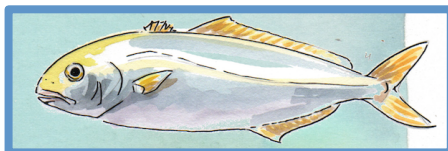


Ειδικές Δράσεις «ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ»

ΜΑΓΙΑΤΙΚΟ Τ6ΥΒΠ-0068



Παραδοτέο

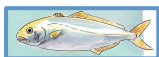
Αριθμός Παραδοτέου:	Π 2.3.2	Μήνας Παράδοσης ΤΠΕ:	33
Τίτλος Παραδοτέου	Χρήση προβιοτικών στη ζωντανή τροφή		
Ενότητα Εργασίας (ΕΕ):	2	Συντονιστής ΕΕ:	ΠΠ
Τίτλος ΕΕ:	Νυμφικές εκτροφές και παραγωγή γόνου		
Αριθμός Εργασίας:	1.1	Υπεύθυνος Παραδοτέου:	ΠΠ
Τίτλος εργασίας:	Χρήση προβιοτικών στη νυμφική εκτροφή		
Εταίροι:	ΠΠ	ΓΑΛΑΞΙΔΙ	
Κατάσταση:	Ολοκληρωμένο	Μήνας παράδοσης:	33

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

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

Σύντομη περιγραφή (ΤΠΕ): Στο παραδοτέο αυτό διερευνήθηκε η χρήση αυτόχθονων προβιοτικών, βακτηριακών στελεχών τα οποία είχαν απομονωθεί από τη μονάδα υδατοκαλλιέργειας όπου και χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή από τον ιχθυογεννητικό σταθμό της Γαλαξίδι Θαλάσσιες Καλλιέργειες Α.Ε. Τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν μέσω αλληλούχισης του 16 S rDNA, ελέγχθηκε η δράση τους *in vitro* ενάντια σε παθογόνα και η *in vivo* δράση τους. Ο τρόπος επίδρασης της μικροχλωρίδας της ζωντανής τροφής στις δεξαμενές εκτροφής των ιχθυονυμφών που επιλέχθηκε ήταν μέσω εμβολιασμού των προβιοτικών αυτών σε ειδικά βιολογικά φίλτρα με κεραμικούς κυλίνδρους που τοποθετήθηκαν στις δεξαμενές εκτροφής. Με αυτό τον τρόπο επηρεάζεται η μικροχλωρίδα του νερού και επειδή οι οργανισμοί της ζωντανής τροφής (τροχόζωα και Artemia) διηθούν το νερό, επηρεάζεται έμμεσα και η μικροχλωρίδα της ζωντανής τροφής.





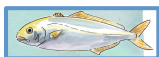
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βακτήρια του γένους *Phaeobacter* και *Ruegeria* ανήκουν στην οικογένεια των *Rhodobacteraceae*, είναι Gram αρνητικά βακτήρια όπως όλα τα Proteobacteria και ευρέως κατανέμονται στο θαλάσσιο περιβάλλον. Διαφορετικά στελέχη του γένους *Phaeobacter* αποικούν διαφορετικούς οικολογικούς θώκους (niches) σε έναν ιχθυογεννητικό σταθμό καλκανιού στη Δανία (Porsby et al. 2008). 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). Τα διάφορα είδη *Phaeobacter* spp. καθώς και αρκετά άλλα είδη της οικογένειας *Rhodobacteraceae*, 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 (Tropo Dithiethic Acid, TDA) αλλά και με αντικαρκινική δράση (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). Τα *Phaeobacter* spp. παράγουν TDA και τη χαρακτηριστική κίτρινο-καφέ χρωστική καθώς δείχνουν και ανταγωνιστική δράση έναντι του *V. anguillarum*, όπως επίσης και η *Ruegeria* spp. εμφανίζει τα τρία αυτά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά σε ακίνητες συνθήκες (Porsby et al. 2008).

Η ανταλλαγή νερού και τα βιοφίλτρα είναι παραδοσιακοί μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των τοξικών μεταβολιτών στην ιχθυοκαλλιέργεια (Jahangiri and Esteban, 2018). Μελέτες προσανατολίζονται προς τη χρήση προβιοτικών στη διαχείριση της ποιότητας του νερού εκτροφής. Οι María J. Prol-García & José Pintado (2013) μελετώντας την επίδραση του σχηματιζόμενου βιοϋμένιου (biofilm) του στελέχους *Phaeobacter* 27-4 σε κεραμικούς κυλίνδρους, στην παρεμπόδιση της δράσης του *Vibrio anguillarum* σε ιχθυονύμφες καλκανιού, διαπίστωσαν ότι βελτιώθηκε η επιβίωση των λαρβών και η ποιότητα του νερού εκτροφής, με μείωση της θολερότητας και περιορίστηκε και η συγκέντρωση των *Vibrionaceae*. Επίσης στελέχη του γένους *Ruegeria* spp. βρέθηκαν ως από τα πιο άφθονα απομονωθέντα βακτηριακά στελέχη από τα βιολογικά φίλτρα και το νερό εκτροφής σε συστήματα ανακύκλωσης νερού ιχθυοκαλλιέργειας (Michaud I., et al., 2009). Οι Makridis et al. (2005), αξιολογώντας την in vivo επίδραση των βακτηριακών στελεχών *Roseobacter* sp. και *Ruegeria* sp., μεταξύ άλλων, ως υποψήφια προβιοτικά σε γονιμοποιημένα αυγά τσιπούρας (*Sparus aurata*), απομονωμένα από ζωντανή τροφή, έδειξαν τη βελτιωμένη σημαντικά επιβίωση των λαρβών, όταν προστέθηκαν στο νερό εκτροφής σε σχέση με τα γονιμοποιημένα αυγά που εκκολάφθηκαν και αναπτύχθηκαν σε σκέτο φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό.

Τα βακτήρια *Phaeobacter gallenciensis*, *Phaeobacter* sp., και *Ruegeria* sp., απομονώθηκαν από τον ιχθυογεννητικό σταθμό του Γαλαξιδίου από ομογενοποιημένες λάρβες, μέσω της αντιμικροβιακής τους δράσης σε τρία στελέχη του γένους *Vibrio* και το στέλεχος *Aeromonas veronii*. Σε in vivo δοκιμή δοκιμάστηκε η μη παθογένειά τους σε αυγά φαγκριού, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια σε πείραμα μεγάλης κλίμακας σε ιχθυογεννητικό σταθμό.

