

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

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Βαθμός αλοανεκτικότητας καλλιεργήσιμων εντερικών βακτηρίων  
τσιπούρας της εκτρεφόμενης τσιπούρας (*Sparus aurata*)»**

Θεοδώρα - Χριστίνα Μπαμπάκα  
Νικόλαος - Αθανάσιος Καλτσάς  
Ζαχαρούλα Θεωνά

ΒΟΛΟΣ 2023

**«Halotolerance of farmed sea bream (*Sparus aurata*) culturable gut  
bacteria»**

### **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

- 1. Κωνσταντίνος Αρ. Κορμάς**, Καθηγητής, Μικροβιακή Οικολογία Υδάτινου Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.
- 2. Καραπαναγιωτίδης Ιωάννης**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.
- 3. Παρλαπάνη Φωτεινή**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Μοριακή Μικροβιολογία και Ποιότητα Αλιευτικών Προϊόντων-Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η εκπόνηση και η ολοκλήρωση της παρούσας προπτυχιακής εργασίας δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την αρωγή ορισμένων προσώπων, τα οποία θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε.

Ευχαριστούμε θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μας, κ. Κωνσταντίνος Κορμάς, ο οποίος με την καθοδήγηση και τα εύστοχα σχόλιά του κατά τη διάρκεια της παρούσας έρευνας μας παρείχε τις απαραίτητες γνώσεις, στήριξη και ενθάρρυνση. Ευχαριστούμε τους αρμόδιους καθηγητές που μας επέτρεψαν να χρησιμοποιήσουμε το εργαστήριο καθώς και τον κύριο Νίκο Ξυπτερά, ο οποίος στάθηκε δίπλα μας και μας βοήθησε στο πειραματικό μέρος της έρευνας. Τέλος, ευχαριστούμε τις οικογένειές μας για την ψυχολογική υποστήριξη και ενθάρρυνση καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μας.

Ζαχαρούλα Θεωνά

Νικόλαος – Αθανάσιος Καλτσάς

Θεοδώρα – Χριστίνα Μπαμπάκα

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τσιπούρα αποτελεί ένα από τα πιο ευρέως εκτρεφόμενα μεσογειακά είδη. Είναι τελεόστεος ιχθύς και συνεπώς είναι υπο-ωσμωτικό στο θαλασσινό νερό, ενώ η κατάποσή του εξισορροπεί τις απώλειές της σε αυτό. Στο έντερο παρέχεται η απαιτούμενη ποσότητα αλατιού και νερού, καθώς η νεφρική και ουροποιητική απέκκριση απομακρύνει δισθενή ιόντα, και η βραγχιακή την περίσσεια αλατιού. Ο σκοπός της μελέτης αυτής είναι ο προσδιορισμός του ρυθμού αύξησης των καλλιεργήσιμων εντερικών βακτηρίων από κόπρانا τσιπούρας και την επίδραση τους από την ύπαρξη αλατότητας. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν τρεις υγρές καλλιέργειες με διαφορετικό ποσοστό αλατότητας η καθεμία (0%, 2% και 3,5%) με 1,65ml εμβολίου και χρησιμοποιώντας το ίδιο θρεπτικό μέσο (R<sub>2</sub>A). Ακολούθησαν έξι διαδοχικές αραιώσεις για κάθε καλλιέργεια, και στη συνέχεια δημιουργήθηκαν οι καμπύλες και τα διαγράμματα των ταχυτήτων μικροβιακής αύξησης για την κάθε δοκιμασία. Παρατηρήθηκε πως η φάση προσαρμογής είναι αντιστρόφως ανάλογη της αλατότητας, ενώ η ταχύτητα αύξησης των βακτηρίων είναι ανάλογη με την αλατότητα. Οι μικροοργανισμοί στη δοκιμασία με αλατότητα 0% είχαν μεγαλύτερες φάσεις προσαρμογής, γεγονός που υποδηλώνει την προσπάθεια προσαρμογής και αύξησης των αλοανεκτικών μικροοργανισμών, εφόσον οι αλόφιλοι δεν μπορούσαν να αναπτυχθούν. Όμως, στις δοκιμασίες με αλατότητα 2% και 3,5% τα αλόφιλα βακτήρια επικρατούν και παρατηρήθηκαν μικρότερες φάσεις προσαρμογής και υψηλότερες ταχύτητες ανάπτυξης. Συνεπώς, τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η αλατότητα έχει θετική επίδραση στην αύξηση των μικροοργανισμών στο έντερο της τσιπούρας. Η εν λόγω διπλωματική εργασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόβαθρο για μελλοντικές μελέτες που σχετίζονται με τα υδροπονικά συστήματα (aquaponics).

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Τσιπούρα (*Sparus aurata*), Αλατότητα, Ώσμωση, Αλόφιλος Αλοανεκτικός, Κόπρانا, Έντερο

## **ABSTRACT**

Sea bream is one of the most widely farmed Mediterranean species. It is a teleost fish and is therefore sub-osmotic to seawater, and its ingestion compensates for its losses in seawater. The gut provides the required amount of salt and water, as renal and urinary excretion removes divalent ions, and gill excretion removes excess salt. The purpose of this study is to determine the growth rate of cultured intestinal bacteria from sea bream feces and their effect of salinity. Specifically, three liquid cultures were performed with different percentages of salinity each (0%, 2% and 3.5%) with 1.65ml of inoculum and using the same nutrient medium (R<sub>2</sub>A). Six consecutive dilutions were made for each culture, and then the curves and graphs of microbial growth rates for each assay were obtained. It was observed that the adaptation phase is inversely proportional to salinity, while the bacterial growth rate is proportional to salinity. The microorganisms in the test with 0% salinity had longer adaptation phases, suggesting the adaptation and growth effort of the halophilic microorganisms since the halophilic ones could not grow. However, in the tests with 2% and 3.5% salinity, the alophilic bacteria were predominant and shorter adaptation phases and higher growth rates were observed. Therefore, these results lead to the conclusion that salinity has a positive effect on the growth of microorganisms in the sea bream gut. This thesis can be used as a background for future studies related to aquaponics.

**KEY WORDS:** Sea bream (*Sparus aurata*), Salinity, Swelling, Halophilic tolerant, Feces, Gut

# Περιεχόμενα

Περίληψη (Abstract)

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 ΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΣΥΣΤΗΜΑΤΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ (*Sparus aurata*)

#### 1.1.1 ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

#### 1.1.2 ΒΙΟΤΟΠΟΣ – ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ

#### 1.1.3 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

### 1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΘΡΕΨΗΣ

#### 1.2.1 ΤΡΟΦΗ – ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ

#### 1.2.2 ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

#### 1.2.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ – ΘΡΕΨΗ

#### 1.2.4 ΟΣΜΩΡΥΘΜΙΣΗ

#### 1.2.5 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΕΣ ΠΕΠΤΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ

#### 1.2.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΒΡΑΓΧΙΩΝ

## 2. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ – ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΜΒΟΛΙΟΥ

### 2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

### 2.3 ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ

### 2.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

### 2.5 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΑΧΟΥΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

## 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ

### 3.2 ΤΑΧΥΤΗΤΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 ΑΛΟΑΝΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ – ΕΚΤΡΟΦΗ ΣΕ ΥΔΡΟΠΟΝΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ





## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 ΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ (*Sparus aurata*)

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) αποτελεί είδος της οικογένειας Sparidae και ένα από τα δύο κυριότερα εκτρεφόμενα είδη στις μεσογειακές υδατοκαλλιέργειες.

Η κατάταξη του είδους *Sparus aurata* είναι η εξής:

|             |                                   |
|-------------|-----------------------------------|
| Βασίλειο    | Ζώα (Animalia)                    |
| Συνομοταξία | Χορδωτά (Chordata)                |
| Ομοταξία    | Ακτινοπτερύγια (Actinopterygii)   |
| Τάξη        | Περκόμορφα (Perciformes)          |
| Οικογένεια  | Σπαρίδες (Sparidae)               |
| Γένος       | Σπάρος ( <i>Sparus</i> )          |
| Είδος       | Τσιπούρα ( <i>Sparus aurata</i> ) |

#### 1.1.1. ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Χαρακτηριστικό γνώρισμα είναι το επίμηκες και ελαφρώς πλευρικά συμπιεσμένο σώμα, καλυμμένο με κτενοειδή λέπια. Έχει μεγάλο κεφάλι με απότομο ρύγχος και παρουσιάζει κύρτωση. Παρουσιάζει γκρι – ασημί χρωματισμό με μία χαρακτηριστική μαύρη κηλίδα που καταλήγει σε ελαφρύ κοκκινωπό χρωματισμό σε κάθε βραγχιοκάλυμμα. Αξίζει να σημειωθεί πως το λατινικό όνομα (*Sparus aurata*) προέκυψε εξαιτίας της χαρακτηριστικής χρυσοκίτρινης γραμμής ανάμεσα στα μάτια. Το μέσο μήκος της φτάνει τα 35 εκατοστά (cm) ενώ το μέγιστο μήκος τα 70 εκατοστά (cm) (Νεοφύτου, 2015). Το μέγιστο βάρος που έχει καταγραφεί είναι στα 17,2 κιλά και η μέγιστη ηλικία τα 11 χρόνια (Fishbase, 2017), με μέσο βάρος 300 - 600 g.

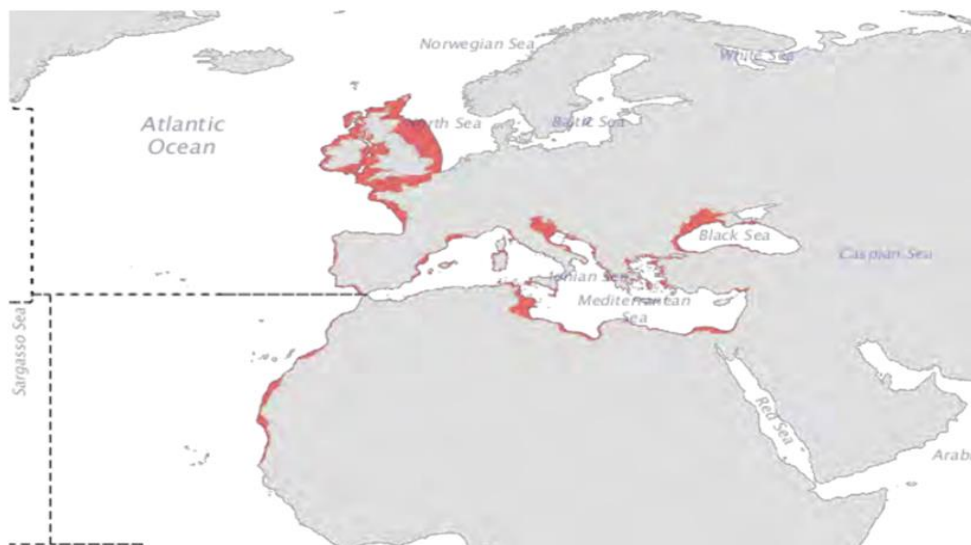


Εικόνα 1: *Sparus aurata* (Πηγή: FAO.org)

### 1.1.2 ΒΙΟΤΟΠΟΣ – ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ

Η τσιπούρα (*S. aurata*) θεωρείται πελαγικό ευρύθερμο και ευρύαλο είδος, με ανθεκτικότητα σε μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος (4 - 32°C) και ταυτόχρονα ευαίσθησία στις χαμηλές θερμοκρασίες των βόρειων περιοχών της Μεσογείου. Γενικά, ευδοκίμει σε υποτροπικό κλίμα με μέση θερμοκρασία 26°C (Fishbase, 2021). Ως ευρύαλο είδος, παρουσιάζει αλοανεκτικότητα (0 - 40 psu) (FAO, 2015). Είναι σαρκοφάγο είδος και στο φυσικό περιβάλλον τρέφεται κυρίως με μαλάκια, γαστερόποδα και καρκινοειδή (Νεοφύτου, 2012).

Το εν λόγω είδος είναι ενδημικό στην Μεσόγειο Θάλασσα ενώ σπανιότερα στη Μαύρη Θάλασσα (Basurco et al., 2011). Επίσης εντοπίζεται στις ακτές του Ατλαντικού Ωκεανού κατά μήκος της Ευρώπης (Εικόνα 2). Επιβιώνει τόσο σε βραχώδη πυθμένα παρουσία φυκιών όσο και σε αμμώδη. Γενικά, εντοπίζεται σε μικρά βάθη (30 – 50 m.), αναλογικά με την ηλικία (Νεοφύτου, 2015).



Εικόνα 2: Γεωγραφική εξάπλωση του είδους *Sparus aurata* (Πηγή: FAO.org)

### 1.1.3 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Όσον αφορά τον βιολογικό κύκλο, είναι ερμαφρόδιτο είδος και παρουσιάζει πρωτανδρισμό. Τα νερά ιχθύδια γεννιούνται αρσενικά και με το πέρασ 3 χρόνων γίνεται αναστροφή φύλου και μετατρέπονται σε θηλυκά (Fishbase, 2020). Ωστόσο, η αναστροφή αυτή μπορεί να διακοπεί και να παραχθεί σπέρμα εκ νέου για την ερχόμενη αναπαραγωγική περίοδο. Η αναπαραγωγική ωρίμανση παρατηρείται στο πρώτο και δεύτερο έτος της ζωής τους. Η αναπαραγωγή λαμβάνει χώρα Οκτώβριο – Δεκέμβριο σε βαθιά νερά για τις ακτές της Μεσογείου, σε θερμοκρασία 13°C (Κλαουδάτος, 2012).

## 1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΘΡΕΨΗΣ

### 1.2.1 ΤΡΟΦΗ – ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ

Στους ζωικούς οργανισμούς που τίθενται προς εκτροφή, η διατροφή αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζει και καθορίζει άμεσα ή έμμεσα τόσο το ρυθμό ανάπτυξης όσο και το κόστος παραγωγής τους.

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) ως σαρκοφάγο είδος, κατά την περίοδο της άνοιξης μεταναστεύει σε υφάλμυρες παράκτιες λιμνοθάλασσες προς αναζήτηση τροφής και ηπιότερων θερμοκρασιών (τροφική μετανάστευση). Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί φαινόμενα φυτοφαγίας σε περίπτωση που το ενδιαίτημά της δεν υποστηρίζει τις διατροφικές της απαιτήσεις. Επίσης, οι διατροφικές της συνήθειες στο φυσικό περιβάλλον εξαρτώνται από το μέγεθος. Το διαιτολόγιο των νεαρών ατόμων αποτελείται από πολύχαιτους και μικρού μεγέθους καρκινοειδή σε αντίθεση με των ενηλίκων, που αποτελείται με τη σειρά του από γαστερόποδα, μύδια και καρκινοειδή (Χώτος & Ρογδάκης, 2010). Οι διατροφικές ανάγκες μετασχηματίζονται ανάλογα το βιολογικό στάδιο (Παπουτσόγλου, 2008).

