

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Σχέση διατροφικής κατάστασης και βακτηρίων εντέρου άγριας και
εκτρεφόμενης τσιπούρας (*Sparus aurata*)»**

Κοσμάς-Δημήτριος Βασιλάτος

ΒΟΛΟΣ 2014

**«Σχέση διατροφικής κατάστασης και βακτηρίων εντέρου άγριας και
εκτρεφόμενης τσιπούρας (*Sparus aurata*)»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) **Έλενα Μεντέ**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Φυσιολογία Θρέψης Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπουσα*.
- 2) **Κωνσταντίνος Κορμάς**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.
- 3) **Ιωάννης Μποζιάρης**, Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα προπτυχιακή διπλωματική εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της εργασίας αυτής, κα Έλενα Μεντέ για την πολύτιμη βοήθειά της και τη διαρκή υποστήριξή της, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κ. Κωνσταντίνο Κορμά και κ. Ιωάννη Μποζιάρη, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Αθανάσιο Φρέντζο και την κα. Αγγελική Λαδά για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά τους, όσον αφορά την προμήθεια εργαστηριακού υλικού.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή εξετάζει τον βακτηριακό πληθυσμό στον πεπτικό σωλήνα της τσιπούρας (*Sparus aurata*) και ελέγχει πιθανές διαφοροποιήσεις που δύναται να υπάρχουν ανάμεσα στη δομή και την κατανομή των βακτηριακών κοινοτήτων σε τσιπούρες βιολογικής εκτροφής, συμβατικής εκτροφής και άγριου πληθυσμού. Για την εξέταση αυτή έγινε σύγκριση της ποικιλότητας των βακτηρίων σε δείγματα εντέρου ιχθύων που προέρχονται από βιολογική και συμβατική εκτροφή από την εταιρία ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΙΑ ΚΕΦΑΛΟΝΙΑΣ Α.Ε η οποία και εδρεύει στον κόλπο του Αργοστολίου στην περιοχή της Πολικής (Ιόνιο Πέλαγος). Τα δείγματα από τις άγριες τσιπούρες ήταν από τον κόλπο του Παγασητικού. Οι ιχθείς θανατώθηκαν φυσιολογικά τοποθετούμενα σε πάγο και μεταφέρθηκαν άμεσα στο εργαστήριο όπου και απομονώθηκε το έντερο και το στομάχι. Η ποικιλότητα των βακτηρίων στα δείγματα προσδιορίστηκε μέσω πυραλληλούχισης σε μέρος του γονιδίου 16S rRNA. Οι οργανισμοί ταξινομήθηκαν σε OTU (Operational Taxonomic Unit, Λειτουργική Ταξινομική Μονάδα).

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι το 5,5% (17 είδη) των OTUs εντοπίστηκαν και στις τρεις ομάδες μελέτης. Επιπλέον τα πέντε από τα δεκαεπτά αυτά είδη στο σύνολο των 305 που βρέθηκαν, και στις εννέα επαναλήψεις και στις τρεις ομάδες, αποτελούσαν το 73,75% του συνόλου των αλληλουχιών. Από το σύνολο όλων τα 89 (29,2%) βρέθηκαν μόνο σε ιχθείς βιολογικής εκτροφής, τα 40 (13,1%) μόνο σε ιχθείς συμβατικής εκτροφής και τα 132 (43,2%) μόνο σε άγριους ιχθείς. Ενώ, 11 (3,6%) βρέθηκαν κοινά σε βιολογικής και συμβατικής εκτροφής, 5 (1,6%) βρέθηκαν κοινά σε συμβατικής εκτροφής και σε άγρια και 9 (2,9%) βρέθηκαν κοινά σε βιολογικής εκτροφής και άγριους ιχθείς.

Λέξεις κλειδιά: μικροβιακές κοινότητες, πυραλληλούχιση, *Sparus aurata*, βιολογική εκτροφή.

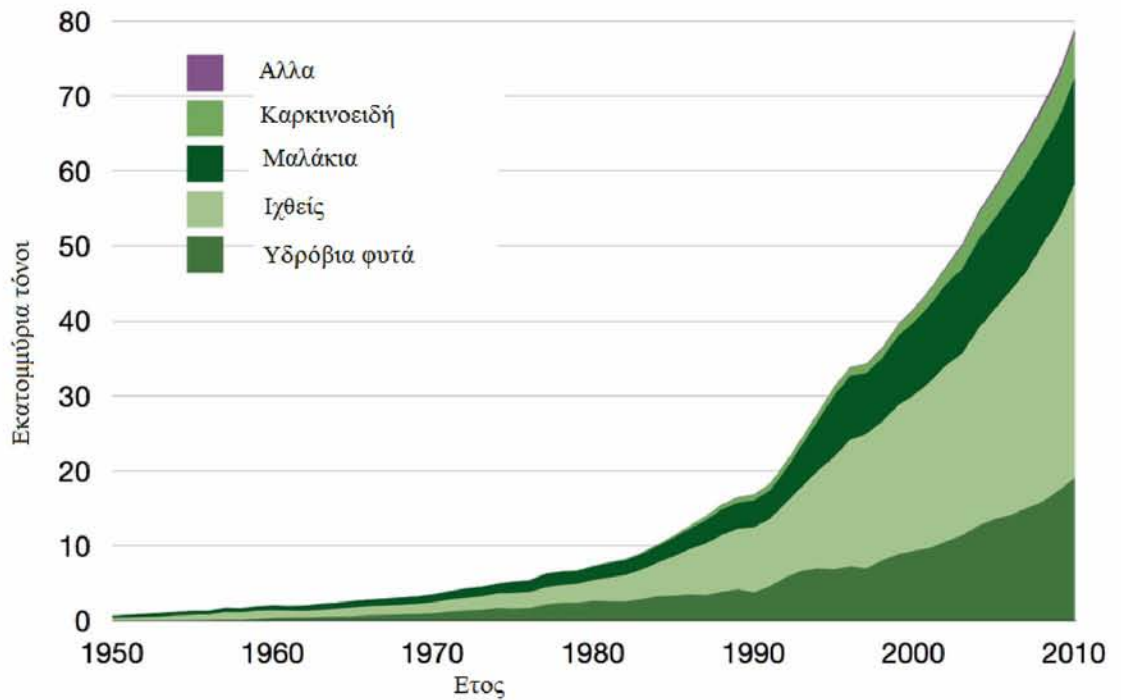
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 8 |
| 1.1. ΥΔΑΤΟΚΑΛΙΕΡΓΕΙΕΣ | 8 |
| 1.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΥΔΑΤΟΚΑΛΙΕΡΓΕΙΕΣ | 13 |
| 1.3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΕΙΔΟΣ <i>Sparus aurata</i> | 17 |
| 1.4. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΕΣ ΣΤΟ ΠΕΠΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΥΔΡΟΒΙΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ | 22 |
| 1.5. ΠΥΡΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ | 24 |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 26 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 28 |
| 3.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 28 |
| 3.2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 41 |
| 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 45 |
| 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 48 |
| 5.1. Ξένη Βιβλιογραφία | 48 |
| 5.2. Ελληνική Βιβλιογραφία | 53 |
| 5.3. Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία | 53 |
| 5.4. Βιβλία | 54 |
| 6. ABSTRACT | 54 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

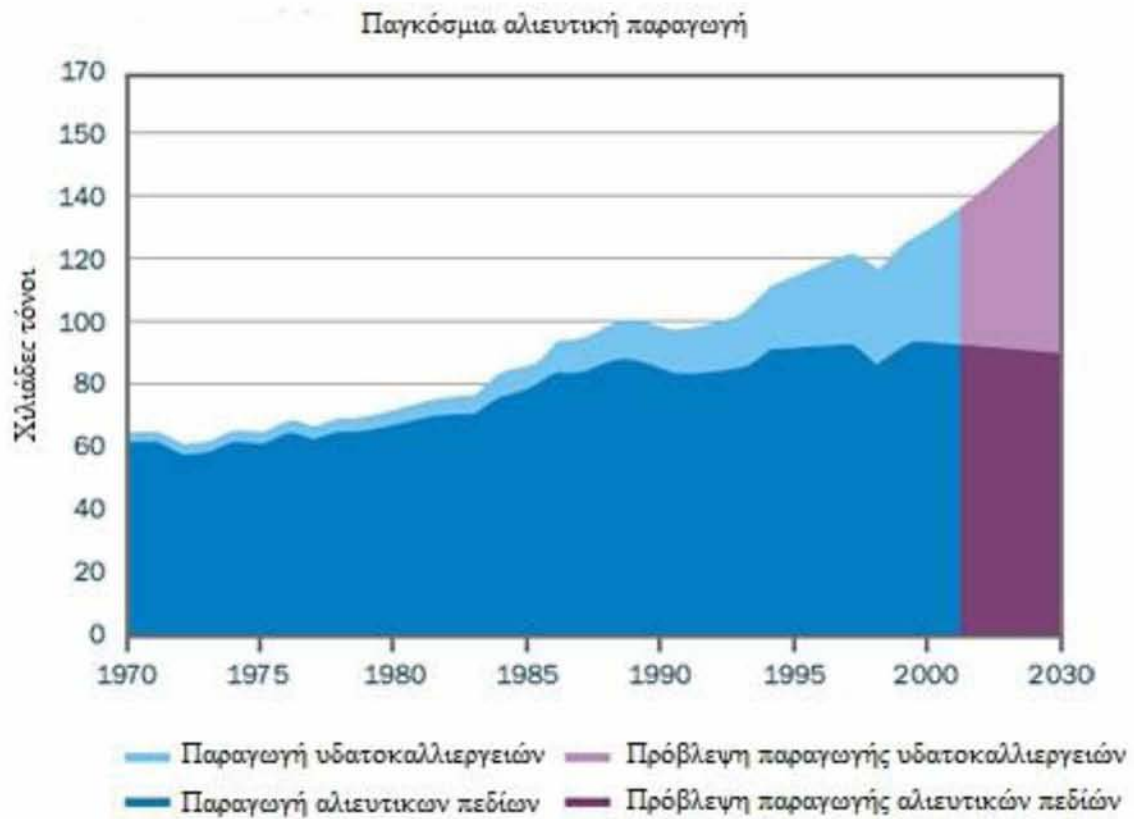
1.1. ΥΔΑΤΟΚΑΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Οι υδατοκαλλιέργειες περιλαμβάνουν την εκτροφή ιχθύων, καρκινοειδών, μαλακίων και υδρόβιων φυτών. Το 2002 η παραγωγή τους έφτασε το 50% της συνολικής αλιευτικής παραγωγής, που είχε σταθεροποιηθεί έως τότε στους 120 εκατ. τόνους από τους οποίους οι 90 περίπου εκατ. τόνοι προορίζονταν για την ανθρώπινη κατανάλωση (Κλαουδάτος Σ. και Κλαουδάτος Δ. 2002). Τα επόμενα 8 χρόνια η συνολική παραγωγή αυξήθηκε στους 158 περίπου εκατ. τόνους, με τις υδατοκαλλιέργειες να αποτελούν τους 77 εκατ. τόνους δηλαδή το 51 % (<ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/a-0a.pdf>). Το μισό της παραγωγής των υδατοκαλλιεργειών αποτελούν οι ιχθείς 38,8 εκατ. τόνοι (54,7%) αξίας 40,5 δισεκατομμυρίων δολαρίων (41,2%), ακολουθούν τα δίθυρα μαλάκια (μύδια, στρείδια και αχιβάδες) με παραγωγή 13,1 εκατ. τόνους, τα καρκινοειδή (γαρίδες, αστακοί, караβίδες, καβούρια) με 5 εκατ. τόνους, τα θαλάσσια φυτά 1,8 εκατ. τόνους, οι ανάδρομοι και κατάδρομοι ιχθύες με 3,3 εκατ. τόνους και άλλα θαλάσσια είδη υδρόβιων οργανισμών με παραγωγή 0,6 εκατ. τόνους (Fao, 2010a).



Εικόνα 1. Χρονολογική απεικόνιση της αύξησης της παράγωγης των υδατοκαλλιεργειών από το 1950 μέχρι το 2010. Η αύξηση ξεκίνησε τη δεκαετία του 80 και συνεχίζεται η ανοδική πορεία μέχρι και σήμερα (Fao, 2010a).

Είναι πλέον γνωστό και τεκμηριωμένο ότι τα περισσότερα αλιευτικά πεδία παγκοσμίως έχουν ήδη φτάσει το ανώτατο όριο δυναμικότητας που θα μπορούσαν να έχουν τη στιγμή που οι διατροφικές απαιτήσεις του ανθρώπινου είδους ολοένα και αυξάνονται. Το κενό αυτό που δημιουργείται ανάμεσα στην προσφορά των αλιευμάτων και της ζήτησης τους από την αγορά καλείται να καλύψει ο κλάδος των υδατοκαλλιεργειών (Blancheton, 2000).

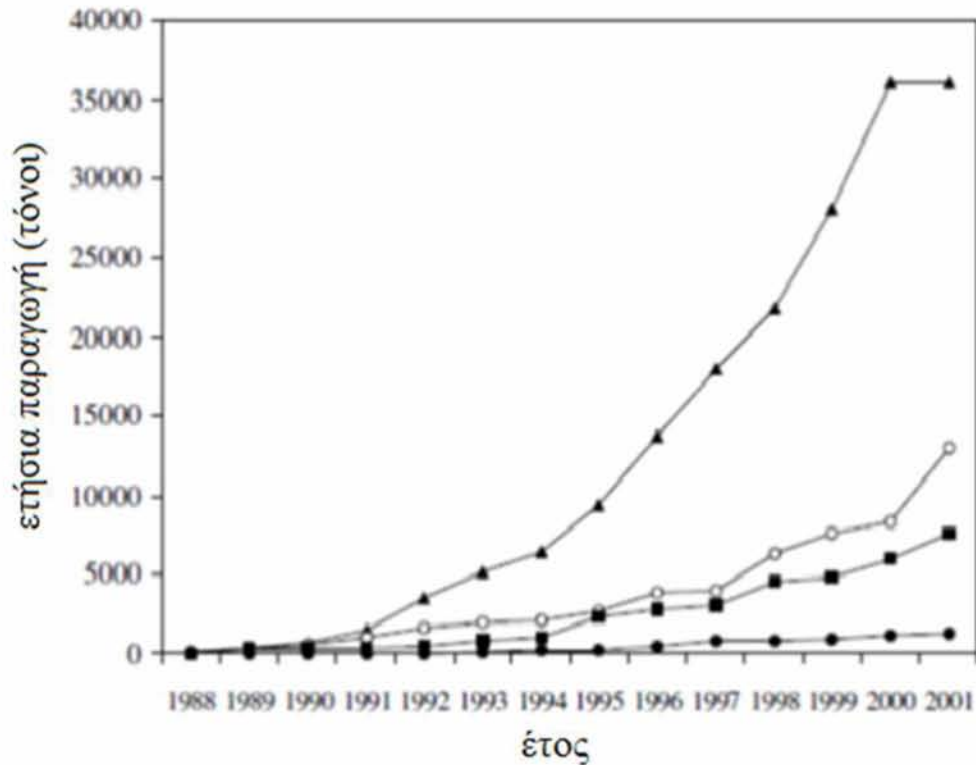


Εικόνα 2. Παγκόσμια αλιευτική παραγωγή και πρόβλεψη έως το 2030. Την δεκαετία του 80 έχουμε παύση της ανοδικής πορείας της παραγωγής από τα αλιευτικά πεδία. Η συνολική όμως αλιευτική παραγωγή συνεχίζει να αυξάνεται, προστιθέμενης και της παραγωγής των υδατοκαλλιεργειών (<http://www.aquaculture.ca/files/opportunity-expansion.php>).