Στόχος της παρούσας έρευνας ήταν να μελετηθεί η επίδραση της χρήσης μίγματος των αυτόχθονων προβιοτικών *Phaeobacter gallenciensis*, *Phaeobacter* sp., και *Ruegeria* sp., σε βιολογικά φίλτρα στις δεξαμενές εκτροφής ιχθυονυμφών πρώτων ημερών μαγιάτικου (*Seriola dumerili*), μετά την εκκόλαψη, ως προς την αναπτυξιακή συμπεριφορά των ιχθυονυμφών και ως προς το συνολικό βακτηριακό τους φορτίο και το βακτηριακό φορτίο των δυνητικά *Vibrionaceae*. Επίσης δείγματα ομογενοποιημένων ιχθυονυμφών, νερού εκτροφής και βιοϋμένιου (biofilm) από τα τοιχώματα δεξαμενών, ελήφθησαν ώστε να μελετηθεί το μικροβίωμα με ανάλυση NGS.



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προετοιμασία μίγματος αυτόχθονων προβιοτικών *Phaeobacter gallenciensis*, *Phaeobacter sp.*, και *Ruegeria sp.*

Τα βακτηριακά στελέχη *Phaeobacter gallenciensis*, *Phaeobacter sp.* και *Ruegeria sp.* αναπύχθηκαν σε Marine Broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Οι στοκ καλλιέργειες διατηρούνταν υπό κατάψυξη (-80°C), σε MicrobankTM πορώδη πλαστικά σφαιρίδια (beads) και αναγεννήθηκαν ξεχωριστά σε 4,5 mL Marine Broth. Η κάθε προ-καλλιέργεια επώαστηκε στους 20°C για τρεις ημέρες στο σκοτάδι και στατικές συνθήκες, μετά την οποία, 0,5 mL από την προ-καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν για εμβολιασμό καλλιέργειας 50 mL Marine Broth. 4 mL από την κάθε καλλιέργεια διανεμήθηκαν σε συνολικά 36 (3 στελέχη x 12 δοκιμαστικοί σωλήνες/στέλεχος) αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες σε ασηπτικές συνθήκες, για να συλλεχθούν δείγματα στις χρονικές στιγμές 0, 24, 48 και 96 ώρες μετά τον εμβολιασμό εις τριπλούν. Για να ποσοτικοποιηθούν τα colony-forming units (CFUs) σε κάθε χρονική στιγμή, με τη μέθοδο των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων στρώθηκαν δείγματα από κάθε καλλιέργεια σε τρυβλία με Marine agar, όπου επώαστηκαν στους 20°C για τρεις ημέρες, πριν την καταμέτρηση των αποικιών ενώ παράλληλα γινόταν μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600 nm των τριών αντιγράφων.

Η προοπτική χρήσης βακτηριακών στελεχών ως προβιοτικά απαιτεί προφανώς ότι αυτά δεν είναι παθογόνοι μικροοργανισμοί. Η επίδραση των τεσσάρων βακτηριακών στελεχών *Rhodobacter sp.*, *Phaeobacter gallenciensis*, *Phaeobacter sp.* και *Ruegeria sp.*, για πιθανή παθογένεια, απομονωμένων από τον ιχθυογεννητικό σταθμό του Γαλαξιδίου, αξιολογήθηκε σε μικρής κλίμακας πείραμα ως προς την εκκολαψιμότητα γονιμοποιημένων αυγών φαγκριού (*Pagrus major*). Γονιμοποιημένα αυγά φαγκριού αποκτήθηκαν από τον ιχθυογεννητικό σταθμό της Γαλαξίδι Θαλάσσιες Καλλιέργειες Α.Ε. Τα αυγά ξεπλύθηκαν με διηθημένο αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και μεταφέρθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας κυττάρων 24-θέσεων Thermo ScientificTM και δύο πλάκες χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο κάθε βακτηριακού στελέχους. Τα βακτηριακά κύτταρα συγκέντρωσης $10^8/\text{mL}$ υγρής καλλιέργειας Marine Agar, αραιώθηκαν σε διηθημένο αποστειρωμένο θαλασσινό νερό σε τελική συγκέντρωση $10^6/\text{mL}$ και τοποθετήθηκαν για προσαρμογή σε επωαστήρα μέσης θερμοκρασίας $17,8^{\circ}\text{C}$ για 30 λεπτά πριν τη χρησιμοποίησή τους. Ένα αυγό τοποθετήθηκε σε κάθε θέση της πλάκας με 1 ml της αραιωμένης βακτηριακής καλλιέργειας. Τρεις πλάκες με αποστειρωμένο διηθημένο θαλασσινό νερό χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδες ελέγχου και η διαδικασία έγινε εις τριπλούν για κάθε βακτηριακό στέλεχος. Η επώαση των αυγών έγινε στους $17,8^{\circ}\text{C}$ στο σκοτάδι. Νεκρά αυγά ή ιχθυονύμφες απομακρύνονταν από τις πλάκες και η εκκολαψιμότητα μετρήθηκε στις 48h. Η εκκολαψιμότητα θεωρήθηκε πετυχημένη, όταν παρατηρούνταν ζωντανές ιχθυονύμφες.

Τρία βακτηριακά στελέχη (*Phaeobacter gallenciensis*, *Phaeobacter sp.* και *Ruegeria sp.*) που απομονώθηκαν στον ιχθυογεννητικό σταθμό της εταιρείας Γαλαξίδι Θαλάσσιες Καλλιέργειες Α.Ε., προετοιμάστηκαν κατάλληλα ώστε να εμβολιαστούν τα βιολογικά φίλτρα των δεξαμενών νυμφικών εκτροφών. Αρχικά τα στελέχη εμβολιάστηκαν, σε 5 mL αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο, Marine Broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) και επώαστηκαν για επτά ημέρες στο σκοτάδι στους 22°C , ώστε να αναπτυχθεί και να αποκτήσει η υγρή καλλιέργεια το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα. Κατόπιν, τα στελέχη εμβολιάστηκαν σε συγκέντρωση 10^8 - 10^9 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, οι υγρές καλλιέργειες των προβιοτικών φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000 g για 10 min στους 18°C , ώστε να απομακρυνθεί το υγρό μέσο καλλιέργειας και να μείνουν μόνο τα βακτηριακά κύτταρα, έγινε ισοκατανομή τους και με την προσθήκη αποστειρωμένου διηθημένου θαλασσινού νερού, μεταφέρθηκαν σε τρία γυάλινα ποτήρια ζέσεως των 5 L και αναμειχθηκαν με τους κεραμικούς κυλίνδρους. Τα ποτήρια καλύφθηκαν με αλουμινοχαρτο και τοποθετήθηκαν σε σκοτάδι στους 22°C για μία εβδομάδα.