Στα σαρκοφάγα είδη, πρώτο μέλημα είναι η ικανοποίηση των διατροφικών αναγκών σε πρωτεΐνη. Από ποσοτική άποψη, οι δίαιτες που προορίζονται για

την εκτροφή πρέπει να περιέχουν 45-55% πρωτεΐνη (σε ξηρές τροφές με υγρασία 9,5-10%) (Oliva-Teles, 2020) καθώς τα αναπτυσσόμενα άτομα έχουν υψηλότερες απαιτήσεις. Πολλές φορές χορηγούνται συμπληρωματικά τροφές εμπλουτισμένες με απαραίτητα ή μη αμινοξέα (Παπουτσόγλου, 2008). Ποιοτικά, οι απαιτήσεις σε αμινοξέα είναι παρόμοιες και με άλλα είδη ιχθύων (Oliva-Teles, 2020).

### 1.2.2 ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Ο πεπτικός σωλήνας των ιχθύων διαφοροποιείται στα διάφορα είδη, με σκοπό την βέλτιστη αξιοποίηση των θρεπτικών ουσιών που εισέρχονται μέσω της τροφής (Ray & Ringo, 2014) και παράλληλα θεωρείται το κύριο ενδοκρινές όργανο στα ανώτερα σπονδυλωτά είδη (Μεντέ, 2011). Το πεπτικό σύστημα της τσιπούρας (*Sparus aurata*) αποτελείται από τα ακόλουθα:

- Στόμα

Το στόμα εξυπηρετεί κυρίως την πρόσληψη τροφής (Βουλτσιάδου, 2015) ενώ τα δόντια - που εντοπίζονται στη γλώσσα, στον ουρανίσκο αλλά ακόμη και στον φάρυγγα - συμβάλλουν στη διάσπασή της.

- Οισοφάγος

Ο οισοφάγος συσπάται ώστε να επιτραπεί η αναμάσηση της τροφής, εάν κριθεί απαραίτητο. Έχει όξινο περιβάλλον ( $\text{pH} < 7$ ) αλλά αυξομειώνεται ανάλογα το βιολογικό στάδιο, τη χημική σύσταση της τροφής και την χρονική διάρκεια μετά το τελευταίο γεύμα (Φανουράκης, 2016).

- Στόμαχος

Ο στόμαχος θεωρείται όργανο αποθήκευσης, ανάμειξης και πρωτογενούς πέψης της τροφής (χημική επεξεργασία), κατά την οποία συμμετέχουν η πεψίνη και το υδροχλωρικό οξύ (Βουλτσιάδου, 2015).

- Πυλωρός

Ο πυλωρός θεωρείται ένας ισχυρός, κυκλικού σχήματος μυ. Ταυτίζεται με το τέλος του στομάχου και ανήκει στον στόμαχο τόσο ανατομικά όσο και ιστολογικά. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποφυγή παλινδρόμησης της τροφής, καθώς λειτουργεί ως σφιγκτήρας, ελέγχοντας την διέλευση της επεξεργασμένης τροφής από τον στόμαχο στο έντερο (Μεντέ, 2011).

- Έντερο

Στην τσιπούρα (*S. aurata*) διακρίνονται έντονα δύο εντερικά τμήματα: πρόσθιο και οπίσθιο (FAO, 2017), με διαφορετικά ιστολογικά χαρακτηριστικά από τα οποία στο δεύτερο φαίνεται να είναι πιο έντονη η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών της τροφής. Ως πρόσθιο τμήμα, ορίζεται το τμήμα που παρουσιάζει διόγκωση, καταλήγει στην είσοδο της χολής και συχνά περιλαμβάνει τον οισοφάγο και τον στόμαχο. Τόσο η απορρόφηση πρωτεϊνικού υλικού όσο και η οσμωρύθμιση λαμβάνουν χώρα στο κεντρικό και ακραίο τμήμα του μεσεντερίου. Το τελικό τμήμα (οπισθέντερο) είναι το κομμάτι του εντέρου που ξεκινάει από το τέλος του μεσεντερίου και καταλήγει στην έδρα.

Ο ρόλος που επιτελεί ο εντερικός σωλήνας έχει διάφορες πτυχές. Η σημαντικότερη λειτουργία του είναι η μεταφορά και απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών της τροφής (Μεντέ 2011, Olsson 2011, Ringo et al. 2016). Παράλληλα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των αλάτων, στην ομοιοστάση του οργανισμού και στην άμυνα εναντίων των παθογόνων μικροοργανισμών (Olsson 2011, Ringo et al. 2016). Σύμφωνα με τους Ringo et al. (2003), η ηλεκτρολυτική ισορροπία του οργανισμού επιτυγχάνεται χάρη σε αυτό το όργανο, όπως και η ενδοκρινική ρύθμιση της πέψης και του μεταβολισμού. Η σωστή λειτουργία των παραπάνω διαδικασιών επιτυγχάνεται με την συμβολή των παρακάτω ενζύμων: πρωτεάσες, καρβουδράσες, εστεράσες, παγκρεατικής προέλευσης πρωτεάσες, καρβουδράσες και εστεράσες καθώς επίσης μικροχλωριδικής προέλευσης αμυλάσες, πρωτεάσες και εστεράσες.

Στο συγκεκριμένο είδος, το πεπτικό σύστημα και ιδιαίτερα η οδοντοφυΐα αποδεικνύουν ένα ευρύ φάσμα προσαρμοστικότητας. Ως σχήμα, είναι ευθύ και

κοντό και είναι ανθεκτικό στα σκισίματα που τυχόν προκαλούνται από κελύφη οστρακοειδών.



Εικόνα 3: Πεπτικός σωλήνας του είδους *Sparus aurata* (Πηγή: FAO.org)

- Πυλωρικά τυφλά

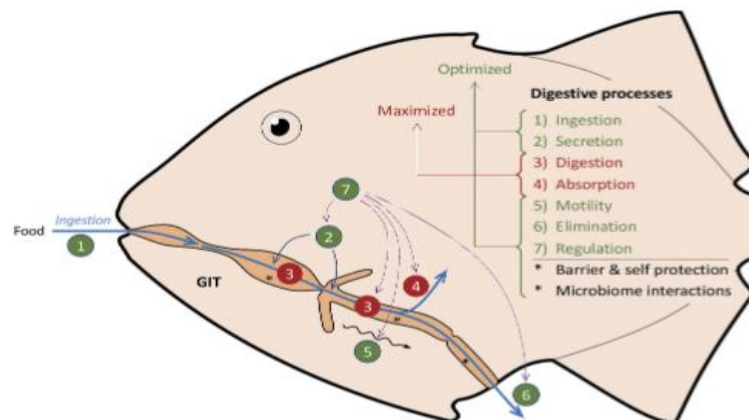
Τα πυλωρικά τυφλά εντοπίζονται μετά το πρόσθιο τμήμα του εντέρου που ακολουθεί μετά τον πυλωρό και είναι αποφύσεις του λεπτού εντέρου. Επίσης, αποτελούν το 10% του συνολικού βάρους της καθώς και περίπου το 6% του πεπτικού σωλήνα όπου το μεγαλύτερο ποσοστό του καταλαμβάνεται από το μικρό σε μήκος έντερο της (Παπουτσόγλου,2008). Η κύρια απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών πραγματοποιείται στις μεταγαστρικές περιοχές ή σε αντίστοιχες αυτών και στα πυλωρικά τυφλά με τη μεσολάβηση εξειδικευμένων μορίων ή μέσω της διάχυσης (Βουλτσιάδου, 2015). Η λειτουργία του τυφλού δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (Βουλτσιάδου, 2015).

### 1.2.3 ΠΕΨΗ – ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Ο όρος "μεταβολισμός", με την ευρύτερη έννοιά του, είναι το άθροισμα όλων των χημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν σε έναν οργανισμό και η μέτρηση του συνολικού οξυγόνου που καταναλώνεται από αυτόν. Αποτελεί, επιπλέον, μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την έμμεση παρακολούθηση του μεταβολικού ρυθμού του (Randall et al., 2002).

Η πέψη αποτελείται από μια σειρά πολύπλοκων διαδικασιών, με στόχο την διάσπαση των θρεπτικών συστατικών της τροφής και τη μέγιστη απορρόφησή τους (Εικόνα 4). Πιο συγκεκριμένα, μετά την κατάποση, η τροφή αποικοδομείται με τη βοήθεια πεπτικών ενζύμων (χημικά) και με μυϊκές κινήσεις του γαστρεντερικού σωλήνα (μηχανικά) - με σημαντικότερη την περισταλτική κίνηση του εντέρου. Η διαδικασία ολοκληρώνεται στο έντερο, όπου εκεί γίνεται και η απορρόφηση των εναπομείναντα θρεπτικών συστατικών. Το μεγαλύτερο μέρος της απορρόφησης έχει προηγηθεί στα πυλωρικά τυφλά.

Τα σαρκοφάγα είδη διαθέτουν κοντό και ευθύ έντερο, τις περισσότερες φορές με την παρουσία πραγματικού στομάχου και πυλωρικών τυφλών.



**Εικόνα 4:** Διαδικασίες που εμπλέκονται στην πέψη. Μετά την κατάποση της τροφής(1), εκκρίνονται πεπτικά υγρά(2) και επιτρέπουν στα ένζυμα να χωνέψουν την τροφή σε πολύ απλά μόρια(3) που μεταφέρονται μέσω του εντερικού επιθηλίου στο αίμα(4). Η τροφή μεταφέρεται ενεργά μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα (GIT) με ομαλές μυϊκές κινήσεις (5). Η εναπομένουσα άπεπτη τροφή τελικά αποβάλλεται (6). Ο χρόνος διέλευσης από το έντερο είναι ο χρόνος από την κατάποση (1) έως την αποβολή (6). Η πέψη αποτελείται από στενά ενωμένες διαδικασίες (7) που ενσωματώνονται με τρόπο που πιστεύεται ότι βελτιστοποιεί την αποτελεσματικότητα και μεγιστοποιεί την απορρόφηση. Τα δομικά και ενζυμικά εμπόδια είναι χαρακτηριστικά ολόκληρου του GIT. Η μικροβιακή και συμβιωτική πέψη μπορεί να συμβεί όχι μόνο στο οπίσθιο τμήμα, αλλά και στα πρόσθια τμήματα. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πεπτικών, του μικροβιοκόσμου και του εντερικού ιστού είναι επίσης πιθανόν να συμβαίνουν. (Πηγή: Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish, 2020)

Η διαδικασία της πέψης πραγματοποιείται σε μεγάλο βαθμό με τη βοήθεια των πεπτικών ενζύμων. Φυσικά, για τη διαδικασία της πέψης ενεργοποιούνται και κατάλληλα ένζυμα τα οποία διαφέρουν ή μεταβάλλονται ανάλογα με τη τιμή του pH του πεπτικού σωλήνα (Παπουτσόγλου, 2008). Τα εν λόγω ένζυμα αποτελούνται από υδρολάσες, ενώσεις που καταλύουν αντιδράσεις υδρόλυσης και ανάλογα με την φυσιολογική τους δράση διακρίνονται σε:

- (α) Πρωτεάσες (ένζυμα πρωτεόλυσης)
- (β) Εστεράσες (ένζυμα λιπόλυσης)
- (γ) Καρβουδράσες (αμυλολυτικά ένζυμα).

Τα πεπτικά ένζυμα εκκρίνονται στο στομάχι, στο πάγκρεας και στο έντερο και διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες (Μεντέ, 2011):

- (α) Ένζυμα που εκκρίνονται από το πάγκρεας (σε μικρότερο βαθμό από το στομάχι), με τη μορφή ζυμογόνων κόκκων ανενεργών προενζύμων και αναμιγνύονται με τον πεπτικό χυμό. Ενεργοποιούνται στο στομάχι και ειδικά στο μπροστινό τμήμα του εντέρου.
- (β) Συνδεδεμένα ένζυμα, που αντιδρούν μόνο όταν συνδέονται με μια μεμβράνη μικρολαχνών. Αυτά τα ένζυμα είναι όλα εντερικά, με κυρίαρχο ρόλο τον διαχωρισμό μακρομορίων που φιλτράρονται από τον γλυκοκάλυκα. Είναι τοποθετημένα κοντά στα συστήματα μεταφορών, τα οποία εξασφαλίζουν απορρόφηση στο κυτταρόπλασμα των εντεροκυττάρων.
- (γ) Κυτταρικά ένζυμα της πεπτικής οδού, που εκκρίνονται στις περιοχές έξω από τον τοίχο, π.χ. στα λυσοσώματα (Μεντέ, 2011).

Γενικά, η ενεργότητα των ενζύμων αυτών επηρεάζεται και ενδέχεται να μεταβάλλεται σε συνάρτηση με την τιμή του pH που επικρατεί στον πεπτικό σωλήνα του μικροοργανισμού, αλλά και την επίδραση ποικίλων παραγόντων του περιβάλλοντος που διαβιούν (Παπουτσόγλου, 2008).

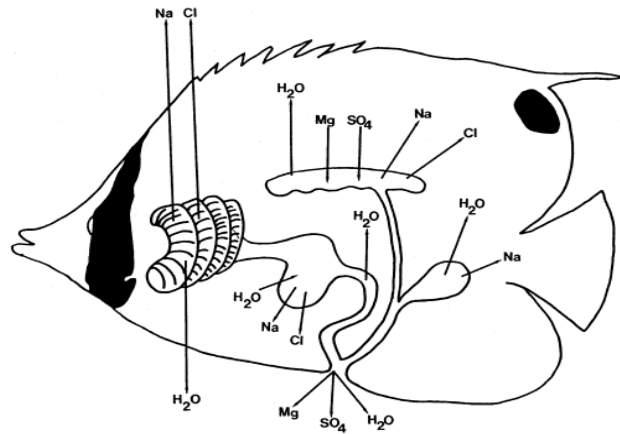


#### 1.2.4 ΟΣΜΩΡΥΘΜΙΣΗ

Αναμφισβήτητα, η μεγαλύτερη πρόκληση για τα ψάρια είναι η διατήρηση του νερού και της ομοιόστασης των ηλεκτρολυτών σε ένα ευρύ φάσμα αλατότητας (Greenwell et al., 2003). Για την εν λόγω διατήρηση απαιτείται η κατανάλωση υψηλών ποσοστών ενέργειας εξαιτίας των ευαίσθητων ημιπερατών επιθηλίων των βραγχίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αποτελεσματική μεταφορά αερίων. Η εξουδετέρωση της παθητικής πρόσληψης ιόντων και απώλειας νερού είναι ο τρόπος με τον οποίο οι θαλάσσιοι τελεόστεοι διατηρούν την ομοιόστασή τους.

Η απορρόφηση και απέκκριση ιόντων μεταξύ του περιβάλλοντος και των σωματικών υγρών πραγματοποιείται μέσω των βραγχίων, των γαστρεντερικών και ουροποιητικών οδών. Πρωταρχικός στόχος είναι η ενυδάτωση μέσω της ενεργού πρόσληψης χλωριούχου νατρίου (NaCl). Λόγω διαφοράς μεταξύ των σωματικών υγρών (250-500 mOsm/kg) και του θαλάσσιου περιβάλλοντος (1000 mOsm/kg) (υπεροσμωτικό περιβάλλον), πρέπει οι θαλάσσιοι τελεόστεοι να καταναλώνουν αλμυρό νερό για να πραγματοποιείται ανταλλαγή ιόντων με σκοπό την αραίωση των σωματικών τους υγρών. Σε αντίθετη περίπτωση, απειλούνται από χρόνια αφυδάτωση (υποογκαιμία) και περίσσεια πρόσληψη αλάτων (υπερνατριαιμία, υπερχλωραιμία) (Greenwell et al., 2003).

