποσότητα πρωτεΐνης που καταναλώνεται. Επιπλέον, χρειάζονται κάποια λιπαρά οξέα, όπως τα ωμέγα-3, τα οποία δεν είναι απαραίτητα στους χερσαίους ζωικούς οργανισμούς, ενώ η δυνατότητα τους να απορροφούν ιχνοστοιχεία από το περιβάλλον τους μειώνει τις θρεπτικές τους απαιτήσεις από την παρεχόμενη τροφή. Τέλος, τα ψάρια παρουσιάζουν περιορισμένες δυνατότητες στη σύνθεση της βιταμίνης C και έτσι εξαρτώνται άμεσα από την παρουσία της μέσα στην τροφή τους (Covey & Cho, 1993).

3.3 Ο ρόλος των ιχθυοτροφών

Μπορεί η υδατοκαλλιέργεια να συναντάται από τις αρχές της ανθρώπινης ιστορίας στις περιοχές της Ασίας, της Ευρώπης και στα νησιά του Ειρηνικού, ωστόσο μόνο τα τελευταία χρόνια άρχισε να συμβαδίζει στο θέμα της παρασκευής των ζωοτροφών και γενικότερα της διατροφής με την υπόλοιπη κτηνοτροφία. Η παραγωγή ιχθυοτροφών εμφανίζει ιδιαίτερες δυσκολίες σε σχέση με τις παραδοσιακές ζωοτροφές εξαιτίας τόσο του ότι η τροφή θα πρέπει να παραδοθεί και να καταναλωθεί σε υδάτινο μέσο όσο και του μικρού μεγέθους και της μεγάλης ποικιλίας που έχουν τα ζώα που καλλιεργούνται, απαιτώντας έτσι μεγάλη ακρίβεια (FAO Fisheries Department, 2001).

Συγκεκριμένα, η ραγδαία αύξηση της παραγωγής ιχθύων που προκύπτει από τις υδατοκαλλιέργειες, συνοδεύεται με την ταχεία ανάπτυξη της παρασκευής και παραγωγής των ιχθυοτροφών, προσπαθώντας να αντισταθμίσει την αυξανόμενη ζήτηση για τέτοιου είδους τροφές. Σε αυτό συντελεί και η μεγάλη ανάπτυξη στην τεχνολογία παρασκευής ιχθυοτροφών. Η συνεχής αυτή αύξηση των απαιτήσεων χρειάζεται τις ιχθυοτροφές σήμερα περισσότερο αποδοτικές και υγιείς τόσο για το ψάρι όσο και για τον άνθρωπο (Cheryl et al., 2019).

Σήμερα, οι βιομηχανικές ιχθυοτροφές παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας μεγάλη ποικιλία πρώτων υλών. Η κάθε πρώτη ύλη έχει τη δική της θρεπτική σύσταση και τις δικές της φυσικές ιδιότητες. Έτσι, η τελική επιλογή και χρήση ενός συστατικού στις ιχθυοτροφές εξαρτάται από τη θρεπτική σύσταση και την πεπτικότητά του, τη διαθεσιμότητα και την τιμή του στην αγορά, καθώς και τις ιδιότητές του για επιτυχή πελλετοποίηση και ασφαλή αποθήκευση (Cheryl et al., 2019).

Οι ιχθυοτροφές παρασκευάζονται με υψηλής τεχνολογίας μηχανήματα και παραγωγικές διαδικασίες και χορηγούνται στα ψάρια ως κόκκοι ή κυλινδρικοί συμπαγούς μορφής, που ονομάζονται «σύμπηκτα» ή «πελλέτες». Συγκεκριμένα, τα σύμπηκτα προορίζονται για τα μεγαλύτερα μεγέθη εκτρεφόμενων ψαριών και οι κόκκοι για τις μικρές ηλικίες. Οι τροφές αυτές συνήθως προκύπτουν από ξηρές πρώτες ύλες, αλλά μπορούν να δημιουργηθούν και από υγρές πρώτες ύλες έπειτα από ξήρανση του μίγματος. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά των ιχθυοτροφών, τα τεμαχίδιά τους πρέπει να έχουν τέτοια σκληρότητα που να είναι

αποδεκτή από το είδος του ψαριού για το οποίο προορίζονται και το σχήμα και το μέγεθος των κόκκων τους να προσαρμόζεται στο είδος και στο στάδιο ανάπτυξης του ψαριού. Επίσης, δεν θα πρέπει οι ιχθυοτροφές να περιέχουν σκόνη και να αποσυντίθενται γρήγορα στο νερό (Stradmeyer, 1989). Όσον αφορά το κόστος αγοράς τους είναι σχετικά υψηλό και οι μεγάλες ποσότητες που απαιτείται να χορηγηθούν ανεβάζουν το συνολικό κόστος παραγωγής της ιχθυοκαλλιεργητικής μονάδας (Cheryl et al., 2019).

Η παρασκευή ιχθυοτροφών είναι η παραγωγική διαδικασία που στοχεύει στην ικανοποίηση των θρεπτικών απαιτήσεων των εκτρεφόμενων ψαριών και στην επεξεργασία των πρώτων υλών που συμμετέχουν στο σιτηρέσιο, ώστε να είναι πιο εύπεπτες και ελκυστικές. Παράλληλα, έχει ως σκοπό να περιορίσει τη σπατάλη σε θρεπτικά συστατικά και να συμβάλλει στη βελτίωση της γεύσης, του χρώματος και της ποιότητας των ψαριών και των παραγόμενων προϊόντων. Τέλος, σημαντικοί στόχοι είναι η διατήρηση του υδάτινου περιβάλλοντος της εκτροφής καθαρού και ακέραιου και η διασφάλιση του χαμηλότερου δυνατού κόστους για τις ιχθυοτροφές (Munguti et al, 2021).

Η αυξανόμενη ζήτηση για τις ιχθυοτροφές αντικατοπτρίζεται και στους αριθμούς. Η παγκόσμια παραγωγή ιχθυοτροφών εκτιμάται ότι έχει ανέλθει στους 40 εκατομμύρια τόνους ετησίως, παρουσιάζοντας σχεδόν εξαπλάσια αύξηση από το 1995 που ήταν περίπου 7 εκατομμύρια τόνοι, αντιπροσωπεύοντας το 4% των ζωοτροφών που παράγονται. Η Κίνα αποτελεί την ηγέτιδα χώρα στο τομέα των ιχθυοτροφών παρασκευάζοντας περίπου 17 εκατομμύρια τόνους ετησίως, ενώ δεύτερη πιο παραγωγική χώρα είναι το Βιετνάμ με 2,8 εκατομμύρια τόνους. Οι περισσότερες ιχθυοτροφές προορίζονται για την εκτροφή του κυπρίνου, αλλά και τις εκτροφές ειδών γαρίδας και τιλάπιας. Σημαντικές ποσότητες διοχετεύονται για τα διάφορα είδη γατόψαρου, σολομού και πέστροφας, αλλά και για τα διάφορα είδη σπαρίδων και λαβρακιού (Naylor et al., 2021). Η Ελλάδα κατέχει μια αξιοσημείωτη θέση παγκοσμίως στην παραγωγή ιχθυοτροφών με την παραγωγή να υπολογίζεται ότι έχει ανέλθει σε περίπου 250.000 τόνους ετησίως.

Σε αυτό το πλαίσιο, ο κλάδος παρασκευής ιχθυοτροφών έρχεται αντιμέτωπος με πολλές προκλήσεις και θα πρέπει να παράγει (Norman et al., 2019):

- Περισσότερες ιχθυοτροφές, για να καλύψει την ολοένα αυξανόμενη ζήτηση.
- Ιχθυοτροφές με υψηλή διατροφική αξία, που να ικανοποιούν πλήρως τις θρεπτικές απαιτήσεις των εκτρεφόμενων οργανισμών και του ανθρώπου-καταναλωτή.
- Βιώσιμες ιχθυοτροφές, των οποίων η παρασκευή να μην εξαντλεί τα φυσικά ιχθυοαποθέματα.
- Περιβαλλοντικά φιλικές ιχθυοτροφές, που να μειώνουν στο ελάχιστο τις όποιες αρνητικές επιδράσεις στο υδάτινο περιβάλλον.
- Ασφαλείς ιχθυοτροφές, που να διασφαλίζουν την υγεία τόσο των εκτρεφόμενων οργανισμών όσο και του ίδιου του ανθρώπου ως τελικού καταναλωτή.

3.4 Διαδικασία παραγωγής ιχθυοτροφών

Η διαδικασία παραγωγής ιχθυοτροφών αποτελείται από μια σειρά βημάτων που περιλαμβάνουν (Munguti et al, 2021):

1. Την κατάρτιση του σιτηρεσίου και την άλεση των πρώτων υλών που συμμετέχουν.
2. Την ανάμιξη των πρώτων υλών (ιχθυάλευρο, ιχθυέλαιο, λεκιθίνη κλπ.) για την παραγωγή ομοιογενούς μείγματος.

3. Την υγροθερμική κατεργασία του τελικού μίγματος και την περαιτέρω μορφοποίησή του σε σύμπηκτα με κατάλληλο σχήμα.
4. Την ξήρανση, την ψύξη και τη συσκευασία του τελικού προϊόντος.

Αναλυτικότερα, στο πρώτο βήμα της κατάρτισης του σιτηρεσίου εκτιμάται ποιες πρώτες ύλες θα χρησιμοποιηθούν και υπολογίζονται τα ποσοστά συμμετοχής τους στο σιτηρέσιο. Ιδιαίτερη φροντίδα πρέπει να δίνεται στη φρεσκάδα των πρώτων υλών και στην πεπτικότητα και διαθεσιμότητα ορισμένων θρεπτικών στοιχείων. Η άλεση στοχεύει στη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων των πρώτων υλών, προσφέροντας ευκολότερη ανάμιξη των διαφόρων συστατικών, αερισμό της πρώτης ύλης και απομάκρυνση της υγρασίας, βελτίωση της πεπτικότητας και της αποδοχής των πρώτων υλών από τα ψάρια. Το επόμενο βήμα της ανάμιξης των συστατικών πραγματοποιείται σε 3 στάδια: στην ανάμιξη μικροσυστατικών, στην ανάμιξη προμίγματος με τα υπόλοιπα στερεά συστατικά και στην ανάμιξη υγρών συστατικών με τα στερεά συστατικά. Έπειτα, η πελλετοποίηση στοχεύει στη μετατροπή του ομοιογενούς μίγματος πρώτων υλών σε ανθεκτικούς κόκκους με φυσικά χαρακτηριστικά που τους καθιστούν κατάλληλους για σίτιση από τα ψάρια. Οι δύο τύποι πελλετοποίησης είναι της απλής συμπύκνωσης και της εξώθησης. Η πρώτη συνίσταται στη συμπίεση υπό ατμό του μίγματος ιχθυοτροφής δια μέσου οπών μεταλλικών πλακών προκειμένου να σχηματιστούν σύμπηκτα. Η δεύτερη περιλαμβάνει την υγροποίηση και προθέρμανση του μίγματος ιχθυοτροφής πριν από την είσοδο στον κύριο θάλαμο επεξεργασίας. Μέσω της απλής συμπύκνωσης παράγονται συνεκτικά pellets, τα οποία καθιζάνουν γρήγορα στο νερό, ενώ μέσω της εξώθησης παράγονται τεμάχια τροφής, τα οποία έχουν την ικανότητα να επιπλέουν στο νερό. Στη συνέχεια, τα σύμπηκτα, επειδή έχουν αυξημένη θερμοκρασία (περίπου 90-150 0^c) και υγρασία (20-30%), πρέπει άμεσα να ψυχθούν και να ξηραθούν. Ακολουθώντας, κοσκινίζονται για να γίνει διαλογή τους από τα θρύμματα, τα οποία είναι μικρά σωματίδια μίγματος που δεν πελλετοποιήθηκαν. Τελευταίο βήμα σε μια μονάδα παρασκευής αποτελεί η τοποθέτηση των συμπηκτων σε σάκους και η αποθήκευσή τους σε κατάλληλες συνθήκες (Wang et al., 2020).

Αφού ολοκληρωθούν τα βήματα της παραγωγής ιχθυοτροφών πραγματοποιείται ποιοτικός έλεγχος για τον υπολογισμό πιθανών απωλειών θρεπτικών ουσιών κατά τη διάρκεια της πελλετοποίησης και για την ανίχνευση τυχόν ανεπιθύμητων και απαγορευμένων ουσιών. Συγκεκριμένα, απαιτείται ο προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών, των ολικών λιπιδίων, της ανόργανης ουσίας, της υγρασίας και της ολικής ενέργειας, αν και σε πολλές περιπτώσεις πραγματοποιούνται περαιτέρω αναλύσεις, όπως η σύσταση αμινοξέων, λιπαρών οξέων, βιταμινών, ανόργανων στοιχείων, πεπτής ενέργειας, πεπτής πρωτεΐνης κ.α. (Wang et al., 2020).

3.5 Κατηγορίες ιχθυοτροφών

Οι ιχθυοτροφές κατηγοριοποιούνται ανάλογα με (Hastings, 2009; Hasan, 2001):

- ✓ το στοχευμένο εκτρεφόμενο είδος ιχθύος, δηλαδή ιχθυοτροφές τσιπούρας, λαυρακιού κ.λπ.
- ✓ το στάδιο ανάπτυξης του εκτρεφόμενου ιχθύος, όπως ιχθυοτροφές ιχθυδίων, αναπτυσσόμενων, ενήλικων ιχθύων κ.λπ.
- ✓ τη διατροφική συμπεριφορά του ιχθύος.

Όσον αφορά το στάδιο ανάπτυξης του ιχθύος διακρίνονται οι παρακάτω τέσσερις ομάδες (Hastings, 2009; Hasan, 2001):

➤ **Ιχθυοτροφές γεννητόρων**

Η αναπαραγωγική ωρίμανση στα ψάρια διαρκεί από εβδομάδες έως και μήνες ανάλογα με το είδος και η διατροφή των γεννητόρων κατά τη φάση αυτή έχει πολύ σημαντικό ρόλο, καθώς επηρεάζει άμεσα την ποιότητα των αναπαραγωγικών προϊόντων. Επομένως, οι ιχθυοτροφές που χορηγούνται στους γεννήτορες κατά το στάδιο αυτό χρειάζεται να έχουν ιδιαίτερα υψηλή ποιότητα και θρεπτική αξία. Συγκεκριμένα, πρέπει να περιέχουν ενισχυμένη περιεκτικότητα σε ορισμένα αμινοξέα, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, βιταμίνες, φωσφολιπίδια και ορισμένα ανόργανα στοιχεία.

➤ **Ιχθυοτροφές ιχθυονυμφών**

Πρόκειται για το στάδιο που οι ιχθυονύμφες έχουν εξαντλήσει τα θρεπτικά αποθέματα του λεκιθικού τους σάκου και έχουν ανάγκη για σίτιση με εξωγενείς τροφές για την επιβίωση και την ανάπτυξή τους. Βασικός, λοιπόν, παράγοντας στη διατροφή αυτής της ομάδας είναι η αποδοχή της εξωγενούς τροφής. Οι ιχθυονύμφες έχουν μεγαλύτερες απαιτήσεις σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, αμινοξέα, βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία συγκριτικά με τα μετέπειτα στάδια της ζωής τους. Μία δυσκολία που συναντάται κατά τη θρέψη των ιχθυονυμφών είναι ότι κολυμπούν και τρέφονται στην επιφάνεια, ενώ τα μικρού μεγέθους σύμπηκτα καταβυθίζονται γρήγορα, με συνέπεια την απώλειά τους στον πάτο της δεξαμενής, τη διαλυτοποίησή τους και, επιπλέον, την υποβάθμιση της ποιότητας του νερού εκτροφής.

➤ **Ιχθυοτροφές νεαρών ιχθυδίων**

Σε αυτήν την ομάδα οι ιχθυοτροφές έχουν μεγαλύτερο μέγεθος κόκκων και περιέχουν σχετικά υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών, κατάλληλα επίπεδα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, φωσφολιπιδίων, βιταμινών, ανόργανων στοιχείων, ελκυστικών ουσιών, καθώς και ικανοποιητικό επίπεδο πεπτικότητας των θρεπτικών τους ουσιών και της ενέργειας τους. Σε αυτό το στάδιο είναι δυνατόν να επιτευχθεί ο μεγαλύτερος ρυθμός σωματικής ανάπτυξης σε σχέση με τη χορηγούμενη ποσότητα τροφής και, επομένως, να αυξηθεί η μεταγενέστερη παραγωγή.

➤ **Ιχθυοτροφές κύριας αύξησης**

Οι ιχθυοτροφές αυτές καταρτίζονται με τέτοιο τρόπο, ώστε να αποδώσουν τον μέγιστο ρυθμό αύξησης με το ελάχιστο δυνατό κόστος, αφού κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου χορηγείται το μεγαλύτερο μέρος της απαιτούμενης ποσότητας ιχθυοτροφών. Ισχύει γενικά ότι όσο αυξάνονται τα ψάρια σε μέγεθος, τόσο μειώνεται ο ρυθμός αύξησής τους, άρα, πρέπει ολοένα και να μειώνεται το διαιτητικό επίπεδο της πρωτεΐνης και να αυξάνεται το επίπεδο της ολικής διαιτητικής ενέργειας. Επειδή η πρωτεΐνη αποδίδει περισσότερο σε σωματική αύξηση, πρέπει να παρέχεται στους εκτρεφόμενους ιχθύες το ελάχιστο αναγκαίο επίπεδο πρωτεϊνών, για την κάλυψη των αναγκών τους σε αμινοξέα και την άριστη σωματική τους αύξηση, ενώ οι ενεργειακές ανάγκες τους να ικανοποιούνται μέσω των άλλων θρεπτικών συστατικών και κυρίως μέσω των λιπιδίων.

3.6 Θρεπτικές ουσίες ιχθυοτροφών

Οι θρεπτικές ουσίες είναι αναγκαίες στη διατροφή των ψαριών. Οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και οι υδατάνθρακες είναι ουσίες που απαιτούνται σε σχετικά μεγάλες ποσότητες από τον οργανισμό (μακροστοιχεία του σιτηρεσίου), αποτελούν δομικές ουσίες για τον οργανισμό και η πέψη τους του παρέχει την απαραίτητη ενέργεια. Από την άλλη πλευρά, οι βιταμίνες και τα ανόργανα στοιχεία απαιτούνται σε μικροποσότητες (μικροστοιχεία) και έχουν δυναμικό ρόλο και όχι δομικό, δηλαδή καλούνται να επιτελέσουν πολύ σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού (Coweay & Cho, 1993).

3.6.1 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες αποτελούν την πιο σημαντική ομάδα θρεπτικών ουσιών στις ιχθυοτροφές και μάλιστα όσο υψηλότερα είναι τα επίπεδα τους στις ιχθυοτροφές, τόσο υψηλότερη αγοραστική τιμή παρουσιάζουν οι τελευταίες (Espe et al., 2016).

Οι ανάγκες σε πρωτεΐνες ποικίλλουν στα διάφορα είδη ψαριών και εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι το μέγεθος και η ηλικία των ψαριών (οι απαιτήσεις ελαττώνονται με την αύξηση της ηλικίας), οι διατροφικές συνήθειες του είδους, η θερμοκρασία και η αλατότητα του νερού, η διαθεσιμότητα της φυσικής τροφής μέσα στην εκτροφή, αλλά και η ποιότητα των πρωτεϊνών. Οι διαιτητικές αυτές ανάγκες είναι ποσοτικές και ποιοτικές, δηλαδή ανάγκες των ψαριών για συγκεκριμένα επίπεδα πρωτεΐνης και ανάγκες για συγκεκριμένα αμινοξέα, αντίστοιχα (Wilson, 1986).

Η ιδανική ποσότητα πρωτεΐνης στη διατροφή των ιχθύων κυμαίνεται από 28% έως 50% επί της συνολικής ουσίας της τροφής. Στην περίπτωση των νεαρών ατόμων, που το σωματικό τους βάρος είναι περίπου 0,5-5 g, το ιδανικό ποσοστό πρωτεΐνης που αποδίδει τη βέλτιστη ανάπτυξη υπολογίζεται στο 29-40 % (El-Sayed, 1999).

Η σημασία των πρωτεϊνών στη διατροφή των ψαριών έγκειται και στο ότι οι οργανισμοί αυτοί δεν μπορούν να συνθέσουν όλα τα αμινοξέα, αλλά χρειάζεται να τα προσλάβουν από την τροφή. Τα δέκα απαραίτητα αμινοξέα για τα ψάρια είναι η αργινίνη, η ιστιδίνη, η ισολευκίνη, η λευκίνη, η λυσίνη, η μεθειονίνη, η θρεονίνη, η τρυπτοφάνη, η φαινυλαλανίνη και η βαλίνη. Έτσι, η ποιότητα των απαραίτητων αμινοξέων και η βιολογική σημασία της πρωτεΐνης καθορίζουν την ποιότητα της (Coweay, 1994).

Η κατασκευή και η αναγέννηση των πρωτεϊνών των ιστών του ψαριού, η ανάπτυξη του, αλλά και παροχές ενέργειας είναι μερικοί από τους ρόλους των πρωτεϊνών. Αν η τροφή έχει μειωμένη ποσότητα πρωτεΐνης, τότε ο οργανισμός θα οδηγηθεί σε ελάττωση του σωματικού βάρους, αναστολή της αύξησης και διαταραχή της ομοιόστασης της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού. Σε αντίθετη περίπτωση, ένα μέρος της ποσότητας θα χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών, ενώ η επιπλέον ποσότητα θα μετατραπεί σε ενέργεια (Espe et al., 2016).

Στις ιχθυοκαλλιέργειες οι κυριότερες πηγές πρωτεϊνών είναι το ιχθυάλευρο, το κρεατάλευρο και το σογιάλευρο. Ωστόσο, η πεπτικότητα των αλεύρων που έχουν ζωική προέλευση είναι γενικά καλύτερη από εκείνη των φυτικών αλεύρων, εξαιτίας της απουσίας κάποιων ενζύμων στα ψάρια (El-Sayed, 1999).

3.6.2 Λιπίδια και λιπαρά οξέα

Τα ψάρια έχουν τη δυνατότητα να αφομοιώνουν πολύ εύκολα τα λιπίδια και η πεπτικότητα επηρεάζεται από αρκετούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της περιεκτικότητας στην τροφή, της θερμοκρασίας του νερού, του σημείου κορεσμού, της τιμής κορεσμού των λιπαρών οξέων και της προέλευσής τους (Tocher, 2015).

Τα λιπίδια προσφέρουν στα ψάρια ενέργεια, αποτελούν δομικά στοιχεία των μεμβρανών και φορείς των λιποδιαλυτών βιταμινών, είναι πρόδρομα των εικοσανοειδών, των ορμονών και της βιταμίνης D και ενζυμικοί συμπαράγοντες. Επίσης, αποτελούν καλή πηγή απαραίτητων λιπαρών οξέων στοχεύοντας μεταξύ άλλων στη διατήρηση της καλής υγείας, στη βέλτιστη ανάπτυξη του σώματος και στην αναπαραγωγή. Συγκεκριμένα, τα απαραίτητα λιπαρά οξέα έχουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, του εγκεφάλου, του δέρματος και στην οπτική οξύτητα. Τα λιπαρά οξέα που χορηγούνται μέσω της τροφής στα εκτρεφόμενα ψάρια περιλαμβάνουν τα πολυακόρεστα ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα και αποτελούν δομικές ομάδες των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. Επίσης, φαίνεται να βοηθούν το ανοσοποιητικό σύστημα και μειώνουν την αντίδραση στο στρες (Guillaume et al., 2001).

Οι διαιτητικές ανάγκες των ψαριών σε λιπίδια και λιπαρά οξέα (ΛΟ) διακρίνονται σε ποιοτικές και ποσοτικές ανάγκες, δηλαδή ανάγκες σε συγκεκριμένα λιπαρά οξέα και ανάγκες σε συγκεκριμένες ποσότητες, αντίστοιχα. Τα διάφορα είδη ψαριών έχουν διαφορετικές ποιοτικές και ποσοτικές απαιτήσεις σε ω-3 και ω-6 ΠΛΟ (Tocher, 2015).

Στις ιχθυοκαλλιέργειες οι πιο σημαντικές πηγές λιπιδίων είναι τα διάφορα ιχθυέλαια (από ρέγκα, σαρδέλα, μπακαλιάρο κ.λπ.), τα διάφορα φυτικά έλαια (ηλιέλαιο, σογιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, φοινικέλαιο κ.λπ.), αλλά και όλα τα άλευρα που συμπεριλαμβάνονται ως πηγές πρωτεΐνης στις ιχθυοτροφές. Στα διάφορα συστατικά και έλαια των ιχθυοτροφών υπάρχουν διαφορές στη σύσταση των λιπαρών οξέων. Έτσι, τα ιχθυέλαια είναι πλούσια σε ω-3 ΠΛΟ, ενώ τα φυτικά έλαια είναι φτωχά σε ω-3, αλλά πλούσια σε ω-6 ΠΛΟ (Caballero et al., 2002).

3.6.3 Υδατάνθρακες

Στις ιχθυοτροφές οι υδατάνθρακες αποτελούν το συστατικό με το μικρότερο κόστος και την πιο άφθονη πηγή ενέργειας. Όμως η πεπτικότητά τους είναι πολύ μικρή, δηλαδή δεν ξεπερνά το 25%, κυρίως αν περιέχουν άμυλο (Guillaume et al., 2001).

Στη διατροφή των ψαριών, οι υδατάνθρακες που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι οι δομικοί πολυσακχαρίτες, όπως η κυτταρίνη, το άγαρ και η χιτίνη, οι οποίοι μπορούν να καταναλωθούν, αλλά να αφομοιωθούν μόνο από φυτοφάγα είδη. Επίσης, χρησιμοποιούνται και άλλοι πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο, που πέπτονται και αφομοιώνονται από όλους τους οργανισμούς (Webster & Lim, 2002).

Τα ψάρια χρησιμοποιούν την ενέργεια που προσλαμβάνουν από την τροφή τους για να καλύψουν τις ανάγκες τους για την επιβίωση, την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή τους. Ωστόσο, πρέπει να δίνεται προσοχή στο επίπεδο των υδατανθράκων στην ιχθυοτροφή των ψαριών, καθώς μία υπερβολική προσφορά ενέργειας μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη εναπόθεση λίπους στο σώμα των ψαριών και παράλληλα να μειώσει την κατανάλωση της τροφής, με συνέπεια τη μείωση της συνολικής πρόσληψης (Webster & Lim, 2002).

3.6.4 Βιταμίνες

Οι ζωικοί οργανισμοί δε συνθέτουν ή συνθέτουν ανεπαρκώς βιταμίνες, με αποτέλεσμα να υπάρχει ανάγκη χορήγησής τους μέσω της τροφής. Η διατροφή των ψαριών περιέχει μικρές ποσότητες βιταμινών. Ωστόσο, η περιεκτικότητά τους στις ιχθυοτροφές επηρεάζεται από την προέλευση των ψαριών, τη μέθοδο επεξεργασίας και τη φρεσκότητα των ιχθύων που επεξεργάστηκαν (Trichet et al., 2015).

