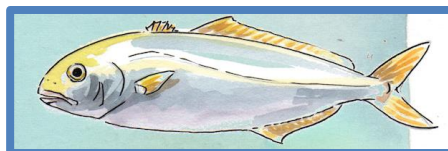


Ειδικές Δράσεις «ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ»

ΜΑΓΙΑΤΙΚΟ Τ6ΥΒΠ-0068



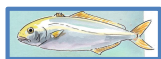
Παραδοτέο

Αριθμός Παραδοτέου:	Π 2.3.1	Μήνας Παράδοσης ΤΠΕ:	24
Τίτλος Παραδοτέου	Χρήση βιολογικών φίλτρων με Phaeobacter sp.		
Ενότητα Εργασίας (ΕΕ):	2	Συντονιστής ΕΕ:	ΠΠ
Τίτλος ΕΕ:	Νυμφικές εκτροφές και παραγωγή γόνου		
Αριθμός Εργασίας:	1.1	Υπεύθυνος Παραδοτέου:	ΠΠ
Τίτλος εργασίας:	Χρήση προβιοτικών στη νυμφική εκτροφή		
Εταίροι:	ΠΠ	ΓΑΛΑΞΙΔΙ	
Κατάσταση:	Ολοκληρωμένο	Μήνας παράδοσης:	29

Υπεύθυνος ερευνητής για το παραδοτέο: Μακρίδης, Π. (Πανεπιστήμιο Πατρών)

Συνεργαζόμενοι ερευνητές από Εταίρους: Παραλίκας, Β. (Πανεπιστήμιο Πατρών), Καραπαναγιώτης, Σ. (ΓΑΛΑΞΙΔΙ), Τσακωνίτη, Κ. (ΓΑΛΑΞΙΔΙ), Μέγκος, Α. (ΓΑΛΑΞΙΔΙ)

Σύντομη περιγραφή (ΤΠΕ): Η έκθεση περιλαμβάνει την αξιολόγηση της βελτίωσης του πρωτόκολλου εκτροφής με τη χρήση προβιοτικού στα βιολογικά φίλτρα.



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βακτήρια του γένους *Phaeobacter* είναι Gram αρνητικά βακτήρια της οικογένειας *Roseobacteraceae* και αποτελούν σημαντικά μέλη της θαλάσσιας μικροχλωρίδας. Υψηλά ποσοστά τους επίσης ανιχνεύονται σε εγκαταστάσεις που εκτρέφονται μαλάκια, θαλάσσια ψάρια και οι προνύμφες αυτών, καθώς και σε καλλιέργειες της ζωντανής τροφής που προορίζονται για την σίτιση προνυμφών (Dittman et al., 2020, Grotkjær et al., 2016, Prol et al., 2009). Παρόλο που εντοπίζονται και ως μεμονωμένα κύτταρα ελεύθερα στο νερό, τις περισσότερες φορές βρίσκονται συσσωρευμένα σχηματίζοντας βιοϋμένιο (biofilm) τόσο σε αβιοτικές (π.χ στους τοίχους των δεξαμενών εκτροφής) όσο και σε βιοτικές (π.χ σε μακροφύκη) επιφάνειες (Sonnenschein et al., 2021, Makridis et al., 2021). Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά έξι είδη: *P. gallaeciensis*, *P. inhibens*, *P. marinintestinus*, *P. piscinae*, *P. porticola* και *P. italicus*. Τα διάφορα είδη *Phaeobacter* spp. καθώς και αρκετά άλλα είδη της οικογένειας *Roseobacteraceae*, χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά σε θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες λόγω της παρεμποδιστικής δράσης τους έναντι παθογόνων βακτηρίων. Η δράση τους αυτή οφείλεται στην ικανότητα τους να παράγουν μια ουσία με αντιμικροβιακή δράση, το διθειοτροπικό οξύ (Trope Dithietic Acid, TDA) (Wilson et al., 2016). Η ουσία αυτή, που γενικά χρησιμοποιείται ως βακτηριοκτόνο αντιβιοτικό, είναι ιδιαίτερα δραστική έναντι πολλών αρνητικών και θετικών κατά Gram παθογόνων βακτηρίων των ιχθύων και του ανθρώπου (Dittmann et al., 2020). Μάλιστα φαίνεται να έχει και σημαντικό ρόλο στην ικανότητα των βακτηρίων να αποικίζουν και να δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με μικροφύκη, παρέχοντάς τους προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος (Berger et al., 2011). Χαρακτηριστικό γνώρισμα των στελεχών αυτών, το οποίο πλέον αποτελεί και δείκτη ανίχνευσής τους, είναι η, ταυτόχρονη με την παραγωγή TDA, έκκριση μιας κίτρινο-καφέ χρωστικής όταν αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικά υλικά παρουσία σιδήρου, λόγω καθίζησης ενός καφέ συμπλέγματος που σχηματίζεται μεταξύ του TDA και των μορίων σιδήρου (Rasmussen et al., 2019, Sonnenschein et al., 2021). Παρόλη την ταυτόχρονη παραγωγή τους, η δράση τους δεν φαίνεται να συγχέεται καθώς έρευνες κατέδειξαν ότι η χρωστική δεν έχει καμία αντιμικροβιακή δράση (Bruhn et al., 2005).