Σύμφωνα με το FAO (2010b) οι υδατοκαλλιέργειες είναι ο ταχύτερα αναπτυσσόμενος παραγωγικός τομέας τροφίμων στον κόσμο: από το 1 εκατ. τόνους ετήσια παραγωγή το 1950, έφτασε το 52,5 εκατ. τόνους το 2008 και 67 εκατ. τόνους το 2012, αξίας 98,4 δισεκατομμυρίων δολαρίων. Η συνεισφορά τους στην κατακεφαλήν κατανάλωση υδρόβιων ζωικών οργανισμών αυξήθηκε από τα 0,7kg το

1970 στα 7,8kg το 2008, που αντιστοιχεί σε ετήσια αύξηση 6,6%. Στην παραγωγή αυτή επικεφαλής είναι οι χώρες της Ασίας και του Ειρηνικού με ποσοστό που φτάνει σε τόνους το 89% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής και σε αξία το 79%. Το μεγαλύτερο ποσοστό κατέχει η Κίνα, που παρήγαγε το 62% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής σε τόνους και το 59% της συνολικής αξίας (Fao, 2010a. <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/a-0a.pdf>).

Η Ελλάδα ξεκίνησε νωρίς την προσπάθεια ανάπτυξης των υδατοκαλλιεργειών, ήδη από το 1951. Τη χρονιά αυτή πραγματοποιήθηκε εισαγωγή αυγών για εκκόλαψη της ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) στον ιχθυογεννητικό σταθμό του ποταμού Λούρου, στο Χάνι του Τερόβου, με σκοπό τον εμπλουτισμό των ορεινών ρεόντων υδάτων και τη διάδοση της τεχνητής εκτροφής. Η ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια κατέχει την πρώτη θέση στη Μεσόγειο, με παραγωγή το 2006, 100.000 τόνους σε συνολική μεσογειακή παραγωγή 208.700 τόνους. Παράλληλα, από τους 37 ιχθυογεννητικούς σταθμούς της χώρας παρήχθησαν περίπου 390 εκατ. ιχθύδια λαυρακιού και τσιπούρας και 10 εκατ. ιχθύδια άλλων υδρύαλων ειδών (φαγκρί, μυτάκι, λυθρίνι κ.α.), που αντιπροσωπεύουν και σε αυτήν την περίπτωση το 50% της μεσογειακής παραγωγής (Κλαουδάτος Σ. και Κλαουδάτος Δ. 2012).

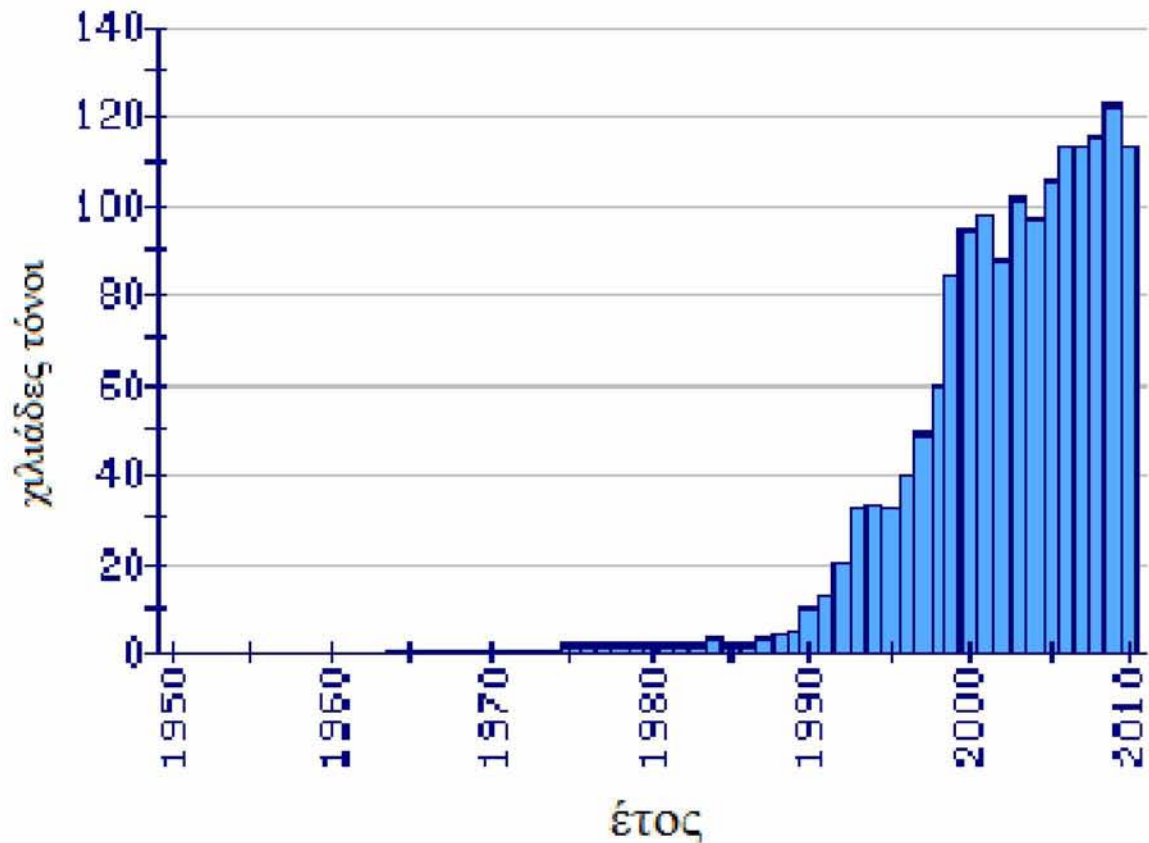


Εικόνα 3. Ετήσια παραγωγή καλλιτεργούμενης τσιπούρας από το 1988 έως το 2001.

Τα επίπεδα παραγωγής αυξήθηκαν ραγδαία κυρίως στην Ελλάδα (▲) η οποία έχει και την μεγαλύτερη παραγωγή, ακολουθούν Ισπανία (○), η Ιταλία (■) και η Γαλλία (●) (R. Brown, 2003).

Η τσιπούρα *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) είναι είδος της Μεσογείου και όχι μόνο, και μαζί με το λαυράκι (*Dicentrarchus labrax*) ένα από τα δύο κυριότερα εκτρεφόμενα είδη στις μεσογειακές και ελληνικές θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες. Η πρώτη προσπάθεια ανάπτυξης ιχθυοτροφείων έγινε το 1981 στο Ληξούρι της Κεφαλονιάς στην περιοχή της Παλικής στον κόλπο του Αργοστολίου, όταν η εταιρία ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΙΑ ΚΕΦΑΛΟΝΙΑΣ Α.Ε εισήγαγε από ιχθυογεννητικό σταθμό της Ιταλίας γόνους τσιπούρας (*Sparus aurata*) και λαυρακιού (*Dicentrarchus labrax*). Η προσπάθεια αυτή ήταν επιτυχημένη έχοντας σαν συνέπεια ραγδαία άνθιση και ανάπτυξη της καλλιέργειας των δυο αυτών ειδών και γενικότερα του κλάδου των

υδατοκαλλιεργειών σε όλη τη χώρα στα πρότυπα και με τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν στην πρώτη αυτή προσπάθεια.



Εικόνα 4. Ελληνική παραγωγή υδατοκαλλιεργειών από το 1950 μέχρι το 2010. Στα τέλη τις δεκαετίας του 80 η παραγωγή ξεκίνησε τη αυξητική της πορεία που συνεχίζεται μέχρι και σήμερα (http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_greece/en).

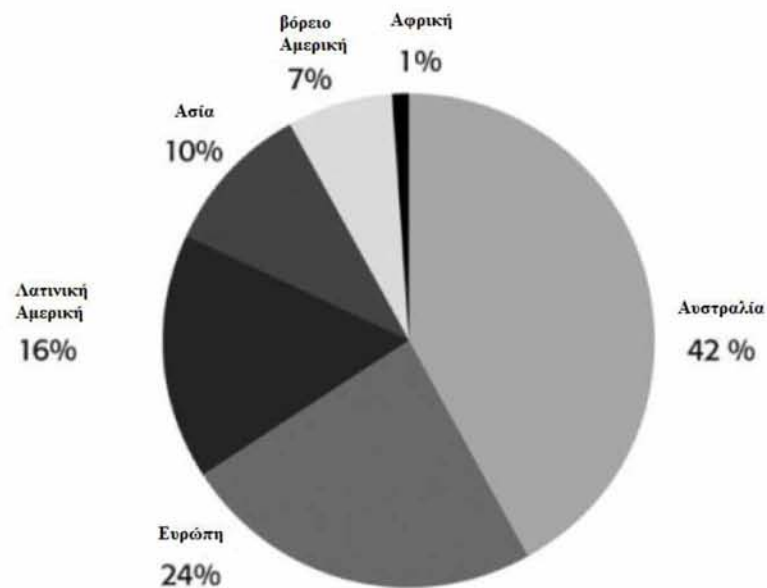
1.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΥΔΑΤΟΚΑΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Οι βιολογικές υδατοκαλλιέργειες είναι πρωτοβουλία η οποία πρωτοεμφανίστηκε στην Ευρώπη και συγκεκριμένα στην Αυστρία το 1994 όταν

ορισμένοι οργανισμοί πιστοποίησης άρχισαν να θέτουν τις ελάχιστες απαιτούμενες προδιαγραφές. Πρωτοπόροι στην κίνηση αυτή ήταν Γερμανικές και Αυστριακές μονάδες οι οποίες καλλιεργούσαν κυπρίνο (*Cyprinus carpio*), θέτοντας τις προδιαγραφές σε όλα τα στάδια της παραγωγής του (<http://aristrouth.blogspot.gr/p/1990.html>).

Η πρώτη επίσημη προσπάθεια καθορισμού των γενικών προδιαγραφών για την βιολογική υδατοκαλλιέργεια έγινε το 2000 στη Γαλλία και την Αγγλία και η πρώτη επίσημη παγκόσμια προσπάθεια έγινε στην Γερμανία την ίδια χρονιά από τη Διεθνή Ομοσπονδία Βιολογικής Γεωργίας (International Federation of Organic Agriculture Movements, IFOAM) (IFOAM EU Group, 2010).

Η παραγωγή από τη βιολογική υδατοκαλλιέργεια το 2000, ήταν 5.000 τόνοι, από τις Ευρωπαϊκές χώρες, το 2003 έφτασε στους 7.500-8000 ενώ το 2005 έφτασε στους 10.330 τόνους και η αξία της σε 56,08 εκ. € (http://www.onlineexpo.gr/articlesDetails_gr.php?artid=28). Έως και το 2012 η παραγωγή προϊόντων βιολογικής υδατοκαλλιέργειας έφτασε τους 14.000 τόνους, την ίδια στιγμή που η παγκόσμια παραγωγή ήταν 53.400 τόνους (<http://www.fao.org/docrep/015/i2734e/i2734e04c.pdf>).



Εικόνα 5. Παγκόσμια παραγωγή προϊόντων υδατοκαλλιέργειας το έτος 2010. Το μεγαλύτερο ποσοστό παραγωγής το έχει η Αυστραλία και ακολουθούν η Ευρώπη και η Ασία (http://www.food.actapol.net/pub/1_2_2010.pdf).

Πλέον παγκοσμίως λειτουργούν 240 οργανισμοί πιστοποίησης προϊόντων υδατοκαλλιέργειας σε 29 χώρες (IFOAM EU Group, 2010). Τα είδη που καλλιεργούνται αυξήθηκαν από 4 το 2000 σε 30 το 2010 (από τα οποία τα 6 καρκινοειδή), στην Ευρώπη κυρίως καλλιεργούνται τα είδη: σολομός του Ατλαντικού (*Salmo salar*), που παράγεται στην Ιρλανδία και τη Σκωτία, πέστροφα (*Salmo trutta*), που παράγεται στη Σκωτία και τη Γερμανία, κυπρίνος (*Cyprinus carpio*), που παράγεται στην Αυστρία και τη Γερμανία, μυδιών του γένους *Pteriomorpha* τα οποία παράγονται στην Ιρλανδία και τσιπούρα (*Sparus aurata*) και

λαυράκι (*Dicentrarchus labrax*) που παράγονται σε Γαλλία και Ελλάδα (<http://www.fao.org/docrep/015/i2734e/i2734e04c.pdf>).

Η αργή αρχική ανάπτυξη της βιολογικής υδατοκαλλιέργειας οφείλεται στην απουσία ευρωπαϊκών και παγκόσμιων αποδεχόμενων κανονισμών και κριτηρίων για την παραγωγή των βιολογικών προϊόντων υδατοκαλλιέργειας. Πρόσφατα, έγινε η διερεύνηση και ο προσδιορισμός των κριτηρίων, με την υιοθέτηση των κανονισμών πλαισίου σε ολόκληρη την Ευρωπαϊκή Ένωση, Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 710/2009 και αριθ. 834/2007. Διερεύνηση που κυρίως αφορούσε την ιχθυοφόρτηση των κλωβών στους οποίους διαβιούν και αναπτύσσονται οι ιχθείς και την εξολοκλήρου απαγόρευση των αντιβιοτικών σε όλα τα στάδια παραγωγής τους. Για τη βιολογική υδατοκαλλιέργεια, κρίνεται αναγκαίο να ερευνηθούν περισσότερο τα κριτήρια βιολογικής υδατοκαλλιέργειας και να καθορισθούν πρότυπα και ρυθμίσεις για την παραγωγή και επεξεργασία των προϊόντων της (<http://aristrouth.blogspot.gr/p/1990.html>).