Η σημασία τους στη διατροφή αφορά τη διατήρηση της ζωής, την υγεία, την αύξηση, την αναπαραγωγή και τον μεταβολισμό των ψαριών. Επιπλέον, οι βιταμίνες επιτελούν ρόλο συνενζύμων, προστατεύουν τις κυτταρικές μεμβράνες, είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά πρωτονίων και ηλεκτρονίων και έχουν ορμονική δράση (Cowe & Cho, 1993). Έτσι, έλλειψη των βιταμινών μπορεί να οδηγήσει σε ανορεξία των ψαριών, βραδεία ανάπτυξη και κακή μετατρεψιμότητα. Ιδιαίτερα ανεπάρκεια της βιταμίνης C, που είναι σημαντική κυρίως στο στάδιο του γόνου και στη νεαρή ηλικία, προκαλεί προβλήματα στο βραγχιακό επικάλυμμα και στη σπονδυλική στήλη των ψαριών, αυξάνει τη θνησιμότητα και μειώνει την αναπαραγωγική ικανότητα (Trichet et al., 2015).

3.6.5 Ανόργανα στοιχεία

Τα ανόργανα στοιχεία διακρίνονται στα ιχνοστοιχεία, που απαιτούνται σε μικροποσότητες και στα μακροστοιχεία, που απαιτούνται σε σχετικά μεγαλύτερες ποσότητες από τους οργανισμούς (Lall & Sadasivam, 2021).

Ο οργανισμός χρειάζεται περίπου είκοσι στοιχεία για τη δομική και μεταβολική του λειτουργία και η διαφορά τους από τα υπόλοιπα θρεπτικά στοιχεία είναι πως ούτε παράγονται ούτε καταναλώνονται από τον οργανισμό. Ωστόσο, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στον μεταβολισμό και τον σχηματισμό του σκελετού και των οστών (Lall & Sadasivam, 2021).

Στις ιχθυοτροφές τα ανόργανα στοιχεία προστίθενται ως τυποποιημένα προμίγματα, σε ποσοστό 0,5-3%, ώστε να αποφευχθούν ελλείψεις στη διατροφή των ψαριών. Συγκεκριμένα για το φώσφορο και το ασβέστιο, επειδή είναι περιορισμένα στη θάλασσα, συχνά προστίθενται στις ιχθυοτροφές σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με τα άλλα στοιχεία με τη μορφή φωσφορικού ή διφωσφορικού διασβεστίου (Lall & Sadasivam, 2021).

3.7 Μη θρεπτικές ουσίες ιχθυοτροφών

Τις μη θρεπτικές ουσίες των ιχθυοτροφών αποτελούν τα πρόσθετα που συμπεριλαμβάνονται σε αυτές και είναι ενώσεις με ελάχιστη ή και καθόλου θρεπτική αξία. Ωστόσο, παρουσιάζουν μεγάλη σημασία, καθώς αυξάνουν τη σταθερότητα των σύμπηκτων, την ασφάλεια αποθήκευσής τους, τη γεύση της τροφής και την απόδοση των ψαριών. Στις μη θρεπτικές ουσίες ανήκουν το νερό (υγρασία), οι συγκολλητικές ουσίες, τα καροτενοειδή, οι αντιοξειδωτικές ουσίες, τα φάρμακα και τα αντιβιοτικά, τα προβιοτικά, οι ορμόνες, οι αντιμικροβιακοί παράγοντες και οι αρωματικές ουσίες (Cheryl et al., 2019).

Το **νερό** προστίθεται κατά τη διαδικασία παρασκευής της ιχθυοτροφής στο στάδιο της ανάμιξης των πρώτων υλών. Ανάλογα με το βαθμό της υγρασίας, οι ιχθυοτροφές διακρίνονται σε ξηρές, ημίξηρες και υγρές. Ο τύπος που χρησιμοποιείται πιο συχνά στις

ιχθυοκαλλιέργειες είναι οι ξηρές ιχθυοτροφές (σύμπηκτα), ενώ οι ημίξηρες ιχθυοτροφές χρησιμοποιούνται για την πάχυνση των ιχθυδίων σε κάποια είδη (Krogdahl & Bakke, 2015).

Οι **συγκολλητικές ουσίες** προσφέρουν συνεκτικότητα στα σύμπηκτα, ώστε να έχουν μεγάλη αντοχή στη μεταχείριση και στη διαλυτοποίηση στο νερό.

Οι ομάδες των **καροτενοειδών** που χρησιμοποιούνται σε κάποιες ιχθυοτροφές είναι: ασταξανθίνη και η κασταξανθίνη, οι ξανθοφύλλες, η β-καροτίνη, η λουτένη και η ζεαξανθίνη. Τα καροτενοειδή βρίσκονται στη διατροφή των ψαριών από τη φύση τους, καθώς συνθέτονται από φύκια και βιοσυγκεντρώνονται στην τροφική αλυσίδα, καταλήγοντας τελικά στα ψάρια. Ωστόσο, τα ψάρια δε μπορούν να συνθέσουν από μόνα τους τα καροτενοειδή γι' αυτό πρέπει να τα λαμβάνουν από την τροφή τους με την προσθήκη συστατικών που περιέχουν τις επιθυμητές καροτενοειδείς χρωστικές. Έτσι, τα καροτενοειδή απομονώνονται από τα συστατικά που τις περιέχουν και στη συνέχεια προστίθενται στις ιχθυοτροφές ως ζελατινοποιημένα μαζί με τα έλαια. Οι χρωστικές αυτές είναι υπεύθυνες για τον χρωματισμό της σάρκας, του δέρματος και των αυγών των ιχθύων. Επίσης, συμβάλλουν στην αναπαραγωγή κάποιων ειδών ψαριών και παράλληλα έχουν αντικαρκινική και αντιοξειδωτική δράση (Krogdahl & Bakke, 2015).

Οι **αντιοξειδωτικές ουσίες** προστίθενται στις ιχθυοτροφές, γιατί συντελούν στην προστασία της οξειδωσης των λιπιδίων και των καροτινοειδών που περιέχουν.

Οι ιχθυοτροφές μπορεί να περιέχουν διάφορα **φάρμακα και αντιβιοτικά** με σκοπό τη θεραπεία, τη μείωση ή την πρόληψη ασθενειών. Στην Ελλάδα εγκρίνεται η χρήση της σουλφαμεθαζίνης, της τριμεθοπρίνης, της τετρακυκλίνης, του οξαλικού οξέος και της φλουμεκίνης στις ιχθυοτροφές. Τα ανοσοδιεγερτικά χρησιμοποιούνται, επίσης, ως πρόσθετα των ιχθυοτροφών, για την ενίσχυση της υγείας και της ευεξίας των ζωικών οργανισμών και για να καταστήσουν τα ψάρια λιγότερο ευαίσθητα σε λοιμώδεις νόσους (Encarnação, 2016).

Τα **προβιοτικά** χορηγούνται στα ψάρια ως συμπλήρωμα διατροφής και μπορεί να αποτελούνται από ένα μοναδικό είδος μικροοργανισμών ή από ένα μίγμα ειδών. Το είδος των μικροοργανισμών που υπάρχει στο συμπλήρωμα αποικίζει τα έντερα και ανταγωνίζεται τα παθογόνα είδη των μικροοργανισμών. Έτσι, παρέχει προφύλαξη, αποφυγή σπατάλης μεταβολικής ενέργειας και θεραπεία. Από την άλλη, τα **πρεβιοτικά** είναι ουσίες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και την ενεργότητα των ωφέλιμων βακτηρίων του πεπτικού σωλήνα για την καλύτερη υγεία των ψαριών (Cheryl et al., 2019).

Οι **ορμόνες** διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: εκείνες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του ψαριού και την αποτελεσματικότητα των ιχθυοτροφών, εκείνες που επηρεάζουν την αναπαραγωγή και εκείνες που επηρεάζουν την οσμωρύθμιση. Ωστόσο, η χρήση ορμονών επιτρέπεται σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις, καθώς υπάρχει προβληματισμός για το αν τα υπολείμματα των ορμονών παραμένουν στα εκτρεφόμενα ζώα και μεταφέρονται στον καταναλωτή (Krogdahl & Bakke, 2015).

Οι **αντιμικροβιακοί παράγοντες** χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία ιχθυοτροφών για την αναστολή της ανάπτυξης μυκήτων ή μικροβίων, καθώς στις ιχθυοτροφές με πάνω από 12% υγρασία μπορούν να αναπτυχθούν βακτήρια, μούχλα και ζύμες. Περισσότερες από 20 ενώσεις χρησιμοποιούνται ως αντιμικροβιακά με πιο διαδεδομένα τα άλατα βενζοϊκού οξέος και τα προπιονικά άλατα (Cheryl et al., 2019).

3.8 Πρώτες ύλες ιχθυοτροφών

Ο κανόνας πως μια ιχθυοτροφή μπορεί να είναι τόσο καλή, όσο καλή είναι η ποιότητα των πρώτων υλών που χρησιμοποιήθηκαν ισχύει πάντα. Έτσι, η διαθεσιμότητα των πρώτων υλών καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την επιτυχή σύνθεση των ιχθυοτροφών, την ανάπτυξη και υγεία των ψαριών και κατ' επέκταση την πρόοδο του κλάδου των ιχθυοκαλλιεργειών, αλλά και την ελαχιστοποίηση των αρνητικών επιδράσεων στο υδάτινο περιβάλλον (Hasan, 2001).

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την εκλογή των υλικών που χρησιμοποιούνται στην τροφή είναι η καταλληλότητα για τα είδη που καλλιεργούνται, ως προς τον τύπο και την ποιότητα, η ποσότητα που διατίθεται τοπικά και η συχνότητα προμήθειας, καθώς και το κόστος αγοράς. Αναλυτικότερα, τον πιο σημαντικό ρόλο έχουν η διατροφική αξία και η τιμή σε σύγκριση με άλλα συστατικά. Οι απαιτήσεις του ζώου και το διατροφικό προφίλ του συστατικού καθορίζουν τη θρεπτική αξία, ενώ οι συνθήκες της αγοράς και οι τιμές των βασικών εμπορευμάτων καθορίζουν την τιμή παράδοσης στο εργοστάσιο ζωοτροφών. Η κύρια διαφορά μεταξύ της διατροφής που προορίζεται για τη γεωργία και της διατροφής για την υδατοκαλλιέργεια είναι η ποσότητα της πρωτεΐνης. Η τελευταία έχει υψηλότερες απαιτήσεις, εξαιτίας και της κακής χρήσης υδατανθράκων από τα περισσότερα υδρόβια ζώα, με αποτέλεσμα να περιορίζεται ο αριθμός των κατάλληλων τροφών που μπορούν να χορηγηθούν (Jackson, 2010).

Οι ιχθυοτροφές ως βασικά συστατικά έχουν κυρίως (FAO, 2011) :

- ✓ Πηγές πρωτεΐνης, όπως το ιχθυάλευρο, το σογιάλευρο και διάφορα γεύματα με ελαιόσπορους
- ✓ Πηγές ενέργειας και υδατανθράκων, όπως δημητριακά και υποπροϊόντα τους
- ✓ Λιπίδια και έλαια, όπως το ιχθυέλαιο και τα φυτικά έλαια.

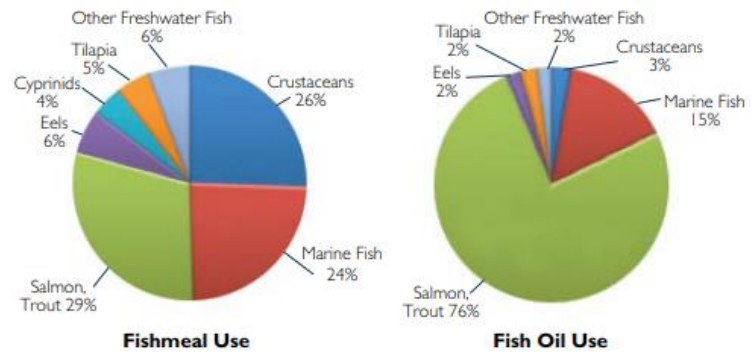
Συγκεκριμένα, οι ιχθυοτροφές που προορίζονται για τα ψάρια του γλυκού νερού έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε φυτικές πρωτεΐνες και πηγές ενέργειας, ενώ αυτές για τα ψάρια που ζουν στα κρύα νερά της θάλασσας περιέχουν κυρίως ιχθυάλευρα και άλλα υποπροϊόντα αλιείας. Αυτό μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με τα συστατικά που είναι διαθέσιμα σε κάθε περιοχή και με το κόστος προμήθειας (FAO Fisheries Department, 2001).

Επιπλέον, οι ίδιες πρώτες ύλες χρησιμοποιούνται για να τραφούν τόσο ψάρια χαμηλότερης «αγοραστικής» αξίας, όπως οι κυπρίνοι, το γατόψαρο, η τιλάπια, όσο και ψάρια με υψηλότερη αξία, όπως οι σολομοί, οι θαλάσσιες γαρίδες και τα χέλια του γλυκού νερού (FAO, 2011).

4. ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΑ ΚΑΙ ΙΧΘΥΕΛΑΙΑ

Η υδατοκαλλιέργεια σε όλη την ιστορία της χρησιμοποιεί ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια για την τροφή τόσο σαρκοφάγων και παμφάγων ψαριών, όσο και φυτοφάγων ψαριών, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια της ανάπτυξής τους όταν χρειάζονται υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης. Ο λόγος που είναι τόσο δημοφιλής στην υδατοκαλλιέργεια είναι τα μοναδικά θρεπτικά συστατικά τους, στα οποία στην περίπτωση των ιχθυάλευρων συγκαταλέγονται το υψηλό επίπεδο πρωτεΐνης (68-72%), το ιδανικό αμινοξικό προφίλ (90%), η υψηλή πεπτικότητα, η έλλειψη αντιθρεπτικών παραγόντων, η υψηλή γευστικότητα και η μεγάλη διαθεσιμότητα και στην περίπτωση των ιχθυέλαιων η υψηλή γευστικότητα και τα απαραίτητα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα.

Έτσι, τα δύο αυτά θαλάσσια προϊόντα έχει αποδειχθεί ότι παράγουν από τη μία τις πιο οικονομικές και αποδοτικές ιχθυοτροφές και από την άλλη υγιή ζώα (Εικ. 9), που με τη σειρά τους παράγουν υγιεινά θαλασσινά (Jackson, 2009; IFFO, 2020).



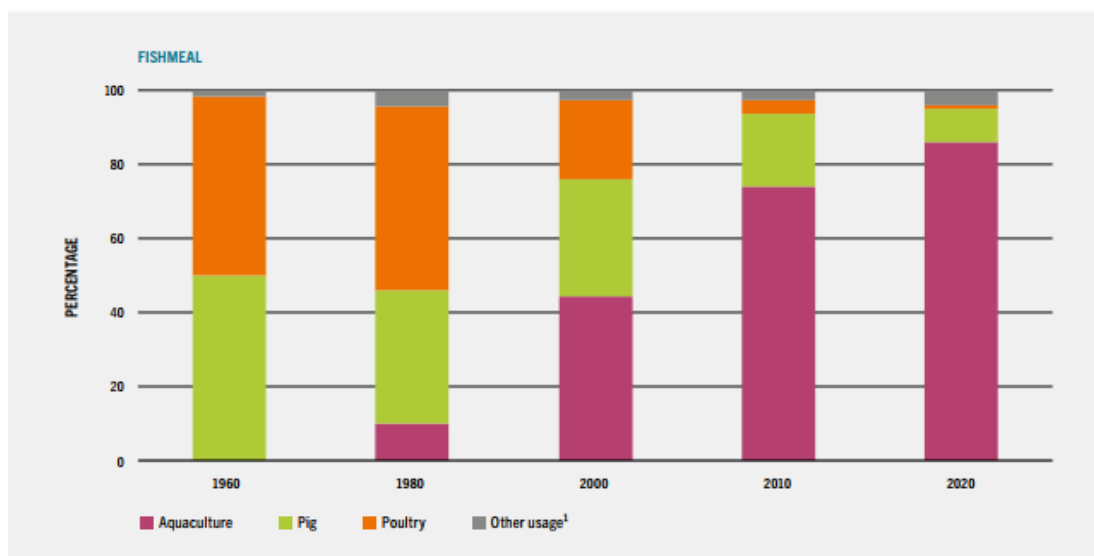
Εικόνα 9: Χρησιμοποίηση ιχθυάλευρου και ιχθυελαίου στην υδατοκαλλιέργεια (Jackson, 2010)

Η σίτιση με ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια έχει ποικίλα πλεονεκτήματα για την υγεία, την καλή διαβίωση και την παραγωγικότητα των ψαριών. Συγκεκριμένα, συμβάλλει στην καλύτερη ανοσία και μεγαλύτερη αντοχή στις ασθένειες και παράλληλα μειώνει τη σοβαρότητα των φλεγμονωδών ασθενειών, καθώς το EPA και το DHA είναι αντιφλεγμονώδη. Επίσης, παρέχει ένα ευρύ φάσμα βασικών θρεπτικών συστατικών, πολλά από τα οποία δεν παρέχονται επαρκώς από τα φυτικά υλικά, βελτιώνοντας έτσι τη διατροφική κατάσταση του οργανισμού και βοηθάει στην παραγωγικότητα μέσω της καλύτερης ανάπτυξης (IFFO, 2020).

Το κρίσιμο σημείο στη βιομηχανία ιχθυάλευρων και ιχθυελαίου είναι πως η πιο συνηθισμένη πρώτη ύλη τους είναι τα πελαγίσια ψάρια, δηλαδή ρέγκες, γαύροι και σαρδέλες. Τα ψάρια αυτά είναι από τη φύση τους βραχύβια και ταχέως αναπτυσσόμενα, σχηματίζουν τεράστιους πληθυσμούς και πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα και σε μεγάλους αριθμούς, με αποτέλεσμα να προσφέρονται ως συστατικά ιχθυοτροφών (Jackson, 2010). Η Νότια Αμερική προμηθεύει το μεγαλύτερο μέρος (37% ή 21,5 εκατομμύρια τόνοι) των πελαγίστων ψαριών που προορίζονται για την παραγωγή των ιχθυάλευρων και των ιχθυελαίων, ενώ ακολουθεί η Άπω Ανατολή με 27% και η Νοτιοανατολική Ασία με 12%. Όσον αφορά την Ευρώπη, η Ισλανδία, η Δανία και η Νορβηγία αποτελούν κύριους προμηθευτές σε ποσοστό περίπου 5% η κάθε μία (Huntington, 2004).

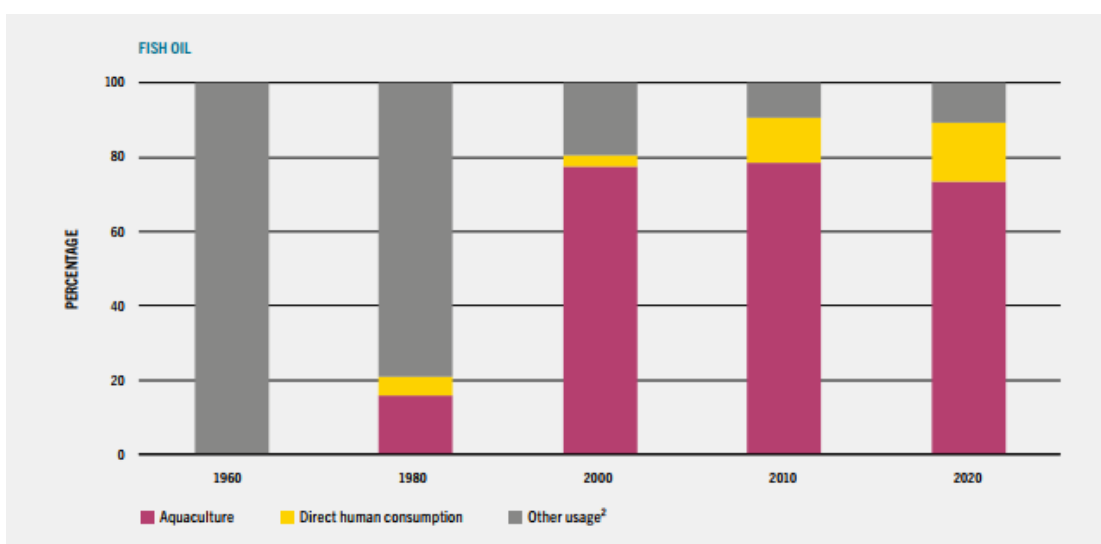
Από τους 90 εκατομμύρια τόνους ψαριών που παρέχει η παγκόσμια αλιεία ετησίως (εξαιρουμένης της υδατοκαλλιέργειας), οι 30 εκατομμύρια τόνοι περίπου αντιπροσωπεύουν ψάρια που προορίζονται για μη άμεση χρήση ως τρόφιμα. Από αυτούς τους 30 εκατομμύρια τόνους, τα 16,5 εκατομμύρια προορίζονται για ιχθυάλευρα και ιχθυέλαιο παραγωγής, ενώ το υπόλοιπο προορίζεται για μια σειρά χρήσεων, συμπεριλαμβανομένης της άμεσης σίτισης ως νωπό ψάρι στα ζώα, ιδιαίτερα σε ψάρια και καρκινοειδή στην Ασία, καθώς και σε τροφές για ζώα συντροφιάς και σε ζώα που παράγουν γούνα. Η κύρια χρήση των ιχθυάλευρων και του ιχθυελαίου που προέρχονται από αυτούς τους τόνους ψαριών είναι ως συστατικά ζωοτροφών για την εκτροφή υδρόβιων ζώων στην υδατοκαλλιέργεια (Jackson & Shepherd, 2010). Γενικά, το μοντέλο δείχνει ότι συνολικά σχεδόν 20 εκατομμύρια τόνοι πρώτης ύλης χρησιμοποιούνται ετησίως για την παραγωγή ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίου, εκ των οποίων περίπου οι 14 εκατομμύρια τόνοι προέρχονται από ολόκληρα ψάρια, σχεδόν τα μισά από τα οποία βρίσκονται στη Νότια Αμερική. Περίπου 3,7 εκατομμύρια τόνοι υποπροϊόντος προέρχονται από την επεξεργασία άγριων ψαριών, με την Ευρώπη να παράγει περίπου 1,2 εκατομμύρια τόνους από αυτό το σύνολο. Οι 1,9 εκατομμύρια τόνοι προέρχονται από την υδατοκαλλιέργεια, εκ των οποίων 0,8 εκατομμύρια είναι κυρίως στην Ασία, το Βιετνάμ και την Ταϊλάνδη. Αυτή η πρώτη ύλη χρησιμοποιείται στη συνέχεια για την παραγωγή περίπου 4,6 εκατομμυρίων τόνων ιχθυάλευρων (IFFO, 2016).

Όσον αφορά την κατανάλωση των ιχθυάλευρων και του ιχθυελαίου υπολογίζεται πως η υδατοκαλλιέργεια χρησιμοποιεί το μεγαλύτερο μέρος τους, αφού το 2007 κατανάλωσε το 68,4% των ιχθυαλεύρων που παρήχθησαν παγκοσμίως και 81,3% του ιχθυελαίου (Jackson, 2010). Καθώς η υδατοκαλλιέργεια αναπτύσσεται, χρησιμοποιεί όλο και περισσότερο ιχθυάλευρα, λαμβάνοντας όγκους, οι οποίοι στο παρελθόν ως επί των πλείστων προορίζονταν για τροφές χοίρων και πουλερικών (Jackson, 2012). Έτσι, το 2020 περίπου το 86% των ιχθυάλευρων χρησιμοποιήθηκαν στην υδατοκαλλιέργεια (Εικ. 10), ενώ το 9% στη χοιροτροφία, το 4% κυρίως τροφές για κατοικίδια και το 1% για πουλερικά.



Εικόνα 10: Τομείς χρησιμοποίησης ιχθυάλευρου (FAO, 2022)

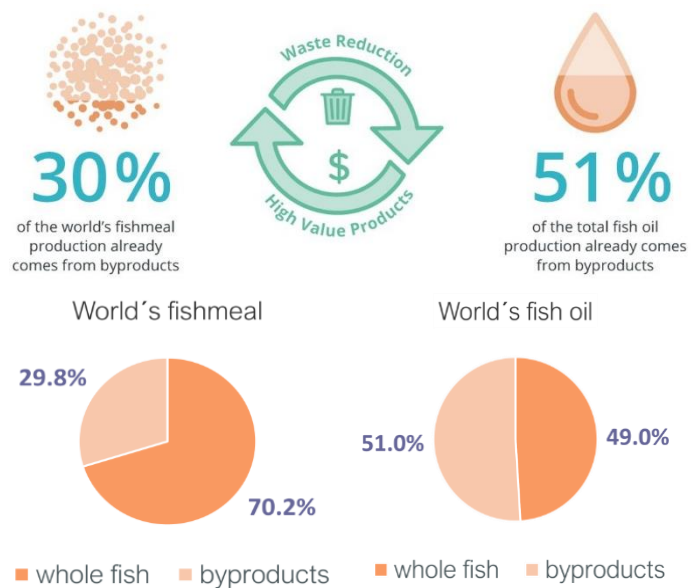
Στο ίδιο έτος, περίπου το 73% του ιχθυελαίου προοριζόταν για υδατοκαλλιέργεια (Εικ. 11), 16% για ανθρώπινη κατανάλωση και 11% για άλλες χρήσεις, συμπεριλαμβανομένων και για βιοκαύσιμα (FAO, 2022).



Εικόνα 11: Τομείς χρησιμοποίησης ιχθυελαίου (FAO, 2022)

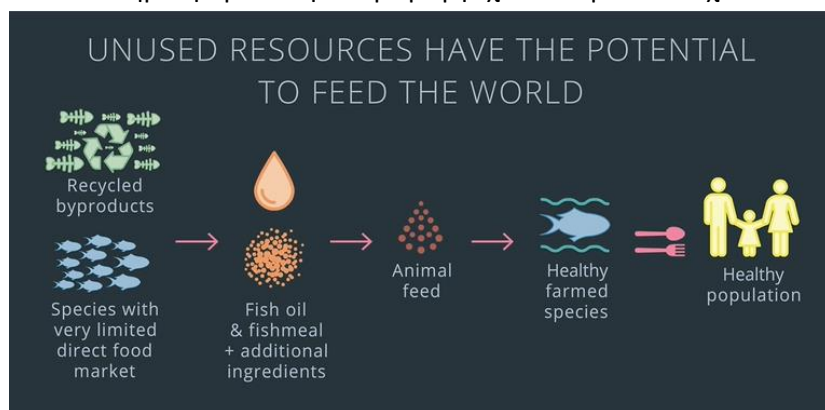
4.1 Χρήση υποπροϊόντων για παραγωγή ιχθυάλευρων και ιχθυελαίου

Η αυξανόμενη χρήση υποπροϊόντων αποτελεί μια ουσιαστική πρόσθετη πηγή πρώτης ύλης για την παραγωγή ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίου υποστηρίζοντας τον αυξημένο όγκο ιχθυοτροφών που απαιτείται για την ταχέως αναπτυσσόμενη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας. Ο όρος υποπροϊόντα περιλαμβάνει ό,τι προέρχεται από την επεξεργασία των ψαριών που προορίζονται για άμεση ανθρώπινη κατανάλωση, για παράδειγμα κεφάλια, σκελετοί, δέρμα και ουρές ψαριών και μπορεί να αποτελεί έως και το 70% των ψαριών και των οστρακοειδών μετά την επεξεργασία. Η κύρια πηγή του υποπροϊόντος είναι από πτερύγια από μπακαλιάρο, σολομό, τόνο, ρέγκα, σκουμπρί και μπορεί να προέρχεται από άγρια ψάρια ή από την επεξεργασία υδατοκαλλιέργειας (IFFO, 2020). Σύμφωνα με την IFFO, το 2021 (Εικ. 12 & 13) το 30 % της παγκόσμιας παραγωγής ιχθυαλεύρων και το 51% της συνολικής παραγωγής ιχθυελαίου προέρχονταν από υποπροϊόντα (IFFO, 2022; Bachis, 2022). Οι μεγαλύτεροι παραγωγοί υποπροϊόντων που προορίζονται για ιχθυάλευρα είναι η Ασία και η Ευρώπη. Παρόμοιο μοτίβο παρατηρείται και στην παραγωγή ιχθυελαίου, αν και η Ευρώπη είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός σε αυτόν τον τομέα, καθώς η Ασία επεξεργάζεται μεγάλο όγκο απορριμμάτων γαρίδας εκτροφής που δεν παράγει λάδι (IFFO, 2016).