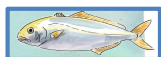
Η χρήση βακτηρίων του γένους *Phaeobacter* ως προβιοτικών έχει μελετηθεί εκτενέστερα τα τελευταία χρόνια, με σκοπό την εφαρμογή τους σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένων και των μονάδων υδατοκαλλιέργειας (Beyersmann et al., 2017). Τα αποτελέσματα καταλήγουν στο ότι έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, ιδιαίτερα έναντι των παθογόνων βακτηρίων *Vibrio* spp., όπως το *V. anguillarum* και το *V. vulnificus*, τα οποία όπως αναφέρθηκε αποτελούν σημαντικό πρόβλημα στις μονάδες υδατοκαλλιέργειας (Makridis et al., 2021). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί των ανθρώπων και ψαριών δεν επηρεάζονται γενετικά και φαινοτυπικά από τη μακροχρόνια έκθεση τους σε TDA (Dittmann et al., 2019). Ακόμα όμως και αν αναπτυχθεί ανοσία αυτή είναι πολύ χαμηλή και αρκετά ασταθής (Porsby et al., 2011). Τέλος, σημαντικό πλεονέκτημα για την ευρεία χρήση τους είναι το γεγονός ότι το TDA δεν προκαλεί αρνητικές αντιδράσεις (ούτε καν θετικές) στα ευκαρυωτικά κύτταρα έτσι θεωρείται μια αρκετά ασφαλής μέθοδος για τους οργανισμούς των υδατοκαλλιεργειών (ιχθυονύμφες, αυγά ιχθύων, ζωντανούς οργανισμούς που προορίζονται για ιχθυοτροφές, κ.α.) (Sonnenschein et al., 2021).

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθεί η επίδραση της χρήσης *Phaeobacter inhibens* σε βιολογικά φίλτρα στις νυμφικές καλλιέργειες μαγιάτικου (*Seriola dumerili*).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προετοιμασία προβιοτικού *Phaeobacter inhibens*

Το βακτηριακό στέλεχος *Phaeobacter inhibens* (Ruiz-Ponte et al. 1998, Martens et al. 2006), παραγγέλθηκε από την Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, σε μορφή λυοφιλοποιημένου σκευάσματος. Το άνοιγμα της γυάλινης αμπούλας και η επανυδάτωση της αποξηραμένης καλλιέργειας του στελέχους έγινε σε ασηπτικές συνθήκες και σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρίας. Αρχικά το στέλεχος εμβολιάστηκε σε 5 mL αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο, Marine Broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) και επώαστηκε για επτά ημέρες στο σκοτάδι στους 22°C, ώστε να αναπτυχθεί και να αποκτήσει η υγρή καλλιέργεια το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα. Κατόπιν, το στέλεχος



εμβολιάστηκε σε συγκέντρωση $2,14 \times 10^7$ CFU/mL, σε κωνικές φιάλες των 2 L με αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο, Marine Broth, στο σκοτάδι και στους 22°C, για μία εβδομάδα.

Πέντε kg κεραμικοί πορώδεις κύλινδροι (Premium Filter Material) από φυσικό χαλαζίτη, αφού τοποθετήθηκαν σε τέσσερα γυάλινα ποτήρια ζέσεως των 5 L, αποστειρώθηκαν στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης στους 121°C για 20 min. Κατόπιν, η υγρή καλλιέργεια του προβιοτικού φυγοκεντρήθηκε στα 12.000 g για 10 min στους 18°C, ώστε να απομακρυνθεί το υγρό μέσο καλλιέργειας και να μείνουν μόνο τα βακτηριακά κύτταρα, τα οποία μετά την προσθήκη αποστειρωμένου διηθημένου θαλασσινού νερού, μεταφέρθηκαν στα τέσσερα γυάλινα ποτήρια ζέσεως των 5 L και αναμείχθηκαν με τους κεραμικούς κυλίνδρους. Τα ποτήρια καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν σε σκοτάδι στους 22°C για μία εβδομάδα.

Κατόπιν οι κύλινδροι ξεπλύθηκαν με θαλασσινό νερό, μεταφέρθηκαν σε τρεις πλαστικούς κουβάδες των 10 L και μεταφέρθηκαν στον ιχθυογεννητικό σταθμό της εταιρείας Γαλαξίδι Θαλάσσιες Καλλιέργειες Α.Ε. Οι κουβάδες καλύφθηκαν με δίχτυ μεγέθους 350 µm, προκειμένου να αποφευχθεί η είσοδος και παγίδευση των ιχθυονυμφών στους κουβάδες.