Οι βιολογικοί ή αλλιώς οργανικοί ιχθείς καλλιέργειας παρουσιάζουν αρκετές διαφορές στην παραγωγή τους σε σχέση με αυτούς της συμβατικής καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, έχουν τρεις βασικές διαφορές, οι διαφορές αυτές είναι, στην τροφή των ιχθύων (αποκλειστικά βιολογικές τροφές), στο χώρο που εκτρέφονται (μικρότερη ιχθυοφόρτηση) και στη χρήση αντιβιοτικών (απαγόρευση σε όλα τα στάδια της παραγωγής (<http://www.fao.org/docrep/015/i2734e/i2734e04c.pdf>)).

Πειράματα που έχουν γίνει πάνω στις διαφορές της βιολογικής και της συμβατικής τσιπούρας έδειξαν ότι η βιολογική τσιπούρα έχει οργανικά και εξωτερικά χαρακτηριστικά που μοιάζουν περισσότερο με την άγρια παρά με την συμβατική. Η

βασικότερη διαφορά τους ως αναφορά την καλλιέργεια είναι ότι η βιολογική τσιπούρα χρειάζεται σχεδόν το διπλάσιο χρόνο για να φτάσει σε εμπορεύσιμο μέγεθος, έχει όμως καλύτερη μετατρεψιμότητα τροφής (1,25 έναντι 1,6 της συμβατικής εκτροφής) (Lysandros et al, 2004).

Αναλυτικά, τα βιολογικά ψάρια τρέφονται με 100% πιστοποιημένη βιολογική τροφή. Συνήθως το μεγαλύτερο μέρος της ιχθυοτροφής, αποτελείται από ιχθυάλευρα, που προέρχονται από προϊόντα τα οποία απομένουν από την αλιεία. Η τροφή αυτή περιέχει υδατάνθρακες, κυρίως από μηδική (τριφύλλι), βιταμίνες, κάποια ανόργανα συστατικά, ανόργανα άλατα και ουσίες που βοηθούν στην τελική μορφή της τροφής. Το νερό είναι άριστης ποιότητας και η ιχθυοφόρτηση στους κλωβούς δε ξεπερνά τα 15 kg/m³. Οι μονάδες που παράγουν σήμερα στη χώρα μας βιολογικά ψάρια εκτροφής είναι οι «Ιχθυοτροφία Κεφαλληνίας Α.Ε», το «Γαλαξίδι Θαλάσσιες Καλλιέργειες» και οι «Ελληνικές Ιχθυοκαλλιέργειες Α.Β.Ε.Ε.».

1.3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΕΙΔΟΣ *Sparus aurata*

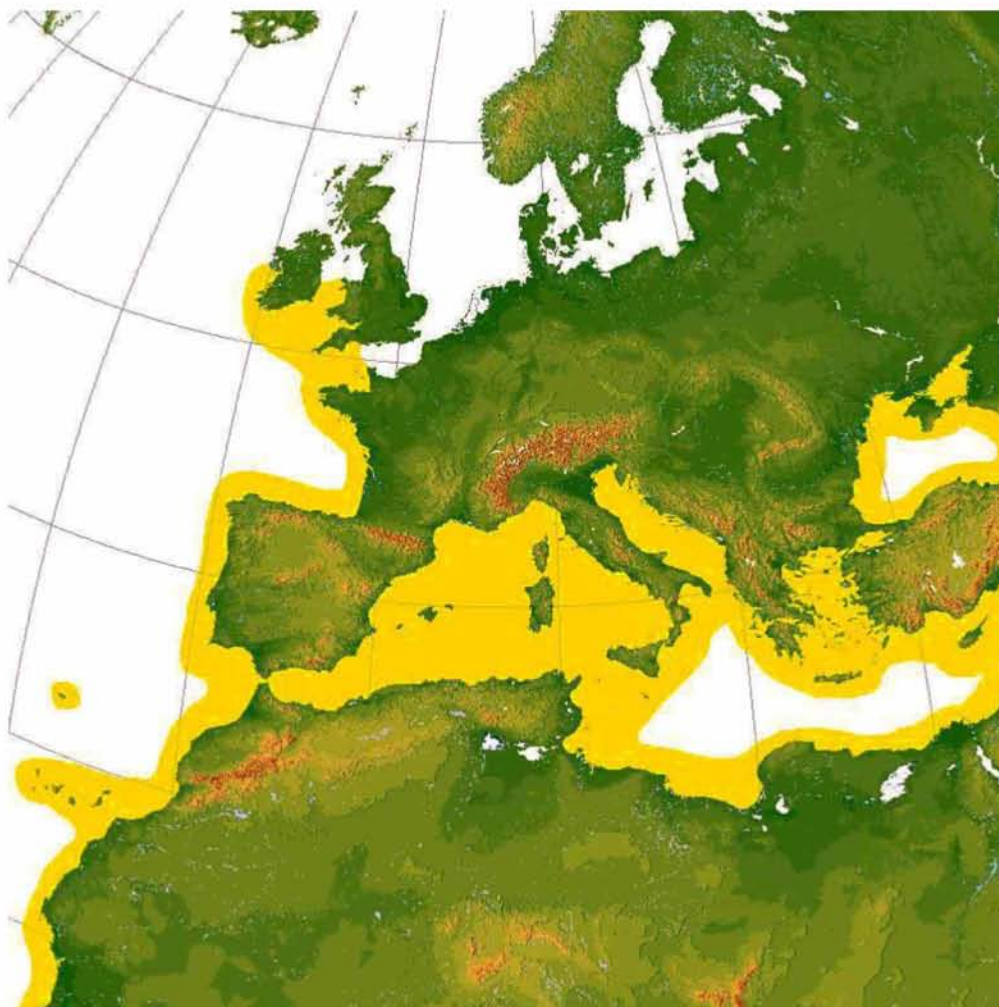
Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) είναι ιχθύς ευρύθερμος και ευρύαλος ανήκει στην οικογένεια των Σπαρίδων (*Sparidae*) η οποία περιέχει ένα μεγάλο αριθμό ιχθύων από διάφορα γένη. Οι ιχθείς της οικογένειας των σπαρίδων βρίσκονται κυρίως σε τροπικά κλίματα. Στη Μεσόγειο τα γένη της οικογένειας των Σπαρίδων που συναντάμε συνήθως είναι: *Dentex*, *Sparus*, *Diplodus*, *Pagellus*, *Pagrus*, *Lithognathus*, *Spondyliosoma*, *Oblada*, *Crenidens*, *Boops* και *Sarpa*. Οι περισσότεροι ιχθείς της οικογένειας των Σπαρίδων έχουν μεγάλη αξία λόγω της καλής ποιότητας στο κρέας τους. Ορισμένα από τα είδη της οικογένειας αυτής ήδη έχουν εισαχτεί σε εντατικά συστήματα καλλιέργειας : ο σαργός (*Diplodus sargus*), το φαγκρί (*Pagrus pagrus*) και

η τσιπούρα (*Sparus aurata*) (R. Brown, 2003 & <http://www.fao.org/docrep/w2333e/W2333E03.htm#31>).



Εικόνα 6. Τσιπούρα (*Sparus aurata*)

Τα ενδιαιτήματα της τσιπούρας βρίσκονται στις ακτές του Ανατολικού Ατλαντικού από τη Μεγάλη Βρετανία ως τη Σενεγάλη, τη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα. Οι πληθυσμοί βρίσκονται κυρίως σε ακτές με σχετικά μικρά βάθη σε ένα εύρος από την ανατολική μεσόγειο έως της ακτές του ατλαντικού, ακόμα και στις βόρειες βρετανικές ακτές κατά τους καλοκαιρινούς μήνες (R. Brown, 2003). Πιθανό είναι να βρεθεί τόσο στο ανοιχτό θαλάσσιο περιβάλλον όπως επίσης και σε περιβάλλοντα όπως οι ακτές, οι εκβολές ποταμών, τα βραχώδη ύδατα και τα ύδατα με θαλάσσια βλάστηση.



Εικόνα 7. Κατανομή πληθυσμών τσιπούρας. Οι πληθυσμοί βρίσκονται κυρίως σε ακτές με σχετικά μικρά βάθη σε ένα εύρος από την ανατολική μεσόγειο έως της ακτές του ατλαντικού, ακόμα και στις βόρειες βρετανικές ακτές κατά τους καλοκαιρινούς μήνες (R. Brown, 2003).

Το σώμα της τσιπούρας έχει σχήμα επίμηκες και το στόμα έχει 4 με 6 κυνόδοντες μπροστά από δυο σιαγόνες. Το χρώμα του σώματος είναι γκρι ασημί με μια μεγάλη σκούρα κηλίδα πάνω από τα βράχια. Στο κεφάλι και από τις δυο πλευρές, ειδικά στους ενήλικες υπάρχει επίσης μια κίτρινη κηλίδα (Bauchot and Hureau, 1986). Ο κύκλος αναπαραγωγής ξεκινά στην ανοιχτή θάλασσα κατά τους μήνες Οκτώβριο, Νοέμβριο και Δεκέμβριο, έπειτα τα νεαρά άτομα μεταναστεύουν της

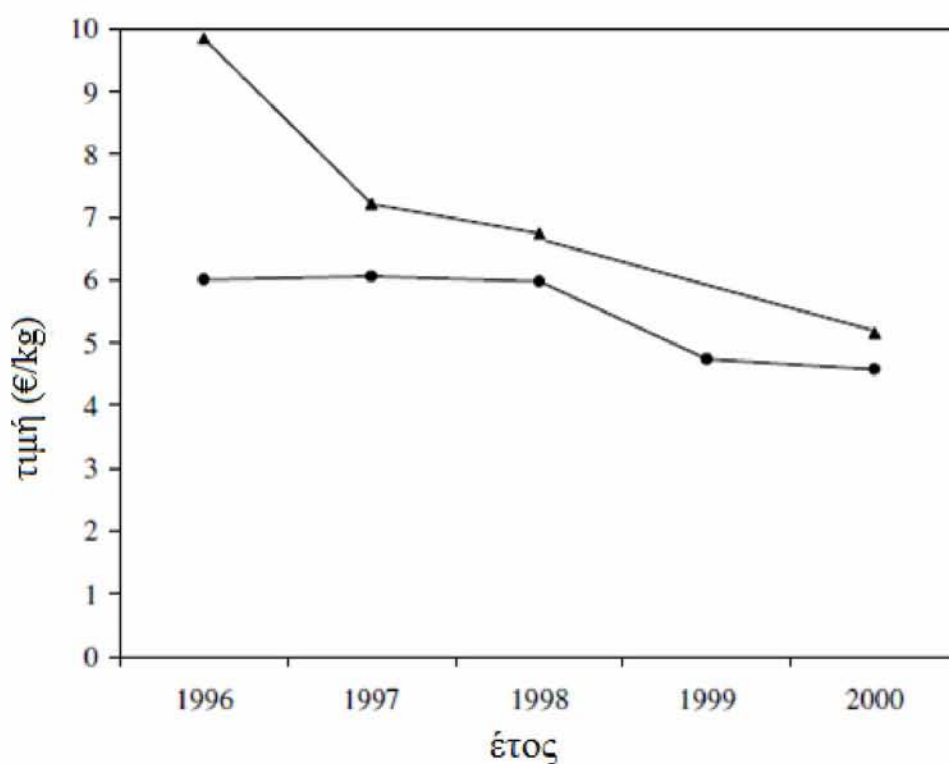
αρχές της άνοιξης στις πιο προστατευμένες παράκτιες περιοχές όπου μπορούν να βρουν ευκολότερα τροφή και έχουν ηπιότερες θερμοκρασίες. Η τσιπούρα είναι ερμαφρόδιτος, πρωτανδρικός ιχθύς, και η αναπαραγωγή συμβαίνει απελευθερώνοντας στη θάλασσα τα αναπαραγωγικά κύτταρα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται καθημερινά για μια περίοδο 3-4 εβδομάδων. Τα αρσενικά ωριμάζουν σεξουαλικά στο δεύτερο έτος της ηλικίας τους σε μέγεθος 30cm ενώ τα θηλυκά στο δεύτερο με τρίτο χρόνο σε μέγεθος 35-40 cm και απελευθερώνουν από 20 έως 80 χιλιάδες σφαιρικά και διαφανή αυγά με διάμετρο μικρότερη από 1 χιλιοστό (Arabaci et al., 2010).

Τα πρώτα χρόνια η παραγωγή τσιπούρας βασιζόταν αποκλειστικά στη συλλογή νεαρών ιχθυδίων από το φυσικό περιβάλλον. Με τα χρόνια η ζήτηση αυξήθηκε και τα αποθέματα μειώθηκαν, αυτό προκάλεσε και την δημιουργία τεχνικών για την παραγωγή ιχθυδίων εντός των συστημάτων καλλιέργειας. Η παραγωγή ιχθυδίων σε μεγάλη κλίματα πραγματοποιήθηκε στη Γαλλία και την Ιταλία στις αρχές τις δεκαετίας του 80' (Moretti et al., 1999). Πλέον η παραγωγή ιχθυδίων εντός των μονάδων καλλιέργειας είναι ευρέως διαδεδομένη, στον τομέα αυτό η Ελλάδα παράγει το 50% της συνολικής παραγωγής στην Ευρώπη περίπου 390 εκατ. ιχθύδια λαυρακιού και τσιπούρας και 10 εκατ. ιχθύδια άλλων υδρύαλων ειδών (φαγκρί, μυτάκι, λυθρίνι κ.α.) (Κλαουδάτος Σ. και Κλαουδάτος Δ. 2012).

Στην αγορά η τσιπούρα παρέχεται σε φρέσκια ή σε κατεψυγμένη μορφή, με εξαίρεση τα ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΙΑ ΚΕΦΑΛΟΝΙΑΣ Α.Ε όπου παράγουν, τσιπούρα και λαυράκι και καθαρισμένο φιλέτο από λαυράκι σε συσκευασμένη μορφή έτοιμο για μαγείρεμα. Γεγονός ασυνήθιστο εάν λάβουμε υπόψη τον αριθμό των προϊόντων από άλλα είδη μαζικής παραγωγής και κατανάλωσης εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης όπως ο τόνος και σολομός, από τα οποία παράγονται πολλά είδη διαφορετικών

επεξεργασμένων προϊόντων όπως, φιλέτα φρέσκα, καπνιστά ή κατεψυγμένα, κονσέρβες και προπαρασκευασμένα έτοιμα γεύματα.

Δίνοντας την καλύτερη ποιότητα κρέατος σε συνδυασμό με τα πολύ χαμηλά λιπαρά και την πολύ χαμηλότερη τιμή σε σχέση με το παρελθόν, η ζήτηση της τσιπούρας θα αυξηθεί περισσότερο καθώς έχει είδη καθιερωθεί ως βασικό προϊόν της μεσογειακής διατροφής (Frimodt, 1995).