Τα κυριότερα ιόντα που σχετίζονται με την οσμωρύθμιση είναι τα μονοσθενή ιόντα, το νάτριο (Na), το χλώριο (Cl), το κάλιο (K), τα δισθενή ιόντα, μαγνήσιο (Mg) και το θειικό άλας (SO<sub>4</sub>). Ο οισοφάγος δεν μπορεί να απορροφήσει νερό αλλά είναι διαπερατός στο νάτριο (Na) και στο χλώριο (Cl), ενώ το εντερικό τοίχωμα είναι διαπερατό τόσο στο νερό όσο και στα μονοσθενή ιόντα (Greenwell et al., 2003). Νάτριο και χλώριο μετακινούνται από τον οισοφάγο και τον αυλό του εντέρου στα σωματικά υγρά με διάχυση μέσω της αντλίας νατρίου – καλίου (ATPάση Na-K). Στη συνέχεια, η περίσσεια νατρίου (Na), χλωρίου (Cl) και καλίου (K) που απορροφάται από το έντερο αποβάλλεται από μιτοχονδριακά κύτταρα (χλωριούχα κύτταρα, CC), που συμβάλλουν στην ενεργή μεταφορά, στην συμμεταφορά και στην παθητική διάχυση.



Εικόνα 5: Ροές ηλεκτρολυτών σε ένα θαλάσσιο τελεόστεο ιχθύ (Πηγή: Osmoregulation in fish Mechanisms and clinical implications)

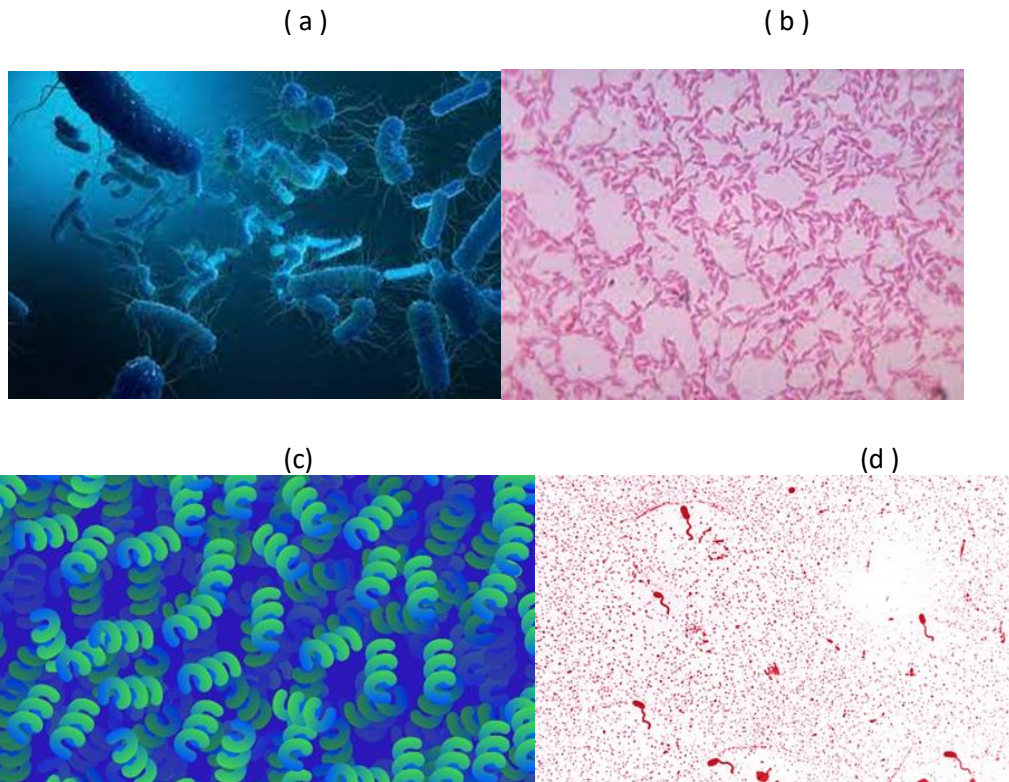
### 1.2.5 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΕΣ ΠΕΠΤΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ

Ο πεπτικός σωλήνας των ιχθύων φιλοξενεί μια πληθώρα μικροβιακών κοινοτήτων, που αποτελούνται κυρίως από βακτήρια, μύκητες, ιούς, αρχαία και πρωτόζωα (Romero et al. 2014). Οι εν λόγω μικροοργανισμοί διακρίνονται σε αυτόχθονους, που είναι σε θέση να αποικίσουν το εντερικό επιθήλιο του ξενιστή ή σχετίζονται με τις μικρολάχνες και επωφελούνται από την παροχή σταθερών συνθηκών διαβίωσης (Μεζίτη, 2011) και στους αλλόχθονους, οι οποίοι μεταφέρονται στον γαστρεντερικό σωλήνα μέσω της τροφής (Ringo et al. 2016), βρίσκουν ευνοϊκές συνθήκες στον πεπτικό σωλήνα με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζονται, αλλά η πλειονότητά τους αποβάλλεται με τα κόπρανα. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση αυτών βρίσκεται στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου (Παπουτσόγλου 2008). Αξίζει να τονιστεί πως η πλειονότητα των αυτόχθονων μικροοργανισμών δεν αποβάλλεται με τα περιττώματα, σε αντίθεση με τα βακτήρια που προέρχονται από την τροφή (Μεντέ, 2011)

Οι μικροοργανισμοί των υδρόβιων οργανισμών παρουσιάζουν ευαισθησία στις διατροφικές αλλαγές του ξενιστή. Η ευαισθησία αυτή, επηρεάζεται από τους μικροοργανισμούς που μεταφέρονται μέσω της τροφής από την μορφή της τροφής (νωπή ή σύμπηκτα), τις θρεπτικές ουσίες, τον διατροφικό σίδηρο και το οξείδιο του χρωμίου (Ringo et al. 2016) και από τα αμινοξέα (Larsen και Arias 2014). Επηρεάζονται, επίσης, από το διαθέσιμο

οξυγόνο (Larsen και Arias 2014), τις εποχικές διακυμάνσεις, το στρες, την ασπία, την μετανάστευση, τους περιβαλλοντικούς και οικολογικούς παράγοντες και από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού, ιδιαίτερα από την θερμοκρασία (Ghanbari et al. 2015). Τέλος, εξαρτώνται από το περιβάλλον του εντέρου, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, το περιβάλλον του ξενιστή (Ringo et al., 2016) και τις διαφορετικές περιοχές του εντέρου που αποικίζουν (Ray & Ringo, 2014).

Τα κυρίαρχα φύλα στον πεπτικό σωλήνα των θαλάσσιων ιχθύων είναι τα Proteobacteria, Bacteroidetes και Firmicutes, με επικρατέστερα όλων τα είδη *Vibrio* spp. (Vatsos, 2016). Οι μικροοργανισμοί του πεπτικού σωλήνα και τα μεταβολικά τους προϊόντα επηρεάζουν πολλές λειτουργίες του οργανισμού - ξενιστή, όπως η ομοιόσταση και η υγεία του εντέρου (Flint et al. 2014). Ταυτόχρονα, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, την πέψη, την απορρόφηση, τη διατροφή, τις ασθένειες, την αντοχή και την ανοσία του ξενιστή (Romero et al., 2014). Οι αυτόχθονοι μικροοργανισμοί αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών, όπως οι παθογόνοι, με την έκκριση ουσιών όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου, τα πεπτίδια βακτηριοσίνης και το γαλακτικό οξύ (Jutfelt, 2011). Επιπλέον στους συμβιώτες του εντέρου παρατηρείται σημαντική πρωτεολυτική, αμυλολυτική και χιτινολυτική δράση, δράση της λεκιθινάσης και παραγωγή μικρού μοριακού βάρους λιπαρών οξέων έπειτα από ζυμωτική δράση 20 βακτηρίων σε πολυσακχαρίτες (Παπουτσόγλου, 2008), ενώ είναι αξιοσημείωτη και η παραγωγή διαφόρων βιταμινών (Nayak 2010).



Εικόνα 6: (a) Proteobacteria, (b) Bacteroidetes, (c) Firmicutes, (d) *Vibrio* spp. (Πηγή: Wikipedia.org)

Παλαιότερα, η ανίχνευση και αναγνώριση των μικροοργανισμών του γαστρεντερικού σωλήνα πραγματοποιούνταν με τεχνικές κυτταροκαλλιέργειας και με τη χρήση φυσιολογικών και βιοχημικών ιδιοτεροτήτων που χαρακτηρίζουν αυτές τις μικροκοινότητες. Από το 2000 έως σήμερα χρησιμοποιούνται μοριακές μέθοδοι, με την ταυτόχρονη χρήση της καλλιέργειας των βακτηριακών στελεχών (Ringo et al. 2016). Σε αυτές περιλαμβάνονται οι τεχνικές κυκλικής ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων (PCR, qPCR, RT-PCR, επάλληλη PCR, multiplex PCR, broad-spectrum PCR, LCR), τεχνικές ισοθερμικών αντιδράσεων, φθορίζων εντοπισμό και εντοπισμό υβριδισμού (FISH), τεχνικές ανάλυσης γονοτύπου, φασματοσκοπία μάζας, μικροσυστοιχίες και χημικούς ιχνηθέτες πραγματικού χρόνου (Κυριαζής et al. 2013).

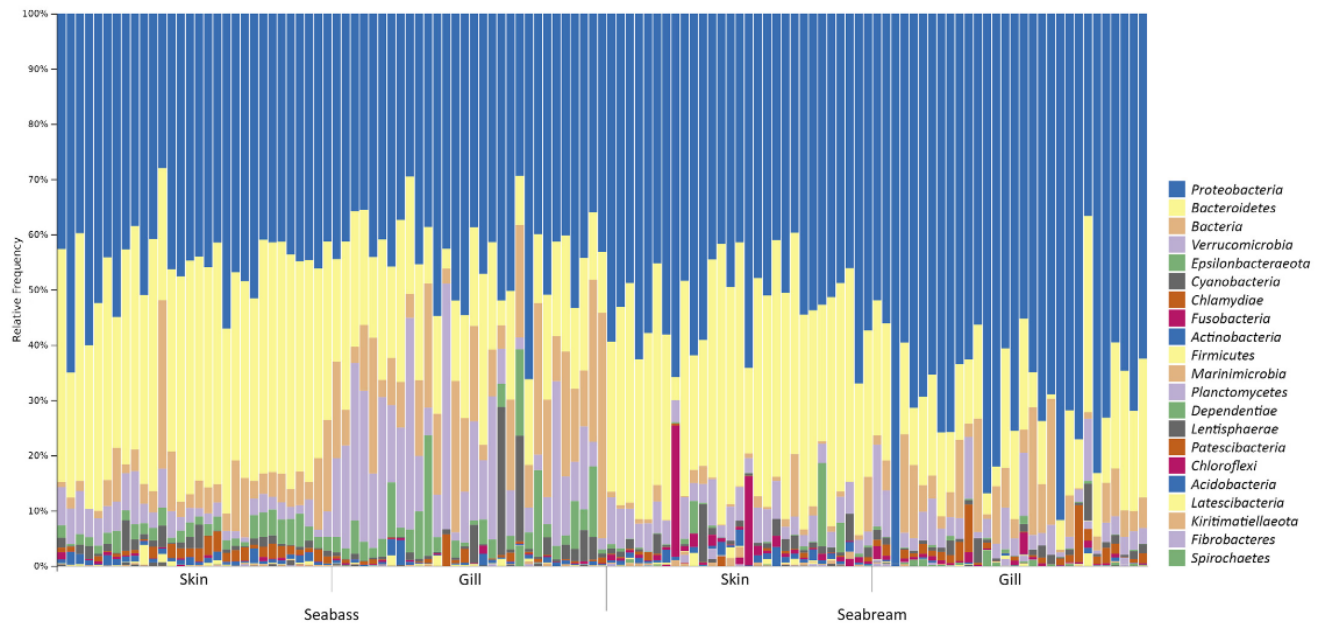
### 1.2.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΒΡΑΓΧΙΩΝ

Η αλατότητα είναι μία από τις κύριες φυσικές ιδιότητες που διέπουν την κατανομή των ψαριών στα υδάτινα ενδιαιτήματα και οφείλεται στην παρουσία διαλυμένων αλάτων στο νερό, με τα σημαντικότερα εξ αυτών το χλώριο ( $\text{Cl}^-$ ) και το νάτριο ( $\text{Na}^+$ ) σε θαλασσινό νερό κανονικής αλατότητας (35 psu). Η συνολική περιεκτικότητα σε 35 psu περιλαμβάνει 77,8%  $\text{NaCl}$  και 10,9%  $\text{MgCl}$ .

Το είδος *Sparus aurata* με σκοπό να διατηρήσει τα σωματικά υγρά κοντά στα ωσμωτικά σημεία ρύθμισης ενόψει των αλλαγών της αλατότητας, βασίζεται σε επίπεδο ιστού σε ωσμωτικές αποκρίσεις και σε συστηματική ενδοκρινική σηματοδότηση για να κατευθύνουν προσαρμοστικές διαδικασίες μεταφοράς ιόντων στα βράγχια και σε άλλα ωσμορρυθμιστικά όργανα (Seale - Breves, 2022). Η αλατότητα εμπλέκεται στη ρύθμιση της ικανότητας ωσμορρύθμισης των ψαριών και πρέπει να διατηρείται εντός του βέλτιστου τιμή για φυσιολογική ανάπτυξη, μεταβολικές και φυσιολογικές αντιδράσεις (Cui et al., 2019; Tseng and Hwang, 2008).

Διακυμάνσεις στην αλατότητα οδηγούν σε αλλαγές τόσο στην ωσμορρύθμιση όσο και στην μικροβιακή χλωρίδα, κυρίως του δέρματος και των βραγχίων καθώς θεωρούνται τα κύρια ανοσολογικά όργανα. Αξίζει να σημειωθεί πως ο ρόλος που διαδραματίζει η μικροβιακή χλωρίδα στις επιφάνειες των βλεννογόνων των ψαριών αντικατοπτρίζεται και στο έντερο (Tapia – Paniagua et. al., 2018).

Η μικροβιακή χλωρίδα του δέρματος παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία ανάμεσα ακόμα και σε διαφορετικές θέσεις του σώματος και η σύνθεσή του επηρεάζεται τόσο από περιβαλλοντικές αλλαγές (θερμοκρασία, pH) όσο και από αλλαγές στην πρόσληψη τροφής. Αποτέλεσμα των παραπάνω αλλαγών είναι η αύξηση ευκαιριακών βακτηρίων και η εμφάνιση ασθενειών.