Εικόνα 12 & 13: Ποσοστά χρησιμοποίησης υποπροϊόντων στην παραγωγή ιχθυάλευρων και ιχθυελαίου (Bachis, 2022)

Η αλιεία που προμηθεύει ολόκληρα ψάρια στην παραγωγή ιχθυάλευρων και ιχθυελαίου αφορά συνολικά είδη ψαριών για τα οποία η αγορά είναι ασθενής ή σε ορισμένες περιπτώσεις ανύπαρκτη. Έτσι, η διαχειριζόμενη συγκομιδή αυτών των αποθεμάτων για την παροχή ιχθυάλευρων και ιχθυελαίου (Εικ. 14) χρησιμοποιεί έναν



Εικόνα 14: Συνεισφορά των υποπροϊόντων στην παγκόσμια διατροφική κάλυψη (IFFO, 2020)

φυσικό πόρο για την παραγωγή τροφίμων που διαφορετικά θα πήγαινε χαμένος, επιβαρύνοντας τόσο το οικονομικό όσο και το περιβαλλοντικό κόστος διάθεσης (IFFO, 2020).

Τα επόμενα δέκα χρόνια το μέρος των ψαριών που προέρχεται από την αλιεία και μετατρέπεται σε ιχθυοτροφές πρόκειται να μειωθεί, αν και ελάχιστα, στο 18% έως το 2030 σε σύγκριση με το 19% το 2018. Ωστόσο, το 2030, εκτιμάται ότι η συνολική ποσότητα ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίου που θα παραχθεί να είναι υψηλότερη κατά 1% και 7%, αντίστοιχα, από το 2018, λόγω της χρήσης των αποβλήτων των ψαριών και των υποπροϊόντων της μεταποιητικής βιομηχανίας για την παραγωγή τους (FAO, 2020).

4.2 Ιχθυάλευρα

Το ιχθυάλευρο (fish meal) (Εικ. 15) αποτελεί σημαντικό συστατικό των ιχθυοτροφών, πλούσιο σε πρωτεΐνες, που προκύπτει έπειτα από επεξεργασία ολόκληρων ψαριών, κυρίως από μικρά πελαγικά είδη, και από υπολείμματα και υποπροϊόντα που προέρχονται από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας ψαριών, κυρίως της φιλετοποίησης και μεταποίησης των



Εικόνα 15: Ιχθυάλευρο (Calas, 2017)

ψαριών (FAO, 2011). Πρόκειται, δηλαδή, για ιχθυάλευρα των οποίων η πρώτη ύλη είναι τα διάφορα υπολείμματα και υποπροϊόντα της φιλετοποίησης και κονσερβοποίησης τόσο αλιευόμενων ιχθύων, όπως είναι ο γαύρος, η σαρδέλα, το σκουμπρί, όσο και εκτρεφόμενων ιχθύων. Στην κατηγορία αυτή εμπíπτουν και τα άλευρα που προέρχονται από παρεμπίπτοντα αλιεύματα, δηλαδή αλιεύματα που δεν αποτελούν είδη-στόχους της αλιευτικής προσπάθειας και δεν έχουν

εμπορική αξία. Αυτά αποτελούν περίπου το 25% της παγκόσμιας παραγωγής ιχθυαλεύρων (Bachis, 2022). Έτσι, σε περίπτωση έλλειψης των ιχθυαλεύρων, τα ψάρια που έχουν μικρή εμπορική αξία και καταναλώνονται από τον αναπτυσσόμενο κόσμο θα χρησιμοποιηθούν, πλέον, ως τροφή για τα καλοθρεμμένα ψάρια του ανεπτυγμένου κόσμου.

Τα ιχθυάλευρα που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στην εκτροφή ιχθύων είναι το άλευρο ρέγκας, το άλευρο γαύρου, το άλευρο σαρδέλας και το άλευρο σκουμπριού. Ειδικότερα, στην παγκόσμια παραγωγή ιχθυαλεύρων χρησιμοποιούνται κατά 90% ρεγκάλευρο, αντσουγιάλευρο, σαρδελάλευρο και σκουμπράλευρο, κατά 10% υπολλείματα από ψάρι και 1% από ασπόνδυλα και φαλαινάλευρο (Shepherd & Jackson, 2013).

Τα διάφορα ιχθυάλευρα ταξινομούνται ανάλογα με τη σύστασή τους σε πρωτεΐνες και λιπίδια ως εξής (Shepherd & Jackson, 2013):

- ✓ Ιχθυάλευρα με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (>68%) και μικρή σε έλαια (<9%). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα περισσότερα ρεγκάλευρα.
- ✓ Ιχθυάλευρα με κανονική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (64-68%) και 13% σε έλαιο. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν τα ιχθυάλευρα Ν. Αμερικής.
- ✓ Ιχθυάλευρα με κανονική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (64-68%) και περιεκτικότητα σε έλαιο μικρότερη από 6%.
- ✓ Ιχθυάλευρα με περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη 60-64%.

Η ποσότητα και η ποιότητα του ελαίου που περιέχεται στα ιχθυάλευρα εξαρτώνται από το είδος, τη φυσιολογία, το φύλο, την αναπαραγωγική κατάσταση, την ηλικία, τις συνθήκες

διατροφής των συλληφθέντων ψαριών, καθώς και από τη μέθοδο επεξεργασίας (Tacon & Metian, 2008).

4.3 Ιχθυέλαια

Η άλλη κύρια πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται στις ιχθυοτροφές είναι το ιχθυέλαιο, δηλαδή το έλαιο που εξάγεται από ολόκληρα ψάρια ή από υποπροϊόντα ψαριών, αφού υποστούν συμπίεση, χημική επεξεργασία και διύλιση. Τα ιχθυέλαια που χρησιμοποιούνται ευρύτερα είναι εκείνα που παρασκευάζονται από τα ίδια είδη ψαριών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των ιχθυαλεύρων (FAO, 2011).

Η μεγάλη σημασία του ιχθυελαίου έγκειται στο ότι αποτελεί πηγή ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και πηγή διαιτητικής ενέργειας. Έτσι, οι κύριοι λόγοι που περιέχονται στις ιχθυοτροφές είναι από τη μία για να ικανοποιήσουν τις διατροφικές απαιτήσεις των ψαριών σε αυτά τα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι απαραίτητα για τη σωστή ανάπτυξη και την καλή υγεία των εκτρεφόμενων ψαριών, και από την άλλη για να αυξήσουν το ενεργειακό περιεχόμενο της ιχθυοτροφής, καθώς τα έλαια και τα λίπη αποτελούν τις πιο πλούσιες ενεργειακά θρεπτικές ουσίες. Τα επίπεδα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στα ιχθυέλαια διαφέρουν μεταξύ διαφορετικών ειδών ψαριών (Jauncey, 1998). Το ιχθυέλαιο, λοιπόν, είναι σημαντικό και για την ανθρώπινη υγεία, λόγω της περιεκτικότητας σε EPA και DHA, τα οποία φτάνουν στον άνθρωπο είτε άμεσα μέσω της κατανάλωσης του ελαίου είτε έμμεσα μέσω των εκτρεφόμενων ψαριών (Jackson, 2012).

Η τιμή και η διαθεσιμότητα στην αγορά, η θρεπτική αξία και η ποιότητα, που καθορίζονται με χημικούς ελέγχους είναι τα κριτήρια με τα οποία επιλέγονται ποια έλαια θα χρησιμοποιηθούν στις ιχθυοτροφές, όπως ισχύει και για τα άλλα συστατικά (Jauncey, 1998).

4.4 Προβληματισμοί από τη χρήση ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίων

Η ταχεία αύξηση των ιχθυοκαλλιεργειών παγκοσμίως υποδηλώνει και μία ανάλογη αύξηση της ζήτησης για ιχθυοτροφές. Η παραγωγή, όμως, των ιχθυοτροφών απαιτεί μεγάλες ποσότητες ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίων, που προέρχονται από συγκεκριμένα αλιευμένα ιχθυαποθέματα, τα οποία πλέον έχουν φτάσει στα όρια της βιωσιμότητάς τους. Η πιθανή μελλοντική μείωση στην προσφορά των ιχθυελαίων και ιχθυαλεύρων, συνοδεύεται και με τις αρνητικές επιδράσεις που έχουν υποστεί τα θαλάσσια υδάτινα οικοσυστήματα, λόγω της υποβάθμισης που υπόκειται η τροφική αλυσίδα των θαλάσσιων θηλαστικών και πουλιών. Παράλληλα, έχει δημιουργηθεί ένα θέμα παγκόσμιας συζήτησης και έχουν διεγερθεί ηθολογικές αντιδράσεις σχετικά με τη χρησιμοποίηση αλιευμένων ιχθύων για την παραγωγή ζωικών τροφών και όχι για την άμεση κατανάλωσή τους από τον άνθρωπο. Ακόμη ένας προβληματισμός που ανακύπτει από τη χρήση ιχθυελαίου στις ιχθυοτροφές είναι η πιθανή παρουσία οργανικών μολυσματικών παραγόντων, οι οποίοι σε υψηλά επίπεδα γίνονται τοξικοί για τα εκτρεφόμενα ψάρια, αλλά και για τον άνθρωπο-καταναλωτή. Τέλος, όσον αφορά το ποσοστό των απαραίτητων λιπαρών οξέων που χορηγείται στην παραγωγή ιχθυοτροφών, είναι υψηλότερο από αυτό που απαιτείται για την κάλυψη των αναγκών των εκτρεφόμενων ψαριών, με συνέπεια τα πολύτιμα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα να «ξοδεύονται» αλόγιστα. Για τους λόγους αυτούς, επομένως, η πρόκληση για την παραγωγή ψαριών είναι να στραφεί προς εναλλακτικές πηγές πρώτων υλών, ώστε να

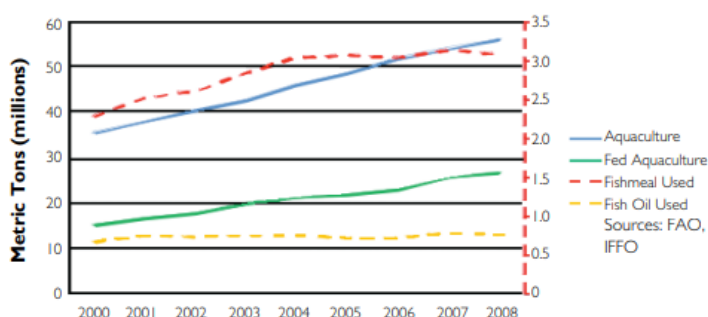
διατηρήσει τα πλεονεκτήματα των ψαριών για την υγεία του ανθρώπου, ενώ ταυτόχρονα να μεγιστοποιήσει την αειφορία, την υγεία των ψαριών και τα οικονομικά οφέλη (Tacon & Metian, 2008; Turchini et al., 2009).

5. ΧΡΗΣΗ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΩΝ ΥΛΩΝ

Η υδατοκαλλιέργεια επεκτάθηκε παγκοσμίως, απορροφώντας αυξανόμενους όγκους ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίου, οδηγώντας κάποιους στην άποψη ότι στο μέλλον η ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας θα περιοριστεί από την έλλειψη θαλάσσιων συστατικών, ενώ άλλους στο ότι η αύξηση των τιμών θα έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη χρήση αυτών των συστατικών σε ιχθυοτροφές στο μέλλον (Jackson, 2009).

Τα δεδομένα, όμως, δείχνουν πως η αυξανόμενη παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιέργειας

κατά τη διάρκεια του 2000 με 2008 πραγματοποιήθηκε ενάντια σε ένα ταυτόχρονο μοτίβο σταθερής ή και ελαφρώς φθίνουσας χρήσης ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίου στην υδατοκαλλιέργεια (Εικ. 16). Αυτό οφείλεται κυρίως σε καινοτομίες που επιτρέπουν τη βελτιωμένη αποτελεσματικότητα



Εικόνα 16: Παγκόσμια ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας και χρήση ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίου απ' αυτήν (Jackson, 2010)

της αντικατάστασης των ιχθυαλεύρων και του ιχθυελαίου με εναλλακτικά συστατικά (Jackson & Shepherd, 2010). Προς αυτή την κατεύθυνση συντελεί η αύξηση των διατροφικών γνώσεων των εκτρεφόμενων ειδών και η πρόοδος στην τεχνολογία παραγωγής και επεξεργασίας πρώτων υλών, ιδιαίτερα για τα φυτικά συστατικά (Jackson, 2010).

Για να διασφαλιστεί πως η αντικατάσταση του ιχθυάλευρου με άλλες πρώτες ύλες είναι βιώσιμη, χρειάζεται η υποψήφια πρώτη ύλη να πληροί ορισμένα κρίσιμα και βασικά χαρακτηριστικά. Ειδικότερα, η μεγάλη διαθεσιμότητα, η ανταγωνιστική τιμή, η ευκολία στον χειρισμό και η δυνατότητα αποθήκευσης και χρήσης είναι τα χαρακτηριστικά που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη (Naylor et al., 2009). Επίσης, η υποψήφια πρώτη ύλη χρειάζεται να διαθέτει θρεπτικά χαρακτηριστικά, όπως χαμηλά επίπεδα ινών, άμυλο, μη διαλυτούς υδατάνθρακες και μη θρεπτικές ουσίες, αλλά και να παρουσιάζει υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, ισχυρό προφίλ αμινοξέων, υψηλή πεπτικότητα και γευστικότητα (Gatlin et al., 2007).

Οι κύριες εναλλακτικές πρώτες ύλες είναι οι φυτικές πρώτες ύλες, τα ζωικά παραπροϊόντα, όπως το πτηνάλευρο, το κρεατάλευρο, το αιματάλευρο και το οστεάλευρο, οι διάφορες πρωτεϊνικές πηγές, όπως οι ζύμες και τα φυσικά συμπυκνώματα και σήμερα αναδύονται ορισμένα βακτηριακά και μυκητιακά προϊόντα. Πολλά από αυτά έχουν τη δυνατότητα να παρέχουν τα απαιτούμενα διατροφικά θρεπτικά συστατικά στα είδη ιχθυοκαλλιέργειας. Η καλύτερη χρήση αυτών των πόρων στις ιχθυοτροφές εξαρτάται από τη λεπτομερή κατανόηση της χημικής σύνθεσης αυτών των προϊόντων και από την επίδραση που έχουν σε κάθε είδος που χορηγούνται (Glencross et al., 2019).

5.1 Πρώτες ύλες φυτικής προέλευσης

Μεταξύ των εναλλακτικών πρώτων υλών, σημαντική έρευνα έχει γίνει σχετικά με τη χρήση των πηγών φυτικής πρωτεΐνης στη διατροφή των ειδών ιχθυοκαλλιέργειας. Οι κυριότερες εναλλακτικές πρώτες ύλες είναι τα άλευρα και τα έλαια ελαιούχων δημητριακών καρπών, όπως το σογιάλευρο, το κραμβάλευρο, το φυσικάλευρο, το άλευρο καρύδας και τα αντίστοιχα έλαια αυτών, τα άλευρα οσπρίων και τα υποπροϊόντα αυτών, όπως τα άλευρα κουκιών και λούπινου, τα άλευρα και τα έλαια σιτηρών και, τέλος, μικροάλγη και υδρόβια μακρόφυτα, όπως ο υάκινθος του νερού (Gatlin et al., 2007).

Η πιο ευρέως παραγόμενη και χρησιμοποιούμενη πηγή φυτικής πρωτεΐνης στη διατροφή των ιχθυοκαλλιεργειών ως υποκατάστατο των ιχθυάλευρων είναι η σόγια, ενώ ως υποκατάστατο του ιχθυελαίου είναι η ελαιοκράμβη, τα οποία έχουν εφαρμοστεί με σημαντική επιτυχία σε τροφές για ένα μεγάλο φάσμα ειδών (Jackson, 2010; Glencross et al., 2019). Αυτό συμβαίνει, καθώς η σόγια και η ελαιοκράμβη περιέχουν λιγότερους επιβλαβείς αντιθρεπτικούς παράγοντες και υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης (Jackson & Shepherd, 2010).

Αναλυτικότερα, όσον αφορά τα **άλευρα ελαιούχων καρπών** αποτελούν σημαντικές πρωτεϊνικές πηγές και παράγονται αφού αλεστεί και αποξηραθεί το υπόλειμμα που παραμένει μετά την εξαγωγή του ελαίου από τους ελαιούχους καρπούς. Αυτά περιλαμβάνουν (Gatlin et al., 2007; El-Sayed, 1999):

- Σογιάλευρο, το οποίο περιέχει 44-49 % πρωτεΐνη, αλλά είναι πολύ φτωχό σε βιταμίνες του συμπλέγματος Β και σε μερικά ανόργανα στοιχεία.
- Φοινικάλευρο, το οποίο έχει σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα πρωτεΐνης, αλλά υψηλή βιολογική αξία και αποτελεί καλή πηγή ασβεστίου και φωσφόρου, χωρίς να περιέχει τοξικές ουσίες και αντιδιατροφικούς παράγοντες.
- Άλευρο ελαιοκράμβης, το οποίο περιέχει πρωτεΐνη 38%, ισορροπημένα αμινοξέα και σημαντικά ποσά ω-3 λιπαρών οξέων.
- Άλευρο βαμβακόσπορου, που είναι πλούσιο σε πρωτεΐνη και ως καρπός καλλιεργείται κυρίως για τις ίνες του και το λάδι από το ενδοκάρπιό του.
- Φυσικάλευρα, που έχουν περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη 33-57 %, αλλά είναι φτωχά σε ασβέστιο και βιταμίνη Β12.
- Ηλιάλευρο, που περιέχει υψηλή πρωτεΐνη και είναι πλούσιο σε βιταμίνη Ε, αλλά δεν έχει καλή γεύση.
- Σουσαμάλευρο, που είναι πλούσιο σε ασβέστιο, χαλκό, μαγγάνιο, φυτοστερόλες, αλλά και σε μεθειονίνη σε αντίθεση με άλλα άλευρα.
- Άλευρο καρύδας, που είναι πλούσια πηγή φωσφόρου, ψευδαργύρου, σιδήρου και φτωχό σε ασβέστιο.

Τα **σιτηρά** αποτελούν άλλη μία σημαντική ομάδα εναλλακτικών πρώτων υλών φυτικής προέλευσης και μάλιστα πρόκειται για φτηνά φυτικά προϊόντα. Παρουσιάζουν 10-20 % περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και είναι φτωχά σε πολλά ανόργανα στοιχεία, αλλά είναι πλούσιες πηγές βιταμίνης Β και Ε. Σε αυτά ανήκουν τα:

- Καλαμπόκι, που είναι φτωχό σε πρωτεΐνη.

- Σιτάρι, που είναι φτωχό σε ασβέστιο, βιταμίνη A και D, αλλά πλούσιο σε φώσφορο και βιταμίνη B.
- Ρύζι, που αποτελεί πλούσια πηγή βιταμίνης B, σιδήρου και μαγγανίου.
- Κριθάρι, που είναι φτωχό σε πρωτεΐνη και όχι ιδιαίτερα εύγεστο.
- Βρώμη.

Τα **όσπρια** είναι, επίσης, φυτικά προϊόντα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά των τροφών και είναι πλούσια σε πρωτεΐνη 25-45 %, σε βιταμίνη B και ανόργανα στοιχεία, ενώ φτωχά σε βιταμίνη C. Τα πιο ευρέως διαδεδομένα είναι τα κουκιά, ο αρακάς και το λούπινο.

Τα άλευρα από **φύκη** είναι φυτικές πρώτες ύλες, που η χρήση της βιομάζας τους ως τροφή οφείλεται στις πρωτεΐνες και τις βιταμίνες που περιέχονται σε αυτά.

Άλλα εναλλακτικά προϊόντα είναι τα **άλευρα παραπροϊόντων ζυθοποιίας**, που αποτελούν μέτρια πηγή πρωτεΐνης και πλούσια πηγή βιταμίνης B και τα **άλευρα από μύκητες και βακτήρια**, που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και βιταμίνες B και E. Οι μύκητες που χρησιμοποιούνται είναι οι *Candida*, *Saccharomyces*, *Torula*, *Kluyveromyces*, και τα βακτήρια *Methanobacter*, *Pseudomonas* και *Micrococcus* (Nevejan et al., 2016).

Στον αντίποδα, όμως, της ανάγκης αντικατάστασης των ιχθυάλευρων με φυτικά συστατικά έρχεται η έρευνα του Πανεπιστημίου του Stirling, που υποστηρίζει πως αυτή η αλλαγή μπορεί να μην είναι τόσο ευεργετική για το περιβάλλον όσο πιστεύεται. Σύμφωνα με αυτήν, μπορεί η χρήση εναλλακτικών φυτικών υλών να μειώνει την εξάρτηση από τους μη ανεξάντλητους θαλάσσιους πόρους, ωστόσο, θα μετατοπίσει τη ζήτηση των πόρων από τους ωκεανούς στη στεριά. Έτσι, αυτό θα προσθέσει δυνητικά πίεση στα χερσαία συστήματα παραγωγής τροφίμων, τα οποία ήδη βιώνουν πίεση για να ανταποκριθούν στην παγκόσμια ζήτηση για τρόφιμα, ζωοτροφές και βιοκαύσιμα. Με τη σειρά του αυτό θα έχει αντίκτυπο στο περιβάλλον και τη βιοποικιλότητα, καθώς και στη διαθεσιμότητα και τις τιμές των καλλιεργειών (IFFO, 2019).

5.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρήσης πρώτων υλών φυτικής προέλευσης στις ιχθυοτροφές

Στα πλεονεκτήματα της χρήσης προϊόντων φυτικής προέλευσης στις ιχθυοτροφές συγκαταλέγονται η άμεση διαθεσιμότητά τους στην αγορά σε μεγάλες ποσότητες και το χαμηλό κόστος σχετικά με τα ζωικά άλευρα. Επιπλέον, τα προϊόντα αυτά είναι πλούσια σε βιταμίνες B και διάφορα ανόργανα στοιχεία, ενώ αποτελούν καλές πηγές ενέργειας και διαθέτουν αυξημένα επίπεδα ινωδών ουσιών.

Από την άλλη, η χαμηλή περιεκτικότητα των φυτικών πρώτων υλών σε πρωτεΐνες και απαραίτητα αμινοξέα σχετικά με τα ζωικά άλευρα και η έλλειψη σημαντικών ω-3 λιπαρών οξέων, με αποτέλεσμα να μην ικανοποιούν τις απαιτήσεις των οργανισμών, αποτελούν μειονεκτήματα της χρησιμοποίησής τους. Σε αυτά προστίθενται το ότι είναι λιγότερο εύγεστα και εύπεπτα από τα ζωικά άλευρα και έλαια και το ότι περιέχουν αντιδιατροφικούς παράγοντες (Gatlin et al., 2007).

Οι αντιδιατροφικοί παράγοντες είναι το φυτικό οξύ, οι παρεμποδιστές πρωτεασών, οι γλυκοζίτες, οι αντι-βιταμινικές ουσίες, η γκοσσυπόλη, οι ταννίνες, τα αλκαλοειδή και οι αιμοσυγκολλητίνες και αποτελούν ενώσεις που παρεμποδίζουν την πέψη και τον μεταβολισμό των θρεπτικών ουσιών των τροφών (El-Sayed, 1999).

5.3 Πρώτες ύλες ζωικής προέλευσης

Τα συστατικά ζωικής προέλευσης αποτελούν συνήθως τα πιο σημαντικά και πιο ακριβά συστατικά της τροφής των ψαριών και γενικά είναι πλούσια σε πρωτεΐνη, λιπίδια, ανόργανα στοιχεία και βιταμίνες και φτωχά σε ινώδεις ουσίες και υδατάνθρακες (Jauncey, 1998).

5.3.1 Άλευρα καρκινοειδών

Πρόκειται για άλευρα που προκύπτουν από την επεξεργασία κυρίως γαρίδων, καβουριών και καλαμαριών, αφού υποστούν ξήρανση. Η περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες είναι πάνω από 40%, ενώ στην περίπτωση των αλεύρων καλαμαριών το ποσοστό αυτό μπορεί να φτάσει έως και 78%. Τα άλευρα αυτά εκτός της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνες αποτελούν και πλούσια πηγή διάφορων ανόργανων στοιχείων, όπως ασβεστίου, πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, καροτινοειδών χρωστικών και είναι ιδιαίτερα ελκυστικά και εύγεστα για τα εκτρεφόμενα ψάρια (Jauncey, 1998).

5.3.2 Άλευρα χερσαίων ζώων

Τα κύρια προϊόντα από χερσαία ζώα που έχουν εξεταστεί ως τροφές των ψαριών είναι το υδρολυμένο πτεράλευρο, το κρεατάλευρο, το οστεάλευρο, τα άλευρα παραπροϊόντων πουλερικών και τα προϊόντα αίματος και γάλακτος (Jauncey, 1998).

Πρόκειται για άλευρα που παρασκευάζονται από ζωικά υποπροϊόντα, δηλαδή από προϊόντα που προκύπτουν κατά την επεξεργασία, συγκεκριμένα κατά τη σφαγή και τη μεταποίηση, διάφορων μονογαστρικών αγροτικών ζώων, όπως είναι τα χοιρινά και τα πουλερικά, και όχι μηρυκαστικών, όπως είναι τα βοοειδή. Τα ζώα από τα οποία συλλέγονται τα υποπροϊόντα προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο και τα τελευταία λαμβάνονται κατά τη στιγμή της σφαγής τους. Ανάλογα με το είδος του ζώου από το οποίο προέρχονται προκύπτουν και διαφορετικοί τύποι αλεύρων (El-Sayed, 1999).

Τα άλευρα χερσαίων ζώων έχουν περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες που κυμαίνεται από 50% έως πάνω από 85%, σε λιπίδια από 5 έως 10%, σε τέφρα από 27 έως 31%, ενώ αποτελούν και πλούσιες πηγές φωσφόρου και ασβεστίου (El-Sayed, 1999).