Εικόνα 8. Τιμή της τσιπούρας στην αγορά της Ελλάδας (▲) και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (●). Η μείωση της τιμής και στις δυο αγορές συμπίπτει χρονολογικά με την αύξηση της παραγωγής των ιχθύων υδατοκαλλιέργειας.

Με την ανάπτυξη νέων προϊόντων και την δημιουργία νέων αγορών η ποιότητα και το μέγεθος της τσιπούρας που παράγονται από της υδατοκαλλιέργειες

θα αλλάξουν αναμφίβολα. Ορισμένες από αυτές τις αλλαγές μπορεί να είναι η τροποποίηση του συστήματος παραγωγής, αλλά υπάρχει επίσης μεγάλη ανάγκη να γίνουν γενετικές βελτιώσεις, διότι η τσιπούρα είναι ένα είδος με πολύ μικρή ιστορία εξημερώσεως και καλλιέργειας από τον άνθρωπο και μέχρι στιγμής τα βιολογικά χαρακτηριστικά του είναι πανομοιότυπα με αυτά των άγριων ιχθύων (Frimodt, 1995).

1.4. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΕΣ ΣΤΟ ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΥΔΡΟΒΙΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Τα βακτήρια είναι παρόντα σε όλα τα ενδιαιτήματα ανεξαιρέτως πάνω στον πλανήτη. Οι μικροβιακές κοινότητες των βακτηρίων στον πεπτικό σωλήνα είναι για πάρα πολλά είδη ζώων, συμπεριλαμβανομένων και των ιχθύων, πολύ σημαντικά για την ολόκληρης της διαδικασίας της θρέψης καθώς ορισμένα από αυτά υποβοηθούν την πέψη και τον μεταβολισμό των τροφών μέσα στο έντερο και το στομάχι (Harris, 1993, Sabree et al. 2009). Πιο συγκεκριμένα, γνωρίζουμε ότι υπάρχουν βακτήρια που βοηθούν, στην απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών και την ανακύκλωση των νιτρικών στο εσωτερικό του οργανισμού όπου διαβιούν. (Sabree et al. 2009).

Οι βακτηριακές κοινότητες αναπτύσσονται σε ένα σταθερό περιβάλλον στο εσωτερικό του εντέρου του ζώου, έτσι επωφελούνται από αυτό για να επιβιώσουν. Οι βακτηριακές κοινότητες επηρεάζονται γενικώς από μια σειρά παραγόντων, όπως είναι η θερμοκρασία η διατροφή, και η ηλικία του οργανισμού (Nayak 2010), οι σημαντικότεροι όμως από αυτούς είναι η αλατότητα (Lozupone & Knight 2007), το pH

(Fierer & Jackson, 2006 Chu et al. 2010) η εποχικότητα (Gilbert et al. 2009,2012) και οι οικολογικές αλληλεπιδράσεις (Steele et al. 2011).

Ταυτόχρονα, επωφελείται και ο οργανισμός που αυτά διαβιούν, είτε μέσω της μεσολάβησης τους στη διαδικασία της πέψης είτε προσδίδοντας στον οργανισμό σημαντικά θρεπτικά συστατικά, όπως κάποια βασικά αμινοξέα (Karren et al, 2012). Χαρακτηριστικό επίσης γνώρισμα των συμβιωτικών βακτηρίων είναι ότι τα εν λόγω δεν αποβάλλονται με τα περιττώματα σε αντίθεση με τα βακτήρια που προέρχονται από την τροφή, γεγονός που υποδηλώνει πιθανώς την προσκόλληση τους στους ιστούς του ξενιστή και τη χρήση των μεταβολικών λειτουργιών τους προς όφελος του (Harris, 1993, Μεντέ & Νέγκας, 2011).

Ωστόσο, ο μικροβιακός εποικισμός της τσιπούρας και το κατά πόσο και με πιο τρόπο οι κοινότητες αλληλεπιδρούν με τον οργανισμό, δεν έχουν μελετηθεί λεπτομερώς ακόμη, σε αντίθεση με τα δεκάποδα τα οποία γνωρίζουμε πολύ περισσότερες λεπτομέρειες για τη λειτουργία των συμβιωτικών βακτηρίων. Όπως για παράδειγμα η λευκή γαρίδα του Ειρηνικού (*Litopenaeus vannamei*) για την οποία γνωρίζουμε συγκεκριμένα προβιοτικά βακτήρια τα οποία βοηθούν στην θρέψη, όπως τα, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio mimicus*, *Photobacterium damsela* (Vandenberghe et al, 1999) και *Bacillus* spp. (Gomez and shen, 2008).

Ανάμεσα στο πλήθος των λειτουργιών αυτών ορισμένες καθοριστικές για την επιβίωση του οργανισμού ξενιστή είναι, η παραγωγή ενζύμων για την διάσπαση της κυτταρίνης και άλλων σύνθετων πολυσακχαριτών, η παραγωγή πρωτεϊνολυτικών και χιτινολυτικών ενζύμων και η αποτοξίνωση επικίνδυνων ουσιών όπως οι φαινολικές ενώσεις (Μεντέ & Νέγκας, 2011).

Τόσο στο φυσικό θαλασσινό νερό, καθώς και στο νερό των υδατοκαλλιεργειών, οι πυκνότητες των μικροοργανισμών που παρουσιάζονται είναι συχνά σημαντικά υψηλές με τιμές που συνήθως φτάνουν στο επίπεδο των 10^6 κύτταρα/ml. Τα βακτήρια αυτά μεταφέρονται πολύ εύκολα τόσο στο υδάτινο περιβάλλον όσο και μεταξύ των οργανισμών που διαβιούν σε αυτό (Maeda, 2002). Η μεταφορά των μικροοργανισμών από το περιβάλλον στους οργανισμούς που διαβιούν σε αυτό, είναι τόσο συνηθισμένη που φτάνει στο σημείο, βακτήρια να βρίσκονται ακόμα και σε αναπτυσσόμενα έμβρυα ιχθύων, ακόμη επίσης και σε αυγά τους.

Στις μέρες μας, στα συστήματα εκτροφής θαλασσιών οργανισμών η μελέτη της βακτηριακής κοινότητας του εντέρου που συνδέεται με την εκτροφή των ψαριών γίνεται όλο και εντονότερη καθώς είναι ο μοναδικός τρόπος ώστε να καταπολεμηθούν παθολογικού τύπου προβλήματα στους οργανισμούς. Παρόλο που από όσο γνωρίζουμε μέχρι σήμερα τα περισσότερα είδη βακτηρίων είναι ωφέλιμα για την υγεία και για την εύρυθμη λειτουργία των ιχθύων, σε ένα κλειστό ή ημίκλειστο σύστημα επανακυκλοφορίας του νερού η περαιτέρω μελέτη και ανάλυση των βακτηριακών κοινοτήτων είναι ύψιστης σημασίας (Blancheton, 2000).

1.5. ΠΥΡΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Η πυραλληλούχιση είναι μια μέθοδος αλληλούχισης του DNA που βασίζεται στην ανίχνευση της πυροφωσφατάσης που απελευθερώνεται κατά την σύνθεση του DNA. Κατά τη διάρκεια των διαδοχικών ενζυματικών αντιδράσεων παράγεται ορατό φως, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη με τον αριθμό των νουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται. Η διαδικασία ξεκινάει με την αντίδραση πολυμερισμού του νουκλεϊκού οξέος και την ενσωμάτωση του εκάστοτε συμπληρωματικού

νουκλεοτιδίου, κατά την οποία απελευθερώνεται ανόργανη πυροφωσφατάση ως αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων από την πολυμεράση. Στη συνέχεια, η πυροφωσφατάση μετατρέπεται σε ATP από την ATP σουλφουριλάση. Το ATP παρέχει την ενέργεια που απαιτείται από την λουσιφεράση για να γίνει η οξείδωση της λουσιφερίνης λόγω της οποίας παράγεται φως. Αυτή η διαδικασία ολοκληρώνεται σε 3-4 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Η ποσότητα του φωτός που παράγεται μπορεί εύκολα να εντοπιστεί από μια φωτοδίοδο, από έναν σωλήνα φωτοπολλαπλασιαστή ή από αισθητήρες CCD (Charge-Coupled Device). Υπάρχουν δύο τρόποι πυραλληλούχισης: η πυραλληλούχιση στερεής φάσης και η πυραλληλούχιση υγρής φάσης. Η πυραλληλούχιση στερεής φάσης κάνει χρήση τριών ενζύμων (πολυμεράση-πυροφωσφατάση-λουσιφεράση) ως υπόστρωμα πάνω στο οποίο ακινητοποιείται το DNA. Μετά την προσθήκη κάθε νουκλεοτιδίου ακολουθεί έκπλυση του υποστρώματος. Στην πυραλληλούχιση υγρής φάσης δημιουργείται ένα σύστημα τεσσάρων ενζύμων με την εισαγωγή απυράσης, ενός ενζύμου που αποικοδομεί τα νουκλεοτίδια. Η προσθήκη αυτού του ενζύμου εξαλείφει την ανάγκη χρήσης στερεού υποστρώματος και ενδιάμεσης έκπλυσης, επιτρέποντας έτσι την χρήση ενός μόνο σωλήνα για την πραγματοποίηση της πυραλληλούχισης (Ronaghi, 2001). Πρόσφατα έγινε προσθήκη της πρωτεΐνης SSB, η οποία είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται σε μονόκλωνο DNA. Η προσθήκη αυτής της πρωτεΐνης ενισχύει την ποιότητα των αλληλουχιών που λαμβάνονται μέσω πυραλληλούχισης. Η πρωτεΐνη SSB καθιστά δυνατή την ανάγνωση αλληλουχιών μεγάλου μήκους και αυξάνει την ευελιξία στο σχεδιασμό των εκκινήτων (Ahmadian et al., 2006).

Η πυραλληλούχιση αποτελεί μια γρήγορη, αξιόπιστη και οικονομικά συμφέρουσα μέθοδος αλληλούχισης του DNA που βασίζεται στην παρακολούθηση της σύνθεσης DNA σε πραγματικό χρόνο, μέσω ανίχνευσης βιοφωταύγειας.

Συγκεκριμένα, δεν απαιτείται κλωνοποίηση, και κατά συνέπεια αλληλουχίες που κλωνοποιούνται δύσκολα ή που είναι ασταθείς μπορούν να αλληλουχηθούν χωρίς πρόβλημα. Επιπλέον, δεν χάνονται οι αλληλουχίες μικρού μήκους που συνήθως απομακρύνονται κατά τον διαχωρισμό ανά μέγεθος στην κατασκευή cDNA βιβλιοθηκών. Τέλος, η διαδικασία είναι πολύ γρήγορη και πολύ πιο οικονομική από τις συμβατικές μεθόδους αλληλούχισης (Weber et al., 2007).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της δομής και της διαφοροποίησης των βακτηριακών κοινοτήτων που περιέχονται στο έντερο της τσιπούρας (*Sparus aurata*), μελετώντας τρεις διαφορετικές ομάδες ιχθύων, βιολογικής εκτροφής, συμβατικής εκτροφής και άγριου πληθυσμού.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Δείγματα τσιπούρας βιολογικής και συμβατικής εκτροφής συλλέχθηκαν από την εταιρία ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΙΑ ΚΕΦΑΛΟΝΙΑΣ Α.Ε που εδρεύει στην Κεφαλονιά στον κόλπο του Αργοστολίου, μεταφέρθηκαν σε δύο αποστειρωμένα κιβώτια από φελιζολ με πάγο στις 14 Φεβρουαρίου του 2012, με ταχυμεταφορέα εντός δυο ημερών στο Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Βόλο όπου και πραγματοποιήθηκε το πείραμα. Τα δύο κιβώτια περιείχαν επτά ψάρια 300-400g τσιπούρας βιολογικής εκτροφής και 7 ψάρια 300-400g τσιπούρας συμβατικής εκτροφής. Τρία δείγματα άγριας τσιπούρας 150-200g πάρθηκαν από αλιείς του Παγασητικού κόλπου στο Βόλο στις 13 Μαρτίου του 2012

και επίσης μεταφερθήκαν κατευθείαν στο Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τα δείγματα της βιολογικής και συμβατικής τσιπούρας θανατώθηκαν με φυσιολογικό τρόπο σε πάγο και νερό, αφού είχαν περάσει 36 ώρες από την τελευταία φορά που είχαν ταϊστεί. Η ιχθυοπυκνότητα στους κλωβούς ήταν 12kg/m^2 την βιολογική τσιπούρα και 10kg/m^2 για τη συμβατική, ενώ οι κλωβοί είχαν απόσταση μεταξύ τους περίπου στα 500m.

Για την παρούσα εργασία συλλέχθηκαν δείγματα από τον πεπτικό σωλήνα της βιολογικής και της συμβατικής τσιπούρας, χωριστήκαν σε δύο μέρη το στομάχι και το έντερο. Δείγματα εντέρου απομονώθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία με ποσότητα δείγματος από 1.5g έως και 7g και καταψυχτήκαν στους -80°C έως ότου θα ήταν έτοιμα και τα δείγματα της άγριας τσιπούρας ώστε να διεξαχθεί η εκχύλιση του DNA. Αναλυτικότερα τα δείγματα του εντέρου των ψαριών ήταν ως εξής, από την τσιπούρα βιολογικής εκτροφής πήραμε 6 δείγματα πεπτικού σωλήνα, 6.12g, 5.12g, 6.63g, 5.6g, 5.1g, και 5.4g. Από την τσιπούρα συμβατικής εκτροφής πήραμε 7 δείγματα πεπτικού σωλήνα, 1.6g, 1.7g, 3.56g, 3.07g, 1.04g, 3.32g, και 3.94g, και από τα δείγματα της άγριας τσιπούρας πήραμε τρία δείγματα, 2.99g, 2.36g, και 3.48g.

Για την εκχύλιση του DNA από τις τσιπούρες βιολογικής και συμβατικής εκτροφής και της άγριας πήραμε δείγματα από το κάθε είδος με βάρος 0.275g, 0.185g και 0.28g για την βιολογική, 0.192g, 0.224g και 0.248g για την συμβατική και 0.263g, 0.217g και 246g για την άγρια. Η εκχύλιση του DNA έγινε ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή του εμπορικού kit UltraClean® Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc.). Το πρωτόκολλο αυτό βασίζεται στη λύση των μικροοργανισμών του δείγματος με συνδυασμό θερμότητας, απορρυπαντικού και

μηχανικής δύναμης. Τα κυτταρικά συστατικά διαλύονται με μηχανική δράση, χρησιμοποιώντας vortex. Το DNA που απελευθερώνεται δεσμεύεται σε φίλτρο spin filter, που περιέχει silica. Το φίλτρο καθαρίζεται και το DNA ανακτάται σε διάλυμα Tris, που δεν περιέχει DNA. Το DNA που απομονώθηκε φυλάχτηκε στους -20°C μέχρι να αποσταλεί στην εταιρεία πυραλληλούχισης.