Εικόνα 7: Ατομική ταξινόμηση σύνθεση. Οι διακριτές ράβδοι αντιπροσωπεύουν τη σχετική αφθονία των βακτηριακών φυλών του δέρματος και των βραγχίων του *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι) και του *Sparus aurata* (τσιπούρα) (Πηγή: Characterization of the skin and gill microbiomes of the farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*))

Παρά την υψηλή ατομική διακύμανση, συνολικά, τα μικροβιογράμματα της τσιπούρας (*Sparus aurata*) ήταν λιγότερο ποικιλόμορφο από εκείνο του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) (Εικόνα 7). Όσον αφορά την σύνθεση βασικού μικροβιώματος, τόσο τα πρωτεοβακτήρια (*Proteobacteria*) (50-60%) όσο και τα βακτηριοειδή (*Bacteroidetes*) (29-50%) αποτελούν τα κύρια συστατικά των μικροβιωμάτων του δέρματος και των βραγχίων και για τα δύο είδη. Τα πρωτεοβακτήρια είναι το πιο κοινό φύλο που αναφέρεται στο μικροβίωμα του δέρματος και των βραγχίων των τελεόστεων, συμπεριλαμβανομένου του λαβρακιού και της τσιπούρας (Chiarello et al., 2015- Pimentel et al., 2017- Tapia-Paniagua et al., 2018). Επίσης, το μικροβίωμα της τσιπούρας περιλαμβάνει υψηλή αφθονία των φυλών *Polaribacter* και *Vibrio*.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το πειραματικό μέρος διήρκησε μία εβδομάδα (3/12/2021 – 11/12/2021) και έλαβε χώρα στο εργαστήριο Ωκεανογραφίας (ή Υδροβιολογίας – Ιχθυολογίας) του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το πειραματικό μέρος μπορεί να διαιρεθεί σε τρεις φάσεις: την προετοιμασία και παρασκευή του εμβολίου, την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος και τον εμβολιασμό.

Ως μέσο καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε το R<sub>2</sub>A (Reasoner's 2A agar), το οποίο χαρακτηρίζεται ως μη επιλεκτικό θρεπτικό υλικό χαμηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά και συστήνεται για την ανάπτυξη ετερότροφων βακτηρίων καθώς το πυροσταφυλικό νάτριο που περιέχει μειώνει την καταπόνηση των κυττάρων από τα κατάλοιπα χλωρίου στο νερό (Reasoner – Geldreich, 1985). Όσον αφορά την αλατότητα, χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά ποσοστά (0%, 2% και 3,5%) για να γίνει αντιληπτό αν η ανάπτυξη των βακτηρίων επηρεάζεται και σε κάποιο βαθμό από την παρουσία χλωριούχου νατρίου (NaCl) και εν συνεχεία σε ποιο ποσοστό αλατότητας παρατηρείται καλύτερη ανάπτυξή τους.

### 2.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ – ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΜΒΟΛΙΟΥ

Για την προετοιμασία του εμβολίου, σε 100ml απιονισμένου νερού (dH<sub>2</sub>O) προστέθηκαν 0,324gr και το διάλυμα αναδεύτηκε με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Προχωρώντας στην παρασκευή του εμβολίου, χρησιμοποιήθηκαν απεκκρίματα από εκτρεφόμενες τσιπούρες του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας τα οποία φυγοκεντρήθηκαν (vortex), ούτως ώστε να διαχωριστούν τα στερεά από τα υγρά υπολείμματα. Αρχικά, το υπερκείμενο (υγρά υπολείμματα) διάλυμα διαχωρίστηκε σε τέσσερα σωληνάρια (erpendorf) με τη χρήση πιστολιού – πιπέτας στα οποία προστέθηκαν 700μl MRD και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν προς αποφυγή δημιουργίας συσσωματωμάτων. Η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμη τρεις φορές. Στη συνέχεια, τα τέσσερα σωληνάρια ομογενοποιήθηκαν σε ένα σωληνάριο (erpendorf) των 15ml το οποίο θεωρείται το μητρικό και περιείχε 13,5ml θρεπτικού υλικού με 1,5ml υγρού διαλύματος μικροοργανισμών (αναλογία 1:10).

## 2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

Συνεχίζοντας στην δεύτερη φάση, 0,49 g R<sub>2</sub>A προστέθηκαν σε 150 ml απιονισμένου νερού (dH<sub>2</sub>O) μετά από μέτρηση σε ζυγό ακριβείας και το διάλυμα αναδεύτηκε με την χρήση του μαγνητικού αναδευτήρα. Το θρεπτικό μέσο που προκύπτει έχει 0% αλατότητα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμη δύο φορές. Στα δύο εκ των τριών θρεπτικών υποστρωμάτων που προέκυψαν, προστέθηκε χλωριούχο νάτριο (NaCl) σε ποσότητα 3g και 5,25g για τα διαλύματα με περιεκτικότητα σε αλατότητα 2% και 3,5% αντίστοιχα.

Πριν τον εμβολιασμό, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στον αυτόκαυστο στους 121°C με ατμό, με στόχο την αποφυγή επιμολύνσεων. Το υγρό θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε για 15 λεπτά, ενώ τα στερεά σκεύη, που χρησιμοποιήθηκαν στην διαδικασία του πειράματος, για 20 λεπτά.

## 2.3 ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ

Τέλος, για τον εμβολιασμό με R<sub>2</sub>A 0%, προστέθηκαν 14,85ml από το εν λόγω θρεπτικό υπόστρωμα με τη βοήθεια πιστολιού – πιπέτας στο διάλυμα με αραιώση 10<sup>-1</sup> σε σωληνάριο τύπου falcon των 50ml. Το διάλυμα που προέκυψε αναδεύτηκε με τη βοήθεια vortex και στη συνέχεια προστέθηκε 1,65ml του εμβολίου. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για διαλύματα με αραιώσεις 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> και 10<sup>-6</sup>. Σε σωληνάρια – control μοιράζονται από 5 ml του θρεπτικού υποστρώματος. Για το διάλυμα αραιώσης 10<sup>-2</sup> λαμβάνονται 1,5ml από την αραιώση 10<sup>-1</sup> και επαναλαμβάνεται η διαδικασία αυτή κατ' αυτόν τον τρόπο και για τις υπόλοιπες αραιώσεις ενώ από το διάλυμα αραιώσης 10<sup>-6</sup> αφαιρείται 1,5ml για να είναι όλα τα σωληνάρια ισόποσα. Τέλος, από κάθε αραιώση λαμβάνονται 5ml και μοιράζονται σε τρία σωληνάρια (A, B, C). Όλη η διαδικασία του εμβολιασμού επαναλαμβάνεται κατ' αυτόν τον τρόπο για το R<sub>2</sub>A 2% και το R<sub>2</sub>A 3,5%.

Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας, ξεκίνησε η μέτρηση της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών. Η πιο κοινή μέθοδος για την εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων σε ένα υγρό εναιώρημα είναι η χρήση μετρήσεων οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος των 600 nm (Myers *et al.*,



2013). Χρησιμοποιήθηκε λοιπόν, φασματοφωτόμετρο και οι μετρήσεις έγιναν σε μήκος κύματος 600nm. Για τη βαθμονόμηση του φωτόμετρου, χρησιμοποιήθηκαν τυφλά δείγματα, τα οποία είχαν μόνο το θρεπτικό υλικό για πιο ακριβή αποτελέσματα. Οι μικροβιακές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα του εργαστηρίου στους 22 ° C όπου και αναδεύονταν καθόλη την διάρκεια των μετρήσεων με σκοπό την ανάπτυξη τους. Για τις μετρήσεις, τα σωληνάρια αφαιρούνταν από τον επωαστήρα και επανατοποθετούνταν εκ νέου.

## 2.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την στατιστική σύγκριση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα ανοιχτού κώδικα Jamovi 2.2.2.0 και τα δεδομένα αναλύθηκαν με One-Way και Two-Way Anova, χρησιμοποιώντας το Tukey Test. Επιπλέον, τα διαγράμματα της μικροβιακής αύξησης βασίστηκαν στο μέσο όρο των τριών επαναλήψεων (A, B, C). Πιο συγκεκριμένα, το στατιστικό πρόγραμμα One - Way Anova χρησιμοποιήθηκε για να βρεθεί αν η κατανομή παρουσιάζει κανονικότητα ή όχι. Έστω ότι το 50% των δεδομένων παρουσιάζει κανονικότητα στην κατανομή, έχουμε κανονική κατανομή. Η κανονική κατανομή περιγράφει τυχαίες μεταβλητές που έχουν την τάση να συγκεντρώνονται γύρω από μία μέση τιμή. Η εύρεση της κατανομής βοηθάει στον έλεγχο των υποθέσεων μας (μηδενική – εναλλακτική υπόθεση) για να κατασταλάξουμε στο είδος του τεστ που θα χρησιμοποιήσουμε μετέπειτα (παραμετρικό ή μη). Αξίζει να σημειωθεί πως η μηδενική μεταβλητή (αμετάβλητη κατάσταση) χρησιμεύει επί της ουσίας για να απορριφθεί και να γίνει αποδεκτή η εναλλακτική (μεταβαλλόμενη κατάσταση). Έστω ότι η τιμή της πιθανότητας ( $p$ ) είναι μικρότερη από 0,05 ( $p < 0,05$ ) υπάρχει μη κανονική κατανομή ενώ στην αντίθετη περίπτωση ( $p \geq 0,05$ ) υπάρχει κανονική κατανομή.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το Tukey Test, το οποίο θεωρείται μια διαδικασία πολλαπλών συγκρίσεων για την εύρεση μέσων όρων που διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Συγκρίνει όλα τα πιθανά ζεύγη μέσων όρων μιας κατάστασης με μιας άλλης στο σύνολο των συγκρίσεων ανά ζεύγη και βασίζεται σε μια κατανομή εύρους σπουδαστών ( $q$ ) (κατανομή παρόμοια με την κατανομή του  $t$  από το  $t$ -Test).

## 2.5 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΑΧΟΥΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Για τον υπολογισμό του τάχους αύξησης των μικροοργανισμών στις τρεις διαφορετικές αλατότητες (0%, 2,5%, 3%), χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$\mu = (\ln x_1 - \ln x_2) / (t_1 - t_2)$$

Όπου X1: Η ελάχιστη οπτική πυκνότητα

X2: Η μέγιστη οπτική πυκνότητα

t1: Ο χρόνος που αντιστοιχεί στην ελάχιστη οπτική πυκνότητα

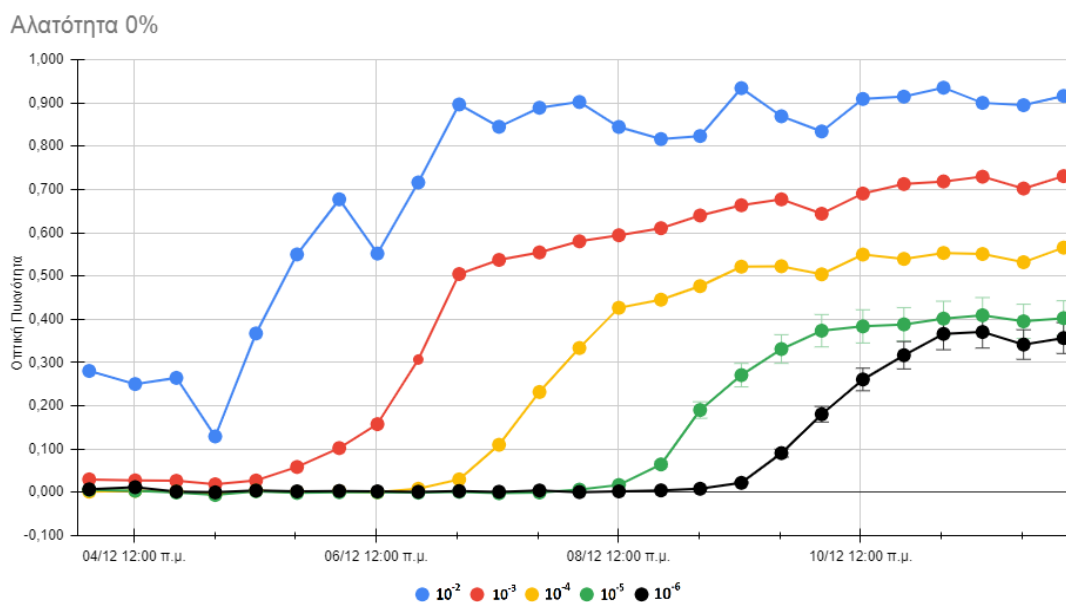
t2: Ο χρόνος που αντιστοιχεί στην μέγιστη οπτική πυκνότητα

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματά διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες: 1) Καμπύλες μικροβιακής αύξησης και 2) Ταχύτητες μικροβιακής αύξησης. Αξίζει να σημειωθεί πως σε όλα τα δείγματα παραλήφθηκε η πρώτη δεκαδική αραιώση λόγω της υψηλής πυκνότητας προϋπάρχοντων μικροοργανισμών και συνεπώς δεν ήταν δυνατό να μετρηθούν αλλαγές στην μικροβιακή ανάπτυξη.

#### 3.1 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ

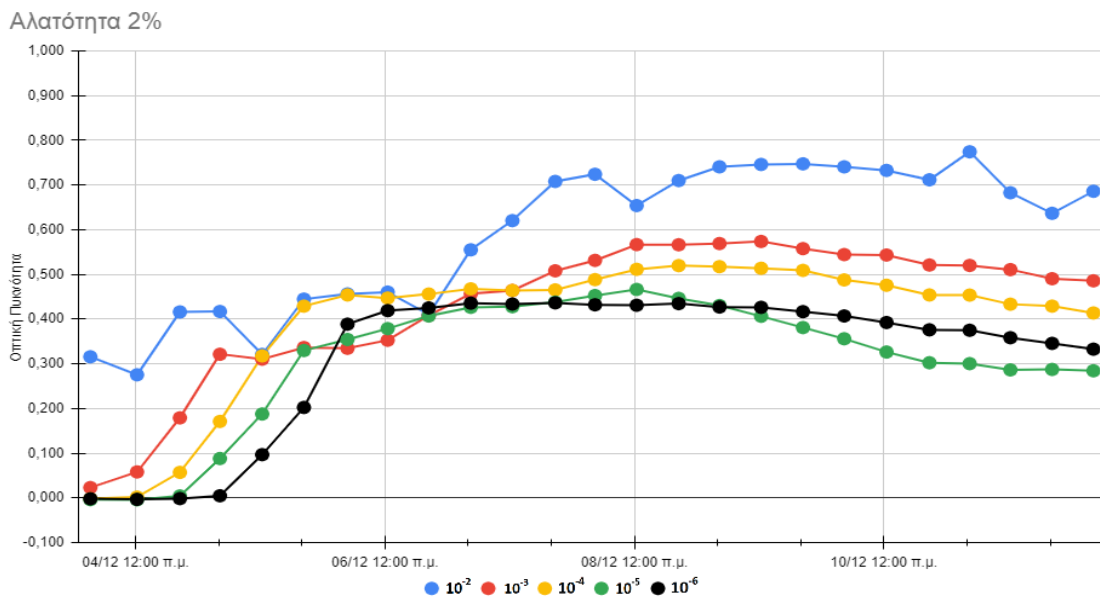
Όσον αφορά τις μικροβιακές συγκεντρώσεις, παρατηρείται πως αν και η αλατότητα 0% εμφανίζει την μεγαλύτερη φάση προσαρμογής - ιδιαίτερα στην αραιώση  $10^{-6}$  - καταλήγει να έχει τις μεγαλύτερες τελικές τιμές (Διάγραμμα 1). Αξίζει να τονιστεί πως στην δοκιμασία με αλατότητα 0% παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των αραιώσεων, γιατί οι εκθετικές φάσεις δεν ξεκινούν την ίδια ημέρα. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της αραιώσης  $10^{-2}$  που εισέρχεται στην εκθετική φάση στις 4/12 ενώ η αμέσως επόμενη παρατηρείται δύο μέρες μετά.