5.3.3 Εντομάλευρα

Η χρήση των εντομάλευρων ως πρώτη ύλη στις ιχθυοτροφές επιτράπηκε με πρόσφατη απόφαση της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ωστόσο, η βιομηχανία ιχθυοτροφών παραμένει ακόμα διστακτική ως προς τη χρήση αυτών.

Κύριο πλεονέκτημα της χρήσης εντόμων είναι τα υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών, που μπορεί να φτάνουν έως και το 70%, ανάλογα με το είδος και το στάδιο ανάπτυξης, και τα επίπεδα λίπους (έως και 55%), αποδεικνύοντας πως μπορούν να παρέχουν κατάλληλες ποσότητες θρεπτικών συστατικών στη διατροφή των ιχθύων. Επιπλέον, αποτελούν πλούσιες πηγές απαραίτητων αμινοξέων, πολλών βιταμινών και ανόργανων στοιχείων, ενώ πολλά είδη έχουν, επίσης, αντι-μυκητιακές και αντι-βακτηριακές δράσεις. Εκτός της θρεπτικής τους

αξίας, τα έντομα αποτελούν τη φυσική τροφή πολλών ειδών ιχθύων και η εκτροφή τους έχει ένα χαμηλό οικολογικό αποτύπωμα σε σχέση με άλλου είδους εκτροφές. Ωστόσο, η χρήση εντόμων στις ιχθυοτροφές παρουσιάζει και μειονεκτήματα, μεταξύ των οποίων το ενδεχόμενο να αποτελούν βιοσυσσωρευτές εντομοκτόνων, βαρέων μετάλλων και φυσικών τοξινών, καθώς και φορείς παθογόνων μικροβίων, αλλά και η περιορισμένη διαθεσιμότητά τους και η υψηλή τιμή τους στην αγορά. Η πλειοψηφία των μελετών, παρόλα αυτά, δείχνει ότι τα εντομάλευρα μπορούν να υποκαταστήσουν επιτυχώς ένα ποσοστό των ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές των περισσότερων ιχθύων, όπως της τσιπούρας και του λαβρακιού (Nogales-Mérida et al, 2018).

5.4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρήσης πρώτων υλών ζωικής προέλευσης στις ιχθυοτροφές

Στα πλεονεκτήματα της χρήσης προϊόντων ζωικής προέλευσης στις ιχθυοτροφές συγκαταλέγονται τα υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών και απαραίτητων αμινοξέων (πηγές μεθειονίνης και λυσίνης) που διαθέτουν, καθώς και η υψηλή πεπτικότητα και γευστικότητα που προσφέρουν. Παράλληλα, αυτά τα προϊόντα αποτελούν πλούσιες πηγές βιταμίνης Α και φωσφόρου, όπως και ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, κυρίως στην περίπτωση των ιχθυελαίων. Σημαντικό στοιχείο, επίσης, είναι η απουσία άπεπτων υδατανθράκων και αντιδιατροφικών παραγόντων στα ζωικά προϊόντα (El-Sayed, 1999).

Όσον αφορά τα μειονεκτήματα αυτών των πρώτων υλών, τα πιο βασικά, ίσως είναι το πολύ υψηλό κόστος τους, αν και τα άλευρα των χερσαίων ζώων είναι φθηνότερα από τα ιχθυάλευρα, αλλά ακριβότερα από κάποια φυτικά άλευρα, και ο προβληματισμός για τη βιωσιμότητα των φυσικών αποθεμάτων. Επιπλέον, η θρεπτική αξία των χερσαίων ζωικών αλεύρων μπορεί να μεταβάλλεται αρκετά ανάλογα με τον τύπο εκτροφής και τη διατροφή των ζώων προέλευσης και η γευστικότητά τους να είναι χαμηλή. Τέλος, η χρησιμοποίησή τους, ίσως, είναι δυσχερής σε διάφορα στάδια της διαδικασίας (El-Sayed, 1999).

5.5 Πρώτες ύλες μικροβιακής προέλευσης

Τα τελευταία χρόνια σημαντικό μέρος της έρευνας για τις εναλλακτικές πρώτες ύλες των ιχθυοτροφών αποτελούν τα μικροβιακά συστατικά. Συγκεκριμένα, τα βακτήρια θεωρούνται ως πολλά υποσχόμενοι υποψήφιοι για τροφή στις υδατοκαλλιέργειες, διότι είναι πιο φιλικά προς το περιβάλλον και έχουν πιθανώς τη δυνατότητα να βελτιώνουν την υγεία των ψαριών.

Η βακτηριακή βιομάζα θεωρείται κατάλληλη πηγή πρωτεΐνης για τις ιχθυοτροφές και παράγεται εύκολα ακόμα και σε μεγάλη κλίμακα, γεγονός που καθιστά τα βακτήρια ικανά ως εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης (Wang et al., 2019). Η βιομάζα αυτή αναφέρεται και ως «μονοκυτταρική πρωτεΐνη», καθώς πρόκειται για ένα είδος πρωτεΐνης που εξάγεται από μονοκύτταρους μικροοργανισμούς, στους οποίους ανήκουν και τα βακτήρια, και παρέχει μία σειρά πλεονεκτημάτων ως συστατικό τροφών. Αρχικά, έχει υψηλή θρεπτική αξία και μεγάλη παραγωγική αποδοτικότητα, τα οποία οφείλονται στο ότι διαθέτει τόσο υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (>800 g/kg) όσο και καλά ισορροπημένο προφίλ αμινοξέων, το οποίο είναι παρόμοιο με αυτό του ιχθυάλευρου (Ma et al., 2022). Ειδικότερα, όσον αφορά το ποσοστό πρωτεϊνών της βακτηριακής βιομάζας αυτό κυμαίνεται μεταξύ 50% και 65%, το οποίο είναι σημαντικό ιδιαίτερα κατά τη σύνθεση ιχθυοτροφών για είδη, όπως ο σολομός

και η πέστροφα, που η διατροφική απαίτηση σε πρωτεΐνη μπορεί να υπερβαίνει το 50%. Επιπλέον, λόγοι που συμβάλουν στη χρήση των βακτηρίων ως συστατικά των ιχθυοτροφών είναι το ότι η μετατροπή των οργανικών ενώσεων, του αζώτου και του φωσφόρου σε πρωτεΐνες είναι πολύ αποτελεσματική σε αυτά σε σύγκριση με τις εναλλακτικές φυτικές πηγές και το ότι η βιομάζα τους χαρακτηρίζεται από απουσία αντιθρεπτικών παραγόντων, οι οποίοι δυσχεραίνουν την πέψη (Delamare-Deboutteville et al., 2019).

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που αναφέρουν την εφαρμογή της «μονοκυτταρικής πρωτεΐνης» ως πηγή πρωτεΐνης για διαφορετικά είδη ψαριών, όπως στον κυπρίνο, στη μαύρη τσιπούρα και στον νεαρό κυπρίνο. Μάλιστα το ποσοστό αντικατάστασης του ιχθυάλευρου μπορεί να φτάσει ως και το 58% αποδεικνύοντας πως η «μονοκυτταρική πρωτεΐνη» είναι ένα πολλά υποσχόμενο πρωτεϊνικό υλικό για τις ιχθυοτροφές (Ma et al., 2022). Η διατροφική σημασία των βακτηρίων έγκειται όχι μόνο στο ότι αποτελούν καλή πηγή πρωτεΐνης, αλλά και πηγή άλλων απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, όπως είναι οι βιταμίνες του συμπλέγματος Β και τα n-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Παράλληλα, τα βακτήρια έχουν τη δυνατότητα να μεταβολίσουν αρκετά θρεπτικά συστατικά που ο ξενιστής δεν μπορεί να μεταβολίσει, όπως η λιγνίνη, και να τα μετατρέψουν σε τελικά προϊόντα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τον ξενιστή, όπως λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας. Ακόμα μία συνεισφορά των βακτηρίων στον ξενιστή είναι το ότι διαθέτουν ένζυμα που βελτιώνουν την πεπτική απόδοση του, όπως συμβαίνει στις γαρίδες (Nevejan et al., 2016). Γενικά, οι ιχθυοτροφές που περιέχουν βακτήρια μπορεί τόσο να έχουν ευεργετικές ιδιότητες για την ανάπτυξη, το ανοσοποιητικό σύστημα και την απόκριση στο στρες των ψαριών όσο και να έχουν βελτιωμένη γεύση (Wang et al., 2019).

Ένα είδος βακτηρίων που χρησιμοποιείται ως συστατικό των ιχθυοτροφών είναι τα μεθανοτροφικά βακτήρια. Η χρήση τους οφείλεται στο ότι μπορούν να αναπτυχθούν σε μεγάλες ποσότητες έχοντας πολύ μικρή εξάρτηση από το νερό, το έδαφος και τις συνθήκες του κλίματος, καθώς και στο ότι η χημική τους σύσταση έχει αρκετές ομοιότητες με αυτή των ιχθυάλευρων. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τα αμινοξέα που περιέχουν, η τρυπτοφάνη συναντάται στην πιο μεγάλη αναλογία, ενώ στη λυσίνη υπάρχει έλλειψη σε σχέση με τα ιχθυάλευρα. Η πλειοψηφία των ερευνών στις οποίες τα ιχθυάλευρα αντικαταστάθηκαν από μεθανοτροφικά βακτήρια είχαν ως αποτέλεσμα αύξηση της αποδοτικότητας της ανάπτυξης των ψαριών, βελτιωμένο ρυθμό μετατρεψιμότητας της τροφής και μειωμένη έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με φλεγμονές (Καστρίτη, 2021).

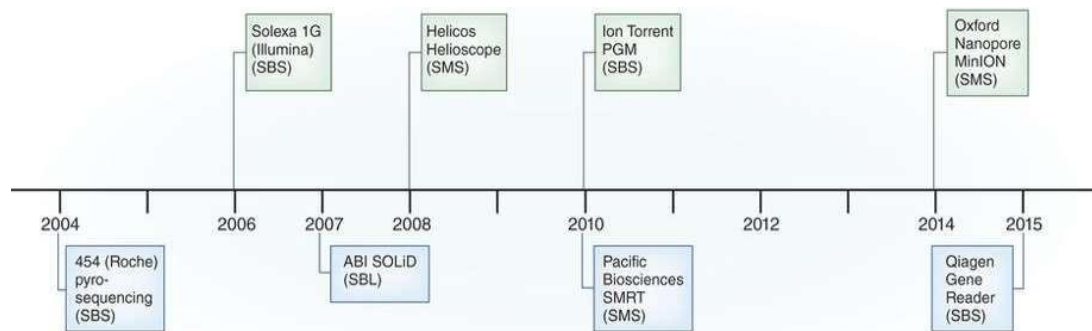
Ανεξαρτήτως, όμως, της προέλευσης των πρώτων υλών, η βελτιωμένη διατροφή, η καλύτερη επεξεργασία των πρώτων υλών και η υπεύθυνη χρήση των θαλάσσιων συστατικών είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για να διασφαλιστεί πως η υδατοκαλλιέργεια έχει τα μέσα να παραμείνει βιώσιμη στο μέλλον (Jackson & Shepherd, 2010).

6. ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ

Με τον όρο αλληλούχιση DNA εννοείται ο προσδιορισμός της ακριβούς σειράς των νουκλεοτιδίων ενός μορίου DNA και περιλαμβάνει κάθε μέθοδο και τεχνολογία, που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της σειράς των τεσσάρων βάσεων σε μια αλυσίδα DNA (Beck & Pohl, 1984). Η αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS) προέκυψε από τις τεχνολογίες προσδιορισμού αλληλουχιών DNA, που αναπτύχθηκαν κάποια χρόνια μετά την εμφάνιση της μεθόδου αλληλούχισης DNA του Sanger το 1977 (Mardis, 2008). Συγκεκριμένα, επιτρέπει την

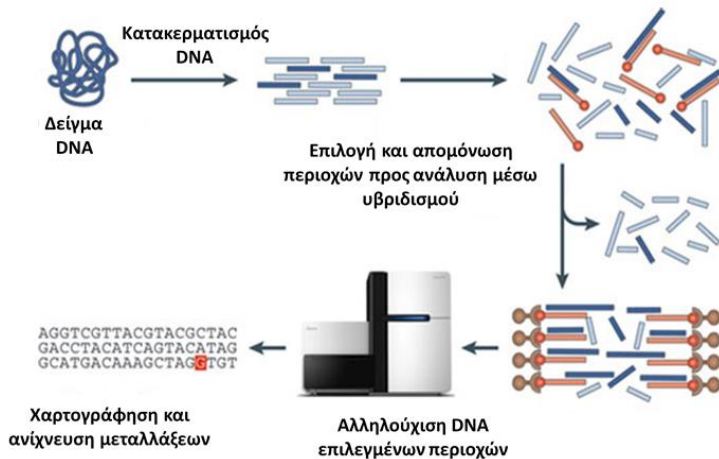
ταυτόχρονη αλληλούχιση εκατομμυρίων θραυσμάτων DNA χωρίς την προηγούμενη γνώση της αλληλουχίας, αναγγέλλοντας τη δεύτερη γενιά αλληλούχισης του DNA (Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς ή Next Generation Sequencing-NGS). Έτσι, είναι δυνατόν να πραγματοποιούνται ταυτόχρονα περισσότερες αντιδράσεις, μεγαλύτερων τμημάτων DNA, σε μικρότερο χρονικό διάστημα και με μεγαλύτερη ταχύτητα (Neil, 2007).

Η ευρεία αποδοχή της καινούριας αυτής τεχνολογίας ώθησε πολλές εταιρείες στην ανάπτυξη διαφορετικών πλατφόρμων του NGS (Εικ. 17). Το 2004 κυκλοφόρησε η πρώτη τεχνολογία NGS, που ήταν η μέθοδος της πυροαλληλούχισης από τη 454 Life Sciences. Μετά από δύο χρόνια, διατέθηκε η Solexa / Illumina και το 2007 η τρίτη πλατφόρμα NGS από την Applied Biosystems, η SOLID. Τέλος, το 2010 η Ion Torrent κυκλοφόρησε το PGM (Personal Genome Machine) (Dijk, 2014).



Εικόνα 17: Η χρονολογική εξέλιξη των συστημάτων και τεχνολογιών αλληλούχισης (Mardis, 2017)

Η διαδικασία που ακολουθείται σε γενικά πλαίσια κατά την εφαρμογή της NGS (Εικ. 18) ξεκινάει με την απομόνωση του γενετικού υλικού από κατάλληλα δείγματα. Έπειτα,



Εικόνα 18: Σειρά βημάτων για την πραγματοποίηση της NGS (Κουσουλίδου, 2022)

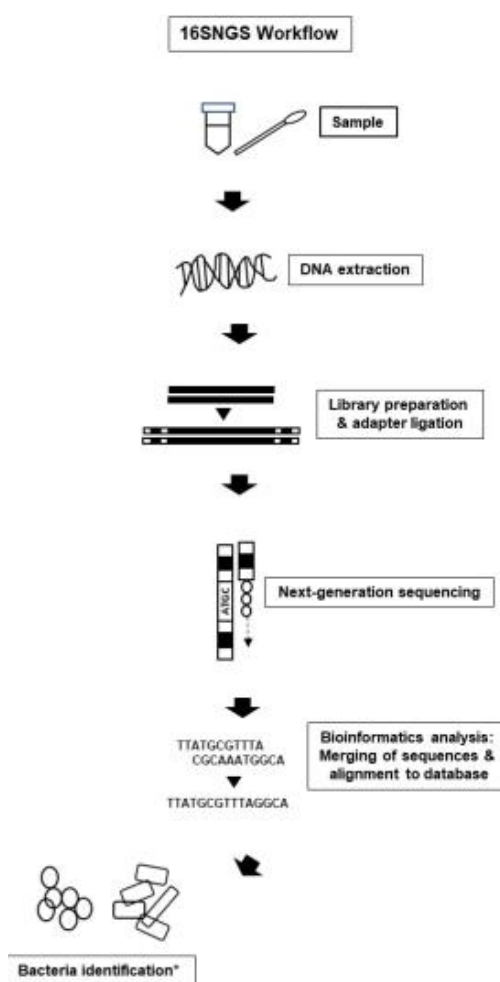
κατακερματίζεται το DNA προς διευκόλυνση της αλληλούχισης και ακολουθεί είτε ειδικός υβριδισμός με άλλα μόρια DNA, που είναι οι περιοχές ενδιαφέροντος, δηλαδή εξόνια ή συγκεκριμένες ομάδες γονιδίων, είτε άμεση αλληλούχιση σε περίπτωση που στόχος είναι η ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος. Στη

συνέχεια, τα κομμάτια του κατακερματισμένου DNA «διαβάζονται» ταυτόχρονα και τοποθετούνται σε σειρά για να συγκριθούν με την αλληλουχία αναφοράς (Κουσουλίδου, 2022).

Όλες οι πλατφόρμες NGS μπορούν να δημιουργήσουν εκατομμύρια μόρια DNA με διαφορετικές αποδόσεις και μήκη αλληλουχίας, μέσω παράλληλης αλληλούχισης, και να επιτρέψουν την ταυτόχρονη πολυπλεξία αρκετών εκατοντάδων δειγμάτων σε μία μόνο εκτέλεση (Muhamad Rizal et al., 2020).

Η αλληλούχιση DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση της ακολουθίας είτε ολόκληρων γονιδίων είτε συγκεκριμένων γενετικών περιοχών, όπως συμπλέγματα γονιδίων ή οπερόνια, είτε ολόκληρων χρωμοσωμάτων ή ολόκληρων γονιδιωμάτων. Ειδικότερα, η περίπτωση της στοχευμένης αλληλούχισης εφαρμόζεται όταν απαιτείται η αλληλούχιση μεμονωμένων γονιδίων ή η αλληλούχιση όλου του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών που βρίσκονται σε ένα δείγμα. Στην περίπτωση των προκαρυωτών πραγματοποιείται η αλληλούχιση των υπερμεταβλητών περιοχών του 16S ριβοσωμικού RNA (rRNA) γονιδίου, ενώ στην περίπτωση των ευκαρυωτών η αλληλούχιση των γονιδίων ITS (Internal Transcribed Spacer) και 18S rRNA (Cocolin et al., 2013). Όσον αφορά την αλληλούχιση του 16S rRNA αποτελεί μια γρήγορη και οικονομική μέθοδο μελέτης του προφίλ των βακτηρίων και βασίζεται στην ποικιλομορφία του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων. Βοηθάει στην ταυτοποίηση των ειδών των βακτηρίων, στην εκτίμηση της ποικιλότητάς τους και στην ομαδοποίησή τους, ώστε να ταξινομηθούν σε οικογένειες, γένη και είδη βακτηρίων (Muhamad Rizal et al., 2020).

Περίληπτικά, η πορεία εργασίας της 16SNGS (Εικ. 19) ξεκινάει με την εξαγωγή γονιδιωματικού DNA βακτηρίων από βιολογικά δείγματα. Το γονιδιωματικό DNA εξάγεται χρησιμοποιώντας είτε συμβατικά πρωτόκολλα είτε εμπορικά κιτ, και στη συνέχεια ποσοτικοποιείται για να προσδιοριστεί η ποσότητα και η ποιότητα του εξαγόμενου DNA. Στη συνέχεια, παρασκευάζονται βιβλιοθήκες γονιδίων 16S rRNA, από τις οποίες θα ενισχυθούν οι μεταβλητές περιοχές του γονιδίου 16S rRNA. Ανάλογα με την πλατφόρμα αλληλούχισης, η μεταβλητή περιοχή που επιλέγεται για ενίσχυση και η αλληλουχία που επιλέγεται για βακτηριακή ταυτοποίηση μπορεί να διαφέρουν. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι οι περιοχές V4-V6 είναι πιο αντιπροσωπευτικές του πλήρους μήκους γονιδίου 16S rRNA. Έπειτα, πραγματοποιείται προεπεξεργασία DNA για τη λήψη θραυσμάτων DNA συγκεκριμένου μεγέθους και ακολούθως θα προστεθούν προσαρμογείς στην ενισχυμένη περιοχή 16S rRNA. Αφού πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίηση και κανονικοποίηση των αμπλικονίων θα διεξαχθεί η αλληλούχιση (Muhamad Rizal et al., 2020).



Εικόνα 19: Πορεία εργασίας στη 16SNGS (Muhamad Rizal et al., 2020)

Μεθοδολογίες που στηρίζονται στην αλληλούχιση επόμενης γενιάς χρησιμοποιούνται στην ανάλυση των τροφίμων, και κατ' επέκταση των ιχθυοτροφών, με στόχο τον προσδιορισμό της προέλευσης, της χημικής και μικροβιολογικής κατάστασης των τροφίμων και τη διασφάλιση της ιχνηλασιμότητάς τους κατά μήκος της αλυσίδας εφοδιασμού. Οι συγκεκριμένες τεχνολογίες έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στον έλεγχο της ταυτότητας των τροφίμων, όπως είναι η πιστοποίηση ειδών, ο προσδιορισμός προέλευσης, η προσθήκη αδήλωτων συστατικών και η ταυτοποίηση της μεθόδου παραγωγής (Haynes, 2019).

ΣΚΟΠΟΣ

Η χρήση του 16S rRNA εδραιώνεται ολοένα και περισσότερο στον τομέα της ανάλυσης τροφών. Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό τον προσδιορισμό των πρώτων υλών οχτώ δειγμάτων ιχθυοτροφών γνωστής και άγνωστης προέλευσης μέσω της ταυτοποίησης των βακτηρίων που εντοπίζονται σε αυτά, με τη βοήθεια της αλληλούχισης νέας γενιάς και των προγραμμάτων DADA2 και Phyloseq.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Δείγματα

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε εξέταση οχτώ δειγμάτων ιχθυοτροφών γνωστής και άγνωστης προέλευσης. Τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν σύμφωνα με τις επισημάνσεις που αναγράφονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Αριθμός	Επισήμανση δείγματος
1	K16S
2	M16S
3	O16S
4	r16S
5	S16S
6	T16S
7	U16S
8	X16S

2. Απομόνωση DNA και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA

Η απομόνωση του ολικού RNA από τις ιχθυοτροφές πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του PureLink™ Genomic DNA Mini Kit.

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA σε συνεργασία με την Inqaba Biotec. Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε και από τα δυο άκρα (paired end).

3. Προετοιμασία δεδομένων αλληλούχισης μέσω αρχείων FASTQ

Μετά την αλληλούχιση τα δεδομένα που παράγονται βρίσκονται σε μορφή FASTQ. Συγκεκριμένα, το αρχείο FASTQ είναι αρχείο κειμένου, που χρησιμοποιείται για να αποθηκεύονται τα δεδομένα των αλληλουχιών με τα αντίστοιχα quality scores τους (Σκορ ποιότητας) (Deorowicz & Grabowski, 2011). Τα quality scores είναι ένας τρόπος να αποδοθεί αξιοπιστία σε μια συγκεκριμένη βάση σε μια ανάγνωση και κάθε ένα αντιπροσωπεύει την πιθανότητα να τοποθετηθεί λανθασμένα μια βάση σε αυτήν τη θέση (NGS Sequencing Technology and File Formats: Quality Scores).

Ένα αρχείο FastQ έχει μία συγκεκριμένη δομή που αποτελείται από τέσσερις σειρές. Η πρώτη σειρά περιέχει κάποιο αναγνωριστικό για την αλληλουχία και ξεκινάει με το σύμβολο «@». Η δεύτερη σειρά αποτελείται από την αλληλουχία και έπειτα η τρίτη σειρά μόνο από το σύμβολο «+», που είναι αναγνωριστικό για το quality score. Η τέταρτη σειρά περιλαμβάνει κωδικοποιημένα τα quality scores κάθε βάσης στη συγκεκριμένη αλληλουχία.

Χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο FastQC για να ελεγχθεί η ποιότητα των πρωτογενών δεδομένων. Αποτελεί μια εφαρμογή ποιοτικού ελέγχου που επιτρέπει στους χρήστες να εκτελούν πολυάριθμους ελέγχους ποιότητας σε ακατέργαστα δεδομένα αλληλούχισης σε μορφή FASTQ και παρέχει μία σειρά στατιστικών αναλύσεων που προσφέρουν πληροφορίες

για πιθανά προβλήματα πριν τη μετάβαση στην εκάστοτε ανάλυση. (Assess Read Quality with FastQC - v0.11.9, 2019) Συγκεκριμένα, εξάγει μια περιεκτική αναφορά σχετικά με τη σύνθεση και την ποιότητα των αναγνώσεων και περιλαμβάνει τις ακόλουθες ενότητες:

- ❖ **Βασικά στατιστικά στοιχεία:** παρέχει εισαγωγικά στατιστικά στοιχεία, όπως όνομα αρχείου, τύπος αρχείου, είδος αλληλούχισης, αριθμός συνολικών αλληλουχιών, αριθμός αλληλουχιών που επισημαίνονται ως κακής ποιότητας, μήκος αλληλουχίας και περιεχόμενο %GC.
- ❖ **Ποιότητα ανάγνωσης ανά βάση:** εμφανίζει μια επισκόπηση του εύρους τιμών ποιότητας για όλες τις βάσεις σε κάθε θέση στο αρχείο FASTQ και το γράφημα χωρίζεται κατακόρυφα σε τρία επίπεδα ποιότητας: καλή (πράσινη), λογική (πορτοκαλί), κακή (κόκκινη).
- ❖ **Ποιότητα ανάγνωσης ανά read:** εμφανίζει την κατανομή του quality score σε όλες τις ακολουθίες, η οποία δίνει τη δυνατότητα στους χρήστες να δουν εάν ένα υποσύνολο των ακολουθιών έχει γενικά τιμές χαμηλής ποιότητας.
- ❖ **Περιεκτικότητα σε %ATCG ανά βάση αλληλουχιών:** παρέχει την αναλογία κάθε βάσης DNA (A, T, C, G) που βρίσκεται σε μια δεδομένη θέση σε όλες τις αλληλουχίες.
- ❖ **Περιεκτικότητα σε GC ανά read:** εμφανίζει την κατανομή GC σε όλες τις αλληλουχίες σε όλο το μήκος και τη συγκρίνει με μια μοντελοποιημένη κανονική κατανομή της περιεκτικότητας σε GC.
- ❖ **Περιεκτικότητα σε βάση N:** εμφανίζει το ποσοστό που κλήθηκε μια βάση N να τοποθετηθεί σε κάθε θέση.
- ❖ **Κατανομή του μήκους των reads:** εμφανίζει την κατανομή των μεγεθών reads σε όλες τις αλληλουχίες και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πλατφόρμα προσδιορισμού αλληλουχίας.
- ❖ **Επίπεδα διπλοτυπιών στα reads:** υπολογίζει τον βαθμό διπλασιασμού για κάθε αλληλουχία σε μια βιβλιοθήκη.
- ❖ **Υπερεκπροσωπούμενες αλληλουχίες:** παραθέτει όλες τις αλληλουχίες που αποτελούν περισσότερο από το 0,1% του συνόλου και επομένως μπορεί να υποδηλώνει ότι είναι εξαιρετικά βιολογικά σημαντικές ή πως η βιβλιοθήκη έχει μολυνθεί.
- ❖ **Περιεκτικότητα προσαρμογέα (adapter):** παρουσιάζει την αναλογία των αλληλουχιών που έχουν μια ακολουθία προσαρμογέα σε μια δεδομένη θέση. Αυτό βοηθάει στο να αποφασιστεί εάν υπάρχει σημαντική ποσότητα προσαρμογέα στις αλληλουχίες και μπορεί να υποστεί περικοπή. (Assess Read Quality with FastQC - v0.11.9, 2019)

Στη συνέχεια, είναι η σειρά της συνένωσης. Τα δύο, δηλαδή, συζευγμένα FASTQ αρχεία που προκύπτουν από την αλληλούχιση συνενώνονται, με σκοπό να προκύψει ένα διάβασμα για την κάθε αλληλουχία. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ειδικών αλγορίθμων, οι οποίοι επιλέγουν για κάθε θέση τη βάση με το μεγαλύτερο quality score, στηριζόμενοι στην ποιότητα διαβάσματος των βάσεων, ώστε η προκύπτουσα αλληλουχία να παρουσιάζει όσο το δυνατόν λιγότερα λάθη. Ο αλγόριθμος απορρίπτει τις αλληλουχίες που έχουν πολύ χαμηλή ποιότητα, καθώς και τις αλληλουχίες που έχουν διαβαστεί μόνο μία φορά.