Σε αυτά τα απλά βιολογικά φίλτρα που κατασκευάστηκαν με αυτό τον τρόπο προστέθηκε αερισμός με μια πέτρα αέρα, ώστε να υπάρχει οξυγόνωση των κυλίνδρων και των μικροβιακών κοινοτήτων του στελέχους *P. inhibens* που είχαν αποικίσει τους κεραμικούς κυλίνδρους και επιπλέον να δημιουργείται ένα συνεχές ρεύμα προς τη στήλη του νερού μέσα στη δεξαμενή. Με αυτόν τον τρόπο μεταφέρονταν κύτταρα του *P. inhibens* σε όλη τη δεξαμενή. Από τη στήλη του νερού μεταφέρονται τα κύτταρα των προβιοτικών βακτηρίων στους οργανισμούς της ζωντανής τροφής και κατόπιν στις ιχθυονύμφες μέσω της ζωντανής τροφής. Επίσης μεταφέρονται απευθείας στις ιχθυονύμφες που πίνουν θαλασσινό νερό για λόγους ωσμορύθμισης (Makridis et al., 2000).

2.2. Νυμφικές καλλιέργειες

Σε έξι δεξαμενές των 2,8 m³ τοποθετήθηκαν 236-270 γραμμάρια αυγών μαγιάτικου (*Seriola dumerili*). Σε τρεις δεξαμενές (Λ13, Λ15 και Λ17) τοποθετήθηκαν πλαστικά δοχεία με κεραμικούς κυλίνδρους που είχαν επωαστεί με καλλιέργειες του προβιοτικού βακτηρίου *Phaeobacter inhibens*, ενώ άλλες τρεις δεξαμενές χρησιμοποιήθηκαν σαν ομάδα ελέγχου (Λ14, Λ16 και Λ18). Στις εκτροφές χρησιμοποιήθηκε συντηρημένο φυτοπλαγκτόν (όχι ζωντανό).

Σύμφωνα με το διατροφικό πρωτόκολλο οι ιχθυονύμφες τράφηκαν με τροχόζωα από 3 μέχρι 24 ημέρες μετά την εκκόλαψη (HME), μικρή ανεμπλούτιστη *Artemia* (AF) από 12 έως 23 HME, εμπλουτισμένη *Artemia* (EG) από 18 HME και ξηρά τροφή από 18 HME. Προστέθηκαν επίσης συντηρημένα μικροφύκη. Η θερμοκρασία κυμάνθηκε από 22 έως 27°C, το pH από 7,7 έως 8,4, και ο κορεσμός του οξυγόνου από 85% έως 140%.

2.3 Δειγματοληψίες ιχθυονυμφών και νερού δεξαμενών εκτροφής μαγιάτικου 2020

Σύμφωνα με το σχεδιασμό των πειραμάτων εκτροφής αποφασίστηκε να τοποθετηθούν βιολογικά φίλτρα σε τρεις δεξαμενές και να χρησιμοποιηθούν άλλες τρεις δεξαμενές σαν ομάδα ελέγχου, αλλά ταυτόχρονα να μη παρθούν δείγματα από μια δεξαμενή από κάθε ομάδα με τη λογική ότι ίσως η διαδικασία της δειγματοληψίας στρεσάρει τις ιχθυονύμφες και οδηγεί σε υψηλότερες θνησιμότητες. Πάρθηκαν δείγματα λοιπόν από τα δύο πρώτα ζεύγη δεξαμενών, αλλά η μια δεξαμενή της ομάδας ελέγχου παρουσίασε ολική θνησιμότητα δυο ημέρες μετά την εκκόλαψη και οι δειγματοληψίες συνεχίστηκαν στη ομάδα ελέγχου μόνο με μια δεξαμενή.

Οι δειγματοληψίες από τις νυμφικές εκτροφές μαγιάτικου του 2020, είχαν ως στόχο τον υπολογισμό του συνολικού μικροβιακού φορτίου και του φορτίου βακτηριακών στελεχών της οικογένειας των *Vibrio* τόσο των ιχθυονυμφών μαγιάτικου όσο και του νερού εκτροφής τους, μέσω του υπολογισμού του αριθμού των βακτηρίων (CFU/mL) σε υπόστρωμα Marine agar (συνολικό βακτηριακό φορτίο) και σε υπόστρωμα TCBS (φορτίο σε δυνητικά *Vibrio*). Οι δειγματοληψίες έλαβαν χώρα στις 2, 8, 14, 19 και 25 HME.