Διάγραμμα 1: Καμπύλες μικροβιακής αύξησης δειγμάτων με 0% αλατότητα.

Σχετικά με τις δοκιμασίες σε αλατότητα 2%, η αραιώση  $10^{-2}$  εισέρχεται ακόμα πιο γρήγορα στην εκθετική φάση σε σύγκριση με την δοκιμασία με αλατότητα 0%, έχοντας τελικά τις μεγαλύτερες τιμές (Διάγραμμα 2). Ακολουθούν και οι επόμενες αραιώσεις, με την μεγαλύτερη φάση προσαρμογής να

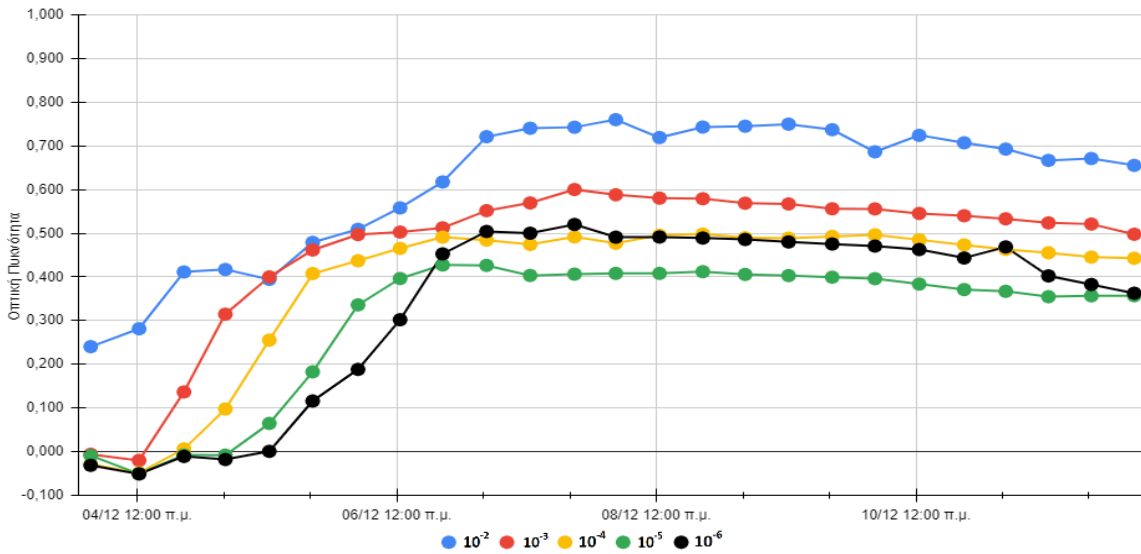
παρατηρείται πάλι στην αραιώση  $10^{-6}$ . Στις αραιώσεις  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  και  $10^{-6}$  παρατηρείται μείωση της εκθετικής φάσης, η οποία σηματοδοτεί και την έναρξη της στατικής φάσης. Οι εν λόγω μειώσεις ξεκινούν στις 8/12 ( $10^{-5}$ ) και 10/12 ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ).



Διάγραμμα 2: Καμπύλες μικροβιακής αύξησης δειγμάτων με 2% αλατότητα

Τέλος, στις δοκιμασίες με αλατότητα 3,5% παρατηρούμε πως η αραιώση  $10^{-2}$  εισέρχεται στην εκθετική φάση σχεδόν απευθείας (Διάγραμμα 3). Και σε αυτήν την περίπτωση η μεγαλύτερη φάση προσαρμογής εντοπίζεται στην αραιώση  $10^{-6}$ . Τις μικρότερες τελικές τιμές τις έχει η αραιώση  $10^{-5}$  ενώ τις μεγαλύτερες η αραιώση  $10^{-2}$ . Οι αραιώσεις  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  και  $10^{-5}$  βρίσκονται στην εκθετική τους φάση έως και τις 6/12 και έπειτα εισέρχονται στην στατική τους φάση. Αξίζει να σημειωθεί πως η πιο απότομη κλίση κατά την έναρξη της εκθετικής φάσης είναι της αραιώσης  $10^{-3}$ .

Αλατότητα 3,5%



Διάγραμμα 3: Καμπύλες μικροβιακής αύξησης δειγμάτων με 3,5% αλατότητα.

Συμπερασματικά από τις καμπύλες μικροβιακής συγκέντρωσης (Διαγράμματα 1, 2 και 3) καταλήγουμε στο γεγονός ότι οι αραιώσεις  $10^{-5}$  και  $10^{-6}$  είχαν την μικρότερη μέγιστη οπτική πυκνότητα σε κάθε δοκιμασία. Από την άλλη μεριά, η μεγαλύτερη μέγιστη οπτική πυκνότητα παρατηρείται στην αραιώση  $10^{-2}$ , με μεγαλύτερη όλων στη δοκιμασία με αλατότητα 0% (Διάγραμμα 1) ενώ οι άλλες δύο δοκιμασίες (2% και 3,5%) έχουν όμοιες μέγιστες οπτικές πυκνότητες (Διαγράμματα 2 και 3). Στις δοκιμασίες τόσο με αλατότητα 2% όσο και με αλατότητα 3,5%, οι μικροοργανισμοί εισήλθαν στην στατική φάση σε διάστημα 2 ημερών, με εξαίρεση την αραιώση  $10^{-2}$  (Διαγράμματα 2 και 3).

Μεταξύ των αραιώσεων, γίνεται αντιληπτό πως σε κάθε δοκιμασία η  $10^{-2}$  αραιώση διαφέρει σημαντικά από τις υπόλοιπες αραιώσεις (Πίνακας 1) διότι η τιμή πιθανότητας (p) είναι μικρότερη από 0,05. Μόνο η  $10^{-5}$  αραιώση σε σύγκριση με την αραιώση  $10^{-6}$  έχει τιμή μεγαλύτερη από 0,05.

| P       |                  | Αραιώση          |                  |                  |                  |                  |
|---------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|         |                  | 10 <sup>-2</sup> | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-4</sup> | 10 <sup>-5</sup> | 10 <sup>-6</sup> |
| Αραιώση | 10 <sup>-2</sup> | -                | < 0.001          | < 0.001          | < 0.001          | < 0.001          |
|         | 10 <sup>-3</sup> |                  | -                | 0.028            | < 0.001          | < 0.001          |
|         | 10 <sup>-4</sup> |                  |                  | -                | 0.011            | 0.007            |
|         | 10 <sup>-5</sup> |                  |                  |                  | -                | 1                |
|         | 10 <sup>-6</sup> |                  |                  |                  |                  | -                |

Πίνακας 1: Οι p-τιμές από το Tukey Test για τον εντοπισμό στατιστικών διαφορών μεταξύ των διαφορετικών αραιώσεων στις μικροβιακές καλλιέργειες από κόπρωνα του είδους *Sparus aurata*.

Μεταξύ των αλατοτήτων, σημαντική στατιστική διαφορά εντοπίζεται ανάμεσα στην αλατότητα 0% με τις αλατότητες 2% και 3,5% (Πίνακας 2), με την μεγαλύτερη τιμή να παρατηρείται μεταξύ των δοκιμασιών με αλατότητες 2% και 3,5%.

| P         |      | Αλατότητα |       |       |
|-----------|------|-----------|-------|-------|
|           |      | 0%        | 2%    | 3,5%  |
| Αλατότητα | 0%   | -         | 0.007 | 0.001 |
|           | 2%   |           | -     | 0.849 |
|           | 3.5% |           |       | -     |

Πίνακας 2: Οι p-τιμές από το Tukey Test για τον εντοπισμό στατιστικών διαφορών μεταξύ των αλατοτήτων στις μικροβιακές καλλιέργειες από κόπρωνα του είδους *Sparus aurata*.

Ανάμεσα στις αραιώσεις και στις τρεις διαφορετικές αλατότητες (Πίνακας 3), σε κάθε δοκιμασία η 10<sup>-2</sup> αραιώση διαφέρει σημαντικά από τις υπόλοιπες αραιώσεις (Πίνακας 1) - όπως προαναφέρθηκε - με εξαίρεση την 10<sup>-3</sup> αραιώση στις δοκιμασίες με αλατότητα 2% και 3,5% (Πίνακας 3). Σε όλες τις δοκιμασίες οι αραιώσεις 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> και 10<sup>-6</sup> αραιώσεις δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά στη ίδια δοκιμασία (Πίνακας 3). Όσον αφορά τα δείγματα με αλατότητα 0%, συγκρίνοντας τις στατιστικές διαφορές μεταξύ των αραιώσεων, παρατηρείται ότι η 10<sup>-2</sup> διέφερε με όλες τις άλλες αραιώσεις. Η αραιώση 10<sup>-3</sup> διαφέρει με την 10<sup>-5</sup> και 10<sup>-6</sup>, αλλά όλες οι υπόλοιπες αραιώσεις μεταξύ τους δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά. Αντιθέτως στα δείγματα με αλατότητα 2% και 3,5%, η μόνη αραιώση που παρουσιάζει διαφορά είναι η αραιώση 10<sup>-2</sup> με την 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> και 10<sup>-6</sup>. Επιπλέον, συγκρίνοντας τις ίδιες αραιώσεις μεταξύ των αλατοτήτων, δεν παρατηρήθηκε διαφορά σε καμία

αραιώση εκτός την  $10^{-6}$  μεταξύ των αλατοτήτων 0% με των 2% και 3,5% (Πίνακας 3).

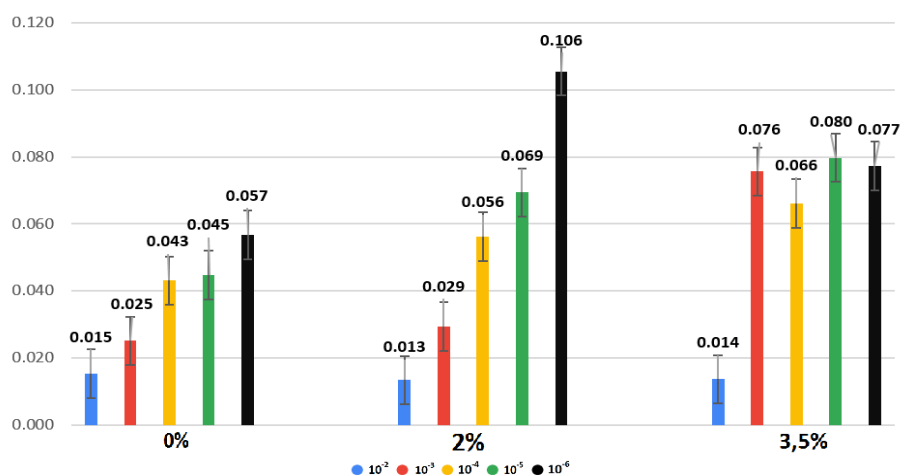
| p    | 0%        |           |           |           |           | 2%        |           |           |           |           | 3,5%      |           |           |           |           |        |
|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|
|      | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | $10^{-6}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | $10^{-6}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | $10^{-6}$ |        |
| 0%   | $10^{-2}$ | -         | <0.001    | <0.001    | <0.001    | 0.519     | 0.308     | <0.001    | <0.001    | <0.001    | 0.856     | 0.092     | <0.001    | <0.001    | <0.001    |        |
|      | $10^{-3}$ |           | -         | 0.132     | <0.001    | <0.001    | 1.000     | 0.233     | <0.001    | <0.001    | <0.001    | 1.000     | 0.034     | <0.001    | <0.001    |        |
|      | $10^{-4}$ |           |           | -         | 0.492     | 0.056     | <0.001    | 1.000     | 0.633     | <0.001    | <0.001    | <0.001    | 1.000     | 0.738     | <0.001    | <0.001 |
|      | $10^{-5}$ |           |           |           | -         | 1.000     | <0.001    | 0.482     | 1.000     | 0.137     | 0.007     | <0.001    | 0.393     | 1.000     | 0.186     | 0.010  |
|      | $10^{-6}$ |           |           |           |           | -         | <0.001    | 0.612     | 1.000     | 0.086     | 0.003     | <0.001    | 0.807     | 0.999     | 0.036     | 0.001  |
| 2%   | $10^{-2}$ |           |           |           |           | -         | 0.184     | 0.035     | <0.001    | <0.001    | 1.000     | 0.046     | 0.006     | <0.001    | <0.001    |        |
|      | $10^{-3}$ |           |           |           |           |           | -         | 1.000     | 0.658     | 0.776     | 0.639     | 1.000     | 0.994     | 0.196     | 0.287     |        |
|      | $10^{-4}$ |           |           |           |           |           |           | -         | 0.954     | 0.983     | 0.021     | 1.000     | 1.000     | 0.980     | 0.994     |        |
|      | $10^{-5}$ |           |           |           |           |           |           |           | -         | 1.000     | <0.001    | 0.565     | 0.918     | 1.000     | 1.000     |        |
|      | $10^{-6}$ |           |           |           |           |           |           |           |           | -         | <0.001    | 0.917     | 0.998     | 1.000     | 1.000     |        |
| 3,5% | $10^{-2}$ |           |           |           |           |           |           |           |           |           | -         | 0.285     | 0.003     | <0.001    | <0.001    |        |
|      | $10^{-3}$ |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | -         | 0.983     | 0.145     | 0.480     |        |
|      | $10^{-4}$ |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | -         | 0.959     | 1.000     |        |
|      | $10^{-5}$ |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | -         | 1.000     |        |
|      | $10^{-6}$ |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | -         |        |

Πίνακας 3: Οι p-τιμές από το Tukey Test για τον εντοπισμό στατιστικών διαφορών μεταξύ των διαφορετικών αραιώσεων και των αλατοτήτων στις μικροβιακές καλλιέργειες από κόπτρανα του είδους *Sparus aurata*.

### 3.2 ΤΑΧΥΤΗΤΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ

Σχετικά με τις ταχύτητες μικροβιακής αύξησης (Διάγραμμα 4), παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες τιμές στις αλατότητες 2% και 3,5% σε σχέση με την αλατότητα 0%, με την υψηλότερη όλων να εντοπίζεται στην αλατότητα 2% (αραιώση  $10^{-6}$ ). Στην δοκιμασία με αλατότητα 0%, παρατηρούνται οι μικρότερες τιμές σε όλες τις αραιώσεις συγκριτικά με τις άλλες δύο δοκιμασίες. Στην δοκιμασία με αλατότητα 2%, υπάρχει μία αύξηση σε όλες τις αλατότητες σε σύγκριση με την αλατότητα 0% αλλά έχουν μικρότερες τιμές σε σχέση με την αλατότητα 3,5%. Στην δοκιμασία με αλατότητα 3,5%, παρατηρείται σημαντική αύξηση σε όλες τις αραιώσεις, εξαιρώντας τις αραιώσεις  $10^{-2}$  και  $10^{-6}$ . Μεταξύ των αραιώσεων και στις τρεις αλατότητες, η  $10^{-2}$  έχει πάντα τη μικρότερη τιμή η οποία δε διαφέρει μεταξύ των αλατοτήτων. Η μέγιστη τιμή της αραιώσης  $10^{-3}$  παρατηρήθηκε στην αλατότητα 3,5% στην αραιώση  $10^{-3}$  (αύξηση 0,1). Οι τιμές της αραιώσης  $10^{-4}$  αυξάνονται όσο αυξάνεται η αλατότητα (+0.01), με την μέγιστη να παρατηρείται στην αλατότητα 3,5%. Η αραιώση  $10^{-5}$  έχει την μέγιστη

τιμή της στην αλατότητα 3,5% και το ίδιο ισχύει για την αραιώση  $10^{-6}$  στην αλατότητα 2%. Συμπερασματικά οι τελικές μέγιστες τιμές και στις τρεις δοκιμασίες (0%, 2%, 3,5%) παρατηρούνται στις αραιώσεις  $10^{-5}$  (0.08) σε αλατότητα 3,5% και  $10^{-6}$  (0.106) σε αλατότητα 2%.



**Διάγραμμα 4:** Μέσοι όροι ταχυτήτων μικροβιακής αύξησης ( $h^{-1}$ ) με βάση τον τύπο  $\mu = (\ln X_1 - \ln X_2) / (t_1 - t_2)$

Όπου:  $X_1$ : Η ελάχιστη οπτική πυκνότητα

$X_2$ : Η μέγιστη οπτική πυκνότητα

$t_1$ : Ο χρόνος που αντιστοιχεί στην ελάχιστη οπτική πυκνότητα

$t_2$ : Ο χρόνος που αντιστοιχεί στην μέγιστη οπτική πυκνότητα

Χρησιμοποιώντας και σε αυτή την περίπτωση το Tukey Test για τον εντοπισμό στατιστικών διαφορών μεταξύ των διαφορετικών αραιώσεων και των αλατοτήτων στις ταχύτητες αύξησης, γίνεται αντιληπτό πως οι μεγαλύτερες διαφορές εντοπίζονται στα δείγματα της δοκιμασίας με αλατότητα 3,5% συγκριτικά με τις άλλες αλατότητες (Πίνακας 4). Στην δοκιμασία με αλατότητα 0% παρατηρείται πως όλες οι τιμές πιθανότητας ( $p$ ) είναι μεγαλύτερες από 0,05. Το ίδιο ισχύει και στην δοκιμασία με αλατότητα 2% σε όλες τις αραιώσεις, εξαιρώντας την αραιώση  $10^{-6}$  ( $p < 0,05$ ). Τόσο στις αραιώσεις με αλατότητα 0% όσο και σε αυτές με αλατότητα 2% υποδεικνύεται πως δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, με εξαίρεση την αραιώση  $10^{-6}$  της αλατότητας 2%. Οι μεγαλύτερες διαφορές παρατηρούνται συγκρίνοντας τις δοκιμασίες με αλατότητες 0% και 2% για τις αραιώσεις  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  και  $10^{-5}$  συγκριτικά με την  $10^{-6}$ . Όσον αφορά την αλατότητα 3,5% παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές ( $p < 0.05$ ) στις αραιώσεις  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  και  $10^{-5}$  συγκριτικά



με την αραίωση  $10^{-2}$  τόσο της αλατότητας 0% όσο και της αλατότητας 3,5% (Πίνακας4).

| P    | 0%        |           |           |           |           | 2%        |           |           |           |           | 3,5%      |           |           |           |           |       |
|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|
|      | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | $10^{-6}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | $10^{-6}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | $10^{-6}$ |       |
| 0%   | $10^{-2}$ | -         | 1.000     | 0.893     | 0.848     | 0.407     | 1.000     | 1.000     | 0.432     | 0.096     | < 0.001   | 1.000     | 0.038     | 0.142     | 0.022     | 0.032 |
|      | $10^{-3}$ |           | -         | 0.997     | 0.993     | 0.796     | 1.000     | 1.000     | 0.818     | 0.315     | 0.002     | 1.000     | 0.148     | 0.420     | 0.092     | 0.130 |
|      | $10^{-4}$ |           |           | -         | 1.000     | 1.000     | 0.848     | 1.000     | 1.000     | 0.940     | 0.031     | 0.858     | 0.761     | 0.976     | 0.619     | 0.724 |
|      | $10^{-5}$ |           |           |           | -         | 1.000     | 0.796     | 0.999     | 1.000     | 0.963     | 0.039     | 0.807     | 0.818     | 0.988     | 0.685     | 0.785 |
|      | $10^{-6}$ |           |           |           |           | -         | 0.348     | 0.915     | 1.000     | 1.000     | 0.188     | 0.360     | 0.995     | 1.000     | 0.976     | 0.992 |
| 2%   | $10^{-2}$ |           |           |           |           | -         | 0.999     | 0.371     | 0.077     | < 0.001   | 1.000     | 0.029     | 0.115     | 0.017     | 0.025     |       |
|      | $10^{-3}$ |           |           |           |           |           | -         | 0.928     | 0.471     | 0.003     | 0.999     | 0.246     | 0.592     | 0.161     | 0.220     |       |
|      | $10^{-4}$ |           |           |           |           |           |           | -         | 1.000     | 0.174     | 0.383     | 0.993     | 1.000     | 0.970     | 0.989     |       |
|      | $10^{-5}$ |           |           |           |           |           |           |           | -         | 0.619     | 0.080     | 1.000     | 1.000     | 1.000     | 1.000     |       |
|      | $10^{-6}$ |           |           |           |           |           |           |           |           | -         | < 0.001   | 0.858     | 0.497     | 0.940     | 0.884     |       |
| 3,5% | $10^{-2}$ |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | -         | 0.031     | 0.120     | 0.018     | 0.026 |
|      | $10^{-3}$ |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | -         | 1.000     | 1.000     | 1.000 |
|      | $10^{-4}$ |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | -         | 1.000     | 1.000 |
|      | $10^{-5}$ |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | -         | 1.000 |
|      | $10^{-6}$ |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | -     |

Πίνακας 4: Οι p-τιμές από το Tukey test για τον εντοπισμό στατιστικών διαφορών μεταξύ των διαφορετικών αραιώσεων και των αλατοτήτων στις ταχύτητες αύξησης των μικροβιακών καλλιεργειών από κόπρανα τσιπούρας.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε αυτή την έρευνα, εξετάστηκε η επίδραση της αλατότητας στους μικροοργανισμούς στο έντερο της τσιπούρας, χωρίς να γίνει ταυτοποίηση των μικροοργανισμών. Παρά το γεγονός ότι η τσιπούρα είναι ένα εκτρεφόμενο είδος υψηλής αξίας για πολλές ευρωπαϊκές χώρες, η έρευνα σχετικά με το μικροβίωμα του εντέρου της έχει επικεντρωθεί στην αξιολόγηση του τρόπου με τον οποίο επηρεάζεται από την κατανάλωση τροφών που περιέχουν πρόσθετα συστατικά, όπως φυτικά συστατικά (Dimitroglou *et al.*, 2010; Cerezuela *et al.*, 2013; Estruch *et al.*, 2015; Parma *et al.*, 2016). Συνεπώς, η γνώση του μικροβιώματος του εντέρου της τσιπούρας παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη, καθώς η αναγνώριση των μικροοργανισμών περιορίζεται ακόμα μέχρι το γένος, ενώ ένα ποσοστό των μικροοργανισμών δεν έχει ταυτοποιηθεί ούτε σε επίπεδο φύλου (Nikouli *et al.*, 2018 & 2019).

Οι μικροοργανισμοί διαφέρουν τόσο ανάμεσα στους ζωικούς οργανισμούς όσο και στο νερό. Στα θηλαστικά, οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί του εντέρου είναι αναερόβιοι από τα φύλα Bacteroidetes και Firmicutes (Lucas López *et al.*, 2017), ενώ η πλειονότητα των μικροοργανισμών του εντέρου των ψαριών συχνά κυριαρχείται από προαιρετικά αναερόβια από το φύλο Proteobacteria (Villasante *et al.*, 2019). Επιπλέον, αφού οι περισσότεροι μικροοργανισμοί της θάλασσας είναι ευρύαλοι (Ventosa *et al.*, 1998), είναι φυσικό στην τσιπούρα οι περισσότεροι να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στις διακυμάνσεις της αλατότητας. Η θάλασσα περιέχει πολλά αλοφιλικά ή άκρως αλοανεκτικά βακτήρια και αρκετές φορές η διάκρισή τους δεν είναι εύκολη, όπως για παράδειγμα έγινε με το *Halomonas elongata* το οποίο θεωρήθηκε αλοανεκτικό (Vreeland *et al.*, 1980), ενώ αργότερα αποδείχθηκε ότι απαιτεί για την αύξησή του 0,5 M NaCl (Cánovas *et al.*, 1996).

Στην δοκιμασία με 0% αλατότητα, υποτέθηκε ότι αυξήθηκαν μόνο αλοανεκτικοί μικροοργανισμοί. Ένα ανάλογο πείραμα των Κάππα – Χιωτέλη (2022) με αντίστοιχες συνθήκες μπορεί να συγκριθεί με την παρούσα μελέτη. Το πείραμα αυτό είχε δύο υγρές καλλιέργειες. Η πρώτη καλλιέργεια, με θρεπτικό μέσο R2A full - strength, με 0% αλατότητα και θρεπτικό μέσο K<sub>1</sub>. Ενώ, η δεύτερη καλλιέργεια με αντίστοιχη ποσότητα εμβολίου (K<sub>2</sub>), αλλά θρεπτικό με

αραιώση 1/10 του αρχικού. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν έξι διαδοχικές αραιώσεις σε κάθε καλλιέργεια. Στην καλλιέργεια  $K_1$ , η αραιώση  $10^{-6}$  εμφανίζει την μεγαλύτερη και πιο απότομη φάση προσαρμογής, όσο και την μέγιστη οπτική πυκνότητα. Άρα, επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ολιγότροφων βακτηρίων, στις υψηλές αραιώσεις. Επιπλέον, το μέγιστο τάχος αύξησης καταγράφηκε στην αραιώση  $10^{-5}$  ( $\mu_{max} = 1,81$ ).

Η ύπαρξη τόσο κοπιότροφων (πχ. γένος *Vibrio*) όσο και ολιγότροφων βακτηρίων στα κόπρανα είναι σαφής. Αν και στην πρώτη μεταχείριση ( $K_1$ ) παρατηρήθηκε υψηλή αύξηση των μικροοργανισμών και στις έξι αραιώσεις και πολύ χαμηλότερη στη δεύτερη ( $K_2$ ). Συγκρίνοντας το δικό μας πείραμα με την καλλιέργεια  $K_1$ , παρατηρήθηκε ότι οι μικροοργανισμοί και στα δύο πειράματα εμφανίζουν ανάπτυξη, με την μεγαλύτερη φάση προσαρμογής στην αραιώση  $10^{-6}$ . Ωστόσο, το μέγιστο τάχος αύξησης ( $\mu_{max}$ ) διαφέρει. Η μέγιστη ταχύτητα μικροβιακής αύξησης ( $\mu_{max}$ ) στο πείραμά μας στη δοκιμασία με αλατότητα 0% παρατηρείται στην αραιώση  $10^{-6}$ , ενώ στο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο  $R_2A$  full – strength παρατηρείται στην αραιώση  $10^{-5}$ . Συμπερασματικά, στις πρώτες αραιώσεις όπου υπάρχει υψηλός ανταγωνισμός το τάχος αύξησης μειώνεται. Ενώ στις υψηλότερες αραιώσεις, ο χαμηλός ανταγωνισμός των μικροβιωτών των κοπράνων της τσιπούρας οδηγεί σε μεγαλύτερη αύξηση των ολιγότροφων βακτηρίων.

Στις άλλες δύο δοκιμασίες διαπιστώνεται, πως η αλατότητα έχει θετική επίδραση στην αύξηση των μικροοργανισμών, καθώς η εκθετική φάση επιτυγχάνεται σε λιγότερο από 24 ώρες στις δοκιμασίες με 2% και 3,5% αλατότητα σε όλες τις αραιώσεις (Διαγράμματα 2 και 3). Αν και δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την ύπαρξη αλοανεκτικών βακτηρίων σε αυτές τις δοκιμασίες, υποθέτουμε πως επικρατούν αλόφιλα βακτήρια στην δοκιμασία με 3,5% αλατότητα, επειδή οι ταχύτητες αύξησης φαίνεται να αυξάνονται με την αλατότητα σε όλες τις αραιώσεις (Διάγραμμα 4). Αντίθετα, στη δοκιμασία με 0% αλατότητα, η εκθετική φάση παρατηρείται μετά τις 24 ώρες, με τις μεγαλύτερες αραιώσεις να καθυστερούν μέχρι και τέσσερις μέρες (Διάγραμμα 1). Αυτό ίσως οφείλεται, στο ότι οι μικροοργανισμοί έχουν προσαρμοστεί σε περιβάλλον με υψηλή αλατότητα, οπότε η φάση προσαρμογής των αλοανεκτικών οργανισμών

διαρκεί περισσότερο. Άρα, είναι πιθανό στο έντερο της τσιπούρας η αλατότητα που επικρατεί, να είναι παρόμοια με αυτή του θαλασσινού νερού. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από τις στατιστικώς σημαντικές διαφορές της δοκιμασίας χωρίς αλάτι με των δύο άλλων (Πίνακας 2). Στη φάση προσαρμογής, όσα είδη δεν μπορούν να προσαρμοστούν στις νέες συνθήκες, δεν αυξάνονται με αποτέλεσμα την θανάτωσή τους. Επιπροσθέτως, οι μεγαλύτερες οπτικές πυκνότητες που παρατηρήθηκαν στην 0% αλατότητα μπορούν να ερμηνευτούν ως ο χαμηλός ανταγωνισμός μεταξύ των ειδών που προσαρμόστηκαν, καθώς και η απουσία του ωσμωτικού στρες στους αλοανεκτικούς μικροοργανισμούς.

