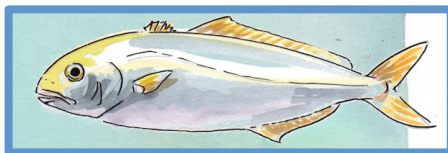


**Ειδικές Δράσεις «ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ»
ΜΑΓΙΑΤΙΚΟ Τ6ΥΒΠ-0068**



Παραδοτέο

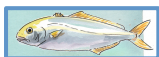
| | | | |
|-------------------------------|--|------------------------------|-----------|
| Αριθμός Παραδοτέου: | Π2.4.2 | Μήνας Παράδοσης ΤΠΕ: | 34 |
| Τίτλος Παραδοτέου | Περιγραφή του εντερικού μικροβιώματος στο μαγιάτικο κατά τη νυμφική εκτροφή του και την εμπλοκή τους σε αντίστοιχα μεταβολικά μονοπάτια φυσιολογίας θρέψης | | |
| Ενότητα Εργασίας (ΕΕ): | 2 | Συντονιστής ΕΕ: | ΠΠ |
| Τίτλος ΕΕ: | Νυμφικές εκτροφές και παραγωγή γόνου | | |
| Αριθμός Εργασίας: | 2.4.2 | Υπεύθυνος Παραδοτέου: | ΤΓΙΥΠ |
| Τίτλος εργασίας: | Περιγραφή του μικροβιώματος και μελέτη των πρωτεϊνών μελών των οικογενειών των HSPs και MAPKs των νυμφών | | |
| Εταίροι: | ΤΓΙΥΠ | ΑΠΘ | ΓΑΛΛΕΞΙΔΙ |
| Κατάσταση: | Ολοκληρωμένο | Μήνας παράδοσης: | 34 |

Υπεύθυνος ερευνητής για το παραδοτέο: Κορμάς, Κ. και Μεντέ, Ε. (ΤΓΙΥΠ)

Συνεργαζόμενοι ερευνητές από Εταίρους: Αντωνοπούλου, Ε. (ΑΠΘ), Τσακωνίτη, Κ., Καραπαναγιώτης, Σ., Μέγκος, Α. (ΓΑΛΛΕΞΙΔΙ), Μακρίδης, Π. (ΠΠ)

Σύντομη περιγραφή (ΤΠΕ):

Η έκθεση περιλαμβάνει την περιγραφή του εντερικού μικροβιώματος στο μαγιάτικο *S. dumerili* κατά τη νυμφική εκτροφή του και την εμπλοκή τους σε αντίστοιχα μεταβολικά μονοπάτια φυσιολογίας θρέψης. Ο ρόλος του εντερικού μικροβιοκόσμου είναι σημαντικός για τη φυσιολογία σε συνεργασία με άλλα συστατικά και την υγεία του ξενιστή. Η δομή και η λειτουργία του καθορίζεται από πολλούς παράγοντες και για αυτό, μπορεί να είναι μοναδικός για κάθε άτομο ενώ παρουσιάζει και μεγάλη μεταβλητότητα ακόμη και στο ίδιο άτομο ανάλογα με τις συνθήκες. Αποτελεί ένα σύνθετο οικοσύστημα που είναι σε διαρκή αλληλεπίδραση του ξενιστή με το περιβάλλον και τα θρεπτικά συστατικά. Για να επιτευχθεί η κατανόηση των συμβιωτικών σχέσεων των εντερικών μικροβίων με τους ξενιστές πρέπει πρώτα να χαρακτηριστεί το «core», κοινό βασικό μικροβίωμα δηλαδή η δομή, η σύσταση και η λειτουργία του. Επιπλέον, η αποκάλυψη της δομής και λειτουργίας των εντερικών μικροβιοκοινοτήτων και η ταυτοποίηση του μικροβιώματος βοηθά στην κατανόηση διεργασιών που εμπλέκονται στη φυσιολογία θρέψης του οργανισμού. Το παραδοτέο 2.4.2 περιγράφει τη σύσταση ειδών των βακτηρίων που φιλοξενούνται στα πρώτα στάδια ανάπτυξης και εξηγεί την τυχόν δράση τους και εμπλοκή τους σε μεταβολικά μονοπάτια θρέψης με στόχο την βελτίωση του μεταβολισμού κατά την νυμφική εκτροφή του μαγιάτικου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια του *S. dumerili* εμφάνισαν βακτηριακές κοινότητες με διαφορετική δομή και δεν υπάρχει επικάλυψη με τις βακτηριακές κοινότητες του νερού εκτροφής και της παρεχόμενης τροφής τροχοζώων. Η δομή των επόμενων αναπτυξιακών σταδίων, ημέρα 3 και ιχθυδίων 0,5 g είχε ελάχιστη ομοιότητα με την κοινότητα των αυγών και της εκκόλαψης. Προτείνεται συστηματική παρακολούθηση της αύξησης των βακτηρίων του γένους *Vibrio* στο νερό της εκτροφής, και ειδικότερα των πιθανώς παθογόνων, κατά τη διάρκεια των ημερών μέχρι το στάδιο των ιχθυδίων 0,5 g. Από τα αφθονότερα βακτήρια με δυνητικώς ωφέλιμο ρόλο για τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια αναγνωρίστηκαν τα *Pseudoalteromonas carrageenonora*, *Phaeobacter* sp. και *Ruegeira* sp. Στελέχη των τριών αυτών βακτηριακών ταξινομικών ομάδων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως προβιοτικά και για την εκτροφή του μαγιάτικου μετά από κατάλληλες πειραματικές δοκιμασίες. Η πληροφορία των εντερικών μικροβιοκοινοτήτων για το μαγιάτικο θα χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για την καλύτερη αφομοίωση των θρεπτικών συστατικών της ιχθυοτροφής και τη διατροφική αναβάθμιση των ιχθυοτροφών.