Κατόπιν οι κύλινδροι ξεπλύθηκαν με θαλασσινό νερό, μεταφέρθηκαν σε τρία πλαστικά δοχεία των 10 L και μεταφέρθηκαν στον ιχθυογεννητικό σταθμό της εταιρείας Γαλαξίδι Θαλάσσιες Καλλιέργειες Α.Ε. Τα δοχεία καλύφθηκαν με δίκτυο μεγέθους 350 μm , προκειμένου να αποφευχθεί η είσοδος και παγίδευση των ιχθυονυμφών στα δοχεία.

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 των προβιοτικών στελεχών 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 των προβιοτικών στελεχών 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 ωσμωρύθμισης (Makridis et al., 2000).

2.2. Νυμφικές καλλιέργειες

Σε έξι δεξαμενές των 2,8 m^3 τοποθετήθηκαν περίπου 250 γραμμάρια αυγών μαγιάτικου (*Seriola dumerili*). Σε δύο δεξαμενές (Λ16 και Λ18) τοποθετήθηκαν πλαστικά δοχεία με κεραμικούς κυλίνδρους που είχαν επωαστεί με καλλιέργειες των προβιοτικών βακτηρίων *Phaeobacter gallenciensis*, *Phaeobacter sp.*, και *Ruegeria sp.* ενώ άλλες δύο δεξαμενές χρησιμοποιήθηκαν σαν ομάδα ελέγχου (Λ15 και Λ17). Στις εκτροφές χρησιμοποιήθηκε συντηρημένο φυτοπλαγκτόν.

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%.

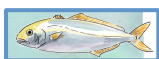
2.3. Δειγματοληψίες ιχθυονυμφών και νερού, και βιοϋμενίου (biofilm) από τα τοιχώματα των δεξαμενών, από τις νυμφικές εκτροφές

Οι δειγματοληψίες από τις νυμφικές εκτροφές μαγιάτικου του 2021, είχαν ως αρχικό στόχο τον υπολογισμό του συνολικού μικροβιακού φορτίου και του φορτίου βακτηριακών στελεχών της οικογένειας των *Vibrio* των ιχθυονυμφών μαγιάτικου, μέσω του υπολογισμού του αριθμού των βακτηρίων (CFU/mL). Οι δειγματοληψίες έλαβαν χώρα στις 2, 11, 16, και 23 HME.

Από κάθε δεξαμενή εκτροφής, ελήφθησαν, τρεις ιχθυονύμφες την 2 HME εις διπλούν και τρεις μεμονωμένες ιχθυονύμφες τις υπόλοιπες ημέρες δειγματοληψίας, οι οποίες αρχικά ομογενοποιήθηκαν 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, ώστε να γίνει εξαγωγή DNA και να αναλυθεί το μικροβίωμά τους. Δείγματα επίσης από κάθε ομογενοποιημένη νύμφη των ημερών δειγματοληψίας 2, 11, 16, και 23 HME, 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.

Η καταγραφή του αριθμού των βακτηριακών αποικιών στα τρυβλία έγινε την επόμενη, μεθεπόμενη και την έβδομη ημέρα της επώασης.

Περίπου 120 ml δείγμα νερού συλλέχθηκε, στα ίδια χρονικά σημεία με τις δειγματοληψίες λαμβάνων, από κάθε δεξαμενή νυμφικής εκτροφής με μία σύριγγα, φιλτραρίστηκε μέσω Sterivex φίλτρου (0,22 μm) και αποθηκεύτηκε με διάλυμα 1 ml DNA/RNA Shield Stabilization Solution στους -20°C, έως ότου πραγματοποιηθεί η εξαγωγή DNA και αποσταλούν τα δείγματα για ανάλυση NGS, για τη μελέτη της επίδρασης των αυτόχθονων προβιοτικών στο μικροβίωμα του νερού των νυμφικών εκτροφών.

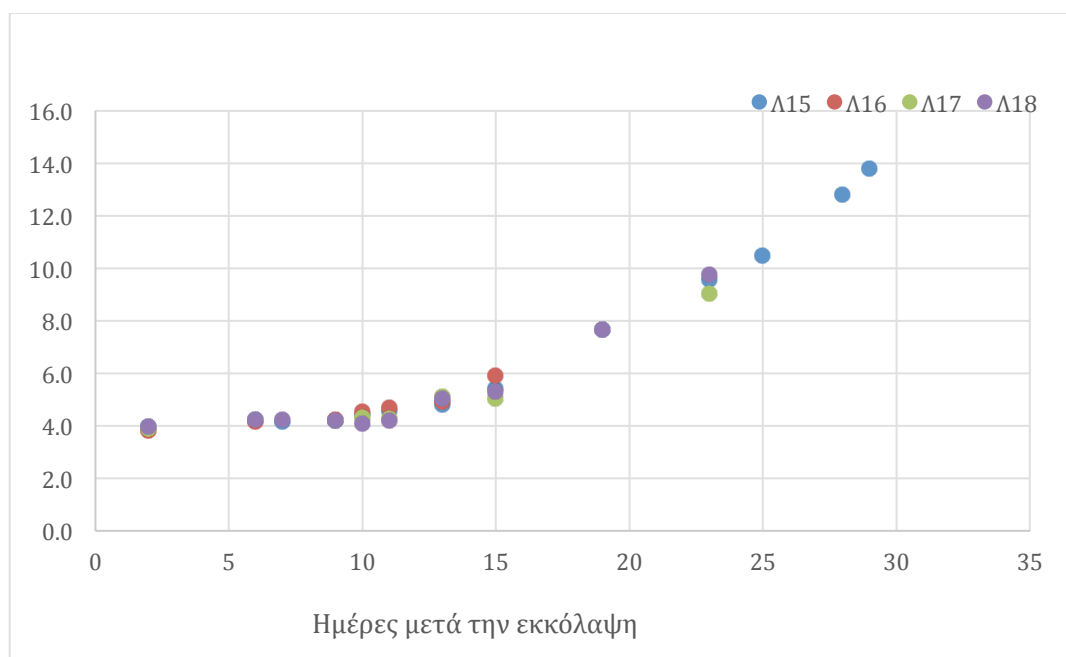


Για την αντίστοιχη μελέτη του βιοϋμενίου (biofilm) των τοιχωμάτων των δεξαμενών νυμφικών εκτροφών, δείγμα από το σχηματισθέν βιοϋμένιο ελήφθη με τη χρήση μίας μπατονέτας, η οποία τοποθετήθηκε με DNA/RNA lysis solution σε ZR BashingBead Lysis Tube (0.1-0.5mm) της ZymoBIOMICS DNA Miniprep kit. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C έως ότου πραγματοποιηθεί η εξαγωγή DNA και αποσταλούν τα δείγματα για ανάλυση NGS.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ανάπτυξη