4. Ανάλυση δεδομένων αλληλούχησης

Τα δεδομένα αλληλούχησης αναλύονται χρησιμοποιώντας το DADA2. Το σημείο εκκίνησης του DADA2 είναι το σύνολο των αρχείων FASTQ, τα οποία έχουν υποστεί διαχωρισμό ανά δείγμα και από τα οποία έχουν ήδη αφαιρεθεί οι προσαρμογείς. Από την άλλη το τελικό προϊόν είναι ένας πίνακας παραλλαγής αλληλουχίας αμπλικονίου (Amplicon Sequence Variant, ASV), ο οποίος καταγράφει πόσες φορές παρατηρήθηκε κάθε ASV σε κάθε δείγμα. Σε επόμενο στάδιο, μέσω του Phyloseq R, που επιτρέπει την ανάλυση δεδομένων μικροβιώματος, προσδιορίζεται η ταξινόμηση των αλληλουχιών που εξήχθησαν. (DADA2 Pipeline Tutorial (1.16))

4.1 Ανάλυση δεδομένων μέσω του DADA2

Για την ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης ακολουθούνται οι οδηγίες του εγχειριδίου του DADA2 έκδοση 1.16.

Πρώτο βήμα αποτελεί ο **έλεγχος των προφίλ ποιότητας ανάγνωσης** και ειδικότερα η οπτικοποίηση των προφίλ ποιότητας αρχικά των forward reads και έπειτα των reverse reads. Αυτό έχει ως σκοπό τη δημιουργία θερμικών χαρτών που απεικονίζουν τη συχνότητα που έχει κάθε quality score σε κάθε θέση βάσης.

Ακολουθεί το **φιλτράρισμα και η περικοπή**, όπου οι αλληλουχίες επιλέγονται με βάση τον αριθμό των σφαλμάτων και το μήκος της αλληλουχίας και αφαιρούνται οι ουρές χαμηλής ποιότητας. Οι τυπικές παράμετροι φιλτραρίσματος που χρησιμοποιούνται είναι το $\text{maxN}=0$, καθώς το DADA2 δεν απαιτεί N, $\text{truncQ}=2$, $\text{rm.phix}=\text{TRUE}$ και $\text{maxEE}=2$. Μέσω της παραμέτρου maxEE ορίζεται ο μέγιστος αριθμός "αναμενόμενων σφαλμάτων" που επιτρέπεται σε μια ανάγνωση. Επιπλέον, χρησιμοποιείται η παράμετρος truncLen για την αφαίρεση αλληλουχιών που είναι μικρότερες από έναν συγκεκριμένο αριθμό βάσεων ανάλογα με τον εκκινητή που χρησιμοποιείται.

Αφού διεξαχθούν τα προηγούμενα βήματα, έρχεται το στάδιο της **συγχώνευσης των reads**. Πραγματοποιείται, δηλαδή, συγχώνευση των forward και reverse reads μαζί προκειμένου να λάβουμε τις πλήρεις αλληλουχίες από τις οποίες έχει απομακρυνθεί ο «θόρυβος». Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ευθυγράμμισης των forward reads με τα αντίστροφα συμπληρωματικά των αντίστοιχων reverse reads. Στη συνέχεια, κατασκευάζονται οι συγχωνευμένες αλληλουχίες "contig", μόνο εφόσον τα forward και reverse reads επικαλύπτονται τουλάχιστον κατά 12 βάσεις και είναι πανομοιότυπες μεταξύ τους στην περιοχή επικάλυψης.

Έπειτα, έρχεται η σειρά της **κατασκευής του πίνακα αλληλουχιών**. Πρόκειται για ένα πίνακα που περιέχει τις *παραλλαγές αλληλουχίας αμπλικονίου (ASVs)*, που αποτελεί μια υψηλότερης ανάλυσης έκδοση του πίνακα *λειτουργικών ταξινομικών μονάδων (Operational Taxonomic Units, OTUs)*, που παράγεται με παραδοσιακές μεθόδους. Στην περίπτωση των OTUs, παρόμοιες αλληλουχίες που παρουσιάζουν ομοιότητα σε επίπεδο $\geq 97\%$, ομαδοποιούνται και συγκεντρώνονται σε μια αντιπροσωπευτική αλληλουχία, που ονομάζεται OTU. Οι παραλλαγές αλληλουχίας αμπλικονίου (ASVs) είναι OTUs που ορίζονται από 100% ομοιότητα αλληλουχίας. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης ASVs περιλαμβάνουν βελτιωμένη ταξινομική ανάλυση, καθώς είναι σχετικά εύκολο να ευθυγραμμιστούν οι νέες αναγνώσεις χρησιμοποιώντας ένα όριο ομοιότητας αλληλουχίας 100% σε μια βάση δεδομένων

αναφοράς ASVs, ενώ είναι πιο περίπλοκο να ευθυγραμμιστούν οι νέες αναγνώσεις σε μια βάση δεδομένων αναφοράς OTUs (Porter & Hajibabaei, 2020; Muhamad Rizal, 2020).

Ένα ακόμα σημαντικό βήμα στην ανάλυση των δεδομένων, είναι η **απομάκρυνση των χιμαιρικών μορίων**. Ο όρος χίμαιρα αναφέρεται σε μια ενιαία αλληλουχία DNA που προέρχεται από πολλαπλές μητρικές αλληλουχίες. Το dada διορθώνει τα λάθη αντικατάστασης και μικρές προσθήκες-αφαιρέσεις βάσεων, ωστόσο οι χίμαιρες παραμένουν. Χρήσιμη σε αυτό φαίνεται η ακρίβεια των παραλλαγών ακολουθίας, που μετά την αποθρομβοποίηση καθιστά τον εντοπισμό χιμαιρικών ASVs απλούστερο από ότι στην περίπτωση των OTUs. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα τα χιμαιρικά μόρια να προσδιοριστούν, αν ανακατασκευαστούν μέσω συνδυασμού του αριστερού και του δεξιού τμήματος δύο άφθονων μητρικών αλληλουχιών. Μέσω του DADA2 μπορεί να υπολογιστεί και η συχνότητα των χιμαιρικών αλληλουχιών, η οποία ποικίλει ανάλογα με το σύνολο δεδομένων και εξαρτάται από παράγοντες, όπως οι πειραματικές διαδικασίες και η πολυπλοκότητα του δείγματος.

Ένα στάδιο πριν την ταξινόμηση, που είναι και απαραίτητο γι' αυτήν, είναι η εξέταση του αριθμού των αναγνώσεων που προκύπτουν σε κάθε βήμα της διαδικασίας, δηλαδή η **συνολική πορεία των reads**.

Σε αυτό το σημείο, συνήθως, εκχωρείται **ταξινόμηση** στις παραλλαγές της αλληλουχίας. Η συνάρτηση "**Assign Taxonomy**" από τη μία εισάγει ένα σύνολο αλληλουχιών που χρειάζεται να ταξινομηθούν και ένα σύνολο αλληλουχιών αναφοράς με γνωστή ταξινόμηση και από την άλλη εξάγει ταξινομικές αναλύσεις. Το dada2, συγκεκριμένα, εφαρμόζει μια μέθοδο για την πραγματοποίηση ταξινομήσεων σε επίπεδο ειδών, στηριζόμενο στην ακριβή αντιστοίχιση μεταξύ ASV και αλληλουχιμένων στελεχών αναφοράς. Η ακριβής αντιστοίχιση, δηλαδή η 100% ομοιότητα, φαίνεται ο πιο κατάλληλος τρόπος για να εκχωρηθούν είδη με βάση τα θραύσματα του γονιδίου 16S. Η ταξινόμηση ξεκινάει με τη δημιουργία ενός **πίνακα για την επιθεώρηση των ταξινομικών εκχωρήσεων**.

Απαραίτητο βήμα για τη συνέχεια αποτελεί η **απομάκρυνση των αλληλουχιών που προέρχονται από χλωροπλάστες και μιτοχόνδρια**, καθώς το γονίδιο 16S συναντάται και σε αυτά τα οργανίδια. Με αυτό το βήμα ολοκληρώνεται το τμήμα του **DADA2** και για τη συνέχεια απαιτείται η μεταφορά στο **Phyloseq**.

4.2 Επεξεργασία και οπτικοποίηση αποτελεσμάτων μέσω του Phyloseq

Το phyloseq είναι ένα πακέτο της R που προσφέρει διαδραστική ανάλυση και γραφικά δεδομένα για την απογραφή του μικροβιώματος. Συγκεκριμένα, αποτελεί ένα εργαλείο για την εισαγωγή, αποθήκευση, ανάλυση και γραφική απεικόνιση σύνθετων δεδομένων φυλογενετικής αλληλούχησης, τα οποία είναι συγκεντρωμένα σε ASVs (Basic storage, access, and manipulation of phylogenetic sequencing data with phyloseq, 2022). Περιέχει έναν πίνακα με ASVs, δείγματα μεταδεδομένων, ταξινομικές αναλύσεις και αλληλουχίες αναφοράς. Το phyloseq αξιοποιεί πολλά από τα διαθέσιμα εργαλεία στην R σχετικά με την οικολογία και τη φυλογενετική ανάλυση, ενώ χρησιμοποιεί προηγμένα συστήματα γραφικών για να παράγει σύνθετα φυλογενετικά δεδομένα. Γενικά, το phyloseq επιδιώκει να διευκολύνει τη χρήση της R για αποτελεσματική διαδραστική και αναπαράξιμη ανάλυση δεδομένων φυλογενετικής αλληλούχησης υψηλής απόδοσης ομαδοποιημένων σε ASVs (Phyloseq: Explore microbiome profiles using R).

Ειδικότερα στις αναλύσεις και τις οπτικοποιήσεις που πραγματοποιούνται σε αυτό το στάδιο συγκαταλέγονται η δημιουργία ταξινομικού πίνακα για τα ASVs και το πλήθος τους σε κάθε δείγμα, η κατασκευή ραβδογραμμάτων (barplots) που παρουσιάζουν τόσο τις οικογένειες όσο και τα γένη των βακτηρίων κάθε δείγματος ιχθυοτροφών, όπως και την αφθονία τους, η αναπαράσταση της σχέσης των διαφορετικών γενών βακτηρίων στα δείγματα μέσω του φυλογενετικού δέντρου, η παρουσίαση των γραφημάτων α-ποικιλότητας με βάση τους δείκτες Shannon και Simpson και, τέλος, η έκθεση του διαγράμματος «rarecurve» για τα είδη των βακτηρίων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

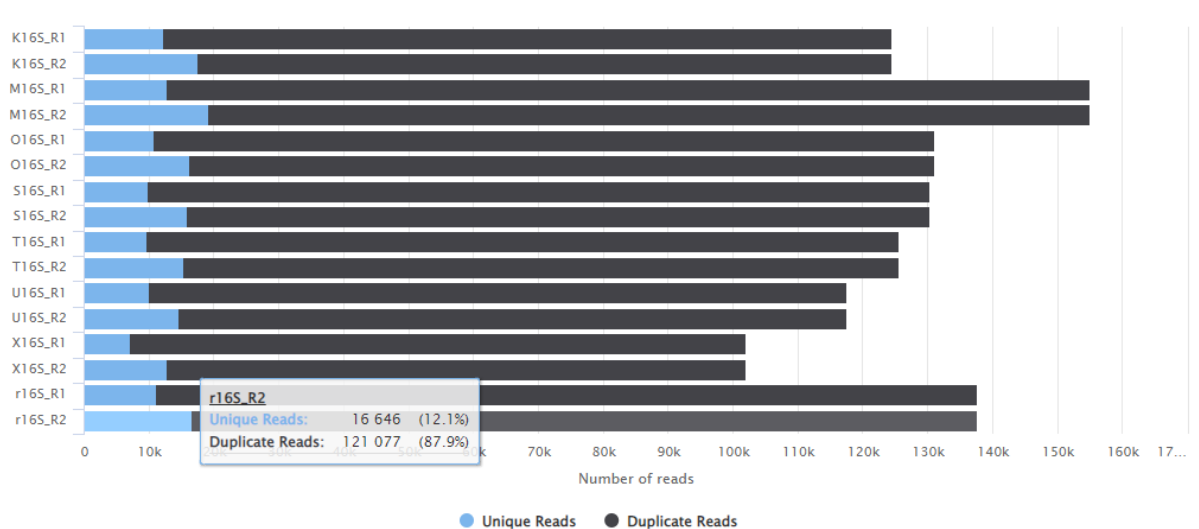
1. Ποιοτικός έλεγχος των αρχείων FASTQ

Μέσω του εργαλείου MultiQC είναι δυνατή η συγκέντρωση των στατιστικών αναλύσεων από το σύνολο των δειγμάτων σε μία μόνο αναφορά και η δημιουργία γραφημάτων, που παρουσιάζουν τον μέσο όρο για κάθε μία από τις προαναφερθείσες ενότητες. Συγκεκριμένα, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 2, το MultiQC παρέχει περιγραφικά στατιστικά, στα οποία συγκαταλέγονται το ποσοστό διπλών reads, το ποσοστό περιεκτικότητας σε GC, ο μέσος όρος μήκους των reads και ο αριθμός των συνολικών αλληλουχιών για κάθε δείγμα.

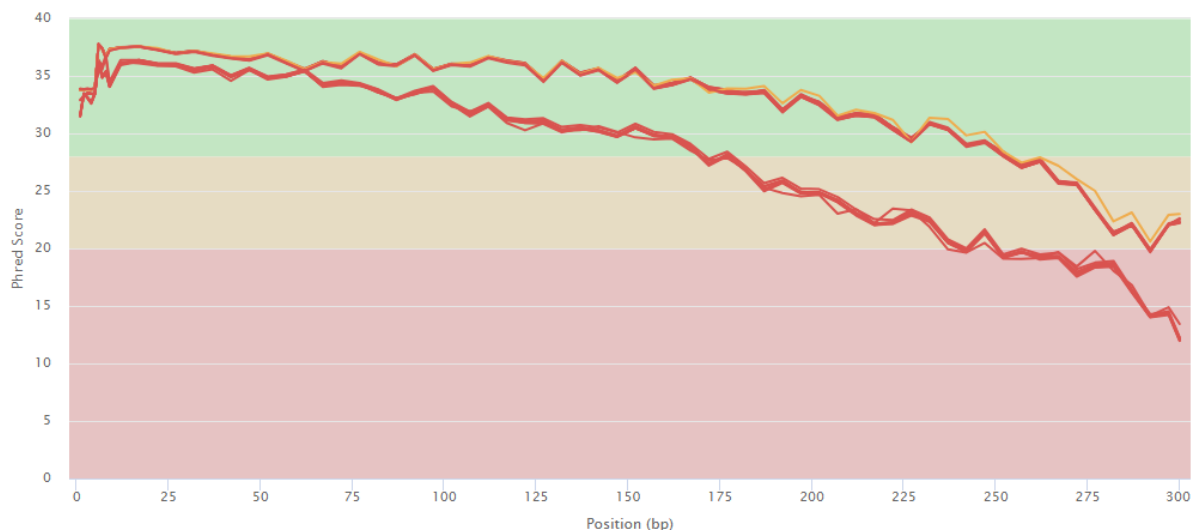
Πίνακας 2: Περιγραφικά στατιστικά των δεδομένων αλληλούχισης ανά δείγμα

Sample Name	% Dups	% GC	Read Length	M Seqs
K16S_R1	90.2%	53%	294 bp	0.1
K16S_R2	85.8%	55%	292 bp	0.1
M16S_R1	91.8%	53%	297 bp	0.2
M16S_R2	87.6%	55%	295 bp	0.2
O16S_R1	91.8%	53%	297 bp	0.1
O16S_R2	87.6%	55%	295 bp	0.1
S16S_R1	92.4%	54%	300 bp	0.1
S16S_R2	87.9%	55%	298 bp	0.1
T16S_R1	92.3%	54%	299 bp	0.1
T16S_R2	87.8%	55%	297 bp	0.1
U16S_R1	91.4%	54%	291 bp	0.1
U16S_R2	87.6%	55%	289 bp	0.1
X16S_R1	92.9%	55%	296 bp	0.1
X16S_R2	87.4%	56%	296 bp	0.1
r16S_R1	91.9%	53%	299 bp	0.1
r16S_R2	87.9%	55%	297 bp	0.1

Επιπρόσθετα, τα Σχήματα 1 και 2 παρουσιάζουν μία συνολική εικόνα για τις μετρήσεις αλληλουχιών για κάθε δείγμα και τη μέση τιμή της ποιότητας σε κάθε θέση βάσης στην ανάγνωση, αντίστοιχα.



Σχήμα 1: Μετρήσεις αλληλουχιών



Σχήμα 2: Ιστογράμματα ποιότητας αλληλουχίας

2. Ανάλυση δεδομένων μέσω του DADA2

Μέσω του DADA2 και συγκεκριμένα μέσω του **φιλτραρίσματος και της περικοπής** οι αλληλουχίες υπόκεινται σε μια διαδικασία διαλογής, με αποτέλεσμα ο αριθμός των reads κάθε δείγματος μετά από αυτό το βήμα να μειώνεται. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3, η στήλη «reads in» αντιστοιχεί στο αριθμό των reads πριν διεξαχθεί το φιλτράρισμα και η περικοπή, ενώ η στήλη «reads out» στον αριθμό των αλληλουχιών που προκύπτουν έπειτα.

Πίνακας 3: Αριθμός reads πριν και μετά το φιλτράρισμα

	reads.in	reads.out
K16S_R1.fastq	124431	55750
M16S_R1.fastq	154949	69866
O16S_R1.fastq	131041	59819
r16S_R1.fastq	137723	65487
S16S_R1.fastq	130302	60270
T16S_R1.fastq	125524	57337
U16S_R1.fastq	117560	53069
X16S_R1.fastq	101985	45145

Μέσω των εντολών του DADA2 για την **απομάκρυνση των χιμαιρικών μορίων** προκύπτει για τα έξι πρώτα δείγματα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4, πως στο δείγμα K16S από τις 124.431 αλληλουχίες που εισήχθησαν οι 32.428 είναι μη χιμαιρικά μόρια, στο M16S από τις 154.949 αλληλουχίες οι 40.396 ανήκουν σε μη χιμαιρικά, ενώ στο O16S από τις 131.041 οι 33.801 αντιστοιχούν στα μη χιμαιρικά. Όσον αφορά το δείγμα r16S οι 37.944 από τις 137.723 αλληλουχίες που εισήχθησαν είναι μη χιμαιρικά μόρια, στο S16S οι 40.228 από τις 130.302 και, τέλος, στο T16S από τις 125.524 αλληλουχίες οι 37.286 αντιστοιχούν στα μη χιμαιρικά μόρια. Μετά την αφαίρεση της χίμαιρας πρέπει το μεγαλύτερο μέρος των αλληλουχιών να παραμένει, ωστόσο δεν είναι σπάνιο να αφαιρείται η πλειονότητα των παραλλαγών αλληλουχίας, όπως σε αυτήν την περίπτωση. Αυτό συνήθως προκαλείται από αλληλουχίες εκκινητών με διφορούμενα νουκλεοτίδια, οι οποίες δεν απομακρύνθηκαν πριν από την έναρξη του DADA2.

Πιο ειδικά, ο Πίνακας 4 είναι το αποτέλεσμα που εξάγεται μέσω του βήματος για τη **συνολική πορεία των reads**, στον οποίον κάθε σειρά αντιστοιχεί σε ένα από τα έξι πρώτα δείγματα και οι στήλες αντιστοιχούν στον αριθμό των reads που εισήχθησαν, των reads μετά το φιλτράρισμα, των αποθρομβοποιημένων forward reads, των αποθρομβοποιημένων reverse reads, των reads μετά τη συγχώνευση και τέλος των μη χιμαιρικών μορίων. Το αποτέλεσμα δείχνει πως η πλειονότητα των reads υπέστη κατεργασία, καθώς παρατηρείται αρκετά μεγάλη πτώση.

Πίνακας 4: Συνολική πορεία των reads

	input	filtered	denoisedF	denoisedR	merged	nonchim
K16S	124431	55750	54353	54737	47050	32428
M16S	154949	69866	68395	68851	58845	40396
O16S	131041	59819	58473	58844	50235	33801
r16S	137723	65487	63947	64535	55035	37944
S16S	130302	60270	59322	59556	53155	40228
T16S	125524	57337	56250	56647	49968	37286

Ο πίνακας των **ταξινομικών αναθέσεων** που προκύπτει από το πρώτο βήμα της ταξινόμησης, ταξινομεί τα ASVs από όλα τα δείγματα. Ειδικότερα, κάθε σειρά του Πίνακα 5

αποτελεί ένα από τα πρώτα έξι ASVs και οι επτά στήλες αντιστοιχούν στο όνομα (σειρά) του ASV, στο βασίλειο, στο φύλο, στην κλάση, στην τάξη, στην οικογένεια και στο γένος του οργανισμού που ταυτοποιήθηκε.

Πίνακας 5: Πίνακας ταξινομικών αναθέσεων

Kingdom	Phylum	Class	Order
[1,] "Bacteria"	"Proteobacteria"	"Alphaproteobacteria"	"Rickettsiales"
[2,] "Bacteria"	"Cyanobacteria"	"Cyanobacteriia"	"Chloroplast"
[3,] "Bacteria"	"Cyanobacteria"	"Cyanobacteriia"	"Chloroplast"
[4,] "Bacteria"	"Firmicutes"	"Bacilli"	"Lactobacillales"
[5,] "Bacteria"	"Proteobacteria"	"Gammaproteobacteria"	"Methylococcales"
[6,] "Bacteria"	"Firmicutes"	"Bacilli"	"Aneurinibacillales"
Family	Genus		
[1,] "Mitochondria"	NA		
[2,] NA	NA		
[3,] NA	NA		
[4,] "Lactobacillaceae"	"Weissella"		
[5,] "Methylococcaceae"	"Methylococcus"		
[6,] "Aneurinibacillaceae"	"Aneurinibacillus"		

Αφού δοθεί η εντολή για την απομάκρυνση των ASVs που ανήκουν στους χλωροπλάστες προκύπτει ο αριθμός των ASVs που απομένουν και συγκεκριμένα εδώ είναι 855 ASVs για τα 8 δείγματα συνολικά. Έπειτα, μέσω της εντολής για ταξινόμηση προκύπτει πως τα 855 ASVs ταξινομούνται σε 6 κατηγορίες. Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και έπειτα από την απομάκρυνση των ASVs των μιτοχονδρίων, που απομένουν συνολικά 817 ASVs και από τα 8 δείγματα.

3. Ανάλυση δεδομένων μέσω του Phyloseq

Το Phyloseq παρέχει τη δυνατότητα ταξινομικής ανάλυσης και γραφικής απεικόνισης των δεδομένων που σχετίζονται με το μικροβίωμα, προσφέροντας τόσο συγκεντρωτικούς πίνακες όσο και βοηθητικά σχήματα.

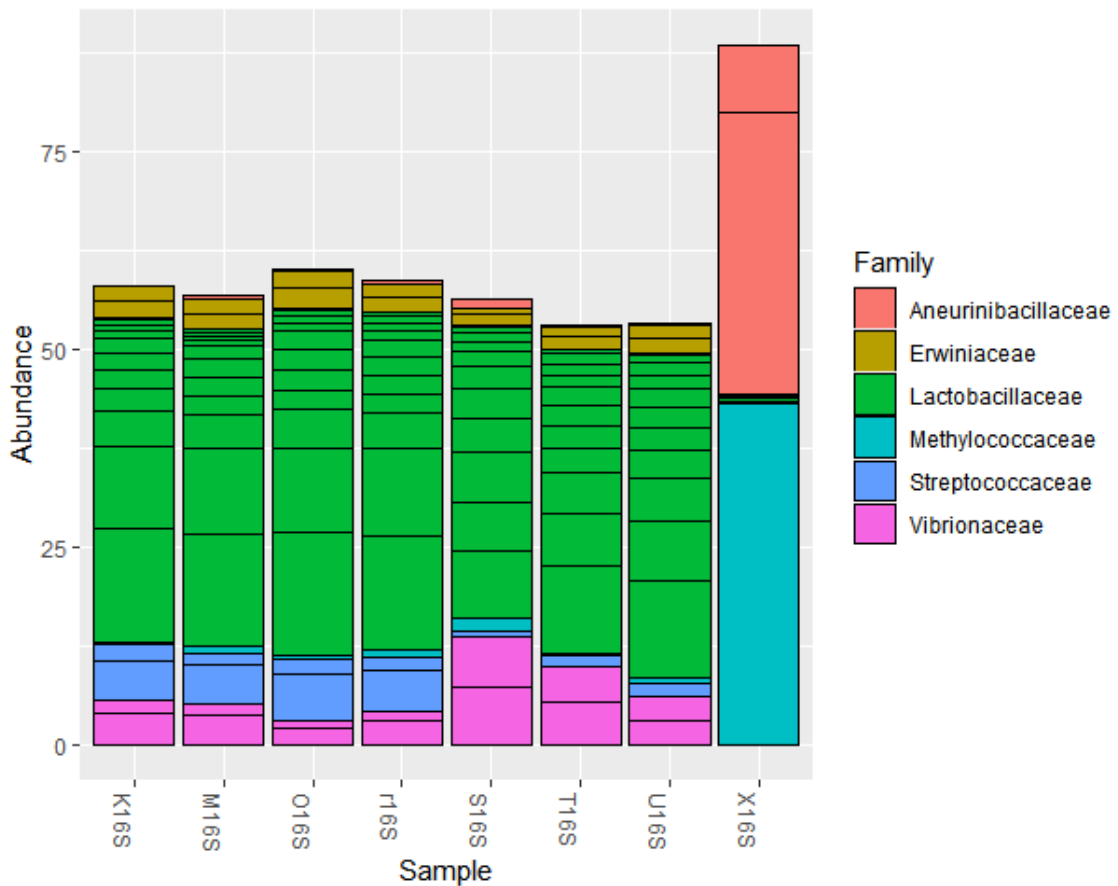
Αρχικά, μέσω των αναλύσεων που προσφέρει μπορεί να δημιουργηθεί ένας κατατοπιστικός πίνακας για την ταξινόμηση των ASVs και το πλήθος τους σε κάθε δείγμα. Συγκεκριμένα, ο Πίνακας 6 περιέχει τα ASVs που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αφθονία, την ταξινόμηση τους σε οικογένεια και γένος και τις φορές που συναντάται κάθε ένα από αυτά τα ASVs σε κάθε δείγμα.