Εισαγωγή

Μέσα από την συνεξέλιξη, τα βακτήρια και οι ξενιστές έχουν αναπτύξει στενές σχέσεις. Οι μικροοργανισμοί των τελεόστεων (Sullam et al. 2012, Egerton et al. 2018, Legrand et al. 2020, Yukgehnaish et al. 2020) παρέχουν θρεπτικά συστατικά στους ξενιστές τους, πιθανότατα διεγείρουν την ανάπτυξη τόσο του ανοσοποιητικού (π.χ. Dimitroglou et al. 2011) όσο και του μεταβολισμού τους, ενώ ασκούν προστατευτικό ρόλο από εισβάλλοντα παθογόνα ή δυνητικά παθογόνα, επηρεάζοντας την ανοσολογική απόκρισή τους (Gomez & Balcazar 2008), τη συμπεριφορά σίτισης και το συνολικό μέγεθος του ιχθύος. Ο μικροβιακός αποικισμός διαμορφώνει το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή που με τη σειρά του μπορεί να διαμορφώσει τη μικροβιακή σύνθεση (Rawls et al. 2006). Γενικά, στους ζωικούς οργανισμούς, κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του εντέρου, θα πρέπει αρχικά να ελέγχεται το βλεννογόνο ώστε να προσαρμόζεται στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών μέσω της τροφής και η κοιλότητα του αυλού που αποτρέπει τη μετάβαση των μικροβίων στο εσωτερικό των κυττάρων του εντέρου. Σε αντίθεση με τα θηλαστικά, η κάθετη μετάδοση των μικροβιωτών δεν φαίνεται να είναι ο κύριος τρόπος απόκτησης των απαιτούμενων για την επιβίωση των ιχθύων μικροοργανισμών, βάσει των ελάχιστων στοχευμένων μελετών που υπάρχουν μέχρι σήμερα. Αντίθετα, φαίνεται να αποκτούν αυτούς τους μικροοργανισμούς από το περιβάλλον τους και στην περίπτωση των εκτροφών, το περιβάλλον του εκκολαπτηρίου (Minich et al. 2021) και η παρεχόμενη ζωντανή τροφή (Nikouli et al. 2019) αποτελεί ίσως το πιο καθοριστικό παράγοντα για τη δομή των μικροβιωτών και του μικροβιώματος που θα αποκτήσουν οι ιχθείς.