Το μήκος των ιχθυονυμφών ήταν λίγο μικρότερο από το μήκος των ιχθυονυμφών ίδιας ηλικίας στις εκτροφές του 2019 (με και δίχως κωπήποδα) ενώ ήταν μεγαλύτερο από το μήκος των ιχθυονυμφών στο πείραμα του 2020 (Εικόνα 1).



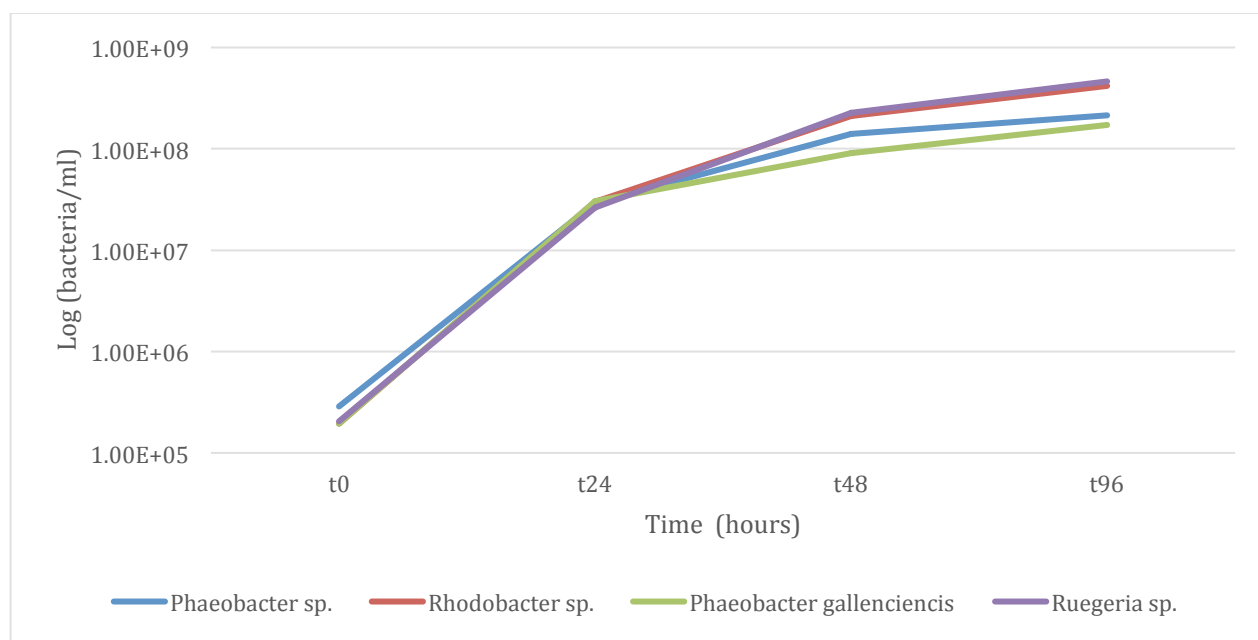
Εικόνα 1. Μήκος ιχθυονυμφών στις δεξαμενές (Λ15, Λ16, Λ17 και Λ18). Στις δεξαμενές Λ16 και Λ18 είχαν προστεθεί προβιοτικά.

Γενικότερα, η ποιότητα του γόνου δεν ήταν καλή και άσχετα με το χειρισμό και αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι μια δεξαμενή με προβιοτικά (Λ14) παρουσίασε ολική θνησιμότητα μετά την ημέρα 15 μετά την εκκόλαψη, και για αυτό δεν εμφανίζονται καθόλου τα αποτελέσματα μέτρησης του μήκους από εκείνο το χρονικό σημείο και μετά. Οι ημέρες που κρατήθηκαν οι δεξαμενές δίνει ένα μέτρο της επιβίωσης στους δυο χειρισμούς. Οι δεξαμενές με προβιοτικά Λ16, Λ18 είχαν λοιπόν ψάρια μέχρι την ημέρα 15 και 23 αντίστοιχα, ενώ οι δεξαμενές της ομάδας ελέγχου Λ15 και Λ17 είχαν ψάρια μέχρι την ημέρα 23, και 29 αντίστοιχα.



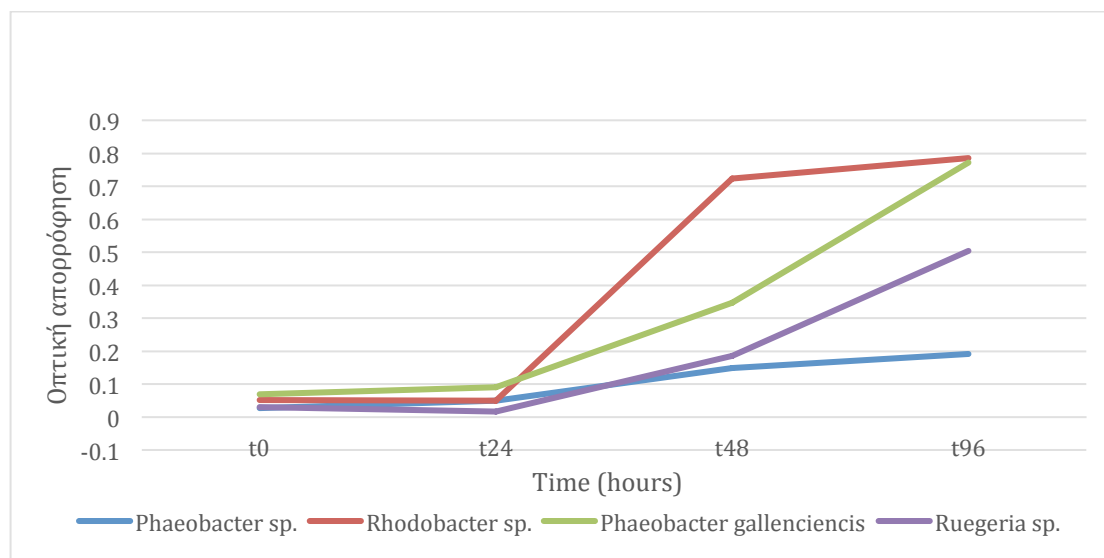
3.2 Ποσοτικοποίηση βακτηριακών προβιοτικών στελεχών *Rhodobacter sp.*, *Phaeobacter gallenciensis*, *Phaeobacter sp.* και *Ruegeria sp.*