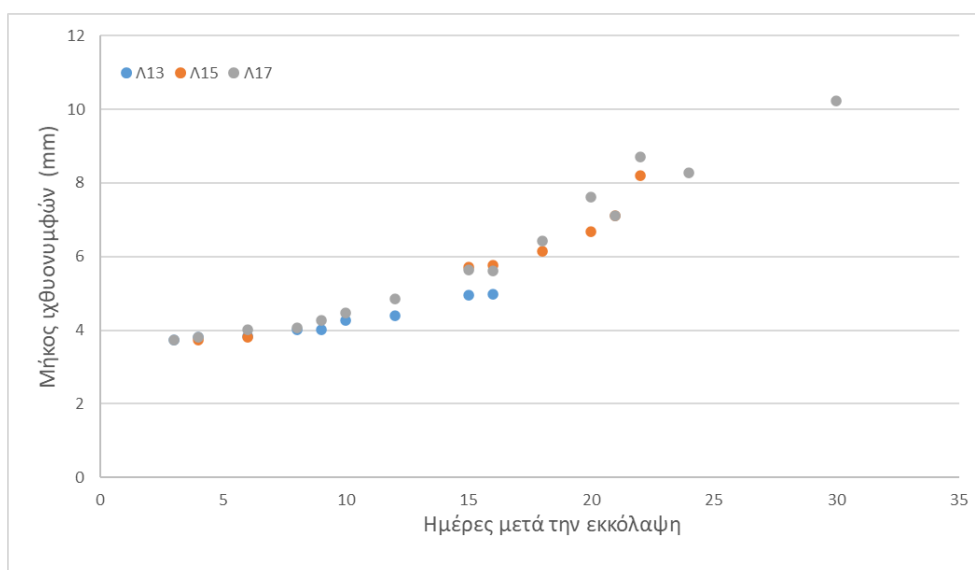
Από κάθε δεξαμενή εκτροφής, ελήφθησαν, πέντε ιχθυονύμφες 2 ΗΜΕ, τρεις ιχθυονύμφες 8 ΗΜΕ και τρεις ιχθυονύμφες τις υπόλοιπες ημέρες δειγματοληψίας, οι οποίες αρχικά ομογενοποιήθηκαν μεμονωμένα σε 0,5 mL αποστειρωμένο διηθημένο θαλασσινό νερό, σε γυάλινο ομογενοποιητή χειρός. Κατόπιν, σε κάθε δείγμα στρώθηκαν σε τρυβλία με Marine agar (Difco Laboratories, USA) μετά από διαδοχικές αραιώσεις. Το υπόλοιπο δείγμα των ομογενοποιημένων ιχθυονυμφών καταψύχθηκε σε φιάλη υγρού αζώτου μέχρι να μεταφερθούν σε καταψύκτη -80°C. Δείγματα επίσης από κάθε ομογενοποιημένη νύμφη των ημερών δειγματοληψίας 14, 19 και 25 ΗΜΕ, στρώθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο TCBS (Thiosulfate citrate bile salts sucrose Agar). Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία περίπου 20°C για επώαση.

Τα δείγματα του νερού εκτροφής, μετά από διαδοχικές αραιώσεις, για όλες τις ημέρες δειγματοληψίας, στρώθηκαν σε τρυβλία με Marine agar και για τις ημέρες δειγματοληψίας 14, 19 και 25 μετά την εκκόλαψη, στρώθηκαν επίσης σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο TCBS. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία περίπου 20°C για επώαση. Η καταγραφή του αριθμού των βακτηριακών αποικιών στα τρυβλία έγινε την επόμενη, μεθεπόμενη και την έβδομη ημέρα της επώασης.

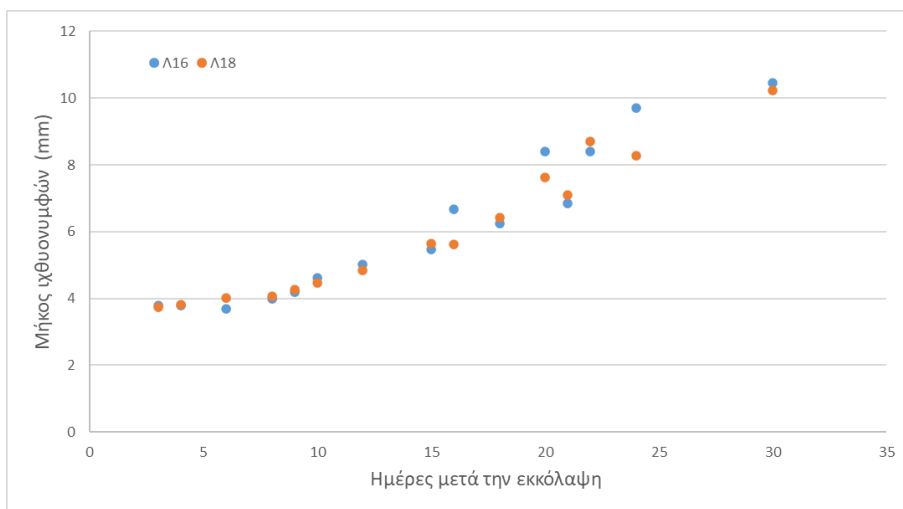
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανάπτυξη

Το μήκος των ιχθυονυμφών ήταν αρκετά μικρότερο από το μήκος των ιχθυονυμφών ίδιας ηλικίας στις εκτροφές του 2019 (με και δίχως κοπήποδα). Για παράδειγμα σε ιχθυονύμφες ηλικίας 30 ημερών το μέσο μήκος μόλις και μετά βίας ξεπέρασε τα 10 mm (**Εικόνες 1 και 2**) στις εκτροφές του 2020, ενώ στις εκτροφές του 2019 οι ιχθυονύμφες ηλικίας 30 ημερών ξεπέρασαν τα 17 mm και στους δυο χειρισμούς.