Μέχρι σήμερα οι μικροβιώτες, δηλαδή το σύνολο των μικροβιακών ταξινομικών ομάδων σε ένα δείγμα, και το μικροβίωμα, δηλαδή το σύνολο του μικροβιακού γενετικού υλικού ενός δείγματος, που σχετίζεται με το *Seriola dumerili* δεν έχουν μελετηθεί, παρόλο που για μερικά εκτρεφόμενα είδη ιχθύων όχι μόνο είναι αρκετά γνωστός ο ρόλος τους μικροβιώματος τους αλλά γίνονται και προσπάθειες βελτίωσης της αύξησης και της υγείας των ιχθύων μέσω μεθόδων χειραγώγησης του μικροβιώματος τους (Luna et al. 2022). Ωστόσο, υπάρχουν δεδομένα για άλλα είδη του γένους (*S. lalandi*, *S. quinqueradiata* και *S. rivoliana*). Το επιστημονικό ενδιαφέρον εστιάζεται κυρίως στην αντιμετώπιση του μικροβιολογικού κινδύνου από το στάδιο του αυγού μέχρι μερικές ημέρες μετά την εκκόλαψη (HME) (Kumon et al. 2002, Verners-Jeffreys et al. 2006, 2007, Stuart et al. 2010, Patrick et al. 2019, Veyrand-Quirós et al. 2020, 2021). Ειδικότερα για το *S. lalandi*, έχει γίνει μία πιο στοχευμένη μελέτη που περιλαμβάνει την ανάλυση των βακτηριακών κοινοτήτων σε διαφορετικά μέρη του σώματος και όργανα κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια και σε ώριμα άτομα, αλλά επιπλέον περιλαμβάνει και τη σχέση των μικροβιωτών του είδους με το περιβάλλον της εμπορικής εκτροφής του (νερό και αβιοτικές επιφάνειες του εκκολαπτηρίου) (Minich et al. 2021).

Η γνώση της φυσιολογίας θρέψης και εφαρμοσμένης διατροφής συμβάλει στην κατανόησή των απαιτήσεων σε θρεπτικά συστατικά σε κάθε είδος ψαριού για κάθε αναπτυξιακό στάδιο και αποτελεί εργαλείο αξιολόγησης υγιούς οργανισμού, ορθής διαχείρισης εκτροφής και παραγωγής υψηλής ποιότητας ιχθυδίων και ενήλικων ψαριών. Τα κωπήποδα είναι η φυσική τροφή των ιχθυονυμφών στην θάλασσα, πλούσια σε αμινοξέα και λιπαρά οξέα και το μικρό μέγεθος των ναυπλίων είναι ιδανικό για την σίτιση των ιχθυονυμφών (Conceição et al. 2010, Rønnestad et al. 2013) του μαγιάτικου. Η μελέτη των εντερικών μικροβιωτών θα συμβάλει στο να παρέχει πληροφορίες για την προσθήκη στο σιτηρέσιο του κατάλληλου θρεπτικού συστατικού στο διατροφικό πρωτόκολλο στο κατάλληλο αναπτυξιακό στάδιο του μαγιάτικου ώστε να είναι καλύτερα αξιοποιήσιμο από το ψάρι. Ο στόχος είναι να αποκτήσουμε γνώση ώστε το σιτηρέσιο που δίνουμε και η κατανάλωση του να σχετίζεται με συγκεκριμένη διατροφική παρέμβαση.

Ο σκοπός του παραδοτέου είναι να χαρακτηριστούν οι μικροβιακές κοινότητες που σχετίζονται με τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια κατά την εκτροφή του *Seriola dumerili* για πρώτη φορά. Πιο συγκεκριμένα, αναλύθηκαν οι μικροβιώτες των αυγών, την ημέρα της εκκόλαψης, 3 ημέρες μετά την εκκόλαψη και σε ιχθύδια 0,5 g με κύριο στόχο τη διερεύνηση των κοινών βασικών (core) μικροβιωτών. Διερευνήθηκε, επίσης, η δυνατότητα διαχωρισμού αυτόχθονων και αλλόχθονων (νερό εκτροφής και καλλιέργεια τροχοζώων) των παραπάνω σταδίων.

Υλικά και Μέθοδοι

Συλλέχθηκαν δείγματα από τις εγκαταστάσεις της Γαλαξίδι Θαλάσσιες Καλλιέργειες Α.Ε. από τα πρώτα στάδια εκτροφής των ιχθυονυμφών ανά διαφορετική ημέρα εκτροφής όπως αυγά και ιχθυονύμφες από την