Κοιτάζοντας τις καμπύλες ανάπτυξης των προβιοτικών στελεχών σε Marine Broth όπως προέκυψαν από το μέτρημα των καλλιιεργειών τους στα τρυβλία (**Εικόνα 2**), παρατηρείται κορύφωση σε χρόνο 48 ώρες, μετά από την οποία η συγκέντρωση log (βακτήρια/ml) παραμένει σχετικά σταθερή σε επίπεδα της τάξης των 10^8 και για τα 4 προβιοτικά στελέχη. Πιθανά το χρονικό διάστημα μεταξύ 48 και 96 ωρών αποτελεί την φάση στασιμότητας στην καμπύλη ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών.



Εικόνα 2. Καμπύλες ανάπτυξης των βακτηρίων όπως αυτές προκύπτουν από τη μέτρηση των αποικιών σε τρυβλία.

Οι καμπύλες της οπτικής απορρόφησης των καλλιιεργειών των προβιοτικών στελεχών αποκαλύπτουν μία κορύφωση μεταξύ των ωρών 48 και 96 (**Εικόνα 3**). Οι καμπύλες δείχνουν μια παρόμοια τάση με τη συγκέντρωση Log (βακτήρια/ml) των απομονωθέντων αυτόχθονων και χρησιμοποιημένων ως προβιοτικά βακτηριακών στελεχών, *Rhodobacter sp.*, *Phaeobacter gallenciensis*, *Phaeobacter sp.* και *Ruegeria sp.*



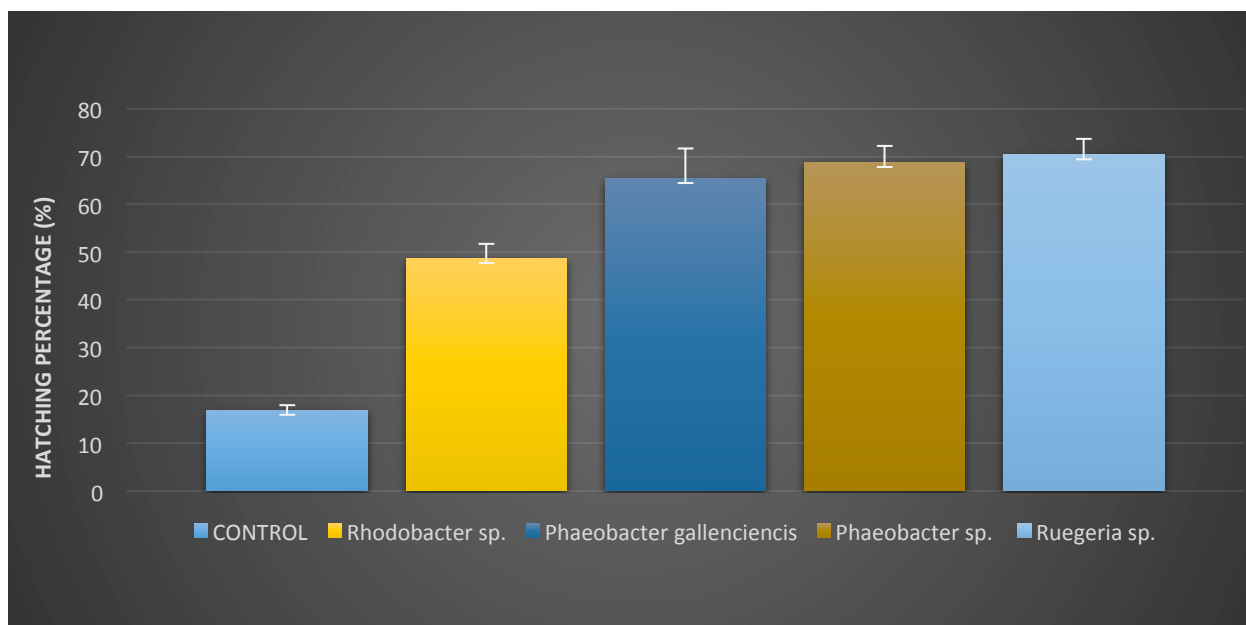
Εικόνα 3. Οπτική απορρόφηση (OD 600) των προβιοτικών σε συνάρτηση με το χρόνο.

3.3 Επίδραση των προβιοτικών σε γονιμοποιημένα αυγά φαγκριού

Το ποσοστό εκκολασιμότητας διέφερε μεταξύ της δοκιμασίας ελέγχου και των δοκιμασιών με τη χρήση προβιοτικού, αποδεικνύοντας ότι η προσθήκη των βακτηριακών στελεχών στις θήκες είχε επίδραση στο ρυθμό εκκολασιμότητας των γονιμοποιημένων αυγών φαγκριού (*Pagrus major*) (**Εικόνα 4**). Συγκεκριμένα η δοκιμασία ελέγχου κατέδειξε ποσοστό εκκολασιμότητας $16,91 \pm 4,31$ S.E.. Από την εφαρμογή των τεσσάρων προβιοτικών, το χαμηλότερο ποσοστό εκκολασιμότητας παρουσίασε το βακτηριακό στέλεχος *Rhodobacter sp.*, με μέση τιμή $48,66 \pm 3,03$ S.E.. Τα προβιοτικά στελέχη των γενών *Phaeobacter gallenciensis*, *Phaeobacter sp.* και *Ruegeria sp.* είχαν σημαντική επίδραση στην εκκολασιμότητα με μέσες τιμές της τάξης $65,41 \pm 6,22$ S.E., $68,74 \pm 3,51$ S.E. και $70,41 \pm 3,32$ S.E., αντίστοιχα. Στατιστικά σημαντική η επίδραση των προβιοτικών στην εκκολασιμότητα των γονιμοποιημένων αυγών φαγκριού (ANOVA $F=28,06$, $p=2,05E-05$) με τις δοκιμασίες να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, όπως παρουσιάζεται στον **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1. Οι t-τιμές (πλάγια γράμματα) και p-τιμές της δοκιμής Tukey's (Post-hoc pairwise comparisons) για την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών της επίδρασης των προβιοτικών στελεχών στα ποσοστά της εκκολασιμότητας γονιμοποιημένων αυγών φαγκριού. Οι σημαντικές συγκρίσεις έχουν σημειωθεί με αστερίσκο.