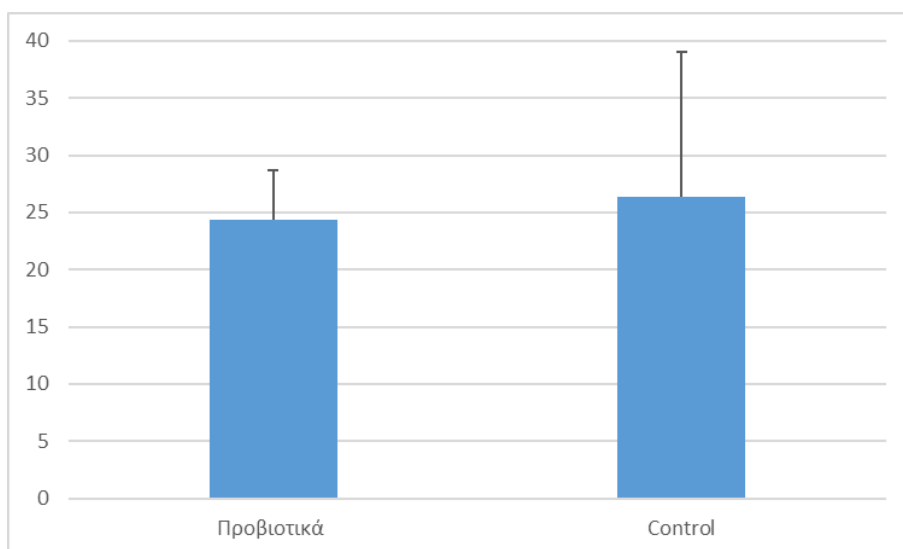


Εικόνα 1. Μήκος ιχθυονυμφών στις δεξαμενές με προβιοτικά (Λ13, Λ15 και Λ17)

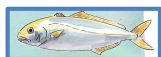


Εικόνα 2. Μήκος ιχθυονυμφών στις δεξαμενές ελέγχου χωρίς προβιοτικά (Λ16 και Λ18)

Γενικότερα, η ποιότητα του γόνου δεν ήταν καλή και άσχετα με το χειρισμό και αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι μια δεξαμενή ελέγχου (Λ14) παρουσίασε ολική θνησιμότητα την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη, και για αυτό δεν εμφανίζονται καθόλου τα αποτελέσματα μέτρησης του μήκους για αυτή τη συγκεκριμένη δεξαμενή στην **Εικόνα 2**. Οι ημέρες που κρατήθηκαν οι δεξαμενές δίνει ένα μέτρο της επιβίωσης στους δυο χειρισμούς. Οι δεξαμενές με προβιοτικά Λ13, Λ15, και Λ17 είχαν ψάρια μέχρι την ημέρα 17, 24, και 32 αντίστοιχα. Ενώ οι δεξαμενές της ομάδας ελέγχου Λ14, Λ16, και Λ18 είχαν ψάρια μέχρι την ημέρα 2, 32, και 45. Αυτό απεικονίζεται στην **Εικόνα 3**, όπου φαίνεται ότι η επαναληψιμότητα είναι μεγαλύτερη στις δεξαμενές με προβιοτικά.

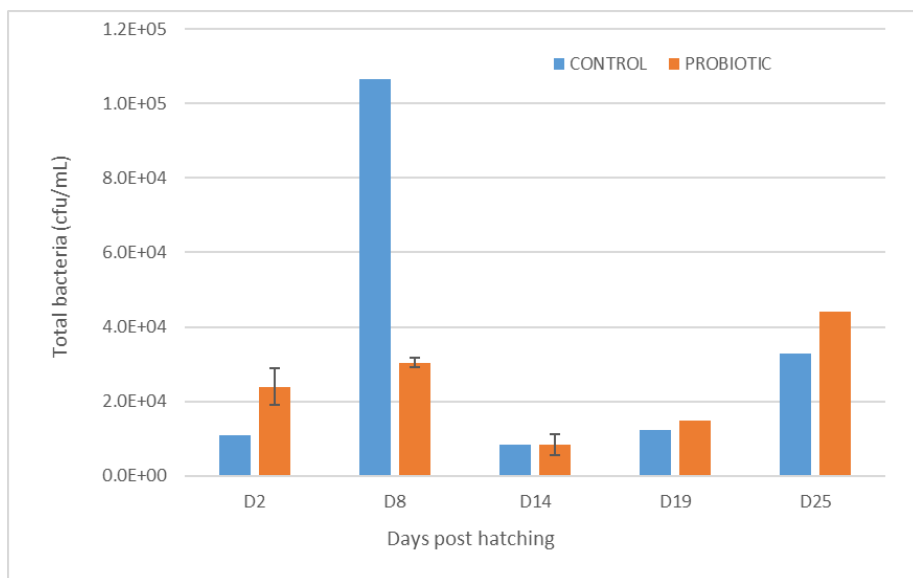


Εικόνα 3. Διάρκεια πειράματος σε ημέρες στους διαφορετικούς χειρισμούς της εκτροφής του 2020 με χρήση βιολογικών φίλτρων εμπλουτισμένων με προβιοτικά βακτήρια *Phaeobacter inhibens*.