ημέρα 0 (εκκόλαψη), την ημέρα 3 (άνοιγμα στόματος και διατροφή με τροχόζωα), ιχθυδίων βάρους περίπου 0,5 g καθώς και δείγματα νερού και τροφών. Καθώς τα ιχθυδία είχαν πολύ μικρό μέγεθος, δεν ήταν δυνατή η ασφαλής εκτομή του πεπτικού συστήματος από τα άτομα που αναλύθηκαν. Ωστόσο, στα δείγματα αυτά εφαρμόστηκαν πολλαπλές εκπλύσεις με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό ώστε να απομακρυνθούν οι μικροοργανισμοί της εξωτερικής επιφάνειάς τους και οι μικροοργανισμοί που βρέθηκαν αφορούν έτσι μόνο όσους βρίσκονται εντός των οργανισμών. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν αμέσως σε υπερκαταψύκτες (-80°C) και ξεκίνησε η διαδικασία της ανάλυσής τους. Ακολούθησε εκχύλιση του DNA, όπως σε προηγούμενες μελέτες, και προσδιορίστηκε η προκαρυωτική ποικιλότητα μέσω της ποικιλότητας του 16S rRNA γονιδίου (περιοχή V3-V4) μέσω αλληλούχισης επομένης γενιάς (πλατφόρμα Illumina MiSeq 2x300 bp) και με τη χρήση εκκινητών ειδικών για τα Bacteria όπως περιγράφεται από τους Nikouli et al. (2019).

Δείγματα νερού όγκου 5 l συλλέχθηκαν από τις δεξαμενές των αυγών και των προνυμφών σε αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία. Τα αυγά, οι ιχθυονύμφες και τα ιχθυδία ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο και διηθημένο θαλασσινό νερό πριν την εκχύλιση του DNA τους ώστε να απομακρυνθούν οι μικροβιώτες που διαβιούν στην εξωτερική επιφάνειά τους.

Για τα δείγματα νερού, υπό-δείγματα όγκου 200 – 500 ml από τα συστήματα εκτροφής διηθήθηκε από πολυκαρβονικό φίλτρο με διάμετρο ίσων πόρων 0,2 μm σε αντλία χαμηλού κενού (<150 mm Hg). Επίσης, συλλέχθηκε δείγμα 65 ml από την εκτροφή τροχοζώων και διηθήθηκε όπως και τα δείγματα του νερού. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία σε υπερκαταψύκτη (-80°C) μέχρι την εκχύλιση του DNA. Η εξαγωγή του βακτηριακού DNA από όλα τα δείγματα έγινε με το DNeasy PowerMax Soil Kit (Qiagen). Έγινε ποσοτική μέτρηση του εκχυλισθέντος DNA σε ng/ul και ποιοτική μέτρηση με βάση την αναλογία οπτικής απορρόφησης 260nm/280nm. Τέλος, έγινε DNA αλληλούχιση όλων των δειγμάτων της περιοχής V3-V4 του γονιδίου 16S rRNA μέσω της πλατφόρμας MiSeq 2x300 bp. Τα δεδομένα αλληλούχισης αναλύθηκαν όπως περιγράφεται από τους Nikouli et al. (2019). Τα τελικά δεδομένα κανονικοποιήθηκαν μέχρι όλα τα δείγματα να έχουν παρόμοιο αριθμό αλληλουχιών ώστε να είναι εφικτή η απευθείας σύγκριση της αφθονίας τους.

Για κάθε δείγμα υπολογίστηκαν οι βασικοί δείκτες ποικιλότητας Shannon H, Simpson 1-D, ισομερισμού κατά Pielou (evenness J) καθώς και ο δείκτης σταθερότητας (stability, S_T) των μικροβιακών κοινοτήτων κατά τη διαδοχική μετάβαση τους από το στάδιο του αυγού έως την εκκόλαψη (ημέρα 0), από την εκκόλαψη έως την τρίτη ημέρα μετά την εκκόλαψη, από την τρίτη ημέρα έως το στάδιο των ιχθυδίων 0,5 g.

Αποτελέσματα

Τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια του *S. dumerili* εμφάνισαν βακτηριακές κοινότητες με διαφορετική δομή (Πίνακας 1). Η χαμηλότερη αφθονία ειδών και δεικτών ποικιλότητας παρατηρήθηκαν κατά την εκκόλαψη (60 operational taxonomic units, OTUs, αντίστοιχο του είδους για τα βακτήρια) ενώ οι ιχθυονύμφες είχαν τις υψηλότερες σχετικές αφθονίες, με περίπου 9,5 φορές υψηλότερη αφθονία OTUs (569). Τα κυρίαρχα OTUs των αυγών διατηρούνται κατά την εκκόλαψη (*Pseudoalteromonas carrageenovora*, *Tenacibaculum litopenaei*, *Vibrio* spp.) αλλά στη συνέχεια τα ίδια αυτά OTUs έχασαν την κυριαρχία τους ή και εξαφανίστηκαν εντελώς από τη βακτηριακή κοινότητα των 3 ημερών και των ιχθυδίων 0,5 g. Κατά τα δύο αυτά στάδια, εμφανίστηκαν νέα κυρίαρχα OTUs όπως τα *Ruegeria* sp., *Phaeobacter italicus*, *Thalassotalea eurytherma*, *Maritimibacter* sp., και *Bacterioplanes sanyensis*. Η σταθερότητα των βακτηριακών κοινοτήτων κατά τη μετάβαση από το στάδιο του αυγού έως το στάδιο των ιχθυδίων 0,5 g αυξήθηκε.