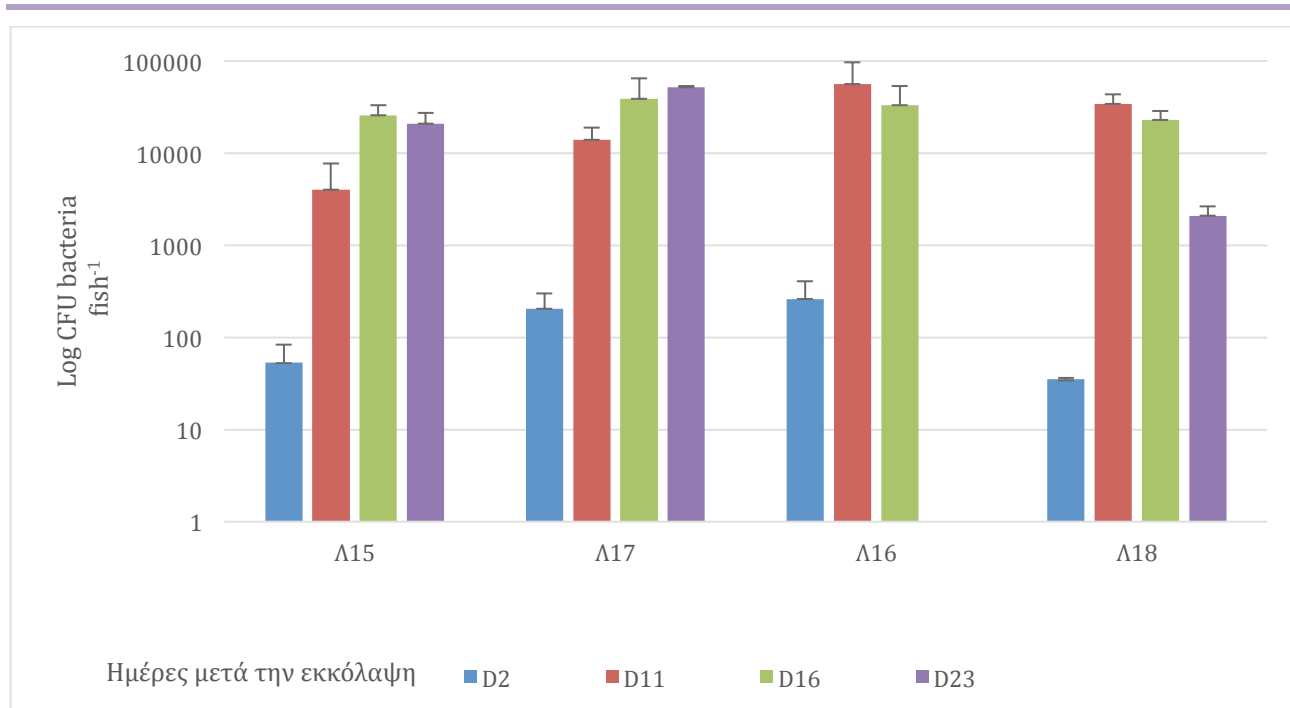
	Ελέγχου	<i>Rhodobacter sp.</i>	<i>Phaeobacter gallenciensis</i>	<i>Phaeobacter sp.</i>	<i>Ruegeria sp.</i>
Ελέγχου		0,002517*	8,18E-05*	4,57E-05*	3,45E-05*
<i>Rhodobacter sp.</i>	7,483		0,1079	0,04592*	0,02981*
<i>Phaeobacter gallenciensis</i>	11,43	3,947		0,9788	0,9141
<i>Phaeobacter sp.</i>	12,22	4,732	0,7849		0,9984
<i>Ruegeria sp.</i>	12,61	5,125	1,178	0,3936	



Εικόνα 4. Ποσοστό εκκολαυσιμότητας αυγών φαγκριού (*Pagrus major*) με την προσθήκη διαφορετικών βακτηριακών στελεχών.

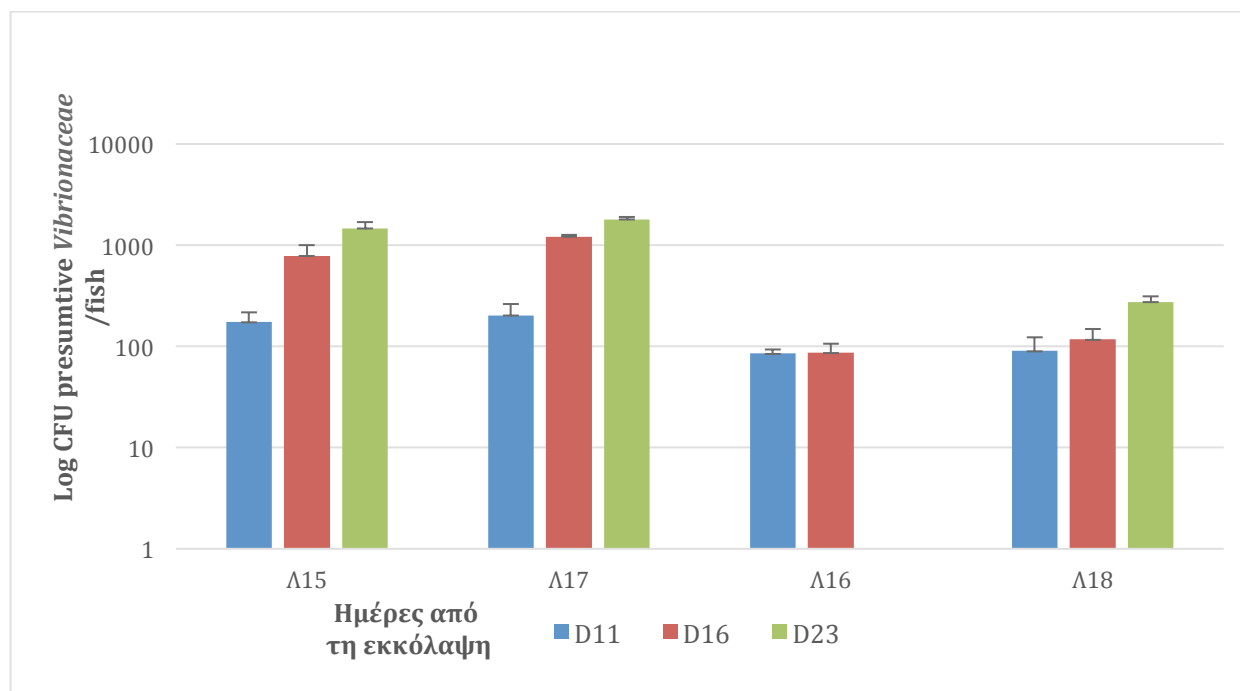
3.4 Μελέτη της επίδρασης μίγματος αυτόχθονων προβιοτικών *Phaeobacter gallenciensis*, *Phaeobacter sp.*, και *Ruegeria sp.* στο μικροβιακό φορτίο των ιχθυονυμφών