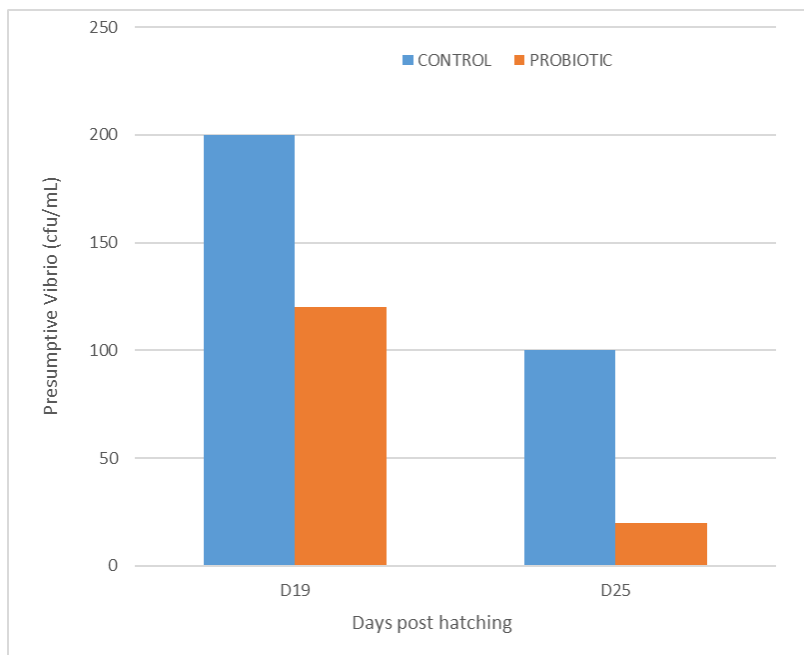


Μικροβιολογικές αναλύσεις

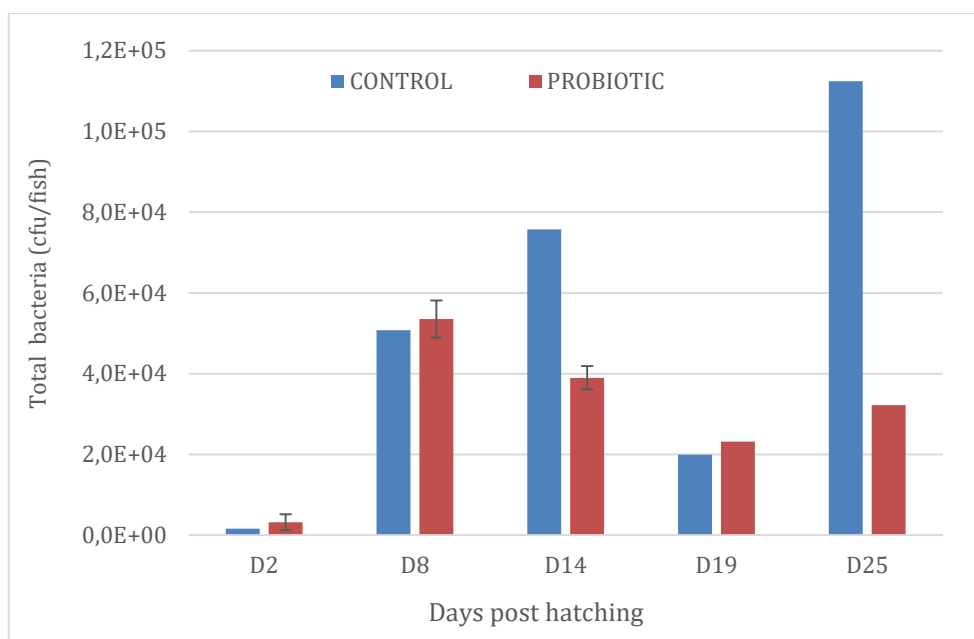
Η προσθήκη προβιοτικών δεν επηρέασε το συνολικό μικροβιακό φορτίο στο νερό των δεξαμενών (**Εικόνα 4**), αλλά επηρέασε το φορτίο δυνητικών *Vibrio* (**Εικόνα 5**), εάν και αυτό δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί στατιστικά αφού δεν υπάρχουν επαναλήψεις και στις δυο ομάδες.