Στη δοκιμασία με 2% αλατότητα αν και δεν έχει τις χαμηλότερες μέγιστες τιμές οπτικής πυκνότητας σε κάθε αραιώση, η ταχύτητα αύξησης αυξάνεται με την αύξηση της αραιώσης, γεγονός το οποίο δηλώνει την ύπαρξη καιροσκοπών μικροοργανισμών. Μπορεί να υποτεθεί, πως διαφορετικά είδη κυριαρχούν σε κάθε αραιώση στις αλατότητες 0% και 2%, σε αντίθεση με την αλατότητα 3,5% όπου οι ταχύτητες έχουν παρόμοιες τιμές σε όλες τις αραιώσεις με εξαίρεση την δεύτερη δεκαδική αραιώση, η οποία παραμένει χαμηλή ανεξαρτήτως αλατότητας (Διαγραμμα 4). Από την αρχή της επώασης των καλλιεργειών, η δεύτερη δεκαδική αραιώση ξεκινάει με μεγαλύτερη οπτική πυκνότητα από τις άλλες αραιώσεις σε όλες τις δοκιμασίες, οπότε ο ήδη μεγάλος αριθμός των μικροβίων δημιουργεί ένα άκρως ανταγωνιστικό περιβάλλον για τα περιορισμένα θρεπτικά, ελαττώνοντας σημαντικά την ταχύτητα αύξησης. Επίσης, η δεύτερη δεκαδική αραιώση παρατηρείται ότι η οπτική πυκνότητά της υποχωρεί (Διαγράμματα 1,2,3), λογικά ως αποτέλεσμα θανάτωσης των υπαρχόντων ειδών που δεν άντεξαν τον ανταγωνισμό.

Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι ένα ευρύ φάσμα ενδογενών και εξωγενών παραγόντων επηρεάζει τη σύνθεση του μικροβιώματος στο έντερο των ψαριών. Συμπεριλαμβανομένης της αλατότητας, της θερμοκρασίας, της γεωγραφικής θέσης, της ηλικίας, της διατροφής, της πρακτικής διαχείρισης στην ιχθυομονάδα, καθώς και της χρήσης αντιβιοτικών και προβιοτικών (Egerton *et al.*, 2018). Από τους παραπάνω παράγοντες, οι Zhao και οι συν. (2020) διαπίστωσαν ότι η αλατότητα των αποβλήτων έπαιξε τον κύριο ρόλο στη

διαμόρφωση και την σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος του Σολωμού του Ατλαντικού (*Salmo salar*), μεταξύ όλων των άλλων βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Επειδή όμως τα δείγματα σε εκείνη την έρευνα λήφθηκαν από ψάρια που μεταφέρθηκαν σε νερά με διαφορετικές αλατότητες αντί να γίνουν μικροβιακές καλλιέργειες. Στις τεχνητές συνθήκες του εργαστηρίου της παρούσας έρευνας, άλλοι παράγοντες όπως η θερμοκρασία ή κάποιο από τα θρεπτικά στοιχεία να αποτελεί περιοριστικό παράγοντα, φαίνεται να επηρεάζουν την πορεία και τα αποτελέσματα της μικροβιακής καμπύλης. Έχει ακόμα παρατηρηθεί ότι στα αλόφιλα βακτήρια οι ελάχιστες και οι βέλτιστες συγκεντρώσεις της αλατότητας αυξάνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας (Ventosa et al., 1998), οπότε ό,τι επίδραση έχει η αλατότητα στο μικροβίωμα της τσιπούρας θα πρέπει να ληφθεί υπόψη για συγκεκριμένη θερμοκρασία.

Σχετικά με την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, δεν πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Παρόλα αυτά, αξίζει να αναφερθούν ορισμένες προτάσεις για το ποιοι μικροοργανισμοί θα μπορούσαν να έχουν αναπτυχθεί σε αυτό το πείραμα.

Γενικότερα, όπως προαναφέρθηκε, οι κατηγορίες των μικροοργανισμών που είναι κοινές σε κάθε θαλάσσιο ζώο και μύκητα είναι: τα Πρωτεοβακτήρια, οι Firmicutes και τα Ακτινοβακτήρια (Solé-Jiménez P et al., 2021). Ιδιαίτερα τα Πρωτεοβακτήρια, βρέθηκαν σαν κυρίαρχες OTU κατά 50% συσχετιζόμενα με το γένος *Diaphorobacter* στο έντερο της τσιπούρας (Kormas KA, et al., 2014). Το γένος *Diaphorobacter*, ανήκει στην κατηγορία των β-Πρωτεοβακτηρίων και με βάση την ωσμωρύθμιση των κυττάρων του εντέρου σε ψάρια προσαρμοσμένα στο θαλασσινό νερό (Taylor et al. 2011), ο μη αλατισμένος βιότοπός τους θα μπορούσε να ευνοήσει την ανάπτυξη του *Diaphorobacter* spp., η οποία λαμβάνει χώρα και σε μέσα χωρίς NaCl (Khan and Hiraishi 2002, Pham et al. 2009). Συνεπώς, θα μπορούσε να έχει αναπτυχθεί στη δοκιμασία με αλατότητα 0% ή και στις υπόλοιπες αλλά σε μεγαλύτερες αραιώσεις όπως στην αραιώση 10-6 της αλατότητας 3,5% η οποία έχει τη μεγαλύτερη φάση προσαρμογής (Διάγραμμα 3). Το ίδιο θα μπορούσε να ισχύει και για το γένος *Comamonas*, το οποίο ανήκει επίσης στην κατηγορία των β-Πρωτεοβακτηρίων και είναι αλοανεκτικό (Ghanbarinia F et al., 2015).

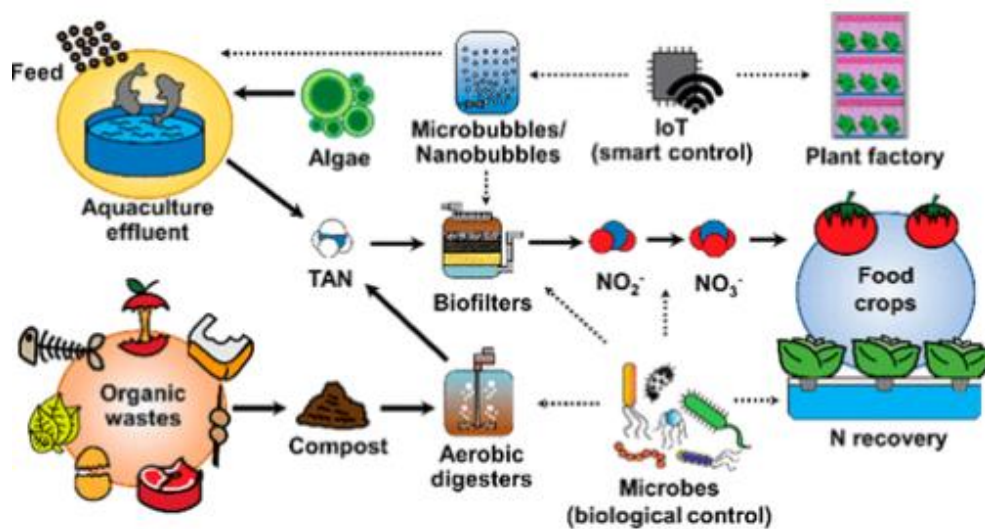
Άλλα αλοανεκτικά βακτήρια που έχουν βρεθεί στο έντερο της τσιπούρας είναι το γένος *Psychrobacter*, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των γ-Πρωτεοβακτηρίων (Brendon Egon et al., 2022). Ακόμη δύο γ-Πρωτεοβακτήρια που έχουν βρεθεί στο έντερο της τσιπούρας σε ποσοστό 3,5% και 1,7% αντίστοιχα είναι το *Aeromonas spp.* και το *Aeromonas molluscorum* (Solé-Jiménez P et al., 2021). Το *Aeromonas spp.* είναι πολύ ανθεκτικό και μεγαλώνει σε μέτριες συγκεντρώσεις άλατος αν και αργά (Delamare AP et al., 2000). Άρα, υπάρχουν αυξημένες πιθανότητες ανάπτυξής του σε όλες τις αραιώσεις της 0% αλατότητας, αλλά και στις μεγαλύτερες αραιώσεις των αλατοτήτων 2% και 3,5%, αφού στις μικρότερες αραιώσεις αφθονούν αυτά που αυξάνονται πιο γρήγορα. Επιπλέον, το *Aeromonas molluscorum*, βρέθηκε στην επιπελαγική ζώνη (<200m) στον ωκεανό και έχει τη δυνατότητα να αναπτυχθεί και χωρίς αλάτι (W.O.R.M.S 2009). Από την κατηγορία των α-Πρωτεοβακτηρίων, μέσα στο έντερο της τσιπούρας βρέθηκε το γένος *Novoshingobium*, όπου έχει απομονωθεί από πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα και από τη θάλασσα αντέχοντας μέχρι και 7% το αλάτι, με ιδανικό το 1-2% (Liu, Y., Pei et al., 2021). Όμως, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας συνηγορούν ότι τα περισσότερα βακτήρια ή άλλοι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο έντερο της τσιπούρας, είναι αλοφιλικά. Στην αλατότητα 3,5% και 2%, φαίνεται ο ισχυρός ανταγωνισμός των αλόφιλων μικροοργανισμών, ένας εκ των οποίων ίσως και να ήταν το *Halobacterium salinarum*. Το *H.salinarum* είναι ένα ιδιαίτερα αλοφίλικό Αρχαίο, το οποίο έχει την ικανότητα να αυξάνεται σε όλες τις συγκεντρώσεις του αλατιού μέχρι και τον κορεσμό του στο νερό. Όσον αφορά τα βακτήρια, σε μία μελέτη στην Σαρδηνία της Ιταλίας των Solé-Jiménez P et al., το μεγαλύτερο ποσοστό των βακτηρίων ανήκε στο *Sphingomonas raucimobilis* (10.5%), το οποίο ανήκει στα α-Πρωτεοβακτήρια και *Proteus spp.* (8.8%) που βρίσκεται σαν συμβιώτης σε αλκαλικά περιβάλλοντα (Drzewiecka D. 2016). Άλλοι μικροοργανισμοί που μπορεί να θεωρηθεί ότι αφθονούν στο έντερο της τσιπούρας είναι τα είδη *Microroccus luteus* της κατηγορίας Micrococcales, *Bacillus hisashii* (Firmicutes), *Delftia acidovorans* (β-Πρωτεοβακτήρια) και *Pseudomonas extremaustralis* (γ-Πρωτεοβακτήρια) (Nikouli E. et al., 2018). Εν κατακλείδι, οι παραπάνω οργανισμοί από τις δύο παραπάνω μελέτες, θα μπορούσαν θεωρητικά να βρίσκονται στις μικρότερες

αραιώσεις των αλατοτήτων 2% και 3,5%, αλλά σε πολύ μικρότερες αφθονίες έως και καθόλου στην αλατότητα 0%.

#### 4.1 ΑΛΟΑΝΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ – ΕΚΤΡΟΦΗ ΣΕ ΥΔΡΟΠΟΝΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Πολλά θαλάσσια ευρύαλα τελεόστεα είδη (πχ. *Sparus aurata*) έχουν την δυνατότητα να προσαρμόζονται σε ένα μεγάλο εύρος αλατότητας, διατηρώντας σταθερή την ισορροπία υγρών εντός του σώματός τους μέσω της οσμωρύθμισης (Carrion et al., 2005). Αυτή η ικανότητά τους οδήγησε την επιστημονική κοινότητα στην προσπάθεια εκτροφής τους με ταυτόχρονη καλλιέργεια φυτών, με στόχο την παραγωγή τροφίμων με βιώσιμο τρόπο καθώς περιορίζεται σημαντικά η χρήση χημικών λιπασμάτων στα φυτά. Ο νέος αυτός κλάδος ονομάζεται υδροπονία και αποτελεί μία μέθοδο γεωργίας απουσίας χώματος με τα φυτά να καλλιεργούνται σε αυτοτελή δοχεία (παρτέρια) (Wongkiew et al., 2021).

Τα υδροπονικά συστήματα συνδυάζουν την εκτροφή ψαριών με την ταυτόχρονη καλλιέργεια φυτών ανακυκλώνοντας τόσο το νερό όσο και τα μεταβολικά προϊόντα των ψαριών προς θρέψη των φυτών (Vlahos et al., 2019). Η μετατροπή των αποβλήτων σε θρεπτικά συστατικά γίνεται στα βιοφίλτρα, κατά την νιτροποίηση (κύκλος του αζώτου) με τη βοήθεια των βακτηρίων *Nitrobacter sp.* και *Nitrosomonas sp.*, που μετατρέπουν την παραγόμενη αμμωνία στις λιγότερο έως καθόλου τοξικές μορφές της. Το νερό ναι μεν απαλλαγμένο από αμμωνία αλλά συμπληρωμένο με θρεπτικά στοιχεία (νιτρικά ιόντα, κάλιο, σίδηρος) ρέει προς τα φυτά, από τα οποία απορροφάται και έπειτα επιστρέφει στις δεξαμενές των ψαριών απαλλαγμένο από θρεπτικά άλατα (έως και 97%) (Vlahos et al., 2019). Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό, πως κύριο ρόλο σε αυτό το σύστημα ανακύκλωσης παίζει το νερό με τα θρεπτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά του, ο λόγος C/N, η ιχθυοτροφή, η αφθονία των βακτηρίων, το φίλτρο, η απολύμανση και ο υδραυλικός χρόνος κατακράτησης καθώς επηρεάζουν τη φέρουσα ικανότητα των υδροπονικών συστημάτων (Vlahos et al., 2019).



Εικόνα 8: Ενδεικτικό σύστημα υδροπονίας (Πηγή: Nitrogen Recovery via Aquaponics – Bioaponics: Engineering Considerations and Perspectives, 2021)

Η εκτροφή ενός θαλάσσιου είδους σε χαμηλότερες (<35 ppt), υψηλότερες (>35ppt) ή μηδαμινές αλατότητες έχει αποδειχθεί πως είναι εφικτή. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα των Azab et al (2015) που υποστηρίζουν πως οι προνύμφες του είδους *S.aurata* που εκτίθενται σε χαμηλή αλατότητα (20 ‰) κατά τη διάρκεια εκτροφής (60 ημέρες) είναι σχεδόν ίσες σε μήκος, βάρος και ποσοστό επιβίωσης με τα άτομα που εκτίθενται σε υψηλή αλατότητα (35‰) ενώ πληθυσμοί βρέθηκαν, επίσης, και σε υψηλότερες αλατότητες (60‰) στη λιμνοθάλασσα Bardawil στην Αίγυπτο (Ben-Tuvia, 1979).