Στις **Εικόνες 5 και 6** η μικροβιακή χλωρίδα των ομογενοποιημένων ιχθυονυμφών μαγιάτικου ηλικίας 2 ημερών εμφάνισε την ελάχιστη τιμή της, ενώ στο εκλεκτικό υπόστρωμα (TCBS) δεν ανιχνεύθηκαν *Vibrio spp.* και για τα δύο διαχειριστικά καθεστάτα εκτροφής. Την 2^η ΗΜΕ δεν έχει ξεκινήσει η διατροφή των ιχθυονυμφών. Στις επόμενες δειγματοληψίες (11 ΗΜΕ & 16 ΗΜΕ) η μικροβιακή χλωρίδα αυξήθηκε ραγδαία, καθώς οι νύμφες έχουν ξεκινήσει να τρέφονται με Rotifer και οι απεκκρίσεις των ψαριών πιθανά αυξάνουν το οργανικό φορτίο του νερού των δεξαμενών εκτροφών. Η οργανική ύλη, όπως είναι γνωστό αποτελεί το θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη ετερότροφων μικροοργανισμών, όπως είναι τα βακτήρια. Η μέγιστη τιμή της παρατηρήθηκε την 11^η ημέρα για τις δεξαμενές με τα προβιοτικά ενώ για τις δεξαμενές ελέγχου έφτασαν τα επίπεδα των 10^4 CFU βακτηρίων/ ιχθυονύμφη και διατηρήθηκαν σε αυτά έως τη λήξη της εκτροφής. Η δεξαμενή Δ16 κατέρρευσε πριν την 23^η ΗΜΕ. Τα δεδομένα από τη δεξαμενή Δ18 με τα προβιοτικά έδειξε ότι η μικροβιακή χλωρίδα, μετά τη μέγιστη της τιμή την 11^η ημέρα, αρχίζει μία σταδιακή μείωση φτάνοντας την 23^η ΗΜΕ στις τάξεις των 10^3 CFU βακτήρια/ ιχθυονύμφη. Στατιστικά, δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στο φορτίο της μικροβιακής χλωρίδας των ιχθυονυμφών που εκτράφηκαν παρουσία ή μη βιολογικού φίλτρου στις δεξαμενές εκτροφής (ONE WAY ANOVA, $p=0,61>0,05$). Σημαντική στατιστικά διαφορά στο φορτίο της μικροβιακής χλωρίδας των ιχθυονυμφών υπήρξε μεταξύ των ημερών δειγματοληψίας και συγκεκριμένα η 2^η ΗΜΕ με την 11^η και 16^η ΗΜΕ (Mann Whitney pairwise $p=0.03<0.05$).



Εικόνα 5. Ολική μικροβιακή χλωρίδα σε ιχθυονύμφες μαγιάτικου σε Marine Agar ανάλογα με την ηλικία και την παρουσία ή μη, βιολογικού φίλτρου. Λ15, Λ17: δεξαμενές ελέγχου, Λ16, Λ18: δεξαμενές παρουσία βιολογικού φίλτρου.

Η πειραματική μεταχείριση με τη χρήση μίγματος αυτόχθονων προβιοτικών, με τη μορφή βιολογικών φίλτρων στις δεξαμενές εκτροφής λαρβών μαγιάτικου, ελέγχθηκε και ως προς την επίδρασή της στο φορτίο της μικροβιακής χλωρίδας των λαρβών σε βακτήρια του γένους *Vibrionaceae* (Εικόνα 6). Τα αποτελέσματα για τις δεξαμενές ελέγχου (Λ15 & Λ17) έδειξε ότι η συγκέντρωση της μικροβιακής χλωρίδας σε βακτήρια του γένους *Vibrionaceae* εμφανίζει συνεχή αυξητική τάση από την 2ΗΜΕ έως την 23 ΗΜΕ, ξεκινώντας από επίπεδα της τάξης του 10^2 και φτάνοντας στα 10^3 . Οι ιχθυονύμφες με την παρουσία του βιολογικού φίλτρου στη δεξαμενή (Λ16 & Λ18) εκτροφής τους, εμφάνισαν σταθερό βακτηριακό φορτίο σε *Vibrionaceae* της τάξης των δεκάδων για τις ημέρες 11 και 16 μετά την εκκόλαψη, ενώ υπάρχει μία αύξησή του οριακά πάνω από την τάξη του 10^2 , την 23 ΗΜΕ. Στατιστικά, για την ημέρα 11 δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο χειρισμών (ONE WAY ANOVA, $p=0,17$) αν και η δοκιμή Dunn's post hoc δείχνει μία σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο χειρισμών των δεξαμενών Λ17 (ελέγχου) και Λ16 (με προβιοτικά), όπου $p=0,027$. Για την 11 ΗΜΕ υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο δεξαμενών ελέγχου (Λ15 και Λ17) και με τις δύο δεξαμενές προβιοτικών ως προς το βακτηριακό φορτίο των δυνητικά *Vibrionaceae* των λαρβών ($p=0,00026$) όπως επίσης και για την 23 ΗΜΕ. ($p=0,00081$).