Πίνακας 6: Συγκεντρωτικός πίνακας των πιο άφθονων ASVs

Row.names	Family	Genus	K16S	M16S	O16S	r16S	S16S	T16S	U16S	X16S
asv001	Lactobacillaceae	Weissella	1485	1814	1536	1663	1149	1361	1189	65
asv004	Lactobacillaceae	Ligilactobacillus	1079	1418	1067	1293	271	299	254	16
asv009	Streptococcaceae	Streptococcus	529	660	590	602	0	7	8	0
asv008	Lactobacillaceae	Limosilactobacillus	444	564	478	531	115	175	87	10
asv005	Vibrionaceae	Photobacterium	411	485	215	357	1001	665	311	26
asv013	Lactobacillaceae	Limosilactobacillus	307	308	255	278	144	172	151	0
asv020	Lactobacillaceae	Lactobacillus	227	306	255	263	32	57	27	0
asv015	Lactobacillaceae	HT002	219	286	235	270	170	178	164	0
asv018	Erwiniaceae	Pantoea	217	256	204	207	120	154	155	0
asv006	Lactobacillaceae	Lactobacillus	207	226	243	276	859	623	527	32
asv019	Streptococcaceae	Streptococcus	203	179	181	200	95	184	148	8
asv021	Lactobacillaceae	Lacticaseibacillus	198	237	173	191	112	108	87	0
asv016	Erwiniaceae	Pantoea	197	240	248	217	170	211	175	6
asv026	Lactobacillaceae	Lactobacillus	192	221	193	199	36	44	34	0
asv028	Family XI	Tepidimicrobium	183	246	107	144	47	35	16	0
asv030	Streptococcaceae	Streptococcus	183	178	178	217	0	0	0	0
asv010	Vibrionaceae	Photobacterium	168	185	101	147	882	556	292	0
asv029	Lactobacillaceae	HT002	156	230	191	200	0	0	0	0
asv031	Lactobacillaceae	Lactobacillus	145	178	137	148	32	0	0	0
asv027	Microbacteriaceae	Curtobacterium	135	124	162	123	117	106	83	7
asv022	Bifidobacteriaceae	NA	132	277	130	174	118	102	106	11
asv032	Lactobacillaceae	Ligilactobacillus	118	204	131	144	0	0	0	0
asv007	Lactobacillaceae	Leuconostoc	44	51	34	52	856	826	740	55
asv012	Lactobacillaceae	Lactobacillus	70	79	100	127	586	346	323	0
asv014	Lactobacillaceae	Ligilactobacillus	77	74	77	105	528	381	286	30
asv017	Lactobacillaceae	NA	81	71	90	119	396	310	231	19
asv025	Lactobacillaceae	Limosilactobacillus	35	57	41	53	341	222	160	20
asv039	Vibrionaceae	Photobacterium	0	0	0	0	275	165	0	0
asv002	Methylococcaceae	Methylococcus	23	131	46	113	254	26	60	9282
asv035	Lactobacillaceae	Lactobacillus	0	0	0	0	221	146	165	0
asv033	Fusobacteriaceae	Cetobacterium	33	53	32	36	215	157	47	8
asv034	Fusobacteriaceae	Psychrilyobacter	46	77	45	59	208	90	42	7
asv036	Peptostreptococcaceae	NA	48	79	38	48	198	91	26	0
asv040	Lactobacillaceae	Leuconostoc	0	0	0	0	161	133	119	0
asv003	Aneurinibacillaceae	Aneurinibacillus	0	67	26	60	156	0	36	7651
asv023	Bacillaceae	Geobacillus	42	40	15	22	94	579	191	0
asv037	Lactobacillaceae	Weissella	17	9	7	0	144	136	158	0
asv046	Bacillaceae	Geobacillus	0	0	0	0	103	124	147	0
asv011	Aneurinibacillaceae	Aneurinibacillus	0	0	0	0	0	10	0	1869
asv024	Xanthomonadaceae	Thermomonas	0	0	6	0	24	0	0	938
asv049	Burkholderiaceae	Ralstonia	0	0	0	0	13	0	0	316
asv066	Carnobacteriaceae	Carnobacterium	0	0	6	0	0	0	0	192
asv073	NA	NA	0	0	0	0	0	0	0	165

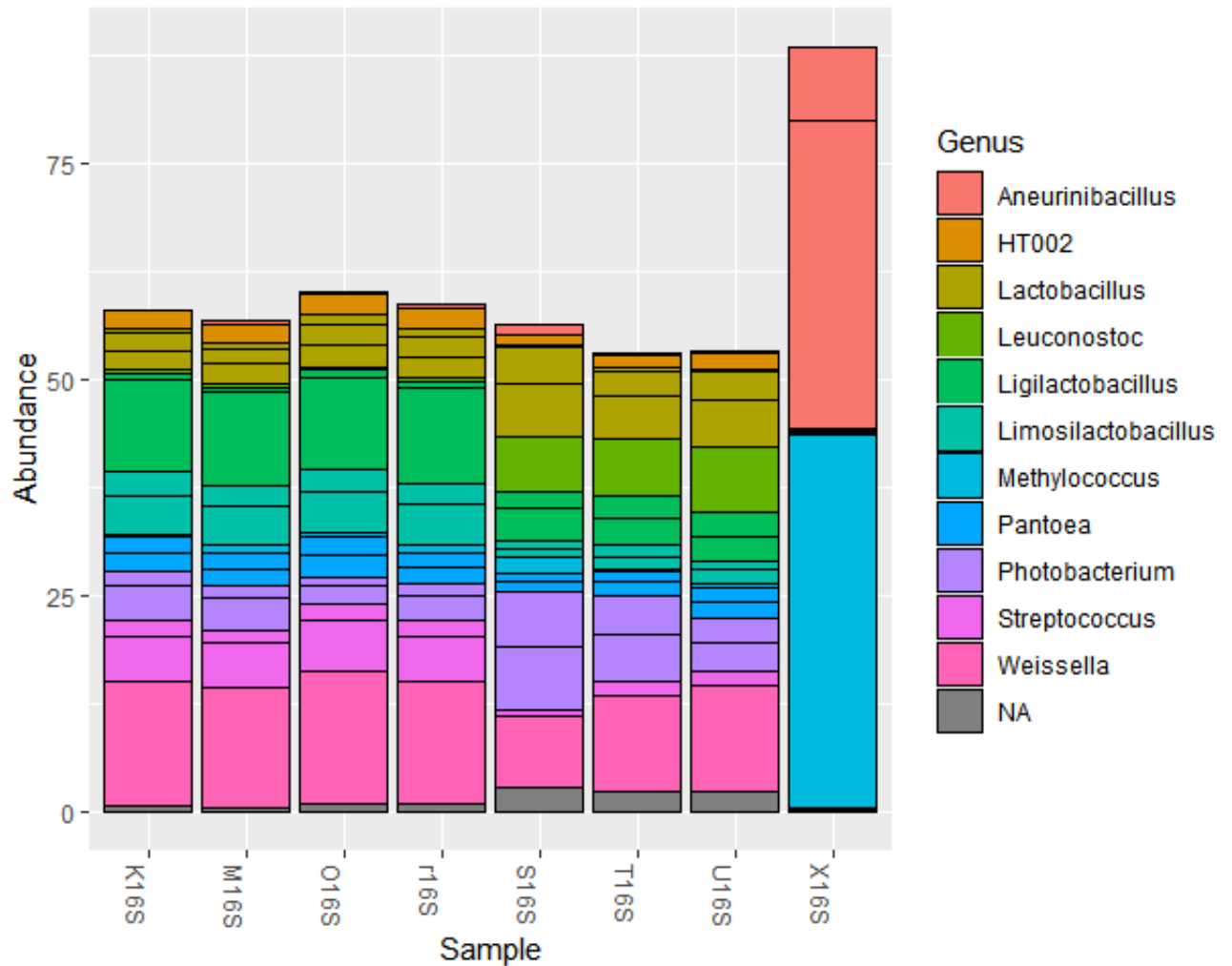
asv081	Aneurinibacillaceae	Aneurinibacillus	0	0	0	0	0	0	0	143
asv116	Burkholderiaceae	Cupriavidus	0	0	0	0	0	0	0	77
asv122	Dysgonomonadaceae	Dysgonomonas	0	0	0	0	0	0	0	72
asv144	Bacillaceae	Bacillus	0	0	0	0	0	0	0	57
asv147	Paenibacillaceae	Fontibacillus	0	0	0	0	0	0	0	55
asv152	Rhizobiaceae	Ochrobactrum	0	0	0	0	0	0	0	51
asv182	Peptostreptococcaceae	Romboutsia	0	0	0	0	0	0	0	36
asv205	Clostridiaceae	Clostridium sensu stricto 1	0	0	0	0	0	0	0	29

Οι ταξινομικές πληροφορίες μέσω του Phyloseq μπορούν να απεικονιστούν σε γραφήματα για μία ευκολότερη προσέγγιση. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το ραβδόγραμμα (Σχήμα 3) παρουσιάζει τις οικογένειες των βακτηρίων που συναντώνται σε κάθε δείγμα ιχθυοτροφών (ένα χρώμα εκπροσωπεί μία οικογένεια) και ειδικότερα δείχνει και την αφθονία κάθε οικογένειας μέσα σε ένα δείγμα. Για τη δημιουργία του ραβδογράμματος χρησιμοποιούνται οι οικογένειες βακτηρίων που αντιστοιχούν στα πιο άφθονα ASVs, όπως φαίνονται και στον Πίνακα 6.



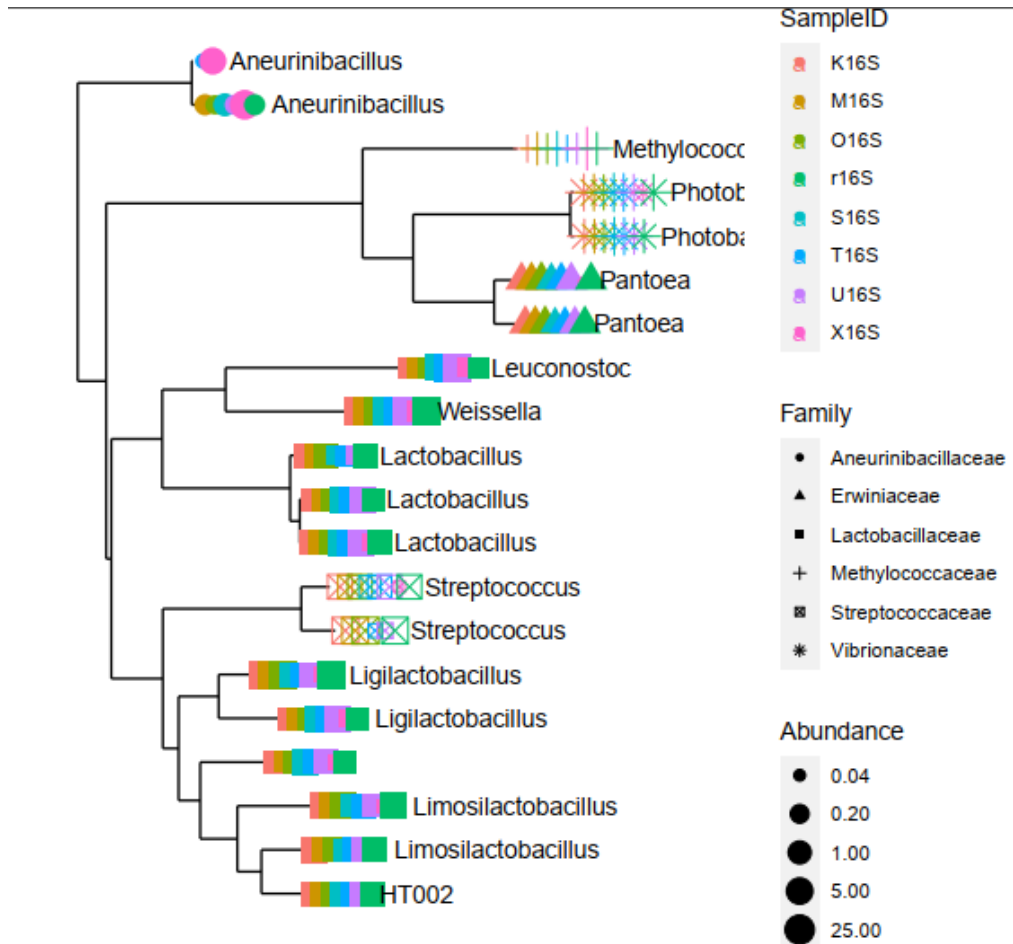
Σχήμα 3: Ραβδόγραμμα για οικογένειες ανά δείγμα

Παράλληλα, για μία αναλυτικότερη μελέτη η ταξινόμηση μπορεί να γίνει με βάση το γένος των βακτηρίων και έτσι το ραβδόγραμμα να παρουσιάζει τα γένη και την αφθονία των βακτηρίων που ταυτοποιούνται σε κάθε δείγμα (Σχήμα 4). Τα *Aneurinibacillus*, *HT002*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Methylococcus*, *Pantoea*, *Photobacterium*, *Streptococcus* και *Weissella* είναι τα γένη των βακτηρίων που ανιχνεύονται από τα πολυπληθέστερα ASVs στα δείγματα ιχθυοτροφών.



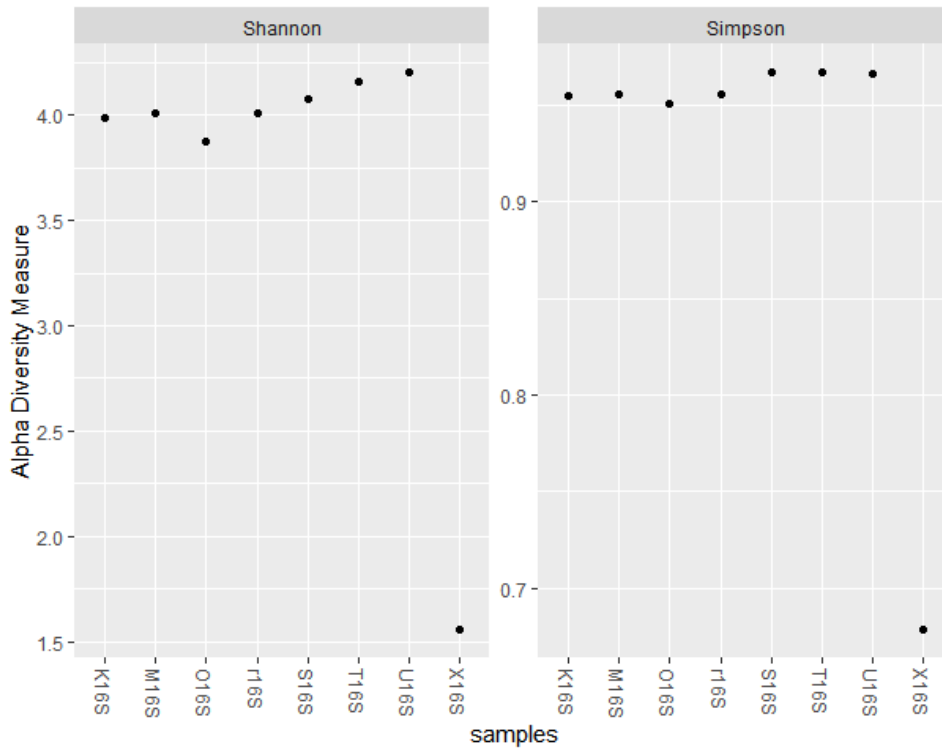
Σχήμα 4: Ραβδόγραμμα για γένη ανά δείγμα

Το φυλογενετικό δέντρο αποτελεί τη γραφική απεικόνιση μιας φυλογενετικής υπόθεσης, δηλαδή περιγράφει την καταγωγή ενός συνόλου από τάξα. Το φυλογενετικό δέντρο σε αυτήν την περίπτωση (Σχήμα 5) αναπαριστά τα πολλά διαφορετικά γένη βακτηρίων που εντοπίζονται στα δείγματα των ιχθυοτροφών και τη σχέση που τα συνδέει. Κάθε δείγμα απεικονίζεται με ένα διαφορετικό χρώμα και κάθε οικογένεια με ένα διαφορετικό σύμβολο.



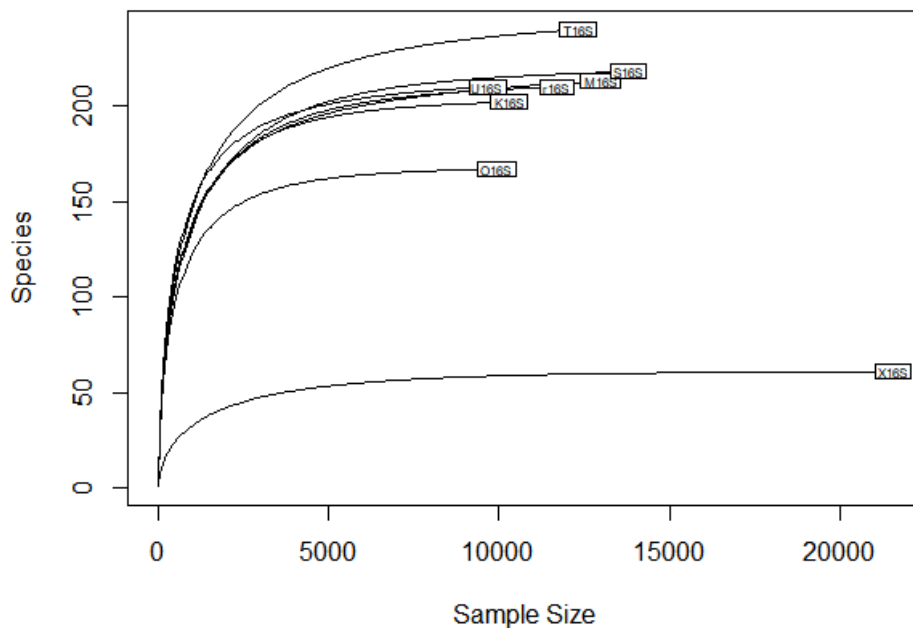
Σχήμα 5: Φυλογενετικό δέντρο για τη σχέση των γενών των βακτηρίων

Επιπλέον, μέσω του Phyloseq εξαγονται και τα γραφήματα α-ποικιλότητας. Ο όρος α-ποικιλότητα αναφέρεται στη μέση ποικιλότητα ειδών σε ένα υπάρχον σύνολο δεδομένων που αποτελείται από υπομονάδες, που συγκεκριμένα εδώ αναφέρεται στα δείγματα των ιχθυοτροφών. Οι πιο γνωστοί δείκτες ποικιλότητας είναι οι δείκτες Shannon και Simpson, οι οποίοι λαμβάνουν υπόψη την αναλογική αφθονία των ειδών. Έτσι, τα παρακάτω γραφήματα (Σχήμα 6) παρουσιάζουν την α-ποικιλότητα σε σχέση με τα δείγματα ιχθυοτροφών με βάση τους δείκτες Shannon και Simpson.



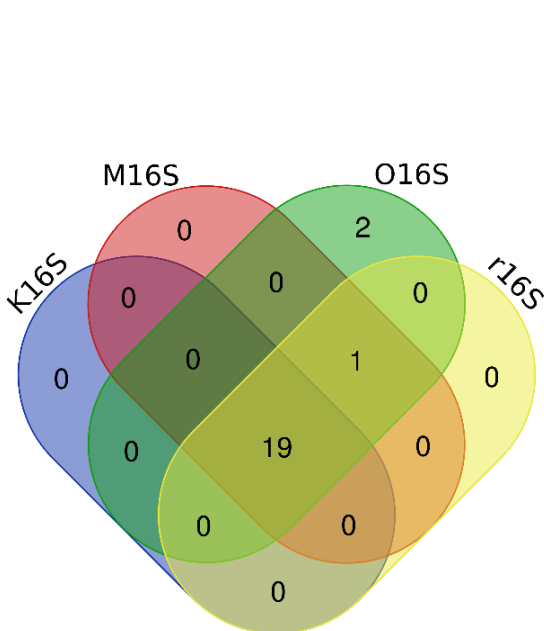
Σχήμα 6: Γραφήματα α-ποικιλότητας σε σχέση με τα δείγματα

Τέλος, το διάγραμμα «rarecurve» μπορεί να δώσει πληροφορίες σε μία μελέτη βιολογίας, καθώς αποτελεί μια γραφική παράσταση του αριθμού των ειδών σε συνάρτηση με το μέγεθος των δειγμάτων. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 7, οι καμπύλες αναπτύσσονται γενικά γρήγορα στην αρχή, καθώς πραγματοποιείται ο εντοπισμός των πιο κοινών ειδών στα προς μελέτη δείγματα των ιχθυοτροφών, ενώ στη συνέχεια σχεδόν σταθεροποιούνται, αφού παραμένουν μόνο τα σπανιότερα είδη για εντοπισμό.

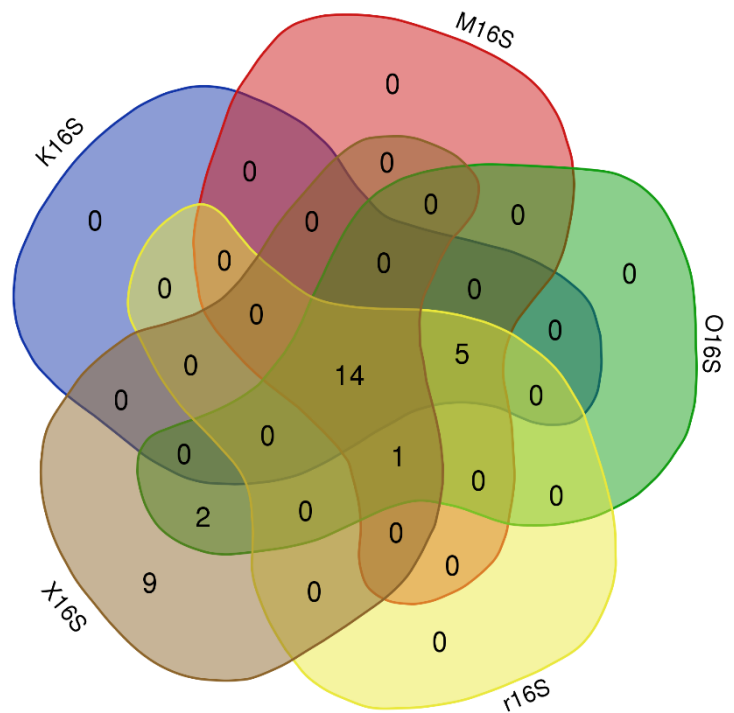


Σχήμα 7: Διάγραμμα «rarecurve» για τα είδη των βακτηρίων

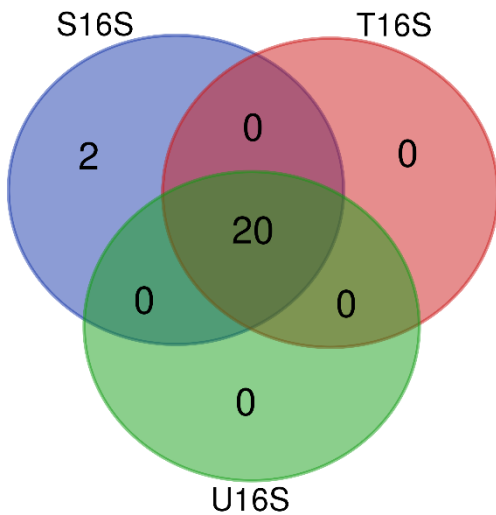
Πέρα από τα εργαλεία που παρέχει, όμως, το Phyloseq χρήσιμα για την κατανόηση και την απλούστευση των αποτελεσμάτων των αναλύσεων είναι και τα διαγράμματα Venn. Αυτά παρουσιάζουν τον αριθμό των κοινών στοιχείων, αλλά και αυτών που διαφοροποιούνται ανάμεσα σε δύο ή παραπάνω λίστες. Εδώ είναι σημαντικά λόγω του μεγάλου αριθμού βακτηριακών γενών και των αρκετών δειγμάτων που υπάρχουν, καθώς βοηθούν στο να γίνει πιο εύκολη η σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων ιχθυοτροφών ως προς τα βακτηριακά γένη που περιέχουν. Για την κατασκευή των διαγραμμάτων Venn χρησιμοποιείται η ιστοσελίδα «Bioinformatics & evolutionary Genomics» και στη συγκεκριμένη περίπτωση κάθε λίστα αντιπροσωπεύει ένα δείγμα και περιέχει τα βακτηριακά γένη που αντιστοιχούν στα πιο άφθονα ASVs του δείγματος αυτού, όπως προκύπτουν από τον Πίνακα 6. Επειδή, όμως, πρόκειται για αρκετά δείγματα, για να είναι πιο ευδιάκριτη η απεικόνιση, τα δείγματα δε συγκρίνονται απευθείας και τα οκτώ μεταξύ τους, αλλά ομαδοποιούνται με βάση το παρόμοιο μοτίβο που παρουσιάζουν στο Σχήμα 4. Τα K16S, M16S, O16S και r16S, δηλαδή, αποτελούν την πρώτη ομάδα, τα S16S, T16S και U16S τη δεύτερη και το X16S διαφοροποιείται τελείως από τις δύο προηγούμενες ομάδες. Έτσι, στη μία περίπτωση κάθε λίστα αποτελεί ένα από τα δείγματα K16S, M16S, O16S και r16S, τα οποία συγκρίνονται μεταξύ τους για να προκύψει το διάγραμμα Venn (Σχήμα 8), που απεικονίζει τον αριθμό των βακτηριακών γενών που είναι κοινά ανάμεσα στα δείγματα, αλλά και τον αριθμό αυτών που συναντώνται μόνο σε κάθε δείγμα. Επίσης, τα δείγματα της πρώτης ομάδας συγκρίνονται με το δείγμα X16S (Σχήμα 9), που εμφανίζεται πολύ διαφοροποιημένο. Στην άλλη περίπτωση, κάθε λίστα αντιστοιχεί σε ένα από τα δείγματα S16S, T16S και U16S για να δημιουργηθεί το διάγραμμα Venn (Σχήμα 10) με τον κοινό αριθμό των βακτηριακών γενών. Τέλος, τα τρία αυτά δείγματα παρατίθενται μαζί με το δείγμα X16S (Σχήμα 11), ώστε να προκύψει πάλι ευδιάκριτα η διαφοροποίησή του από τα υπόλοιπα δείγματα ως προς τα γένη των βακτηρίων.