Η πυραλληλούχιση έγινε στην εταιρεία MRDNA, Inc (Shallowater, TX, USA), σύμφωνα με τα πρότυπα της εταιρείας. Χρησιμοποιήθηκαν οι βακτηριακοί εκκινητές S-DBact-0341-b-S-17 και S-D-Bact-0785-a-A-21 (Kilindworth et al. 2012) που καλύπτουν τις πρώτες περίπου 500 βάσεις του γονιδίου 16S rRNA. Ο έλεγχος ποιότητας των δεδομένων πυραλληλούχισης και η ανάλυση των αλληλουχιών έγινε εφαρμόζοντας την πλατφόρμα MOTHUR (Schloss et al. 2009). Ο στατιστικός έλεγχος των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα past (έκδοση 2.17c) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο στατιστικής ανάλυσης One-way ANOVA.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης One-way ANOVA (Πίν. 1), οδηγούν στο συμπέρασμα πως στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν υπάρχουν σε καμία από της επαναλήψεις μεταξύ των τριών ομάδων των δειγμάτων.

Πίνακας 1. Παρουσίαση της στατιστικής σημαντικότητας των διαφορών στη σύσταση των μικροβιακών πληθυσμών έξι δεξαμενών δειγματοληψίας. ns (not significant): στατιστικά μη σημαντικά

| <i>SaC1, SaC2, SaC3</i> | Sum of sqrs | df | Mean square | F | p(same) |
|-------------------------|--------------------|-----------|--------------------|----------|----------------|
| Between groups: | 119424 | 2 | 59711,8 | 2,466 | 0,08547 |
| Within groups: | 2,20086E07 | 909 | 24211,9 | | |
| Total: | 2,2128E07 | 911 | | | |
| omega^2: | 0,003205 | | | | |

| <i>SaB1, SaB2, SaB3</i> | Sum of sqrs | df | Mean square | F | p(same) |
|-------------------------|--------------------|-----------|--------------------|----------|----------------|
| Between groups: | 106392 | 2 | 53195,8 | 0,5762 | 0,5623 |
| Within groups: | 8,39267E07 | 909 | 92328,6 | | |
| Total: | 8,40331E07 | 911 | | | |
| omega^2: | -0,0009303 | | | | |

| <i>SaW1, SaW2, SaW3</i> | Sum of sqrs | df | Mean square | F | p(same) |
|-------------------------|--------------------|-----------|--------------------|----------|----------------|
| Between groups: | 115193 | 2 | 57596,4 | 2,341 | 0,09679 |
| Within groups: | 2,23619E07 | 909 | 24600,5 | | |
| Total: | 2,24771E07 | 911 | | | |
| omega^2: | 0,002933 | | | | |

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης One-way ANOVA μας δίνουν το $p=0,09679$ στα δείγματα των άγριων ιχθύων, στα δείγματα των βιολογικών $P= 0,5623$ και στα δείγματα των συμβατικών $p=0,08547$, βλέπουμε λοιπόν ότι μεταξύ των τριών επαναλήψεων σε κάθε μια από τις τρεις ομάδες ξεχωριστά, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοράς.

Παρατηρήθηκε η ύπαρξη μικροοργανισμών οι οποίοι κυριαρχούσαν αριθμητικά έναντι των υπολοίπων. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν τα οχτώ OTU με την υψηλότερη αφθονία τόσο σε κάθε επανάληψη ξεχωριστά, όσο και στο σύνολο των τριών ομάδων. Οι κυρίαρχες ομάδες OTU διέφεραν ανάμεσα στις τρεις ομάδες, αλλά και ανάμεσα σε όλες τις επαναλήψεις. Οι πέντε αλληλουχίες που βρίσκονταν στην υψηλότερη αφθονία, όταν λαμβάνονταν υπόψιν το σύνολο των δειγμάτων από όλες τις δεξαμενές, ήταν οι Otu001, Otu156, Otu016, Otu005 και Otu254 με αφθονία αλληλουχιών 7767 (60,39%), 716 (24,8%), 744 (14,70%), 28 (11,24) και 1101 (10,00%) αντίστοιχα. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι πέντε αλληλουχίες που βρίσκονταν σε υψηλότερη αφθονία. Ορισμένες από τις αλληλουχίες βρίσκονταν σε περισσότερες από μία επαναλήψεις ανεξάρτητα από την ομάδα. Η αλληλουχία Otu001 βρέθηκε σε όλες τις ομάδες σε όλες τις επαναλήψεις και είχε πάντα την μεγαλύτερη αφθονία, σε ένα ποσοστό που κυμαίνεται από 26,56% έως και 60,39%.

Πίνακας 2. Κυρίαρχα είδη μικροοργανισμών (σε φθίνουσα συγκέντρωση ατόμων) στο σύνολο των τριών ομάδων σε όλες τις επαναλήψεις και το ποσοστό τους σε σχέση με το σύνολο των οργανισμών σε κάθε επανάληψη

| <i>SaB1</i> | <i>SaB2</i> | <i>SaB3</i> | <i>SaC1</i> | <i>SaC2</i> | <i>SaC3</i> | <i>SaW1</i> | <i>SaW2</i> | <i>SaW3</i> |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Otu001 (35.72%) | Otu001 (60.39%) | Otu001 (35.39%) | Otu001 (35.57%) | Otu001 (33.57%) | Otu001 (41.36%) | Otu001 (26.56%) | Otu001 (26.6%) | Otu001 (35.2%) |
| Otu004 (8.9%) | Otu024 (5.27%) | Otu075 (5.57%) | Otu008 (9.06%) | Otu016 (8.35%) | Otu005 (11.24%) | Otu016 (14.70%) | Otu156 (24.8%) | Otu254 (10.0%) |
| Otu008 (5.4%) | Otu008 (6.4%) | Otu016 (2.90%) | Otu016 (6.09%) | Otu002 (7.5%) | Otu016 (10.04%) | Otu008 (5.95%) | Otu016 (5.9%) | Otu016 (7.5%) |
| Otu003 (5.1%) | Otu016 (5.07%) | Otu058 (2.75%) | Otu006 (5.50%) | Otu008 (6.83%) | Otu008 (9.23%) | Otu173 (5.54%) | Otu006 (5.5%) | Otu255 (6.9%) |
| Otu002 (4.9%) | Otu005 (46%) | Otu024 (7.92%) | Otu024 (5.40%) | Otu005 (6.13%) | Otu004 (8.43%) | Otu004 (4.01%) | Otu097 (5.2%) | Otu183 (4.7%) |
| Otu006 (4.1%) | Otu002 (0.4.2%) | Otu008 (2.90%) | Otu004 (5.22%) | Otu033 (6.05%) | Otu002 (5.62%) | Otu172 (3.70%) | Otu00 (24.7%) | Otu258 (3.9%) |
| Otu007 (3.9%) | Otu006 (3.9%) | Otu078 (2.75%) | Otu127 (3.6%) | Otu151 (5.95%) | Otu006 (3.21%) | Otu174 (3.68%) | Otu219 (3.0%) | Otu156 (2.9%) |

| | | | | | | | | |
|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Otu005 (3.8%) | Otu004 (2.0%) | Otu079 (2.50%) | Otu128 (3.41%) | Otu152 (4.40%) | Otu003 (2.00%) | Otu024 (3.08%) | Otu004 (2.9%) | Otu157 (2.8%) |
|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|

Μπορεί να παρατηρηθεί ότι οι κυρίαρχες αλληλουχίες δεν διαφέρουν στις τρεις ομάδες ιχθύων (βιολογικής εκτροφής, συμβατικής εκτροφής και άγριας), με τα Otu001, Otu016 και Otu008 να κυριαρχούν σε όλες τις ομάδες με επικρατέστερο κατά πολύ περισσότερο το Otu001 και να καλύπτουν συνολικά ένα ποσοστό περίπου στο 50%. Ενώ τα είδη Otu156 και Otu254 να κυριαρχούν αποκλειστικά στην ομάδα της άγριας τσιπούρας με ποσοστό και τα δυο μαζί 11.5%. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα κυρίαρχα Otu στις τρεις ομάδες δειγμάτων.

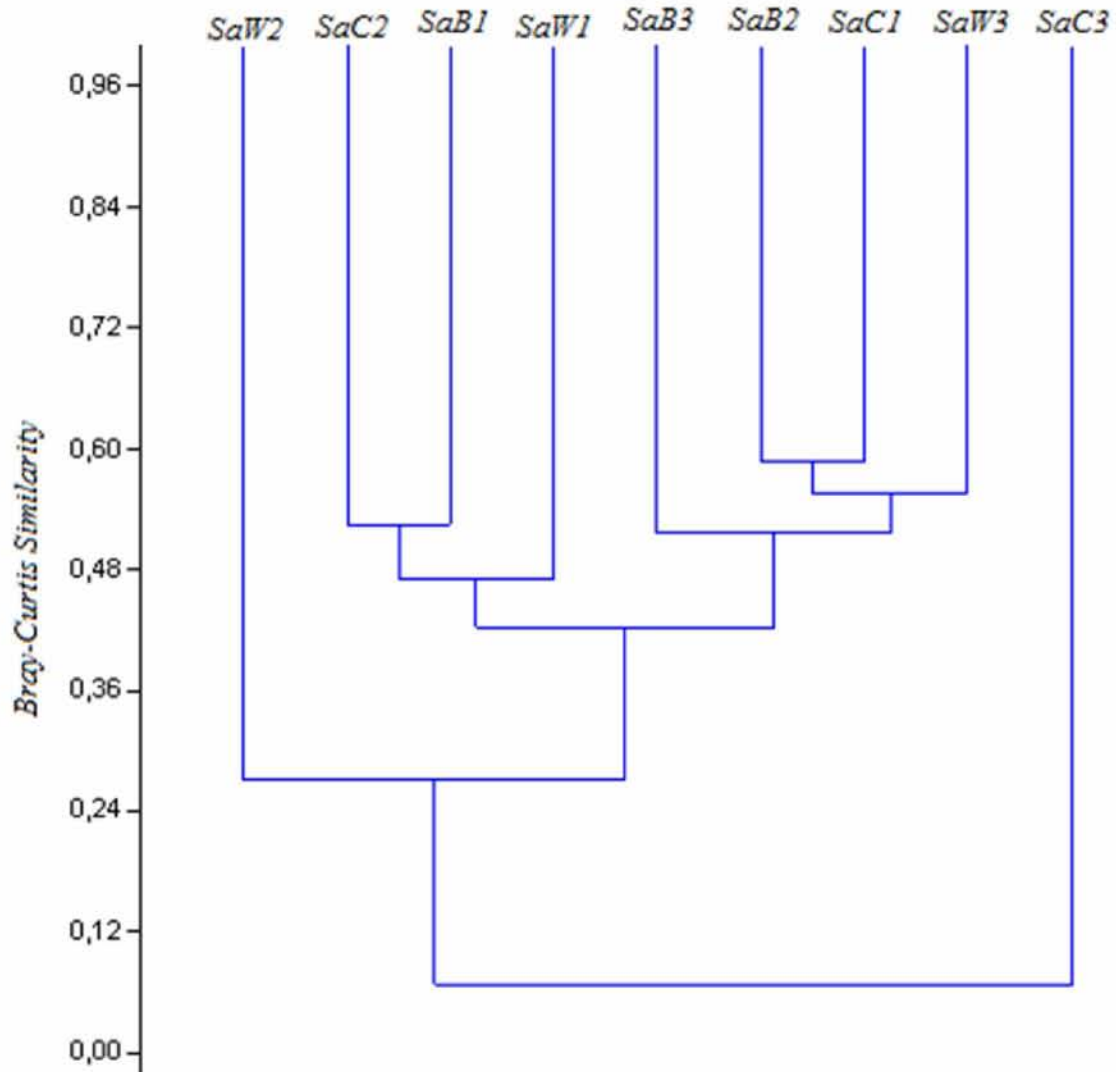
Πίνακας 3. Μέσος όρος κυρίαρχων ειδών μικροοργανισμών (σε φθίνουσα συγκέντρωση ατόμων) ανά ομάδα

| <i>SaB</i> | <i>SaC</i> | <i>SaW</i> |
|-------------------|-------------------|-------------------|
| Otu001 (43.8%) | Otu001 (39.9%) | Otu001 (29.4%) |
| Otu016 (6.8%) | Otu008 (8.7%) | Otu016 (9.3%) |
| Otu075 (5.9%) | Otu016 (8.5%) | Otu156 (8.2%) |
| Otu008 (4.9%) | Otu004 (5.5%) | Otu254 (3,3%) |
| Otu006 (3.2%) | Otu002 (2.8%) | Otu008 (3.3%) |

Το Otu001 βρέθηκε σε μεγάλη αφθονία και στις τρεις ομάδες δειγματοληψίας με ποσοστό 29.9% στην ομάδα των άγριων ιχθύων, 39.9% στην ομάδα των ιχθύων συμβατικής εκτροφής και 43.8% στην ομάδα των ψαριών βιολογικής εκτροφής. Επίσης τα Otu008 και Otu016 βρέθηκαν να έχουν υψηλά ποσοστά και στις τρεις ομάδες, με ποσοστά από 6.8% έως και 8.5% για το Otu016 και από 3.3% έως και

8.7% για το Otu008. Γενικά σε όλες τις ομάδες υπήρχε μεγάλη σταθερότητα ως αναφορά την εμφάνιση των μικροοργανισμών, με ελάχιστες εξαιρέσεις όπως τα Otu156 και Otu254 στην ομάδα τρία με ποσοστά 8.2% και 3.3% αντίστοιχα.