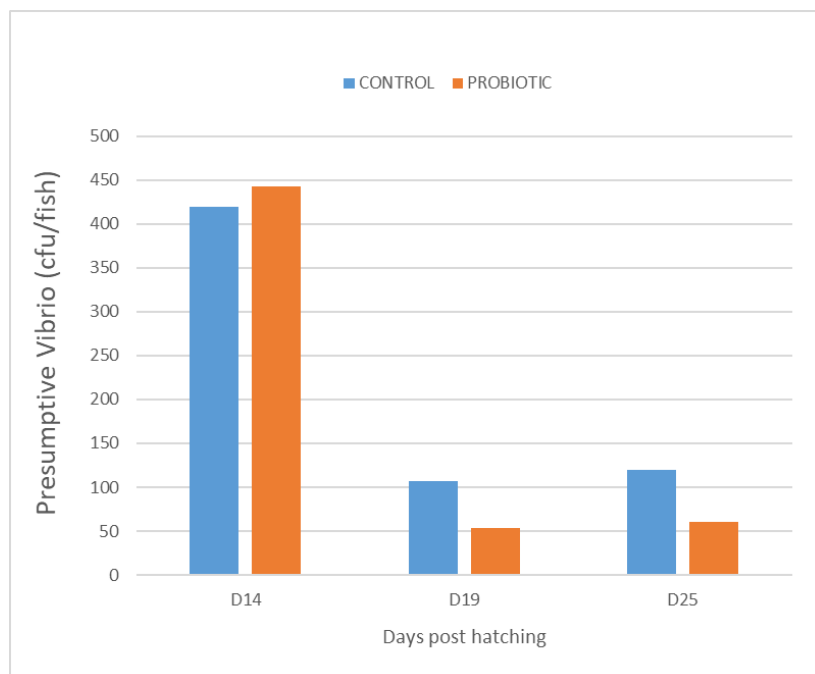
Εικόνα 4. Συνολικό μικροβιακό φορτίο στο νερό των δεξαμενών καλλιέργειας των ιχθυονυμφών μαγιάτικου εκφραζόμενο σαν αποικίες (CFU) ανά mL (\pm τυπικό σφάλμα) στην ομάδα ελέγχου (Control) και στην ομάδα όπου τοποθετήθηκαν τα βιολογικά φίλτρα με τα προβιοτικά *Phaeobacter inhibens* (Probiotic) κατά την διάρκεια του πειράματος 2, 8, 14, 19 και 25 ημέρες μετά την εκκόλαψη.



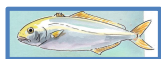
Εικόνα 5. Φορτίο δυνητικών *Vibrio* στο νερό των δεξαμενών καλλιέργειας των ιχθυονυμφών μαγιάτικου εκφραζόμενο σαν αποικίες (CFU) σε TCBS ανά mL στην ομάδα ελέγχου (Control), και στην ομάδα όπου τοποθετήθηκαν τα βιολογικά φίλτρα με τα προβιοτικά *Phaeobacter inhibens* (Probiotic) 19 και 25 ημέρες μετά την εκκόλαψη.



Εικόνα 6. Συνολικό μικροβιακό φορτίο στις ιχθυονύμφες μαγιάτικου εκφραζόμενο σαν αποικίες (cfu) ανά mL (\pm τυπικό σφάλμα) στην ομάδα ελέγχου (Control) και στην ομάδα όπου τοποθετήθηκαν τα βιολογικά φίλτρα με τα προβιοτικά *Phaeobacter inhibens* (Probiotic) κατά την διάρκεια του πειράματος 2, 8, 14, 19 και 25 ημέρες μετά την εκκόλαψη.



Εικόνα 7. Φορτίο δυνητικών *Vibrio* στις ιχθυονύμφες μαγιάτικου εκφραζόμενο σαν αποικίες (CFU) σε TCBS ανά άτομο στην ομάδα ελέγχου (Control), και στην ομάδα όπου τοποθετήθηκαν τα βιολογικά φίλτρα με τα προβιοτικά *Phaeobacter inhibens* (Probiotic) 14, 19 και 25 ημέρες μετά την εκκόλαψη.



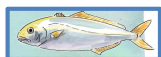
Στην περίπτωση των ιχθυονυμφών (Εικόνα 6) παρατηρήθηκε στους ομογενοποιημένους μια αυξητική τάση του συνολικού βακτηριακού φορτίου. Ταυτόχρονα, το μικροβιακό φορτίο στην ομάδα ελέγχου ήταν γενικά υψηλότερο από την ομάδα των προβιοτικών στα περισσότερα σημεία της δειγματοληψίας. Στην περίπτωση πάλι των δυνητικών βακτηρίων *Vibrio*, σε δυο από τα τρία σημεία όπου μετρήθηκε η παράμετρος αυτή, παρατηρήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση δυνητικών βακτηρίων *Vibrio* στην ομάδα ελέγχου (Εικόνα 7).