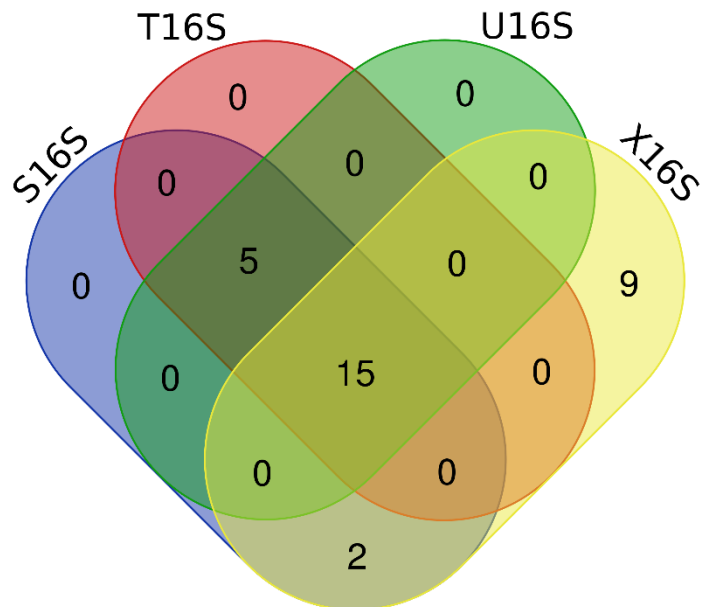
Σχήμα 8: Διάγραμμα Venn για τα δείγματα K16S, M16S, O16S και r16S



Σχήμα 9: Διάγραμμα Venn για τα δείγματα K16S, M16S, O16S, r16S και X16S



Σχήμα 10: Διάγραμμα Venn για τα S16S, T16S και U16S



Σχήμα 11: Διάγραμμα Venn για τα S16S, T16S, U16S και X16S

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο τομέας της υδατοκαλλιέργειας τις τελευταίες δύο δεκαετίες παρουσιάζει ταχεία ανάπτυξη, καθώς αναγνωρίζεται ο σημαντικός του ρόλος στην παγκόσμια επισιτιστική ασφάλεια και διατροφή (FAO, 2022). Οι ρυθμοί αυτοί επιτάσσουν την υδατοκαλλιέργεια να δώσει μεγαλύτερη έμφαση στη διατροφή των ιχθύων και συγκεκριμένα στην ποιότητα της τροφής τους, βασιζόμενη στην επιστημονική σύνθεση των ιχθυοτροφών και τη σωστή τεχνολογική τους επεξεργασία. Προς αυτή την κατεύθυνση της βελτίωσης της ποιότητας των ιχθυοτροφών και της εξασφάλισης της βιωσιμότητας του κλάδου, στρέφεται και η προσπάθεια ανίχνευσης των πρώτων υλών των ιχθυοτροφών. Σε αυτή την προσπάθεια σημαντικοί αρωγοί είναι οι τεχνολογίες αλληλούχισης νέας γενιάς και ιδιαίτερα η αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου, που έχει αποδείξει την αποτελεσματικότητά της στις προσπάθειες προσδιορισμού της βακτηριακής κοινότητας των τροφών. Έτσι και στη συγκεκριμένη εργασία, μέσω της αλληλούχισης και στη συνέχεια μέσω της βοήθειας των προγραμμάτων DADA2 και Phyloseq, πραγματοποιήθηκε ο εντοπισμός των βακτηρίων που συναντώνται σε οχτώ δείγματα ιχθυοτροφών γνωστής και άγνωστης προέλευσης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δεδομένων και την ταξινόμηση των ASVs, τα βακτήρια των οποίων οι ακολουθίες ανιχνεύθηκαν στο γενετικό υλικό που απομονώθηκε από τα δείγματα των ιχθυοτροφών, ανήκουν σε πολλές διαφορετικές οικογένειες. Η εργασία μας επικεντρώθηκε στη μελέτη των βακτηρίων που αντιστοιχούν στα ASVs που συναντώνται σε μεγαλύτερη αναλογία. Οι οικογένειες, λοιπόν, αυτών των βακτηρίων είναι: Aneurinibacillaceae, Erwiniaceae, Lactobacillaceae, Methylococcaceae, Streptococcaceae και Vibrionaceae. Όσον αφορά τα γένη των βακτηρίων, για μία πιο ειδική προσέγγιση, αυτά είναι: *Aneurinibacillus*, *HT002*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Methylococcus*, *Pantoea*, *Photobacterium*, *Streptococcus* και *Weissella*.

Το βακτήριο του γένους **Aneurinibacillus**, το οποίο εντοπίστηκε σε πολύ μεγάλο ποσοστό σε ένα δείγμα ιχθυοτροφής, αναφέρεται ως ένα ριζοβακτήριο, που απομονώθηκε από τη ριζόσφαιρα ενός βοτάνου με φαρμακευτική δράση, του *Valeriana jatamansi* (Hashmi et al., 2020). Μάλιστα, σύμφωνα με τον Selvakumar και την ομάδα του (2020) το *Aneurinibacillus* έχει εδαφική προέλευση και αποτελεί ένα από τα ευεργετικά αερόβια ριζοβακτήρια, καθώς συντελεί στην ανάπτυξη των φυτών και παράγει πολλά αντιμικροβιακά πεπτίδια. Συγκεκριμένα, το γένος αυτό αυξάνει το βάρος του φυτού και προάγει τη βλάστηση των σπόρων και το μήκος των βλαστών και των ριζών, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταστολή των ασθενειών, αφού αναστέλλει την ανάπτυξη παθογόνων (Hashmi et al., 2020). Η συσχέτιση αυτή του *Aneurinibacillus* με την υγεία των φυτών οδηγεί ίσως στο ότι το γένος αυτό απομονώθηκε από τροφές που περιείχαν φυτικά συστατικά. Μία άλλη μελέτη αναφέρει πως το γένος *Aneurinibacillus* χρησιμοποιείται ως προβιοτικό στη διατροφή στην υδατοκαλλιέργεια για να ενισχύσει την ανάπτυξη και την ανοσία των ιχθύων (Bhatnagar & Rathi, 2020). Πράγματι ιχθύες που τρέφονταν με τροφή που περιείχε προβιοτικό βακτήριο *Aneurinibacillus* παρουσίαζαν υψηλότερα επίπεδα ανάπτυξης σε σχέση με το μάρτυρα, όπως και μεγαλύτερη εντερική ενζυματική δραστηριότητα και ανοσολογική απόκριση, αποδεικνύοντας την προσφορά του στην ανάπτυξη, την ανοσία και την ποιότητα της διατροφής των ψαριών (Bhatnagar & Dhillon, 2019; Dhillon & Bhatnagar, 2020). Πέρα, όμως, από αυτήν την κατεύθυνση, ο Guo και οι συνεργάτες του (2022) αναφέρουν πως το *Aneurinibacillus* είναι ένα από τα βακτήρια που προσφέρουν το απαραίτητο μεθάνιο και την αμμωνία για την παρασκευή ενός εμπορικού γεύματος βακτηριακών πρωτεϊνών (FeedKind), που χρησιμοποιείται στη θρέψη υδρόβιων οργανισμών.

Εκτός, όμως, από το γένος *Aneurinibacillus*, στο βακτηριακό πρωτεϊνικό μίγμα FeedKind χρησιμοποιείται και το βακτηριακό γένος **Methylococcus**, το οποίο παρατηρείται πως αντικαθιστά αποτελεσματικά την πρωτεΐνη των ιχθυάλευρων έως και 30%, χωρίς κάποια επίδραση στην ανάπτυξη (Biswas et al., 2020). Επίσης, χρησιμοποιείται σε πολλές εταιρείες για την παραγωγή ζωοτροφών μέσω του φυσικού αερίου. Συγκεκριμένα, το *Methylococcus* στη φύση τρέφεται με το μεθάνιο που απελευθερώνεται από το φυσικό αέριο, το οποίο προέρχεται από την αποσύνθεση νεκρών ψαριών και φύλλων, πολλαπλασιάζεται και όντας πλούσιο σε πρωτεΐνες αποτελεί ιδανική τροφή για τα ψάρια. Ο τρόπος αυτός συμπεριφοράς του βακτηρίου στη φύση ακολουθείται και στο βιομηχανικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα το *Methylococcus* να συνεισφέρει στην παραγωγή μικροβιακής πρωτεΐνης (Koeleman, 2018).

Το βακτηριακό γένος **Lactobacillus** θεωρείται γενικά μη παθογόνο και ασφαλές βακτήριο (Skoronski et al., 2022). Χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων και παρουσιάζει ευεργετικά αποτελέσματα ως προβιοτικό στη διατροφή των ψαριών. Ειδικότερα, μέσω της χορήγησης του από τη μία παράγεται μια ποικιλία αντιμικροβιακών ενώσεων, που έχει τη δυνατότητα να εξουδετερώνει τους παθογόνους μικροοργανισμούς, συνεισφέροντας, έτσι, στον έλεγχο ασθενειών στην υδατοκαλλιέργεια και από την άλλη προσφέρει θεραπευτικές ιδιότητες στην υγεία του εντέρου (Nyman et al., 2017; Skoronski et al., 2022). Επιπλέον, ο Hoseinifar και η ομάδα του (2015) μελέτησαν τις επιδράσεις του *Lactobacillus* ως συμπλήρωμα διατροφής σε ιχθύες και παρατήρησαν πως βελτιώνει την αύξηση του βάρους και συμβάλει στην καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού και στην αντοχή στο στρες της αλατότητας. Ακόμα, το *Lactobacillus* χρησιμοποιείται ευρέως στη διαδικασία της ζύμωσης, η οποία αποτελεί μία τεχνική που βελτιώνει διατροφικά το σογιάλευρο, καθώς μειώνει τους ολιγοσακχαρίτες και το φυτικό οξύ και προάγει το αμινοξικό προφίλ. Σύμφωνα με μελέτες, η χρήση σογιάλευρου έπειτα από ζύμωση στις ιχθυοτροφές οδηγεί σε αύξηση του βάρους των ψαριών και ενισχύει την εντερική τους υγεία (Skoronski et al., 2022). Επομένως, το

Lactobacillus στα δείγματα των ιχθυοτροφών πιθανώς να υποδεικνύει τη χρήση φυτικής πρώτης ύλης.

Το φυσικό ενδιαίτημα του βακτηριακού γένους *Leuconostoc* είναι τα φυτά, από την επιφάνεια των οποίων απομονώνεται τις περισσότερες φορές, όπως είναι το ζαχαροκάλαμο και τα φυλλώδη λαχανικά (Fisher, 2009). Επομένως, η παρουσία του στα δείγματα θα μπορούσε να εξηγηθεί με τη φυτική σύσταση της ιχθυοτροφής. Επιπλέον, το βακτήριο αυτό χρησιμοποιείται στη βιομηχανία για την παραγωγή τροφίμων και ιδιαίτερα ως βακτήριο της καλλιέργειας εκκίνησης, με σκοπό τη βελτίωση της θρεπτικής και οργανοληπτικής ποιότητας και την αύξηση της διάρκειας ζωής του τροφίμου (Fisher, 2009). Ωστόσο, σύμφωνα με τον Gressoni και τους συνεργάτες του (2014), το γένος *Leuconostoc* αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές ομάδες μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση στα προϊόντα, ως αποτέλεσμα μη σωστού καθαρισμού και υγιεινής, κυρίως του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται μετά την παστερίωση. Έτσι, δεν αποκλείεται να αποτελούν μη επιθυμητά στελέχη που εντοπίζονται στα δείγματα λόγω μόλυνσης της ιχθυοτροφής. Από την άλλη, η μελέτη του Allameh και της ομάδας του (2012), αξιολογεί το *Leuconostoc* για τις προβιοτικές του ιδιότητες, καθώς αναστέλλει την ανάπτυξη παθογόνων των ψαριών και παρουσιάζει ανοχή σε χολικά άλατα.

Ένα ακόμα βακτηριακό γένος που εντοπίζεται στα δείγματα και έχει προβιοτική δράση είναι το *Ligilactobacillus*. Σύμφωνα με τη μελέτη της Quilodrán-Vega και των συνεργατών της (2020), το γένος αυτό παρουσιάζει ανθεκτικότητα τόσο στο pH όσο και στις μεγάλες συγκεντρώσεις χολικών αλάτων και εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση για την εξουδετέρωση πολλών εντερικών παθογόνων, ρόλοι που το καθιστούν ιδανικό ως προβιοτικό. Παράλληλα, αρκετά στελέχη του γένους *Ligilactobacillus* έχει βρεθεί ότι είναι πλούσια σε γονίδια της ομάδας ενζύμων CAZyme, η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων. Αυτό καταδεικνύει πως το *Ligilactobacillus* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο ζωοτροφών, συμβάλλοντας στην καλύτερη πέψη και απορρόφηση της τροφής, που περιέχει υψηλή ποσότητα ινών (Li et al., 2022).

Όσον αφορά το γένος *Limosilactobacillus*, μελέτες που διεξήχθησαν σε γαρίδες δείχνουν πως ρυθμίζει την ανάπτυξη, την ανοσία και την εντερική μικροχλωρίδα του ζώου. Συγκεκριμένα, γαρίδες των οποίων η τροφή περιέχει το *Limosilactobacillus*, παρουσίαζαν καλύτερη επιβίωση και ανάπτυξη, καθώς αντιμετώπιζαν τα παθογόνα βακτήρια του εντέρου και διέθεταν ενισχυμένη λειτουργία του ανοσοποιητικού. Έτσι, το γένος αυτό προτείνεται ως προβιοτικό βελτιώνοντας την υγεία των καλλιεργούμενων υδρόβιων οργανισμών. (Lee et al., 2021) Επιπλέον, το *Limosilactobacillus* χρησιμοποιείται για τη μείωση του ποσοστού Αρσενικού(As), που συσσωρεύουν τα ψάρια από το υδάτινο περιβάλλον και ελλοχεύει κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία. Χορηγείται για την προσρόφηση του αρσενικού και τις αντιοξειδωτικές του ικανότητες, οδηγώντας σε ελάττωση της συγκέντρωσης μετάλλου και σε αποκατάσταση της μικροχλωρίδας του εντέρου, με συνεπή αύξηση της παραγωγής υδατοκαλλιέργειας. (Han et al., 2022) Συνεπώς, η ανίχνευση του *Limosilactobacillus* στα δείγματά μας μπορεί να εξηγηθεί είτε από το γεγονός πως ιχθύες που τους χορηγήθηκε το βακτήριο αυτό για προστασία, στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι για την παραγωγή ιχθυοτροφής, είτε από το ότι το βακτήριο χρησιμοποιείται για την ασφαλή παραγωγή της τροφής των ψαριών.

Τα αποτελέσματα των μελετών για το βακτηριακό γένος *Pantoea* διίστανται. Το βακτήριο αυτό συνδέεται συνήθως με τα φυτά και σύμφωνα με μεγάλο μέρος των ερευνών αναπτύσσει παρασιτική σχέση μαζί τους, αποτελώντας παράγοντα ασθενειών για φυτά,

όπως το καλαμπόκι, το ζαχαροκάλαμο, το βαμβάκι κ.α. (Cunningham & Marcon, 2013; Walterson & Stavrinides, 2015). Από την άλλη, ορισμένα στελέχη αναπτύσσουν αμοιβαίες σχέσεις με τους φυτικούς ξενιστές ή ακόμα και προάγουν την ανάπτυξη των φυτών (Walterson & Stavrinides, 2015). Η στενή αυτή σύνδεση του *Pantoea* με τα φυτά αποτελεί μια ένδειξη για παρουσία συστατικών φυτικής προέλευσης στα δείγματα των ιχθυοτροφών μας. Προς μία άλλη κατεύθυνση, ο Amehyogbe και οι συνεργάτες του (2021), απομονώσαν *Pantoea* από το έντερο των ψαριών και απέδειξαν πως διαθέτει εξαιρετικές μεταβολικές ικανότητες και προβιοτικές ιδιότητες, που το καθιστούν ικανό για την αντιμετώπιση παθογόνων, καθώς και ότι εκμεταλλεύεται τις πηγές άνθρακα βοηθώντας στην αφομοίωση υδατανθράκων και στην υδρόλυση αμινοξέων των τροφών. Ωστόσο, αντίθετα με αυτή την έρευνα, ένα είδος αυτού του βακτηριακού γένους απομονώθηκε από μια ιριδίζουσα πέστροφα και θεωρήθηκε παθογόνος παράγοντας (Saticioglu et al., 2018). Άρα, πρόκειται για στοιχεία που ίσως συνηγορούν στο ότι περιέχονται ιχθυάλευρα στα προς ανάλυση δείγματα.

Το βακτηριακό γένος *Photobacterium* συναντάται κυρίως στο θαλάσσιο περιβάλλον, όπως στο νερό και στα θαλάσσια ιζήματα και μπορεί να ζει ελεύθερο ή σε συμβίωση με ορισμένα είδη ψαριών. Συγκεκριμένα, πρόκειται για θαλάσσιο οργανισμό που μπορεί να βρίσκεται στην επιφάνεια των ψαριών, σε συμβιωτική ανάπτυξη στο εσωτερικό τους ή σε κάποιες περιπτώσεις να αποτελούν παθογόνα ψαριών (Urbanczyk et al., 2011). Πολλά στελέχη του *Photobacterium* απομονώθηκαν από την εντερική μικροχλωρίδα τόσο ζωντανών ψαριών όσο και από υποπροϊόντα της αλιείας (Dalgaard, 1997). Η στενή σχέση, λοιπόν, του συγκεκριμένου βακτηριακού γένους με τα ψάρια, ίσως, μαρτυρεί την παρουσία του στα ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια και συνεπώς σε δείγματα που περιέχουν τέτοια συστατικά.

Η συσχέτιση του *Streptococcus* με τους ιχθύες έγκειται στη βακτηριακή ασθένεια που τους προσβάλλει και οφείλεται σε αυτό το γένος. Τόσο τα ψάρια του γλυκού νερού όσο και τα θαλάσσια, υδατοκαλλιέργειας ή άγρια, μπορούν να προσβληθούν από το *Streptococcus* και να το διατηρήσουν σε όλο τον κύκλο της ανάπτυξής τους. Τα πιο επιρρεπή είδη σε αυτή την ασθένεια είναι η ιριδίζουσα πέστροφα και η τιλάπια. Η μόλυνση με *Streptococcus* μπορεί να προκληθεί από την άμεση επαφή με μολυσμένα ψάρια ή από μολυσμένες τροφές ψαριών (Merck & Co, 2022; Athanassopoulou & Roberts, 2017). Έτσι, το βακτηριακό αυτό γένος μέσω των ιχθύων μπορεί ενδεχομένως να εντοπιστεί και σε ιχθυοτροφές αποτελούμενες από πρώτη ύλη θαλάσσιας προέλευσης.

Το *Weissella* είναι ακόμα ένα από τα βακτηριακά γένη που παρουσιάζουν προβιοτικές δυνατότητες και έχουν επικυρωμένη χρήση στα τρόφιμα, λόγω της μικροβιολογικής ασφάλειας που προσφέρει. Μεταξύ των ευεργετικών του ρόλων είναι η αντιβακτηριακή δράση και η αντιφλεγμονώδη αποτελεσματικότητα. Ωστόσο, παρά τη θετική του επίδραση, ορισμένα στελέχη *Weissella* δρουν ως ευκαιριακά παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα. Χαρακτηριστική περίπτωση στα ψάρια είναι αυτή της εκτρεφόμενης ιριδίζουσας πέστροφας, όπου το *Weissella* αποτελεί αιτία σηψαιμίας και θνησιμότητας (Fusco et al., 2018). Επίσης, μία άλλη έρευνα αναφέρει πως αυτό το βακτηριακό γένος παράγει εξωπολυσακχαρίτες και επιδρά στο ιξώδες και τη δομή των τροφίμων, στα οποία έχει πραγματοποιηθεί ζύμωση, με αποτέλεσμα να έχει απομονωθεί και από ψάρια που έχουν ζυμωθεί (Lonvaud-Funel, 2014). Αυτό θα μπορούσε να δικαιολογήσει την παρουσία του *Weissella* σε δείγματα ιχθυοτροφών με ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια.

Όσον αφορά το γένος **HT002**, ο Agboola και η ομάδα του (2022), αναφέρουν πως εντοπίζεται σε αναλύσεις τροφών που χρησιμοποιούνται για τον σολομό του Ατλαντικού. Συγκεκριμένα, οι δίαιτες για τους ιχθύες διέφεραν, καθώς άλλες περιείχαν μόνο ιχθυάλευρο και άλλες μόνο

σογιάλευρο. Ωστόσο, σε αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν φάνηκε πως το HT002 αποτελεί περίπου το 10% των βακτηρίων που εντοπίζονται στις ιχθυοτροφές τόσο με ιχθυάλευρα όσο και με σογιάλευρο. Επιπλέον, αναλύοντας τα βακτήρια της εντερικής χλωρίδας ψαριών που κατανάλωσαν τροφή με ιχθυάλευρα και ψαριών που κατανάλωσαν τροφή με σογιάλευρο προέκυψε πως το HT002 βρισκόταν σε μεγαλύτερη αφθονία στο έντερο των πρώτων ψαριών (Agboola et al., 2022). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν πως ενδεχομένως στη δική μας μελέτη οι ιχθυοτροφές που ανιχνεύτηκαν με HT002 περιέχουν ιχθυάλευρα ή/και σογιάλευρο, με πιο επικρατή τα ιχθυάλευρα.

Πολλά από τα βακτήρια, λοιπόν, που ανιχνεύονται στα δείγματά μας, παρουσιάζουν προβιοτικές ιδιότητες. Η παρουσία τους σε αυτά μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα βακτήρια αυτά έχουν τη δυνατότητα να απομονώνονται από την οδό του ξενιστή και έπειτα να χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά, αποτελώντας μία εναλλακτική λύση για τα αντιβιοτικά (Amenyogbe et al., 2021). Από την άλλη, τα βακτήρια αυτά αποτελούν αποικιστές του εντέρου των ιχθύων, οπότε αν κατά την παρασκευή ιχθυοτροφών χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη ψάρια ή υποπροϊόντα τους, πολύ πιθανόν τα βακτήρια να ανιχνευτούν και στις ιχθυοτροφές.

Συνοπτικά η συσχέτιση των βακτηριακών γενών με τις ιχθυοτροφές απεικονίζεται στον παρακάτω Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Συσχέτιση βακτηριακού γένους με συστατικά ιχθυοτροφών

Γένος	Ιχθυάλευρα/ ιχθυέλαια	Φυτικές πρώτες ύλες	Μικροβιακή πρωτεΐνη	Προβιοτικές ιδιότητες
<i>Aneurinibacillus</i>	-	✓	✓	✓
<i>HT002</i>	✓	✓	-	-
<i>Lactobacillus</i>	✓	✓	-	✓
<i>Leuconostoc</i>	-	✓	-	✓
<i>Ligilactobacillus</i>	✓	-	-	✓
<i>Limosilactobacillus</i>	✓	-	-	✓
<i>Methylococcus</i>	-	-	✓	-
<i>Pantoea</i>	✓	✓	-	✓
<i>Photobacterium</i>	✓	-	-	-
<i>Streptococcus</i>	✓	-	-	-
<i>Weissella</i>	✓	-	-	✓

Με μία πιο προσεκτική ανάλυση του ραβδογράμματος, που παρουσιάζει τα γένη και την αφθονία των βακτηρίων που ταυτοποιούνται σε κάθε δείγμα (Σχήμα 4), παρατηρείται πως υπάρχουν κάποια επαναλαμβανόμενα μοτίβα βακτηρίων μεταξύ των δειγμάτων, αλλά και διαφοροποιήσεις.

Η τετράδα των δειγμάτων K16S, M16S, O16S και r16S φαίνεται να αποτελεί μία ομάδα, με το δείγμα O16S να παρουσιάζει ίσως τις περισσότερες διαφοροποιήσεις. Συγκεκριμένα, στα δείγματα αυτά το βακτήριο που χαρακτηρίζεται από τη μεγαλύτερη αφθονία είναι το *Weissella* και περιέχεται σχεδόν σε ίδια ποσότητα και στα τέσσερα δείγματα, με το O16S να παρουσιάζει ελαφρώς μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αυτό, ενώ το *Ligilactobacillus* είναι το αμέσως πιο άφθονο βακτήριο με πανομοιότυπη κατανομή σε όλα τα δείγματα της τετράδας. Τα βακτηριακά γένη *Streptococcus* και *Limosilactobacillus* με παρόμοια ποσοστά τόσο μεταξύ τους όσο και σε όλη την ομάδα ακολουθούν σε αφθονία, ενώ το *Photobacterium* φαίνεται να διαφοροποιείται ανάμεσα στα δείγματα, καθώς το O16S σε αυτή την περίπτωση διαθέτει σχεδόν τη μισή ποσότητα *Photobacterium* σε σχέση με τα υπόλοιπα τρία δείγματα. Το *Lactobacillus* κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα στα δείγματα K16S και M16S, ενώ σε ελάχιστα υψηλότερα επίπεδα στα O16S και r16S. Τα δείγματα K16S, M16S και r16S έχουν περίπου την ίδια περιεκτικότητα στο γένος *Pantoea*, ενώ το O16S λίγο μεγαλύτερη. Τα τέσσερα δείγματα χαρακτηρίζονται από την ίδια ποσότητα του HT002, ενώ αυτό που τα διαφοροποιεί είναι τόσο η περιεκτικότητα σε *Aneurinibacillus*, που είναι μικρή στα δείγματα M16S και r16S, ελάχιστη στο O16S και μηδενική στο K16S, όσο και η περιεκτικότητα σε βακτήρια που δεν ταξινομήθηκαν σε επίπεδο γένους και συναντώνται σε ίδια ποσοστά στα K16S και M16S και σε ίδια στα O16S και r16S. Τέλος όσον αφορά αυτή την ομάδα, το *Methylococcus* περιέχεται σε μικρές ποσότητες στα M16S και r16S και σε ελάχιστες στα K16S και O16S, ενώ το *Leuconostoc* βρίσκεται σε ιδιαίτερα μικρές ποσότητες, που είναι δύσκολο να τις διακρίνουμε.

Στη δεύτερη ομάδα, που φαίνεται να σχηματίζεται στο ραβδόγραμμα, συμμετέχουν τα δείγματα S16S, T16S και U16S, τα οποία έχουν περισσότερες διαφορές μεταξύ τους από ότι τα δείγματα της πρώτης ομάδας. Ειδικότερα, το βακτηριακό γένος *Weissella* εμφανίζεται σε διακριτά υψηλότερα επίπεδα στα δείγματα U16S και T16S από ότι στο S16S, ενώ αντίθετα το *Photobacterium* παρουσιάζεται σε αρκετά μεγαλύτερη ποσότητα στο δείγμα S16S, ενώ ακολουθεί το T16S και έπειτα με αρκετά μικρότερη το U16S. Το ίδιο μοτίβο με το *Weissella* μιμείται και το *Streptococcus* σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα βέβαια. Άλλα γένη που παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις εντός της ομάδας είναι το *Lactobacillus*, το οποίο συναντάται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στο S16S και σε μικρότερη στα U16S και T16S και το *Leuconostoc* σε λίγο περισσότερη περιεκτικότητα στο U16S από τα υπόλοιπα δύο. Περίπου στα ίδια επίπεδα ανάμεσα στα τρία δείγματα κυμαίνονται τα *Ligilactobacillus*, τα HT002 και τα μη ταξινομημένα κατά γένη βακτήρια, ενώ μεγάλη διαφοροποίηση παρουσιάζει το *Aneurinibacillus* με μικρή ποσότητα στο S16S και σχεδόν μηδενική στα άλλα δύο, όπως παρατηρείται και για το *Methylococcus*. Το βακτηριακό γένος *Pantoea* εμφανίζει ελάχιστες διαφορές μεταξύ των τριών δειγμάτων, με το S16S να διαθέτει τη μικρότερη περιεκτικότητα, κάτι που συμβαίνει και στην περίπτωση του *Limosilactobacillus*.