Τι συμβαίνει όμως στο μικροβίωμα; Το μικροβίωμα των ψαριών (έντερο, δέρμα και βράγχια) είναι υψίστης σημασίας για τη φυσιολογία του ξενιστή (Moschos et al., 2022), καθώς δίνει μία εικόνα των μικροοργανισμών που αναμένουμε να εντοπιστούν, των περιβαλλοντικών αλλαγών που συντελούνται και σε βάθος χρόνου δίνει πληροφορίες σχετικά με τις συνθήκες εκτροφής. Στην περίπτωση εκτροφής θαλάσσιων και υφάλμυρων ειδών, επικρατούν συνήθως στο έντερο αναερόβια ή προαιρετικά αναερόβια χημειότροφα γένη (*Aeromonas*, *Aliivibrio*, *Ralstonia*, *Salmonella*, *Shewanella*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Megamonas*, *Bacteroides*), με τα επικρατέστερα φύλα αυτά των πρωτεοβακτηρίων (*Proteobacteria*) και των γαλακτοβάκιλλων και οι οικογένειες *Rhodobacteriaceae* και *Flavobacteriaceae* να είναι οι κυρίαρχες (Moschos et al., 2022). Χαρακτηριστικός είναι ο



μικροοργανισμός του εντερικού μικροβιώματος του *S. aurata* (33%) *Pseudomonas* sp., που συμβάλλει σημαντικά στην καλλιέργεια της κόκκινης πιπεριάς (*Capsicum annuum*) (Samaddar et al., 2019).

Από τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό πως βασική προϋπόθεση στα υδροπονικά συστήματα παίζει το είδος και ο ρόλος των βακτηρίων σε συνδυασμό με την αλατότητα με χαρακτηριστικό παράδειγμα την διαδικασία της νιτροποίησης. Από την μία πλευρά, ο Vlahos et al. (2019) παρατήρησε ότι σε ένα υφάλμυρο υδροπονικό σύστημα όπου εκτρέφεται το είδος *Sparus aurata* (τσιπούρα) και καλλιεργείται το είδος *Crithmum maritimum* (μαρούλι) παρατηρείται μεγαλύτερη αφθονία βακτηρίων σε αλατότητα 20 ppt σε σύγκριση με 5 ppt. Στα συγκεκριμένα είδη επικρατεί μία σχέση σχήματος “U”, κατά την οποία η Na/K-ATPase και η αλατότητα έχουν αντιστρόφως ανάλογες τιμές στα βράγχια (Carrion et. al., 2005). Από την άλλη πλευρά, ο R.J. Gonzalez (2011) συμπέρανε πως σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατότητας (>35 ppt) διατηρείται η οσμωρύθμιση χάρη στην χαμηλή υδροπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών με αποτέλεσμα την σταθερή ροή αλάτων προς τον οργανισμό. Και στις δύο περιπτώσεις καθοριστικό ρόλο παίζει η πλαστικότητα και αναδιαμόρφωση των βραγχίων μέσω της οσμωρύθμισης κατά την προσαρμογή σε διαφορετικές αλατότητες (5ppt, 20 ppt, >35 ppt) από την επικρατούσα στην θάλασσα (35 ppt). Προϋπόθεση κατά τον εγκλιματισμό ευρύαλων τελεόστεων ειδών σε μια νέα αλατότητα, είναι η διαμόρφωση της αντλίας Na/K-ATPase στα κύτταρα με υψηλή συγκέντρωση ιόντων χλωρίου (chloride cells, CC) του βραγχιακού επιθηλίου (Carrion et. al., 2005), γιατί απορροφά μεγάλο ποσοστό αλάτων για να διευκολυνθεί η σωστή ποσότητα απορροφούμενου νερού. Τα χλωριούχα κύτταρα (CC) συμβάλλουν στην αποβολή περίσσειας αλάτων από τα σωματικά κύτταρα κατά την οσμωρύθμιση (Perry, 1997).

Ανάλογα τις συνθήκες εγκατάστασης του συστήματος, επικρατούν και οι αντίστοιχοι μικροοργανισμοί στα βιοφίλτρα, οι οποίοι εξαρτώνται από την εγκατάσταση και τις συνθήκες λειτουργίας (διάταξη, ποιοτικά χαρακτηριστικά νερού, τύπος βιοφίλτρου, μέθοδοι απολύμανσης, είδη εκτροφής και ιχθυοτροφών) (Moschos et al., 2022). Τα βιοφίλτρα είναι εμπλουτισμένα με μέλη των Nitrosomonadaceae και Nitrospiramembers, οι οποίοι θεωρούνται οι

πιο κοινοί οξειδωτές αμμωνίου και νιτρωδών, αντίστοιχα. Συνήθως, το 75% των γενών που αναπτύσσεται αργά (slow-growers) κυριαρχούν τόσο στα βιοφίλτρα όσο και στο νερού ενώ οι λίγοι καιροσκόποι που αναπτύσσονται γρήγορα (fast-growers) σχετίζονται κυρίως με το έντερο των εκτρεφόμενων ειδών (Moschos et al., 2022). Παρατηρούμε, λοιπόν, πως τα είδη που επικρατούν στα βιοφίλτρα υδροπονικών συστημάτων δεν είναι τα ίδια με αυτά των εκτρεφόμενων ειδών. Πιθανό αυτό να συμβαίνει εξαιτίας του γεγονότος ότι το μικροβίωμα των εκτρεφόμενων ειδών δεν είναι πλήρως προσαρμοσμένο σε τέτοιες συνθήκες και εξαιτίας του μεγάλου ανταγωνισμού, να υπερισχύουν μικροοργανισμοί πλήρως προσαρμοσμένοι.

Συμπερασματικά, με τη χρήση υδροπονικών συστημάτων είναι εφικτό να καλλιεργηθούν και είδη που παρουσιάζουν αλοανεκτικότητα (αλόφιλα), με το μαρούλι, την ντομάτα, τον βασιλικό, την μελιτζάνα, την πιπεριά και το σπανάκι να αποτελούν τα συνηθέστερα (Vlahos et al., 2019). Αυτό οφείλεται στην αύξηση της συγκέντρωσης αλάτων στα εδάφη και στην χρήση υπόγειων υδάτων στην γεωργία, τα οποία έχουν υψηλές συγκεντρώσεις ανθρακικών αλάτων. Έτσι λοιπόν εκτρέφονται μεσογειακά ευρύαλα είδη (*Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*) με ταυτόχρονη καλλιέργεια φυτικών οργανισμών με υψηλή εμπορική και διατροφική αξία (Vlahos et al., 2019). Καθοριστική είναι η συμβολή τόσο των βακτηρίων όσο και της οσμωρύθμισης, με τις δύο δράσεις να αλληλοσυμπληρώνονται πολλές φορές.

## **5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ**

Συνοψίζοντας, η αλατότητα παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των εντερικών βακτηρίων της τσιπούρας. Η αλατότητα επιδρά θετικά στην αύξηση των μικροοργανισμών και ταυτόχρονα παρατηρείται η ταχύτερη ανάπτυξή τους. Από την άλλη πλευρά, απουσία αλατότητας τα καλλιεργήσιμα βακτήρια φτάνουν σε μεγαλύτερες οπτικές πυκνότητες. Οι δύο παραπάνω συνθήκες αποτελούν υπόβαθρο για γρήγορη καλλιέργεια και συλλογή δειγμάτων για περαιτέρω αναλύσεις και για πειράματα που απαιτούν μεγάλη ποσότητα μικροοργανισμών, αντίστοιχα. Σημαντικό ρόλο στα υδροπονικά συστήματα (aquaponics) παίζουν τα εντερικά βακτήρια, τα οποία σε συνδυασμό με το ποσοστό της αλατότητας, οδηγούν και στην επιλογή των καλλιεργήσιμων φυτών.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Brendon Egon Kormann Staloch, Henrique Niero, Robert Cardoso de Freitas, Patricia Ballone, Fernanda Rodrigues-Costa, Daniela Barretto Barbosa Trivella, Andréa Dessen, Marcus Adonai Castro da Silva, André Oliveira de Souza Lima, (2022). Draft genome sequence of *Psychrobacter nivimaris* LAMA 639 and its biotechnological potential, Data in Brief, Volume 41, 107927, ISSN 2352-3409, <https://doi.org/10.1016/j.dib.2022.107927>.

Cánovas, D., Vargas, C., Csonka, L. N., Ventosa, A., & Nieto, J. J. (1996). Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: high-affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. *Journal of Bacteriology*, 178(24), 7221–7226.

Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S. T., Meseguer, J., Morinigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2013). Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(5), 1063–1070.

Dehler, C. E., Secombes, C. J., & Martin, S. A. M. (2017). Seawater transfer alters the intestinal microbiota profiles of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Scientific Reports*, 7(1).

Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R., & Davies, S. J. (2010). Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilization, intestinal histology, and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 300(1-4), 182–188.

Eichler J. *Halobacterium salinarum*: Life with more than a grain of salt. *Microbiology (Reading)*. (2023), doi: 10.1099/mic.0.001327. PMID: 37068123.

Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The Gut Microbiota of Marine Fish. *Frontiers in Microbiology*, 9.

Estruch, G., Collado, M. C., Penaranda, D. S., Tomás Vidal, A., Jover Cerdá, M., Pérez Martínez, G., & Martínez-Llorens, S. (2015). Impact of Fishmeal Replacement in Diets for Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) on the Gastrointestinal Microbiota Determined by Pyrosequencing the 16S rRNA Gene. *PLOS ONE*, 10(8), e0136389.

Floris, Rosanna & Manca, Silvana & Fois, N. (2013). Microbial ecology of intestinal tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) from two coastal lagoons of Sardinia (Italy). *Transitional Waters Bulletin*. 7. 4-12. 10.1285/i1825229Xv7n2p4.

Gonzalez, R. J. (2011). The physiology of hyper-salinity tolerance in teleost fish: a review. *Journal of Comparative Physiology B*, 182(3), 321–329.

Greenwell, M. G., Sherrill, J., & Clayton, L. A. (2003). *Osmoregulation in fish. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 6(1), 169–189.

Kormas KA, Meziti A, Mente E, Frentzos A. (2014). Dietary differences are reflected on the gut prokaryotic community structure of wild and commercially reared sea bream (*Sparus aurata*). *Microbiologyopen*. 2014 Oct;3(5):718-28. doi: 10.1002/mbo3.202. PMID: 25066034; PMCID: PMC4234263.

Lucas López, R., Grande Burgos, M. J., Gálvez, A., & Pérez Pulido, R. (2016). The human gastrointestinal tract and oral microbiota in inflammatory bowel disease: a state of the science review. *APMIS*, 125(1), 3–10.

Myers, J. A., Curtis, B. S., & Curtis, W. R. (2013). Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophysics*, 6(1), 4.

M. Power, M.A. Sheridan, *General and Comparative Endocrinology*, Seale - Breves, (2022)

Nikouli, Meziti, Antonopoulou, Mente, & Kormas. (2019). Host-Associated Bacterial Succession during the Early Embryonic Stages and First Feeding in Farmed Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *Genes*, 10(7), 483.

Nikouli, E., Meziti, A., Antonopoulou, E., Mente, E., & Kormas, K. (2018). Gut Bacterial Communities in Geographically Distant Populations of Farmed Sea Bream (*Sparus aurata*) and Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Microorganisms*, 6(3), 92.

Parma, L., Candela, M., Soverini, M., Turrone, S., Consolandi, C., Brigidi, P., Bonaldo A. (2016). Next-generation sequencing characterization of the gut bacterial community of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed low fishmeal-based diets with increasing soybean meal levels. *Animal Feed Science and Technology*, 222, 204–216.

Perry, S. F. (1997). The chloride cell: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. *Annual Review of Physiology*, 59(1), 325–347.

Randall, D. J., W. Burggren, and K. French. (1997). *Eckert animal physiology: Mechanisms and adaptations*. W. H. Freeman and Co., New York.

Raul Laiz - Carrion, Pedro M. Guerreiro, Juan Fuentes, Adelino V. M. Canario, Maria P. Martin Del Rio, Juan M. Mancera (2005). Branchial osmoregulatory response to salinity in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*), *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Zoology*, 563 - 576

Rosado, D., Pérez-Losada, M., Severino, R., Cable, J., & Xavier, R. (2018). Characterization of the skin and gill microbiomes of the farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*) and seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 57 - 64.

Sandipan Samaddar, Poulami Chatterjee, Aritra Roy Choudhury, Shamim Ahmed, Tongmin Sa (2019). Interactions between *Pseudomonas*

spp. and their role in improving the red pepper plant growth under salinity stress, *Microbial Research*, σσ 66 - 73.

Solé-Jiménez P, Naya-Català F, Piazzon MC, Estensoro I, Calduch-Giner JÀ, Sitjà-Bobadilla A, Van Mullem D and Pérez-Sánchez J (2021). Reshaping of Gut Microbiota in Gilthead Sea Bream Fed Microbial and Processed Animal Proteins as the Main Dietary Protein Source. *Front. Mar. Sci.* 8:705041. doi: 10.3389/fmars.2021.705041

Stefanos Moschos, Konstantinos Ar. Kormas, Hera Karayanni (2022). Prokaryotic diversity in marine and freshwater recirculating aquaculture systems, *Reviews in Aquaculture*, σσ 1861 - 1886.

Tapia-Paniagua, S. T., Ceballos-Francisco, D., Balebona, M. C., Esteban, M. Á., & Morinigo, M. Á. (2018). Mucus glycosylation, immunity and bacterial microbiota associated to the skin of experimentally ulcerated gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology*, 75, 381–390.

Ventosa, A., Nieto, J. J., & Oren, A. (1998). *Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 504–544.

Villasante, A., Ramírez, C., Rodríguez, H., Catalán, N., Díaz, O., Rojas, R., Romero, J. (2019). In-depth analysis of swim bladder-associated microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Scientific Reports*, 9(1).

Vlahos, N., Levizou, E., Stathopoulou, P., Berillis, P., Antonopoulou, E., Bekiari, V., Krigas, N., Kormas, K., Mente, E. (2019). An Experimental Brackish Aquaponic System Using Juvenile Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) and Rock Samphire (*Crithmum maritimum*). *Sustainability*, 11(18), 4820.

Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Martin, E. L, & Elliot, E. (1980). *Halomonas elongata*, a New Genus and Species of Extremely Salt-Tolerant Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30(2), 485–495.

Wu, Y., Zaiden, N., & Cao, B. (2018). The Core- and Pan-Genomic Analyses of the Genus *Comamonas*: From Environmental Adaptation to Potential Virulence. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03096>

Zhao, R., Symonds, J. E., Walker, S. P., Steiner, K., Carter, C. G., Bowman, J. P., & Nowak, B. F. (2020). Salinity and fish age affect the gut microbiota of farmed Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 528, 735539.

Κάππα Ε., Χιωτέλη Δ. (2022). Επίδραση της συγκέντρωσης θρεπτικού υλικού στο ρυθμό αύξησης βακτηρίων από κόπρανα τσιπούρας (*Sparus aurata*), Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κλαουδάτος, Σ., & Κλαουδάτος, Δ. (2012). Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφές υδρόβιων ζωικών οργανισμών. Αθήνα: Εκδόσεις Προπομπός.

Μεντέ, Ε., & Νέγκας, Ι. (2011). Στοιχεία Φυσιολογίας Θρέψεως και εφαρμοσμένη διατροφή ιχθύων και καρκινοειδών. Αθήνα: Εκδόσεις Παπαζήση.

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

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