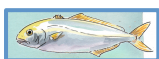


Εικόνα 6. Μικροβιακή χλωρίδα δυνητικών *Vibrionaceae* σε ιχθυονύμφες μαγιάτικου σε TCBS Agar ανάλογα με την ηλικία και την παρουσία ή μη, βιολογικού φίλτρου. Λ15, Λ17: δεξαμενές ελέγχου, Λ16, Λ18: δεξαμενές παρουσία βιολογικού φίλτρου.

Στην περίπτωση των ιχθυονυμφών (**Εικόνα 5**) παρατηρήθηκε μια αυξητική τάση του συνολικού βακτηριακού φορτίου έως την 11 ΗΜΕ και για τις δύο ομάδες (ελέγχου και προβιοτικών). Ταυτόχρονα, το μικροβιακό φορτίο στην ομάδα ελέγχου ήταν γενικά υψηλότερο από την ομάδα των προβιοτικών στα περισσότερα σημεία της δειγματοληψίας, με συνεχή αυξητική τάση από την 2 ΗΜΕ έως την 23 ΗΜΕ. Για την ομάδα των προβιοτικών από την 11 ΗΜΕ και μετά, το συνολικό CFU/ιχθυονύμφη εμφανίζει αξιοσημείωτη πτώση με αποκορύφωμα την 23 ΗΜΕ, με τιμή της τάξης των 2×10^3 .

Στην περίπτωση πάλι των δυνητικών βακτηρίων *Vibrio*, σε τρία από τα τέσσερα σημεία όπου μετρήθηκε η παράμετρος αυτή, παρατηρήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση δυνητικών βακτηρίων *Vibrio* στην ομάδα ελέγχου και συγκεκριμένα η ομάδα των προβιοτικών παρουσίασε κατά μέσο όρο 77% μικρότερη συγκέντρωση για την 11ΗΜΕ, 90% για την 16ΗΜΕ και 83% για την 23ΗΜΕ, αντίστοιχα. (**Εικόνα 6**).

Η προσθήκη αυτόχθονων προβιοτικών της ομάδας των *Rhodobacteraceae*, τα οποία με βάση πολλές δημοσιευμένες εργασίες περιορίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων της ομάδας *Vibrio*, και στην περίπτωση του πειράματος που έγινε στο ιχθυογεννητικό του Γαλαξιδίου φάνηκε να περιορίζει τα *Vibrio*. Η προσθήκη προβιοτικών δοκιμάστηκε σε βιομηχανική κλίμακα, που σημαίνει ότι η δυνατότητα πολλών επαναλήψεων είναι περιορισμένη. Χρησιμοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για κάθε χειρισμό αλλά η ολική θνησιμότητα σε μια δεξαμενή προβιοτικών (Λ16) πριν την 23 ΗΜΕ δεν επέτρεψε να γίνει στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που συλλέχθηκαν συνολικά αλλά τμηματικά. Συγκεκριμένα για τις ημέρες 2, 11 και 16 μετά την εκκόλαψη δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το συνολικό βακτηριακό φορτίο των λαρβών ανάμεσα στους χειρισμούς, αφού ONE WAY ANOVA ανάλυση, έδειξε τιμές $p=0,315$, $p=0,38$ και $p=0,91$, αντίστοιχα. Στατιστικά όμως σημαντική διαφορά υπήρξε την 23 ΗΜΕ και συγκεκριμένα το συνολικό βακτηριακό φορτίο των ιχθυονυμφών από τη δεξαμενή με το βιολογικό φίλτρο των γηγενών προβιοτικών διέφερε σημαντικά από το αντίστοιχο βακτηριακό φορτίο και των δύο δεξαμενών ελέγχου ($p=0,0003$). Είναι φανερή η θετική επίδραση της προσθήκης των προβιοτικών σε μορφή απλών βιολογικών φίλτρων μέσα στο νερό εκτροφής των δεξαμενών και ως προς την επαναληψιμότητα των εκτροφών και ως



προς την μικροβιολογικές αναλύσεις, που έδειξαν ότι, το φορτίο των δυνητικών *Vibrio* και του συνολικού μικροβιακού φορτίου μειώθηκαν στις ιχθυονύμφες της ομάδας των προβιοτικών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και η επίδραση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς προχωρά η εκτροφή μετά την 16ΗΜΕ.

Διαφοροποιήσεις από ΤΠΕ: Καμία

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Berger, M., Neumann, A., Schulz, S., Simon, M., and Brinkhoff, T. (2011). Tropolithetic 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.
- 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.
- Jahangiri, L., Esteban, M.A., 2018. Administration of probiotics in the water in finfish aquaculture systems: a review. *Fishes* 3, 30–33. <https://doi.org/10.3390/fishes3030033>.
- Makridis, P., Martins, S., et.al., 2005. Evaluation of candidate probiotic strains for gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*) using an *in vivo* approach. *Letters in Applied Microbiology* 40, 274-277.
- 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>.
- Michaud, L., Lo Giudice, A., et.al., 2009. Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1935-1946.
- Porsby, C. H., Nielsen, K. F. & Gram, L. 2008. *Phaeobacter* and *Ruegeria* Species of the *Roseobacter* Clade Colonize Separate Niches in a Danish Turbot (*Scophthalmus maximus*)-Rearing Farm and Antagonize *Vibrio anguillarum* under Different Growth Conditions. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 7356–736.
- Porsby, C. H., Webber, M. A., Nielsen, K. F., Piddock, L. J. V. & Gram, L. 2011. Resistance and tolerance to tropodithetic 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.
- Prol, M.J. & Pintado, J., 2013. Effectiveness of Probiotic of Probiotic *Phaeobacter* Bacteria Grown in Biofilters Against *Vibrio anguillarum* Infections in the Rearing of Turbot (*Psetta maxima*) Larvae. *Mar Biotechnol* 15:726-738.



- Rasmussen, B.B., Kalatzis, P.G., Middelboe, M., Gram, L., 2019. Combining probiotic *Phaeobacterinhibens* 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>.
- Wilson, M. Z., Wang, R., Gitai, Z. & Seyedsayamdost, M. R., 2016. Mode of action and resistance studies unveil new roles for tropodithetic acid as an anticancer agent and the α -glutamyl cycle as a proton sink. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 1630–1635.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRAS



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



GALAXIDI
Marine Farm S.A.

IRIDA



ARGOSARONIKOS
FISHFARMS SA