Το δείγμα X16S αποτελεί την τελευταία ομάδα και περιέχει κυρίως δύο βακτηριακά γένη το *Aneurinibacillus* και το *Methylococcus*, με το πρώτο σε λίγο μεγαλύτερη ποσότητα.

Γενικά, ανάμεσα στις τρεις ομάδες, η τρίτη, δηλαδή το δείγμα X16S, παρουσιάζει ένα τελείως διαφορετικό πρότυπο από τις υπόλοιπες, με δύο κυρίαρχα βακτήρια σε πολύ μεγάλες ποσότητες. Σε ότι αφορά τις δύο πρώτες ομάδες αυτές περιέχουν τα ίδια βακτηριακά γένη, ωστόσο τα επίπεδα αφθονίας στα οποία συναντώνται διαφέρουν και σε αυτό στηρίζεται και η ομαδοποίησή τους. Κάποια βακτήρια, όπως το *Weissella* και το *Pantoea*, συναντώνται σε περίπου ίδια επίπεδα και στις δύο ομάδες, ενώ κάποια άλλα, όπως για παράδειγμα το *Ligilactobacillus* και το *Streptococcus*, σε τελείως διαφορετικά επίπεδα.

Σύμφωνα με αυτή την ομαδοποίηση και τα κυριότερα βακτήρια που ανιχνεύονται, για τη σύσταση των δειγμάτων των ιχθυοτροφών προκύπτει πως η πρώτη ομάδα με τα δείγματα K16S, M16S, O16S και r16s περιέχει σε μεγάλη ποσότητα προβιοτικά, τα οποία πιθανώς προστέθηκαν για να προστατέψουν τις ιχθυοτροφές από την ανάπτυξη παθογόνων, καθώς τα βακτήρια *Weissella* και *Ligilactobacillus*, που περιέχονται σε υψηλότερες ποσότητες, αλλά και τα *Lactobacillus* και *Limosilactobacillus*, σε χαμηλότερες, έχουν αποδεδειγμένα προβιοτικές ιδιότητες. Επίσης, μία άλλη ερμηνεία είναι το ότι τα δείγματα αυτά περιέχουν ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια ως πρώτες ύλες των ιχθυοτροφών και η ανίχνευση αυτών των βακτηρίων οφείλεται στην παρουσία τους στο έντερο ιχθύων, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρασκευή. Το ίδιο ισχύει και για τη δεύτερη ομάδα σε ότι αφορά αυτά βακτήρια. Επιπλέον, τα βακτηριακά γένη *Photobacterium* και *Streptococcus*, που βρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες και στις δύο ομάδες, μαρτυρούν ίσως πως τα ιχθυάλευρα είναι τα συστατικά των ιχθυοτροφών, αφού πρόκειται για βακτήρια που συνδέονται στενά με τους θαλάσσιους οργανισμούς. Παράλληλα, η αξιόλογη παρουσία του *Lactobacillus* και η μικρή παρουσία του *Pantoea* και στις δύο πρώτες ομάδες, ενδεχομένως να υποδεικνύει την φυτική σύσταση των ιχθυοτροφών που μελετήθηκαν, καθώς το πρώτο γένος συμμετέχει στη ζύμωση του σογιάλεου και το δεύτερο έχει άμεση σύνδεση με τα φυτά. Η φυτική προέλευση μεγάλου μέρους των ιχθυοτροφών ενισχύεται στη δεύτερη ομάδα, λόγω της ηχηρής παρουσίας του *Leuconostoc*, που έχει ως φυσικό ενδιαίτημα τα φυτά. Τέλος, για τις δύο πρώτες ομάδες η μικρή σχετικά περιεκτικότητά τους σε HT002 μπορεί να συνδέεται με τη χρήση τόσο ιχθυάλεων όσο και σογιάλεου στις τροφές. Όσον αφορά το δείγμα X16S, τα δύο κυρίαρχα βακτηριακά γένη, *Aneurinibacillus* και *Methylococcus*, έχουν χρησιμοποιηθεί σε γεύμα μικροβιακών πρωτεϊνών, οπότε η ανίχνευσή τους στα δείγματα μας υποδηλώνει πως πρόκειται για μια εναλλακτική ιχθυοτροφή μικροβιακών πρωτεϊνών.

Μεταξύ των δειγμάτων που αναλύθηκαν τα S16S, T16S, U16S και X16S είναι γνωστής σύστασης. Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν κυρίως στις ιχθυοτροφές των δειγμάτων αυτών είναι: γλουτένη καλαμποκιού και σιταριού, γεύμα από φυτό ηλιοτρόπιο, κουκιά, συμπύκνωμα πρωτεΐνης σόγιας, σιτάρι, ιχθυέλαιο και ιχθυάλευρο, κραμβέλαιο, γεύμα εντόμων και «μονοκυτταρική πρωτεΐνη». Κάθε ένα από αυτά τα συστατικά βρίσκεται σε διαφορετικό ποσοστό σε κάθε δείγμα. Γενικά, οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται σε μεγαλύτερη αναλογία στα τέσσερα δείγματα αντιστοιχούν σε φυτικές πρώτες ύλες, σε ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια και σε μικροβιακή πρωτεΐνη. Αυτό φαίνεται να συμφωνεί και με τα ευρήματα που προέκυψαν από τη συσχέτιση των βακτηριακών γενών, που εντοπίστηκαν στα δείγματα των ιχθυοτροφών (Πίνακας 7), με τις πρώτες ύλες. Συγκεκριμένα, τα δείγματα S16S, T16S και U16S περιέχουν συμπύκνωμα πρωτεΐνης σόγιας σε ποσοστό 22%, γλουτένη σιταριού ~16,5%, ιχθυάλευρα σε ποσοστό 15%, 10% και 5% αντίστοιχα, κουκιά 10%, γλουτένη καλαμποκιού 9% και ιχθυέλαιο 7-9%. Σύμφωνα με το ραβδόγραμμα (Σχήμα 4), τα βακτήρια που ανιχνεύτηκαν σε μεγαλύτερες ποσότητες σε αυτά τα δείγματα, τα οποία αποτελούν και τη δεύτερη ομάδα του ραβδογράμματος, είναι τα γένη *Weissella*, *Photobacterium* και *Ligilactobacillus*, που με βάση την έρευνα σχετίζονται με ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια (Πίνακας 7) και τα γένη *Lactobacillus* και *Leuconostoc* που συνδέονται με φυτικές πρώτες ύλες. Άρα, οι πρώτες ύλες με τις οποίες σχετίζονται τα βακτήρια που εντοπίστηκαν στα δείγματα S16S, T16S και U16S ταιριάζουν με τη γνωστή σύσταση της ιχθυοτροφής των δειγμάτων αυτών. Όσον αφορά το δείγμα X16S περιέχει, επίσης, 22% συμπύκνωμα πρωτεΐνης σόγιας, ~17% γλουτένη σιταριού, 10% κουκιά, 9% γλουτένη καλαμποκιού, 8,5% ιχθυέλαιο, 5% ιχθυάλευρο και αυτό που το διαφοροποιεί από τα υπόλοιπα γνωστά δείγματα είναι το ότι αποτελείται από 10% «μονοκυτταρική πρωτεΐνη». Η σύσταση αυτή

επιβεβαιώνει τις υποθέσεις ότι πρόκειται για γεύμα μικροβιακών πρωτεϊνών, όπως προέκυψε και από τη βιβλιογραφία που συνδέει τα βακτήρια *Aneurinibacillus* και *Methylococcus*, τα οποία ανιχνεύτηκαν σε μεγάλες ποσότητες στο δείγμα X16S, με μικροβιακές πρωτεΐνες. Οπότε και σε αυτήν την περίπτωση η γνωστή σύσταση της ιχθυοτροφής του δείγματος X16S επαληθεύει τα ευρήματα που έδωσαν τα βακτήρια. Το γεγονός πως οι πρώτες ύλες που βρέθηκαν στα δείγματα των ιχθυοτροφών S16S, T16S, U16S και X16S, μέσω των βακτηρίων που ανιχνεύτηκαν, συνάδουν με τη γνωστή σύσταση των δειγμάτων αυτών οδηγεί στο συμπέρασμα πως και οι προβλέψεις για τα συστατικά των άγνωστης προέλευσης δειγμάτων K16S, M16S, O16S και r16S είναι σωστές. Τα δείγματα αυτά, δηλαδή, έχουν προβιοτικές ιδιότητες και περιέχουν σε μεγάλο ποσοστό ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια, καθώς και σημαντική ποσότητα φυτικών πρώτων υλών.

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, πως μέσω των τεχνολογιών αλληλούχισης νέας γενιάς και συγκεκριμένα μέσω της αλληλούχισης του 16S rRNA γονιδίου, καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση των βακτηριακών γενών που συναντώνται στα προς μελέτη δείγματα ιχθυοτροφών και συνεπώς η συσχέτιση αυτών με τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν. Οι τεχνολογίες αυτές σε συνδυασμό με τις αναλύσεις της βιοπληροφορικής προσφέρουν ένα ισχυρό εργαλείο στον κλάδο των υδατοκαλλιεργειών και γενικότερα στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή τροφών υψηλής ποιότητας και διατροφικής αξίας, αλλά και οικονομικά βιώσιμων και φιλικών προς το περιβάλλον.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agboola J., et al., (2022), *Effects of Yeast Species and Processing on Intestinal Health and Transcriptomic Profiles of Atlantic Salmon (Salmo salar) Fed Soybean Meal-Based Diets in Seawater*, International Journal of Molecular Sciences, 23, 1675
- Allameh S., et al., (2012), *Isolation, identification and characterization of Leuconostoc mesenteroides as a new probiotic from intestine of snakehead fish (Channa striatus)*, AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, 11, 3810-3816
- Amenyogbe E., et al., (2021), *Probiotic Potential of Indigenous (Bacillus sp. RCS1, Pantoea agglomerans RCS2, and Bacillus cereus strain RCS3) Isolated From Cobia Fish (Rachycentron canadum) and Their Antagonistic Effects on the Growth of Pathogenic Vibrio alginolyticus, Vibrio harveyi, Streptococcus iniae, and Streptococcus agalactiae*, Frontiers in Marine Science, 8
- Athanassopoulou F., & Roberts R. J., (2017), *Streptococcal infections of farmed fish*, Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 55, 136-144
- Bachis E., (2022), *By-product*, IFFO – The Marine Ingredients Organisation
- Beck S., & Pohl F., (1984), *DNA sequencing with direct blotting electrophoresis*, The Embo Journal, 3, 2905-2909
- Bhatnagar A. & Dhillon O., (2019), *Characterization, screening, and application of bacteria with probiotic properties isolated from the gut of Labeo calbasu*, Fisheries & Aquatic Life, 27, 178-189
- Bhatnagar A., & Rathi P., (2020), *Dosage determination of autochthonous probiotic bacterium Aneurinibacillus aneurinilyticus for the optimum growth and immunostimulation of Labeo calbasu*, Annals of Biology, 36, 81-87
- Biswas A., et al., (2020), *Methanotroph (Methylococcus capsulatus, Bath) bacteria meal as an alternative protein source for Japanese yellowtail, Seriola quinqueradiata*, Aquaculture, 529, 735700
- Caballero M., et al., (2002), *Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss*, Aquaculture, 214, 253-271
- Cheryl A., et al., (2019), *Functional feed additives used in fish feeds*, International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 7, 44-52
- Cowey CB., (1994), *Amino acid requirements of fish: a critical appraisal of present values*, Aquaculture, 124, 1-11
- Cowey CB., & Cho CY., (1993), *Nutritional requirements of fish*, Proceedings of the Nutrition Society, 52, 417-426
- Cunningham D., & Marcon M., (2013), *140 - Enterobacter, Cronobacter, and Pantoea Species*, Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fourth Edition), 804-805
- Dalgaard P., (1997), *Classification of photobacteria associated with spoilage of fish products by numerical taxonomy and pyrolysis mass spectrometry*, Zentralbl Bakteriol, 285, 157-168

Delamare-Deboutteville J., et al., (2019), *Mixed culture purple phototrophic bacteria is an effective fishmeal replacement in aquaculture*, *Water Research* X, 4, 100031

Deorowicz S., & Grabowski S., (2011), *Compression of DNA sequence reads in FASTQ format*, *Bioinformatics*, 27, 860-862

Dhillon O., & Bhatnagar A., (2020), *Gut colonization and permanence of the probiotics in Labeo calbasu*, *Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries*, 24, 427-440

Dijk L., et al., (2014), *Ten years of next generation sequencing technology*, *Trends in Genetics*, 30, 418-426.

El-Sayed A., (1999), *Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, Oreochromis spp.*, *Aquaculture*, 179, 149-168

Encarnação P., (2016), *Chapter 5 - Functional feed additives in aquaculture feeds*, *Aquafeed Formulation*, 217-237

Espe M., et al., (2016), *Functional amino acids in fish nutrition health and welfare*, *Frontiers in Bioscience*, 8, 143-169

FAO, (2011), *Aquaculture development - 5. Use of wild fish as feed in aquaculture*, *FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries*, FAO

FAO, (2014), *Fishery and Aquaculture Country Profiles-Greece*, FAO

FAO, (2014), *The State of World Fisheries and Aquaculture Opportunities and challenges*, FAO

FAO, (2021), *Fisheries and Aquaculture: Aquaculture*, FAO

FAO, (2020), *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020*, FAO

FAO, (2020), *The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)*, FAO

FAO, (2022), *FAO Fisheries and Aquaculture Division*, FAO

FAO, (2022), *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*, FAO

FAO Fisheries Department, (2001), *Aquaculture development. 1. Good aquaculture feed manufacturing practice*, *FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries*, FAO

FAO Fisheries Department, (1997), *Aquaculture development. FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries. No. 5*, FAO

Fisher R., (2009), *Chapter 97-Miscellaneous Gram-Positive Cocci*, *Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases (Sixth Edition)*, 86, 893-896

Fusco V., et al., (2018), *Chapter 10-Opportunistic Food-Borne Pathogens*, *Food Safety and Preservation*, 269-306

Gatlin D., et al., (2007), *Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review*, *Aquaculture Research*, 38, 551-579

Glencross B. D., et al., (2019), *Risk assessment of the use of alternative animal and plant raw material resources in aquaculture feeds*, *Reviews in Aquaculture*, 12, 703–758

- Gressoni I., et al., (2014), *FRUITS AND VEGETABLES | Fruit and Vegetable Juices*, Encyclopedia of Food Microbiology, 1, 992-999
- Guillaume J., et al., (2001), *Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans*, Aquaculture, 212, 404–405.
- Guo B., et al., (2022), *A Natural Gas Fermentation Bacterial Meal (FeedKind®) as a Functional Alternative Ingredient for Fishmeal in Diet of Largemouth Bass, *Micropterus salmoides**, Antioxidants, 11, 1479
- Han R., et al., (2022), *Feed-additive *Limosilactobacillus fermentum* GR-3 reduces arsenic accumulation in *Procambarus clarkia**, Ecotoxicology and Environmental Safety, 231, 113216
- Hasan M.R., (2001), *Nutrition and Feeding for Sustainable Aquaculture Development in the Third Millennium*, Scientific Research, 193-219
- Hashmi I., et al., (2020), *Chapter 18 – Firmicutes*, Beneficial Microbes in Agro-Ecology, Bacteria and Fungi, 363-396
- Hastings W., (2009), *Fish Feeds*, Proceedings of the Annual Workshop - World Mariculture Society, 1, 118-126
- Haynes E., et al., (2019), *The Future of NGS (next Generation Sequencing) Analysis in Testing Food Authenticity*, Food Control, 101, 134-143
- Hoseinifar S., et al., (2015), *The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*)*, Fish & Shellfish Immunology, 42, 533-538
- Huntington T., (2004), *Feeding the Fish: Sustainable Fish Feed and Scottish Aquaculture*, Joint Marine Programme (Scottish Wildlife Trust and WWF Scotland) and RSPB Scotland
- IFFO, (2019), *Study questions the sustainability of plant ingredients as fishmeal substitutes*, IFFO-The Marine Ingredients Organisation
- IFFO, (2020), *Benefits of Marine Ingredients*, IFFO-The Marine Ingredients Organisation
- IFFO, (2020), *Forage fish and whole fish*, IFFO-The Marine Ingredients Organisation
- IFFO, (2020), *Marine ingredients value chain*, IFFO-The Marine Ingredients Organisation
- IFFO, (2020), *Quality feed means quality food*, IFFO-The Marine Ingredients Organisation
- IFFO, (2022), *Aquaculture*, IFFO-The Marine Ingredients Organisation
- IFFO, (2020), *Unused resources have the potential to feed the world*, IFFO-The Marine Ingredients Organisation
- IFFO, (2016), *Project to model the use of fisheries by-products in the production of marine ingredients, with special reference to the omega 3 fatty acids EPA and DHA*, IFFO-The Marine Ingredients Organisation
- Jackson A., (2009), *The Continuing Demand for Sustainable Fishmeal and Fish Oil in Aquaculture Diets*, International Aquafeed, 12, 32-36

- Jackson A., (2010), *Fishmeal, Fish Oil, Prime Feed Ingredients Not Limiting Factors For Responsible Aquaculture*, Global aquaculture advocate, 14-17
- Jackson A., & Shepherd J., (2010), *Connections between Farmed and Wild Fish: Fishmeal and Fish Oil as Feed Ingredients in Sustainable Aquaculture*, In *Advancing the Aquaculture Agenda: Workshop Proceedings*, by OECD, 331-43
- Jackson A., (2012), *Fishmeal and Fish Oil and its role in Sustainable Aquaculture*, International Aquafeed, 17-21
- Jauncey K., (1998), *Tilapia Feeds and Feeding*, Pisces Press LTD, 241
- Krogdahl A., & Bakke A.M., (2015), *Chapter 10-Antinutrients, Dietary Nutrients, Additives and Fish Health*, 211-236
- Lall P., & Sadasivam J.K., (2021), *Nutrition and Metabolism of Minerals in Fish*, Animals, 11, 2711
- Lee B., et al., (2021), *Limosilactobacillus fermentum SWP-AFFS02 Improves the Growth and Survival Rate of White Shrimp via Regulating Immunity and Intestinal Microbiota*, Fermentation, 7, 179
- Li Y., et al., (2022), *Comparative Genomic Analysis Reveals Intestinal Habitat Adaptation of Ligilactobacillus equi Rich in Prophage and Degrading Cellulase*, Molecules, 27, 1867
- Lonvaud-Funel A., (2014), *Leuconostocaceae Family*, Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), 455-465
- Ma S., et al., (2022), *A new single-cell protein from Clostridium autoethanogenum as a functional protein for largemouth bass (Micropterus salmoides)*, Animal Nutrition, 10, 99-110
- Mardis E., (2008), *Next-generation DNA sequencing methods*, Annual Review of Genomics and Human Genetics, 9, 387-402
- Mardis E., (2017), *DNA sequencing technologies: 2006-2016*, Nature Protocols, 12, 213-218
- Muhamad Rizal N.S., et al., (2020), *Advantages and Limitations of 16S rRNA Next-Generation Sequencing for Pathogen Identification in the Diagnostic Microbiology Laboratory: Perspectives from a Middle-Income Country*, Diagnostics, 10, 816
- Munguti J., et al, (2021), *State of Aquaculture Report in KENYA*, Kenya Marine and Fisheries Research Institute, 1-190
- Naylor R., et al., (2009), *Feeding aquaculture in an era of finite resources*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 106, 15103-15110
- Naylor R.L., et al., (2021), *A 20-year retrospective review of global aquaculture*, Nature, 591(7851), 551-563
- Neil H., (2007), *Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology*, The Journal of Experimental Biology, 210, 1518-1525
- Nevejan N., et al., (2016), *Bacteria as food in aquaculture: do they make a difference?*, Reviews in Aquaculture, 10, 180-212

- Nogales-Mérida S., et al, (2018), *Insect Meals in Fish Nutrition*, Reviews in Aquaculture, 11, 1080-1103
- Norman R.A., et al., (2019), *The importance of fisheries and aquaculture production for nutrition and food security*, Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) 38, 395-407
- Nyman A., et al., (2017), *Effects of microbe- and mussel-based diets on the gut microbiota in Arctic charr (Salvelinus alpinus)*, Aquaculture Reports, 5, 34-40
- Perdikaris C., & Paschos I., (2010), *Organic aquaculture in Greece: a brief review*, Reviews in Aquaculture, 2, 102-105
- Porter T., & Hajibabaei M., (2020), *Putting COI Metabarcoding in Context: The Utility of Exact Sequence Variants (ESVs) in Biodiversity Analysis*, Frontiers in Ecology and Evolution, 8, 248
- Quilodrán-Vega S., et al., (2020), *Functional and Genomic Characterization of Ligilactobacillus salivarius TUCO-L2 Isolated From Lama glama Milk: A Promising Immunobiotic Strain to Combat Infections*, Frontiers in Microbiology, 11, 608752
- Saticioglu I., et al., (2018), *Antimicrobial resistance and molecular characterization of Pantoea agglomerans isolated from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fry*, Microbial Pathogenesis, 119, 131-136
- Selvakumar G., et al., (2020), *Exploring the Utility of Aneurinibacillus as a Bioinoculant for Sustainable Crop Production and Environmental Applications*, Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol, 135-141
- Shepherd C.J., & Jackson A.J., (2013), *Global fishmeal and fish-oil supply: inputs, outputs and markets*, Journal of Fish Biology, 83, 1046-1066
- Shields R. J., (2001), *Larviculture of marine finfish in Europe*, Aquaculture, 200, 55-88
- Skoronski E., et al., (2022), *Fermentation of Soybean Meal with Lactobacillus acidophilus Allows Greater Inclusion of Vegetable Protein in the Diet and Can Reduce Vibrionacea in the Intestine of the South American Catfish (Rhamdia quelen)*, Animals, 12, 690
- Smith D., et al., (2003), *Aquaculture Diet Development Subprogram: Nutrient Requirements of Aquaculture Species*, NSW Fisheries Final Report Series, 59
- Stradmeyer L, (1989), *A behavioural method to test feeding responses of fish to pelleted diets*, Aquaculture, 79, 303-310
- Tacon A., & Metian M., (2008), *Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects*, Aquaculture, 285, 146-158
- Tocher D.R., (2015), *Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective*, Aquaculture, 449, 94-107
- Trichet V., et al., (2015), *Chapter 7-The Effect of Vitamin C on Fish Health*, Dietary Nutrients, Additives and Fish Health, 151-171
- Turchini G.M., et al., (2009), *Fish oil replacement in finfish nutrition*, Reviews in Aquaculture, 1, 10-57

- Urbanczyk H., et al., (2011), *Phylogeny, genomics, and symbiosis of Photobacterium*, FEMS Microbiology Reviews, 35, 324-342
- Walterson A., & Stavrinos J., (2015), *Pantoea: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae*, FEMS Microbiology Reviews, 39, 968-984,
- Wang C., et al., (2019), *Beneficial bacteria for aquaculture: nutrition, bacteriostasis and immunoregulation*, Journal of Applied Microbiology, 128, 28-40
- Wang H., et al., (2020), *Optimization of the Process Parameters for Extruded Commercial Sinking Fish Feed with Mixed Plant Protein Sources*, Journal of Food Process Engineering, 44, 1-11
- Webster C.D., & Lim C.E., (2002), *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*, Aquaculture, 214, 419-420
- Wilson R.P., (1986), *Protein and Amino Acid Requirements of Fishes*, Annual Review of Nutrition, 6, 225-244
- Bone Q., & Moore R., (2017), *Βιολογία ιχθύων*, Πεδίο, 491-495
- Γενική Διεύθυνση Αλιείας, (2022), *Θαλάσσια Υδατοκαλλιέργεια*, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων
- Καστρίτη Γ., (2021), *Οικονομική και Περιβαλλοντική βιωσιμότητα της υποκατάστασης συστατικών ιχθυοτροφών με τροφές απ άλευρα με πρωτεΐνες εντόμων στις Ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες (Τσιπούρα – Λαβράκι)*, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Αθήνα
- Κουσουλίδου Λ., (2022), *Αλληλούχιση DNA νέας γενιάς*, The Cyprus Institute of Neurology & Genetics
- Παυλίδης Μ., & Σαμαράς Α., (2019), *Ευζωία Μεσογειακών Ιχθύων-Οδηγός Καλών Πρακτικών και δείκτες εκτίμησης*, Fish from Greece
- Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών, (2008), *Ελληνικές Υδατοκαλλιέργειες*, ΣΕΘ
- Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών, (2015), *Ελληνική Υδατοκαλλιέργεια 2015*, ΣΕΘ
- Assess Read Quality with FastQC - v0.11.9, (2019), KBase Predictive Biology, Διαθέσιμο στον δικτυακό τόπο: https://kbase.us/applist/apps/kb_fastqc/runFastQC/release?gclid=EAIaIQobChMIvfG02-iJ-gIVgXkGAB2JYw8nEAAYASAAEgKkx_D_BwE (8/9/2022)
- Basic storage, access, and manipulation of phylogenetic sequencing data with phyloseq*, (2022), Διαθέσιμο στον δικτυακό τόπο: <https://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/phyloseq/inst/doc/phyloseq-basics.html> (8/9/2022)
- Bioinformatics & Evolutionary Genomics, Διαθέσιμο στον δικτυακό τόπο: <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> (9/9/2022)
- Calas D., (2017), *Heading towards total replacement of fish meal*, All about feed, Διαθέσιμο στον δικτυακό τόπο: <https://www.allaboutfeed.net/all-about/new-proteins/heading-towards-total-replacement-of-fish-meal/> (8/9/2022)

DADA2 Pipeline Tutorial (1.16), (n.d.), Διαθέσιμο στον δικτυακό τόπο: <https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html> (5/6/2022)

Ernst M. & Breuer G., (2022), *Παραγωγή υδατοκαλλιέργειας στην Ευρωπαϊκή Ένωση*, Θεματολογικά δελτία για την Ευρωπαϊκή Ένωση, Διαθέσιμο στον δικτυακό τόπο: https://www.europarl.europa.eu/ftu/pdf/el/FTU_3.3.7.pdf (30/8/2022)

Koeleman E., (2018), *The future of feed might be microbial protein*, All about feed, Διαθέσιμο στον δικτυακό τόπο: <https://www.allaboutfeed.net/all-about/new-proteins/the-future-of-feed-might-be-microbial-protein/> (8/9/2022)

Merck & Co, (2022), *Streptococcus*, Aquavac, Διαθέσιμο στον δικτυακό τόπο: <https://www.aquavac-vaccines.com/disease-center/streptococcus/> (10/5/2022)

NGS Sequencing Technology and File Formats: Quality Scores, (n.d.), Διαθέσιμο στον δικτυακό τόπο: <https://learn.gencore.bio.nyu.edu/ngs-file-formats/quality-scores/> (8/9/2022)

Phyloseq: Explore microbiome profiles using R, (n.d.), Διαθέσιμο στον δικτυακό τόπο: <https://joey711.github.io/phyloseq/index.html> (8/9/2022)