Η προσθήκη προβιοτικών του είδους *Phaeobacter inhibens*, το οποίο με βάση πολλές δημοσιευμένες εργασίες περιορίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων της ομάδας *Vibrio*, και στην περίπτωση του πειράματος που έγινε στο ιχθυογεννητικό του Γαλαξιδίου επιβεβαιώθηκε. Η προσθήκη προβιοτικών δοκιμάστηκε σε βιομηχανική κλίμακα, που σημαίνει ότι η δυνατότητα πολλών επαναλήψεων είναι περιορισμένη. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε χειρισμό, αλλά σε σχέση με άλλη Εργασία (2.2.2 Αξιολόγηση του βελτιωμένου πρωτοκόλλου και σύγκριση με το αρχικό του πρώτου έτους, αλλά και συγκριτικά με τη χρήση ή μη των προβιοτικών καθώς και κωπηπόδων στο διατροφικό πρωτόκολλο νυμφικής εκτροφής του μαγιάτικου) του προγράμματος, έλαβε όλη η ερευνητική ομάδα του προγράμματος την απόφαση να μην γίνουν δειγματοληψίες από ένα ζεύγος δεξαμενών. Η ολική θνησιμότητα σε μια δεξαμενή ελέγχου δεν μας επέτρεψε να γίνει στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που συλλέχθηκαν. Παρόλα αυτά είναι φανερό η θετική επίδραση της προσθήκης των προβιοτικών και ως προς την επαναληψιμότητα των εκτροφών και ως προς τις μικροβιολογικές αναλύσεις που έδειξαν ότι το φορτίο των δυνητικών *Vibrio* και το συνολικό μικροβιακό φορτίο μειώθηκε στις ιχθυονύμφες της ομάδας των προβιοτικών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Διαφοροποιήσεις από ΤΠΕ: Το Παραδοτέο 2.3.1 παραδόθηκε με καθυστέρηση 5 μηνών λόγω καθυστερήσεων που προέκυψαν από την πανδημία COVID-19.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Berger, M., Neumann, A., Schulz, S., Simon, M., and Brinkhoff, T. (2011). Tropodithietic acid production in *Phaeobacter gallaeciensis* is regulated by N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. J. Bacteriol. 193, 6576– 6585. doi: 10.1128/jb.05818-11.
- Beyersmann, P.G., Tomasch, J., Son, K., Stocker, R., Göker, M., Wagner-Döbler, I., Simon, M., Brinkhoff, T., 2017. Dual function of tropodithietic acid as antibiotic and signaling molecule in global gene regulation of the probiotic bacterium *Phaeobacter inhibens*. Sci. Rep. 7, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00784-7>.
- Bruhn, J.B., Gram, L., and Belas, R., 2007. Production of antimicrobial compounds and biofilm formation by Roseobacter species are influenced by culture conditions. Applied and Environmental Microbiology 73, 442-450.
- Dittmann, K.K., Rasmussen, B.B., Melchiorson, J., Sonnenschein, E.C., Gram, L., Bentzon-Tilia, M., 2020. Changes in the microbiome of mariculture feed organisms after treatment with a potentially probiotic strain of *Phaeobacter inhibens*. Appl. Environ. Microbiol. 86, 1–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.00499-20>.
- Grotkjær, T., Bentzon-Tilia, M., D’Alvise, P., Dourala, N., Nielsen, K., Gram, L. 2016. Isolation of TDA-producing *Phaeobacter* strains from sea bass larval rearing units and their probiotic effect against pathogenic *Vibrio* spp. in *Artemia* cultures, Systematic and Applied Microbiology. 39(3),180-188.
- Makridis, P., Kokou, F., Bournakas, C., Papandroulakis, N., Sarropoulou, E., 2021. Isolation of *Phaeobacter* sp. from larvae of atlantic bonito (*Sarda sarda*) in a mesocosmos unit, and its use for the rearing of european seabass larvae (*Dicentrarchus labrax* L.). Microorganisms 9, 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010128>.
- Porsby, C. H., Webber, M. A., Nielsen, K. F., Piddock, L. J. V. & Gram, L. 2011. Resistance and tolerance to tropodithietic acid, an antimicrobial in aquaculture, is hard to select. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 1332–1337.



- Prol, M.J., Bruhn, J.B., Pintado, J., Gram, L. 2009. Real-time PCR detection and quantification of fish probiotic *Phaeobacter* strain 27-4 and fish pathogenic *Vibrio* in microalgae, rotifer, *Artemia* and first feeding turbot (*Psetta maxima*) larvae. J. App. Microbiol., 106, 1292–1303.
- Rasmussen, B.B., Kalatzis, P.G., Middelboe, M., Gram, L., 2019. Combining probiotic *Phaeobacter inhibens* DSM17395 and broad-host-range vibriophage KVP40 against fish pathogenic vibrios. Aquaculture 513, 734415. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734415>
- Sonnenschein, E.C., Jimenez, G., Castex, M., Gram, L., 2021. The Roseobacter-Group Bacterium *Phaeobacter* as a Safe Probiotic Solution for Aquaculture. Appl. Environ. Microbiol. 87, 1–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.02581-20>.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Ταμείο
Περιφερειακής Ανάπτυξης

ΕΠΑνΕΚ 2014–2020
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ