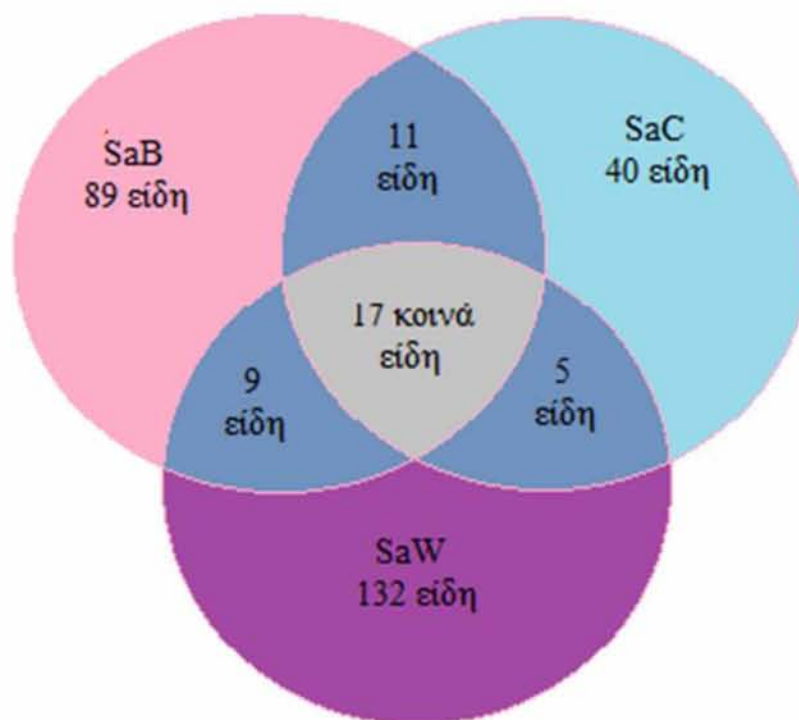
Στο δένδρογραμμα που προέκυψε από την Ιεραρχική Ανάλυση κατά Συστάδες (Hierarchical Cluster Analysis) φαίνονται οι σχέσεις ομοιότητας-ανομοιότητας ανάμεσα ομάδες και σε όλες τις επαναλήψεις. Όσο μικρότερη είναι η κάθετη απόσταση ανάμεσα σε δύο επαναλήψεις, τόσο μεγαλύτερη είναι η ομοιότητα που εμφάνισαν όσον αφορά την αύξηση των μικροοργανισμών. Αντίστροφα, μεγαλύτερη απόσταση εκφράζει μικρότερη ομοιότητα, ή μεγαλύτερη ανομοιότητα. Μπορεί να παρατηρηθεί η δημιουργία ομάδων με επαναλήψεις που παρουσιάζουν έντονη ομοιότητα.



Σχήμα 1. Εξέταση βαθμού ομοιότητας ανάμεσα στις διαφορετικές ομάδες και επαναλήψεις με την μέθοδο της Ιεραρχικής Ανάλυσης κατά Συστάδες.

Μπορεί να παρατηρηθεί ότι μόνο 17 Οtu απαντώνται και στις τρεις ομάδες, αναλυτικότερα έχουμε 89 Οtu που απαντώνται μόνο στους ιχθείς βιολογικής εκτροφής, 40 που απαντώνται μόνο στους ιχθείς συμβατικής εκτροφής, 132 που

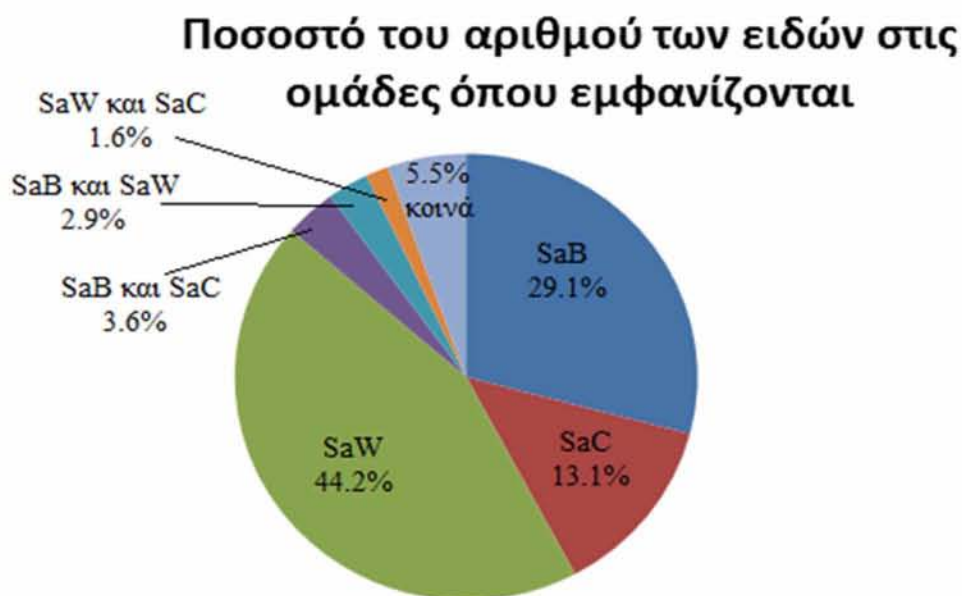
απαντώνται μόνο στα άγριους ιχθείς, 11 είδη που απαντώνται κοινά σε ιχθείς βιολογικής και συμβατικής εκτροφής, 5 είδη που απαντώνται κοινά σε ιχθείς συμβατικής εκτροφής και άγριους και 9 είδη που απαντώνται κοινά σε ιχθείς βιολογικής εκτροφής και άγριους. Αυτό το γεγονός πιθανόν να υποδεικνύει ότι οι συνθήκες διαβίωσης και καλλιέργειας των ιχθύων ως βιολογικές τσιπούρες ευνοεί περισσότερο την αύξηση μεγαλύτερης ποικιλότητας βακτηρίων σε σχέση με τους ιχθείς συμβατικής εκτροφής, αυτό ίσως να οφείλεται στη μη χρήση αντιβιοτικών στους ιχθείς βιολογικής εκτροφής σε αντίθεση με αυτούς της συμβατικής. Ωστόσο, τα 17 Otu που απαντώνται και στις τρεις ομάδες παρουσιάζουν μεγαλύτερη αφθονία όσον αφορά τον αριθμό των ατόμων κάθε Otu, αφού καλύπτουν και στις τρεις ομάδες περίπου το 73,75% από το συνολικό αριθμό των μικροοργανισμών.



Σχήμα 2. Διάγραμμα Venn στο οποίο παρουσιάζεται ο αριθμός ειδών που απαντώνται αποκλειστικά σε μία από τις τρεις ομάδες και των ειδών που απαντώνται και στις τρεις ομάδες.

Στο Σχήμα 3 παρουσιάζεται το ποσοστό των ειδών Otu στις ομάδες όπου εμφανίζονται. Όπως βλέπουμε από το συνολικό αριθμό των Otu που εντοπίστηκαν το 44,2% βρέθηκε μόνο στους άγριους ιχθείς, το 29,1% βρέθηκε μόνο στους ιχθείς βιολογικής εκτροφής, το 13,1% βρέθηκε μόνο στους ιχθείς συμβατικής εκτροφής, το 5,5% των ειδών ήταν κοινά σε όλες τις ομάδες, το 3,6% ήταν κοινά στους ιχθείς βιολογικής και συμβατικής εκτροφής, το 2,9% ήταν κοινά στους ιχθείς βιολογικής

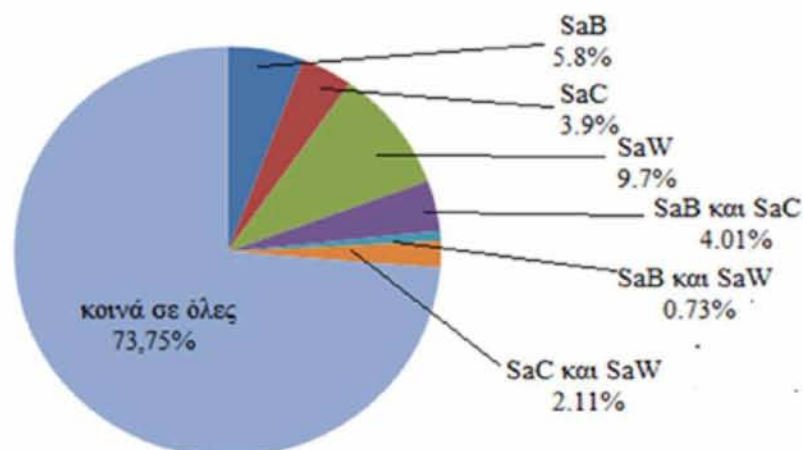
εκτροφής και τα άγρια και το 1,6% ήταν κοινά στους ιχθείς συμβατικής εκτροφής και τα άγρια.



Σχήμα 3. Εκατοστιαίο ποσοστό του αριθμού των ειδών στις ομάδες όπου εμφανίζονται.

Είναι φανερό ότι η πλειοψηφία των ειδών των οργανισμών ενδημούν μόνο σε κάποια από της τρεις ομάδες, δεν μπορούμε να πούμε λοιπόν ότι υπάρχει μια καθολική δομή στην κατανομή των μικροοργανισμών δεδομένου ότι τα είδη που απαντώνται και στις τρεις ομάδες και στις τρεις επαναλήψεις είναι μόνο 17, το 5.5% των συνολικών ειδών που ανιχνεύθηκαν. Παρατηρώντας το σχήμα 4 δεν θα μπορούσαμε να βγάλουμε το ίδιο συμπέρασμα διότι ως αναφορά το πλήθος των αλληλουχιών που εντοπίστηκαν γιατί βλέπουμε να υπάρχει μία συνεπεία στην εμφάνιση ορισμένων από των βασικότερων ειδών.

Ποσοστό αφθονίας αλληλουχιών στις ομάδες όπου εμφανίζονται

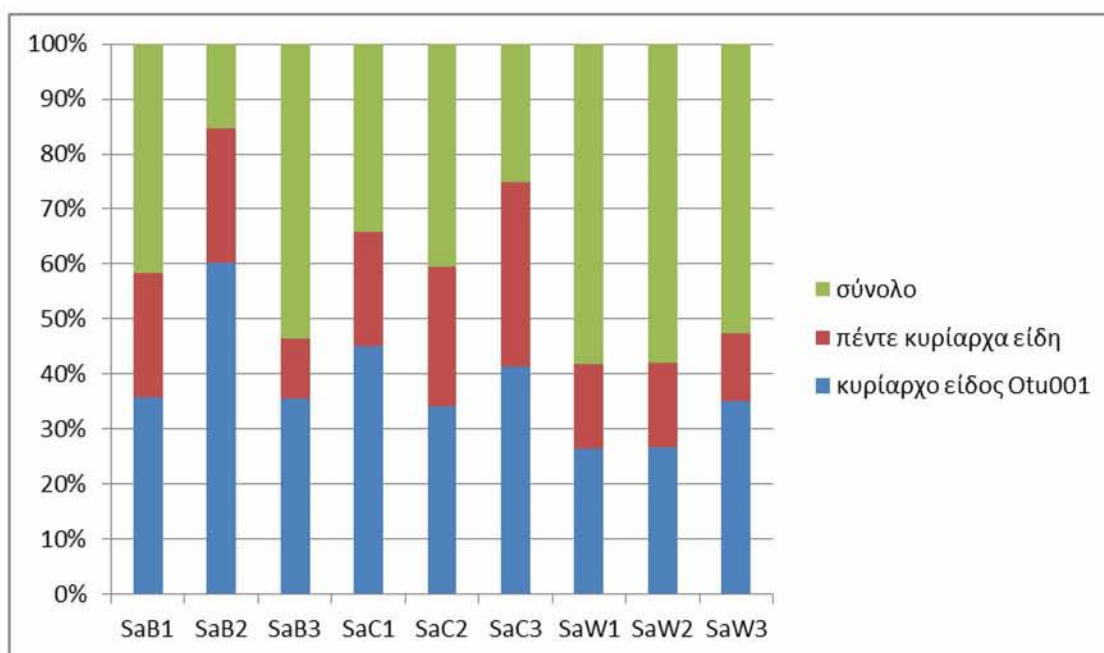


Σχήμα 4. Ποσοστιαία συνεισφορά της αφθονίας αλληλουχιών που εμφανίζονται αποκλειστικά σε μία από τις τρεις ομάδες, κοινά σε βιολογικής και συμβατικής εκτροφής, κοινά σε βιολογικής εκτροφής και άγριους ιχθείς, κοινά σε συμβατικής εκτροφής και άγριους ιχθείς και κοινά σε όλες τις ομάδες, σε σχέση με την συνολική αφθονία αλληλουχιών που καταγράφηκε.

Το 73,75% εμφανίζονται και στις τρεις ομάδες, το 5,8% εμφανίζεται μόνο σε ιχθείς βιολογικής εκτροφής, το 3,9% εμφανίζεται μόνο σε ιχθείς συμβατικής εκτροφής, το 9,7% εμφανίζεται μόνο σε άγριους ιχθείς, ενώ εμφανίζεται κοινά σε, βιολογικής και συμβατικής εκτροφής, σε βιολογικής εκτροφής και άγριους και συμβατικής εκτροφής και άγριους το 4,01%, 0,73% και 2,11% αντίστοιχα. Όπως

παρατηρούμε οι συντριπτική πλειοψηφία των αλληλουχιών απαντάται και στις τρεις ομάδες σε ένα ποσοστό της τάξης του 73,75%, ενώ όλες οι άλλες αλληλουχίες απαντώνται σε μικρότερα ποσοστά.

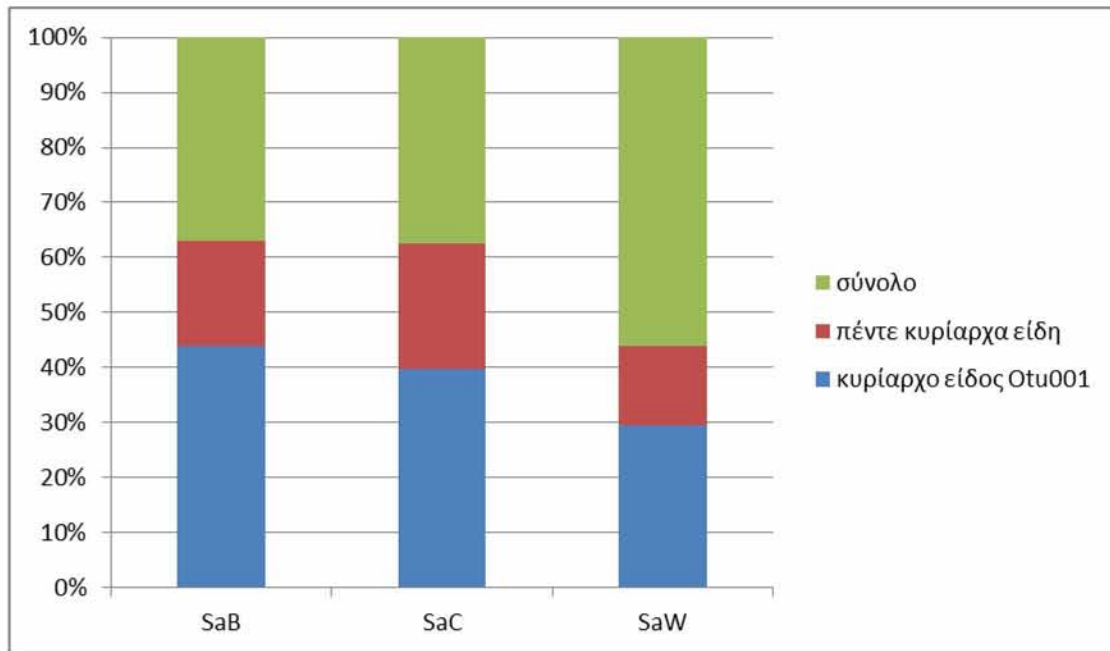
Η συμμετοχή των κυρίαρχων Otu στο σύνολο του πλήθους των ατόμων παρουσιάζεται στο Σχήμα 5. Μπορεί να παρατηρηθεί ότι η συνεισφορά των κυρίαρχων Otu στην τελική αφθονία αλληλουχιών είναι ιδιαίτερα υψηλή. Συγκεκριμένα, σε όλα τα δείγματα η αφθονία των πέντε πρώτων κυρίαρχων ειδών κυμαίνεται σε ένα ποσοστό από 42% στα δείγματα SaW1 και SaW2 έως και 84% δείγμα SaB2. Εξαιρετικά υψηλή αφθονία σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα παρουσιάζει το είδος Otu001, του οποίου το ποσοστό κυμαίνεται από 26,5% στο δείγμα SaW1 έως και 60,3% στο δείγμα SaB2.



Σχήμα 5. Αθροιστικό ποσοστό των πέντε κυρίαρχων μικροοργανισμών Otu001, Otu016, Otu008, Otu004 και Otu002 από τα εννέα δείγματα ψαριών με παράθεση των αποτελεσμάτων ανά ομάδα και επαναλήψεις.

Τα χαμηλότερα ποσοστά των κυρίαρχων Otu παρουσιάστηκαν στα δείγματα των άγριων ιχθύων. Με το δεδομένο επίσης ότι τα δείγματα των άγριων ιχθύων παρουσίασαν και κατά πολύ μεγαλύτερη ποικιλότητα και αφθονία ειδών από αυτά των ιχθύων βιολογικής και συμβατικής εκτροφής, μπορούμε εύκολα να συμπεράνουμε ότι τα εν λόγω είναι πιο ευάλωτα και δεκτικά στην ανάπτυξη μικροβιακών κοινοτήτων.

Το αθροιστικό ποσοστό των πέντε κυρίαρχων Otu σε κάθε μία από τρεις ομάδες, παρουσιάζεται στο Σχήμα 6. Σε όλες τις ομάδες το ποσοστό των κυρίαρχων Otu ξεπερνάει το 43%, ενώ στις ομάδες βιολογικών και εκτρεφόμενων ιχθύων το ποσοστό φτάνει έως και το 63%.



Σχήμα 6. Παρουσίαση των αθροιστικών ποσοστών του μέσου όρου των πέντε κυρίαρχων μικροοργανισμών στις τρεις ομάδες δειγμάτων.

Επιπλέον, εντοπίστηκε μικρός αριθμός οργανισμών που παρουσίασαν ιδιόμορφη κατανομή συγκριτικά με το σύνολο. Τα είδη των μικροοργανισμών αυτών παρουσίαζαν πολύ μεγάλο αριθμό αλληλουχιών σε κάποια από της επαναλήψεις σε κάποια εκ των τριών ομάδων ενώ απουσίαζαν εντελώς από της υπόλοιπες. Συγκεκριμένα τα είδη με την ιδιόμορφη αύξηση ήταν τα εξής: το είδος Otu075 στην τρίτη επανάληψη της πρώτης ομάδας (SaB3), τα είδη Otu254 και Otu255 στην τρίτη επανάληψη της τρίτης ομάδας (SaW3) και το είδος Otu151 στην δεύτερη επανάληψη της δεύτερης ομάδας (SaC2). Εκτός από την ιδιόμορφη αύξηση, Otu254 και Otu255 αποτέλεσαν και κυρίαρχους μικροοργανισμούς που εντοπίστηκαν στα δείγματα των άγριων ιχθυών που προέρχονταν από τον κόλπο του Παγασητικού.

Πίνακας 4. Αφθονία και ποσοστό αλληλουχιών σε είδη μικροοργανισμών που παρουσίασαν ιδιόμορφη αύξηση.

| | Είδος οργανισμού (Otu) | Αφθονία αλληλουχιών | Ποσοστό σχετικής αφθονίας |
|-------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| SaB3 | Otu075 | 1778 | 17,9% |
| SaC2 | Otu151 | 404 | 5,9% |
| SaW3 | Otu254 | 1011 | 9,2% |
| SaW3 | Otu255 | 756 | 6,8% |

3.2. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γεγονός ότι, μεταξύ των μικροβιακών κοινοτήτων του θαλάσσιου περιβάλλοντος όπου διαβιεί η οργανισμός και αυτών στο εσωτερικό περιβάλλον του οργανισμού της υπάρχει σε πολύ μεγάλο βαθμό αλληλεπίδραση, ειδικά κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των ιχθύων. Η αλληλεπίδραση αυτή πιστεύεται ότι παίζει βασικό ρόλο στην υγεία και κατά συνέπεια στην επιβίωση του ιχθύ (Tuong H. 2012). Τρόποι με τους οποίους αλληλεπιδρούν οι κοινότητες αυτές στο εσωτερικό του οργανισμού με τον ίδιο τον οργανισμό μπορεί να είναι είτε βοηθώντας στην αποικοδόμηση σύνθετων οργανικών ενώσεων, είτε στην αποικοδόμηση ορισμένων αζωτούχων ενώσεων (Meziti et al, 2007).

Από τις πρώτες μέρες που θα βρεθεί ο οργανισμός σε επαφή με το θαλάσσιο περιβάλλον,, θα μολυνθεί άμεσα από τα υπάρχον βακτήρια στο περιβάλλον. Οι πρώτες μολύνσεις συμβαίνουν στο δέρμα και στις βλεννογόνους κοιλότητες του οργανισμού (Hansen and Olfson, 1999). Τα βακτήρια αυτά αρχικά παίζουν συμπληρωματικό ρόλο στην απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών της τροφής και

το μεταβολισμό της. Επιπλέον η έκθεση των νεαρών ατόμων σε μικροβιακές κοινότητες και η μόλυνση του οργανισμού από αυτές βοηθούν στην ανάπτυξη της ανοσολογικής ανοχής του οργανισμού. Όπως στην περίπτωση του ζεβρόφαρου (*Danio danio*) το οποίο για να ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού του σύστημα χρησιμοποιεί σε ένα μεγάλο ποσοστό παρασιτικούς του συμβιωτικούς μικροοργανισμούς (Kanther and Rawls, 2010).

Η εγκαθίδρυση των μικροβιακών κοινοτήτων στο εσωτερικό του οργανισμού αυξάνει κατά πολύ τα ποσοστά επιβίωσης του οργανισμού στα αρχικά στάδια της ζωής του. Ως εκ τούτου η ποιότητα καθώς και η ποσότητα των πρώιμων ιχθυδίων σε αρκετά είδη ιχθύων, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την κατανόηση και τη δυνατότητα έλεγχου των σύνθετων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του καλλιεργούμενου ιχθυδίου και των βακτηριακών κοινοτήτων που αναπτύσσονται στις επιφάνειες των βλεννογόνων, στα πρώιμα στάδια της ζωής του ψαριού (Hansen and Olfesen, 1999).

Οι Hansen και Olfesen (1999) διερεύνησαν την άμεση εγκαθίδρυση μικροβιακών πληθυσμών στο εξωτερικό του αυγού. Όπως αποδείχθηκε στη συνέχεια του πειράματος οι μικροβιακές κοινότητες στο εσωτερικό των ιχθύων ήταν ανεξάρτητες από το είδος της τροφής στο πρώτο τάισμα. Κατέληξαν έτσι στο συμπέρασμα ότι οι πρώτες μολύνσεις στον γαστρεντερικό σωλήνα των προνυμφών συμβαίνουν πριν ακόμα ταΐσθούν τα ιχθυδία, όταν τα ψάρια βάζουν σε λειτουργία των μηχανισμό οσμορύθμισης τους. Επιπλέον γνωρίζουμε ότι οι μικροβιακές κοινότητες που εποικούν μέσα στο εσωτερικό των ψαριών διαφέρουν ανάλογα με το στάδιο και την ηλικία τους. Όπως για παράδειγμα στην ψήσσα (*Hippoglossus hippoglossus*) όπου το πλήθος και το είδος των βακτηριακών κοινοτήτων αυξάνονται και διαφοροποιούνται κατά τα διάφορα στάδια που περνά έως την ενηλικίωση του (Ottesen and Olafsen, 1997).

Σε νεαρούς ιχθείς και σε ενήλικα είναι γεγονός ότι οι βλεννογόνοι και οι εκκριτικοί-ανοσολογικοί μηχανισμοί παίζουν κατασταλτικό ρόλο στην προστασία του οργανισμού από παθογόνα βακτήρια. Με ποιον ακριβώς τρόπο όμως ο αμυντικός μηχανισμός αυτός λειτουργεί σε συνάρτηση με τους βακτηριακούς πληθυσμούς ακόμα δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε (Hart et al., 1987). Έχει αποδειχθεί ότι η ενδοκυττάρωση των βακτηριακών αντιγόνων από τις προνύμφες του γάδου (*Gadus morhua*) και της ρέγγας (*Clupea harengus*) παίζουν καταλυτικό ρόλο στην διέγερση και την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού τους συστήματος (Olafsen και Hansen, 1992).

Είναι λοιπόν φανερό από όλα τα παραπάνω ότι οι βακτηριακές μικροβιακές κοινότητες που αποικούν μέσα σε ένα υδρόβιο μικροοργανισμό κατά τη διάρκεια της ζωής του κυρίως είναι προς όφελος του.

Η μικροβιολογία του εντερικού σωλήνα των θαλάσσιων ιχθύων και αυτών του γλυκού νερού έχει μελετηθεί από διάφορους ερευνητές και οι περισσότεροι από αυτούς είχαν σαν στόχο να προσδιοριστεί η προέλευση των μικροοργανισμών που είναι υπεύθυνη για την αλλοίωση των φρέσκων ιχθύων. Η περισσότερες έρευνες έδειξαν ότι η ποιότητα και η ποσότητα των διαφορετικών βακτηρίων είναι μια αντανάκλαση κάποιων διαφορετικών παραγόντων: το υδάτινο περιβάλλον (Sugita et al., 1989), η διατροφή (Austin and Al-Zahrani, 1988), το στάδιο ανάπτυξης (Campbell and Buswell, 1983) και ο τύπος της εγκατάστασης εκτροφής (Cahill, 1990), οι σημαντικότεροι όμως είναι η αλατότητα ((Lozurone & Knight 2007), το pH (Fierer & Jackson, 2006; Chu et al. 2010) η εποχικότητα (Gilbert et al. 2009,2012 Al-Harbi and Uddin, 2004) και οι οικολογικές αλληλεπιδράσεις (Steele et al. 2011).

Στην παρούσα έρευνα οι οργανισμοί που μελετήθηκαν αλιεύτηκαν στην ίδια εποχή και σε πολύ κοντινή ηλικία μεταξύ τους. Οι διαφορές τους ήταν ότι αλιεύτηκαν από δύο διαφορετικά ενδιαιτήματα, οι μεν βιολογικής και συμβατικής εκτροφής από τον κόλπο του Αργοστολίου στην Κεφαλονιά (Ιόνιο Πέλαγος) και οι δε άγριες από τον κόλπο του Παγασητικού (ανατολική Μεσόγειος). Τέλος, και οι τρεις ομάδες των δειγμάτων είχαν εντελώς διαφορετικό διαιτολόγιο. Οι άγριες τσιπούρες τρέφονταν με οργανισμούς από το ενδιαιτήμα τους στον Παγασητικό κόλπο, οι συμβατικές τσιπούρες εκτροφής με συμβατική τροφή και οι βιολογικές με βιολογική. Αναλυτικά, οι ιχθείς βιολογικής εκτροφής τρέφονταν με 100% πιστοποιημένη βιολογική τροφή.

Από τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος είδαμε ότι στις εννέα επαναλήψεις ξεχωριστά η ποικιλομορφία των OTUs όταν συγκρίναμε τις τρεις ομάδες δειγμάτων ήταν διαφορετική μεταξύ τους, αφού από το σύνολο των τριακοσίων πέντε ειδών που ανιχνευτήκαν, κοινά βρέθηκαν μόνο δεκαεπτά (5,5%) είδη. Μπορούμε να πούμε ότι πιθανώς όσον αναφορά τον παράγοντα του υδάτινου περιβάλλοντος τα αποτελέσματα μας φαίνεται να έρχονται σε συμφωνία με την υπόθεση του Sagita et al. (1989) και Steele et al. (2011) κατά την οποία οι μικροβιακές κοινότητες διαφέρουν ανάλογα με το υδάτινο περιβάλλον. Ο αριθμός όμως των δειγμάτων του πειράματος και τα αποτελέσματα του στατιστικού έλεγχου δε μας επιτρέπουν να υποστηρίξουμε αυτό το συμπέρασμα με μεγαλύτερη σιγουριά.

Όσον αναφορά τα OTUs που βρέθηκαν σε βιολογικές και συμβατικές ήταν επίσης διαφορετικά, αφού βρέθηκαν μόνο 9 (1,6%) είδη κοινά μεταξύ των δύο, συνεπώς επιβεβαιώνεται και η υπόθεση του Cahill (1990) που αναφέρει ότι οι κοινότητες των βακτηριακών πληθυσμών διαφέρουν εάν διαφέρει και ο τύπος εγκατάστασης εκτροφής. Λόγο όμως της μεγαλύτερης ποικιλότητας των βιολογικών

δειγμάτων (89 OTUs έναντι 40 των συμβατικών δειγμάτων) σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι κλωβοί καλλιέργειας των δυο απέχουν μόλις 500m μπορούμε να πούμε ότι η βιολογική εκτροφή προσομοιώνει καλύτερα τις φυσικές συνθήκες (132 OTUs στα δείγματα του πειράματος μας) σε σχέση με τη συμβατική όσον αφορά την βακτηριακή ποικιλότητα.

Η τρίτη υπόθεση που μπορούμε να ελέγξουμε από τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής είναι το ότι οι βακτηριακές κοινότητες διαφέρουν εάν διαφέρει και η διατροφή των οργανισμών. Και εδώ τα αποτελέσματα έρχονται σύμφωνα με την υπόθεση των Austin και Al-Zahrani (1988) εφόσον όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι τρεις ομάδες ιχθύων, οι οποίες και είχαν διαφορετικό διαιτολόγιο βρέθηκε να έχουν κοινά μόνο δεκαεπτά (5,5%) είδη μικροοργανισμών.

Περισσότερη μελέτη και ανάλυση της βιβλιογραφίας για τις μικροβιακές κοινότητες βακτηρίων στα εντόσθια της τσιπούρας είναι πιθανό να δώσει σημαντικές πληροφορίες για την ποιότητα των ιχθύων και το χρόνο που μπορούν να αποθηκεύονται ανεπηρέαστα από αλλοιωγόνους παράγοντες που οφείλονται σε βακτηριακούς πληθυσμούς.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο βακτηριακός μικροβιακός πληθυσμός στον πεπτικό σωλήνα της τσιπούρας (*Sparus aurata*) για να ελεγχθούν οι τυχόν διαφοροποιήσεις που μπορεί να υπάρχουν ανάμεσα στη δομή και την κατανομή των βακτηριακών κοινοτήτων. Το πείραμα έγινε σε τσιπούρες βιολογικής εκτροφής,

συμβατικής εκτροφής και σε άγριες. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με προηγούμενες έρευνες οι οποίες είχαν διερευνήσει το κατά πόσο, οι βακτηριακές κοινότητες που βρίσκονται στο εσωτερικό του πεπτικού σωλήνα των ψαριών εξαρτώνται από, το υδάτινο περιβάλλον, τη διατροφή, και τον τύπο της εγκατάστασης εκτροφής.

Όσον αφορά την ποικιλότητα των ειδών των βακτηριακών πληθυσμών έχουμε τριακόσια πέντε διαφορετικά είδη. Το σημαντικότερο συμπέρασμα που εξήχθηκε από αυτή την εργασία είναι ότι τα πέντε κυρίαρχα είδη τα οποία και βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα σε όλες τις επαναλήψεις κάλυπταν το 73,75% των αλληλουχιών. Από αυτά το Otu001 βρέθηκε να έχει εξαιρετικά υψηλή συγκέντρωση συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα, έχοντας ένα ποσοστό από 26% έως και 60%.

Βρέθηκαν επίσης 17 (5,5%) είδη κοινά και στις τρεις ομάδες σε όλες τις επαναλήψεις, η πλειοψηφία όμως των ειδών βρέθηκε να είναι έποικοι μόνο σε μια συγκεκριμένη από τις τρεις ομάδες. Πιο συγκεκριμένα έχουμε 89 είδη μικροοργανισμών που απαντώνται μόνο στους ιχθείς βιολογικής εκτροφής, 40 είδη που απαντώνται μόνο στους ιχθείς συμβατικής εκτροφής, 132 είδη που απαντώνται μόνο στους άγριους ιχθείς, 11 είδη που απαντώνται κοινά σε ιχθείς βιολογικής και συμβατικής εκτροφής, 5 είδη που απαντώνται κοινά σε ιχθείς συμβατικής εκτροφής και άγριους και 9 είδη που απαντώνται κοινά σε ιχθείς βιολογικής εκτροφής και άγριους. Γενικότερα το είδος το πλήθος και η διαφοροποίηση των βακτηριακών πληθυσμών στα τρία ψάρια μας επιτρέπει να πούμε πως οι συνθήκες εκτροφής της βιολογικής τσιπούρας προσομοιώνουν καλύτερα της φυσικές συνθήκες ως αναφορά την βακτηριακή ποικιλότητα, σε σχέση με τη συμβατική.

Εκ πρώτης όψεως φαίνεται τα αποτελέσματα της έρευνας να συμφωνούν με τις υποθέσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, καθώς ψάρια με διαφορετικό διαιτολόγιο, διαφορετικό σύστημα εκτροφής και παρμένα από διαφορετικά ενδιαιτήματα βρέθηκαν να έχουν στον πεπτικό σωλήνα τους διαφορετικές βακτηριακές κοινότητες μικροοργανισμών.

Πέρα από το γεγονός ότι τα συμπεράσματα που εξήχθησαν δείχνουν μία διαφοροποίηση μεταξύ της ποικιλότητας των τριών διαφορετικών ομάδων, ο περιορισμένος αριθμός δειγμάτων και η εξέταση των κοινοτήτων μόνο σε δύο ενδιαιτήματα (κόλπος Αργοστολίου και Παγασητικός κόλπος) δεν επιτρέπουν την εξαγωγή σαφών συμπερασμάτων σχετικά με τη διαμόρφωση και τη διαφοροποίηση των βακτηριακών κοινοτήτων στα εντόσθια της τσιπούρας και την επίδραση της μεθόδου εκτροφής, της τροφής και γεωγραφικής θέσης.

Για την εκτενέστερη εξέταση του κατά πόσο οι παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω επηρεάζουν κατασταλτικά τους μικροβιακούς πληθυσμούς, απαιτούνται περαιτέρω πειράματα που θα εξετάσουν της ίδιες παραμέτρους μελετώντας περισσότερα δείγματα από περισσότερα ενδιαιτήματα και παρατηρώντας τη διαμόρφωση της δομής των βακτηριακών κοινοτήτων σε μεγαλύτερη κλίμακα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 Ξένη Βιβλιογραφία

Arabaci M., Yilmaz Y., Ceyhun S. B., Erdogan O., Dorlay H. G., Diler I., Akhan S., Kocabas M., Ozdemir K., Koyun H., Koncagul S. (2010). A Review on population characteristics of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Animal and Veteriniry Advances*, 9, 6, 976-981.

Allen D.A., Austin B., Colwell R. R. (1983). Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery. *Journal of General Microbiology*, 129, 2043-2062.

Al-Harbi A.H., Uddin M.N. 2004. Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 229, 37-44.

Ahmadian A., Ehn M., Hober S. (2006) Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*, 363:83-94.

Austin B., Al-Zahrani A.M.J. 1988. The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 33, 1-14

Bauchot M.L., Hureau J.C. 1986. Sparidae. In: *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*, Vol. II (Whitehead P.J.P., Bauchot M.L., Hureau J.C., Nielsen J. and Tortonese E. Eds.), UNESCO, Paris, pp. 883-907.

Blancheton J.P. (2000) – Development in recirculation systems for Mediterranean fish species. – *Aquaculture Engineering*, 22: 17-31.

Campbell A. C., Buswell J.A. 1983. The intestinal microflora of farmed Dover sole (*Solea solea*) at different stages of fish development. *Journal of Applied Bacteriology*, 55, 215-223.

Cahill M.M. 1990. Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecology*, 19, 21-41.

Chu H, Fierer N, Lauber CL et al. (2010) Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental Microbiology*, 12, 2998–3006.

Fuller R. 1989. A review. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378.

Fierer N, Jackson RB (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 626–631.

Gilbert JA, Field D, Swift P et al. (2009) The seasonal structure of microbial communities in the Western English Channel. *Environmental Microbiology*, 11, 3132–3139.

Gilbert JA, Steele JA, Caporaso JG et al. (2012) Defining seasonal marine microbial community dynamics. *ISME J*, 6,298–308,

Ifoam EU Group. 2010. Organic aquaculture EU Regulations (EC) 834/2007 ,(EC) 889/2008, (EC) 710/2009. Background, assessment, interpretation, (A. Szeremeta, L. Winkler, F. Blake & P. Lembo, eds.) Brussels, International, Federation of Organic Agriculture Movements EU Group and Valenzno, Bari CIHEAM/IAMB. 34 pp.

Harris JM (1993) The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microb Ecol* 25: 195–231.

Hart, S., Wrathmell, A. B., Harris, J. E., Doggett, T. A. (1987). Gut-associated lymphoid tissue (GALT) in the common dogfish *Scyliorhinus canicula* L.: an ultrastructural study. *J Mar Biol Ass U K*, 67, 639-645

Hansen, G. H., Olfen, J. A. (1999). Bacterial Interactions in Early life stages of Marine Cold Water fish. *Microbial ecology*, 38, 1-26

Hansen, G. H., Bergh, O., Michaelsen, J., Knapskog, D (1992). *Flexibacter ovolyticus* sp. nov., a pathogen of eggs and larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 42, 451-458.

Karen E., Steven D., Luzopone A., Mickael p., Rosen G., Susan S. and Jacob A. (2012) Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis *Molecular Ecology* 21, 3363–3378

Kanther, M and Rawls, J. F. (2010). Host-microbe interactions in the developing zebrafish. *Immunology*, 22, 10-19

Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies Jr, Quast C, Horn M, Glöckner FO (2012) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41

Lozupone C, Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8228–8235.

Maeda, M. Lee, C. S and Bryen, P (2002). Microbial communities and their use in aquaculture,. *Microbial Approaches to Aquatic Nutrition within Environmentally*

Sound Aquaculture Production Systems. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 61-78

Meziti A, Kormas K, Papadopoulou A, Legaki M, (2007) Bacterial Phlotypes Associated with the Digestive Tract of the Sea Urchin *Paracentrotus lividus* and the Ascidian *Microcosmus* sp. *Russian Journal of Marine Biology*, 33, 2, pp. 84–91

Nayak SK (2010) Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41, 1553–1573.

Ottesen, O. H., Olafsen, J. A. (1997). Ontogenetic development and composition of the mucous cells and the occurrence of saccular cells in the epidermis of Atlantic halibut. *Fish Biol*, 50, 620-633.

Olafsen, J. A., Hansen, G. H. (1992). Intact antigen uptake in intestinal epithelial cells of marine fish larvae. *Fish Biol*, 40, 141-156.

Papadopoulos V., Chouliara I., Badeka A., Savvaidis I.N., Kontominas M.G. (2003). Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology*, 20, 411-420.

Ringø E., Strøm E., Tabachek J-A. 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research*, 26, 773-789

Sabree ZL, Kambhampati S, Moran NA (2009) Nitrogen recycling and nutritional provisioning by *Blattabacterium*, the cockroach endosymbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 19521–19526.

Sugita H., Iwata J., Miyajima C., Kubo T., Noguchi T., Hashimoto K., Deguchi Y. (1989). Changes in microflora of a puffer fish *Fugu niphobles*, with different water temperatures. *Marine Biology*, 101, 299–304.

Sugita H., Miyajima C., Deguchi Y. (1991). The Vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquaculture*, 92, 267–276.

Steele JA, Countway PD, Xia L et al. (2011) Marine bacterial, archaeal and protistan association networks reveal ecological linkages. *ISME Journal*, 5, 1414–1425.

Truong H. T. (2012) Effect of water treatment systems on gut microbial community in reared larvae of Atlantic Cod (*Gadus morhua*), Norwegian University of Science and Technology

Fao 2010a “Fishery Statistical Collections. Global Production”. Fisheries Global Information System.

Fao 2010b State of World fisheries and Aquaculture. Fisheries and Aquaculture department. Rome 2009 Produced by the Electronic Publishing Policy and Support Branch Communication Division. <http://www.fao.org>.

Vanderberghe J. verdonck L. Robles-Arozarena R. Rivera G. Bolland A. Balladares M. Gomez-gil B. Calderon J. Sorgeloos P. and Swings J. (1999) Vibrios Associated with *Litopenaeus vannamei* Larvae, Postlarvae, Broodstock, and Hatchery Probiotics. *Appl Environ. Microbiol.*, 65: 2592-2597.

Weber A.P.M., Weber K.L., Carr K., Wilkerson C., Ohlrogge J. (2007). Sampling the *Arabidopsis* Transcriptome with Massively Parallel Pyrosequencing. *Plant Physiology*, 144:32-42.

Ronaghi M. (2001). Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Research*, 11:3-11.

5.2 Ελληνική Βιβλιογραφία

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 710/2009

Λύσανδρος Κ. Γρηγοράκης Κ. (2004) Οργανική τσιπούρα (*Sparus aurata*): Στοιχεία διατροφής και ανάπτυξης σε σύγκριση με τη συμβατική εκτροφή.

5.3. Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

http://ec.europa.eu/fisheries/marine_species/farmed_fish_and_shellfish/seabream/index_el.htm

<http://www.aquaculture.ca/files/opportunity-expansion.php>

<ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/a-0a.pdf>

<http://aristrouth.blogspot.gr/p/1990.html>

http://www.onlineexpo.gr/articlesDetails_gr.php?artid=28

<http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/en>

http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_greece/en

<http://www.fao.org/docrep/w2333e/W2333E03.htm#31>

http://www.food.actapol.net/pub/1_2_2010.pdf
<http://www.fao.org/docrep/015/i2734e/i2734e04c.pdf>

5.4. βιβλία

Μεντέ Ε. – Νέγκας Ι. (2011) Στοιχεία φυσιολογίας θρέψεως και εφαρμοσμένη διατροφή ιχθύων και καρκινοειδών σελ. 362, 363

Κλαουδάτος Δ. Κλαουδάτος Σ. (2012) Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφές υδρόβιων ζωικών οργανισμών.

Κλαουδάτος Δ. Κλαουδάτος Σ (2010) κατασκευές υδατοκαλλιεργητικών συστημάτων.

6. ABSTRACT

This thesis is an attempt to examine the bacterial microbial population in the intestines of sea bream (*Sparus aurata*) and test the potential differences that may exist between the structure and the distribution of bacterial communities in organic and conventional beam farming and wild beam, who grew up in the open sea. For this test we compared the diversity of microorganisms in the gut of fish. Regarding organic and conventional farming, samples were taken from the fish farming company ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΙΑ ΚΕΦΑΛΟΝΙΑΣ Α.Ε. (KEFALONIA FISHERY S.A.), located in the bay of Argostoli in the Palikis region (Ionian Sea). The wild fish samples were taken from the Gulf of Pagasitikos (Western Mediterranean). Samples were killed normally placed on ice and immediately transferred to the laboratory where the intestine and stomach were collected. The diversity was determined by

pyrosequencing. The organisms were classified into OTU (Operational Taxonomic Unit). The analysis of the results showed that 5.5% (17 species) of OTUs were found in all three of the study groups. Also, five of the seventeen species in the total of three hundred and five found, in all nine repetitions and in all three groups, constituted 73.75% of all sequences. From the total of all species encountered 89 (29.1%) of them were found only in organic fish farming, 40 (13.1%) only in conventional fish farming and 132 (43.2%) only in wild fish. Moreover, 11 (3.6%) were found common in organic and conventional farming, 5 (1.6%) were found common in conventional farming and wildlife, 9 (2.9%) were found common in organic farming and in the wild and 17 (5.5%) were found common in all groups. Apart from the fact that the conclusions drawn show a differentiation between the diversity of the three different groups, the limited number of samples and the examination of communities from only two habitats (Argostoli bay and Pagasitikos gulf) do not allow clear conclusions about the configuration and diversification of bacterial communities in the gut of sea bream and the effect of the method of rearing, food and geography. Therefore, further experiments are required that will examine the same parameters by studying more samples and observing the formation of the structure of bacterial communities on a larger scale.