Οι βακτηριακές κοινότητες του νερού εκτροφής και τροχοζώων εμφάνισαν πολύ διαφορετικές βακτηριακές κοινότητες με ελάχιστη επικάλυψη ακόμη και όσον αφορά τα κυρίαρχα OTUs (Πίνακας 2). Ωστόσο, ορισμένα από τα κυρίαρχα OTUs σε δείγματα νερού ή τροχοζώων, βρέθηκαν επίσης σε κάποιο αναπτυξιακό στάδιο του μαγιάτικου, όπως τα *Tenacibaculum discolor*, *Vibrio harveyi*, *Ruegeria* sp., *Phaeobacter italicus* και *Tropicibacter phthalicicus*.

Οι βακτηριακές κοινότητες στα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν ήταν διαφορετικές μεταξύ τους ενώ η συνεισφορά μικροβιωτών από το νερό και την παρεχόμενη τροφή τροχοζώων στις προνύμφες και τα ιχθυδία είναι μικρή (Εικ. 1). Η μεγαλύτερη ομοιότητα, περίπου 33%, παρατηρήθηκε μεταξύ των αυγών και των ιχθυονυμφών κατά την εκκόλαψη. Τα επόμενα αναπτυξιακά στάδια, ημέρα 3 και ιχθυδίων 0,5 g, είχαν ελάχιστη ομοιότητα με την κοινότητα των αυγών και την εκκόλαψη (Εικ. 1).

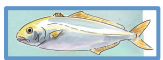


Πίνακας 1. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα αλληλούχισης και δείκτες ποικιλότητας και σταθερότητας μικροβιακών κοινοτήτων (operational taxonomic units, OTUs) σε αναπτυξιακά στάδια του *Seriola dumerili*.

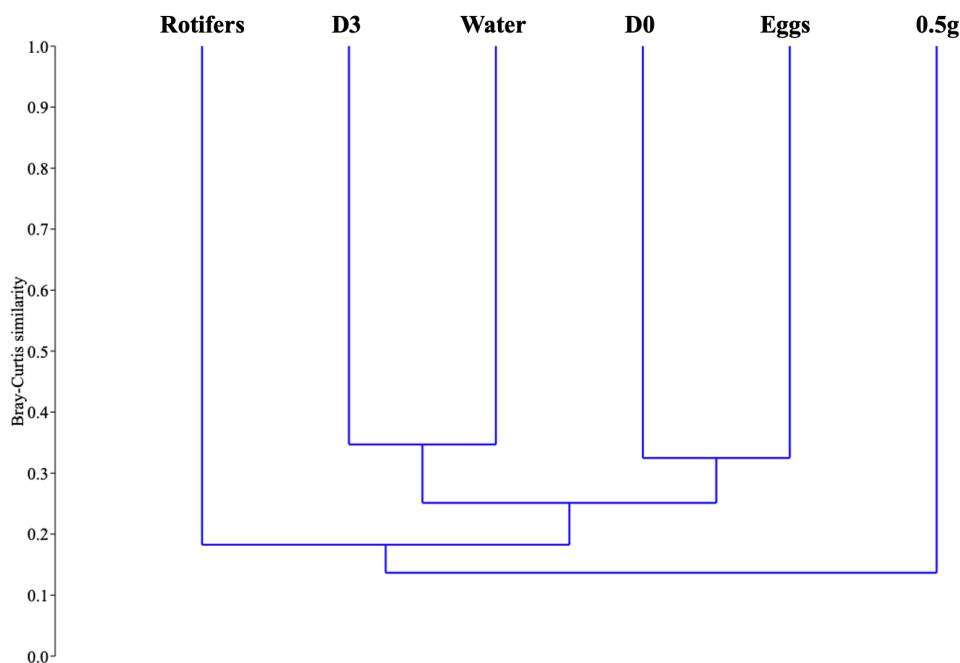
| | <i>Αυγά</i> | <i>Ημέρα 0</i> | <i>Ημέρα 3</i> | <i>Ιχθύδια (0,5 g)</i> |
|---|---|---|---------------------------------|---------------------------------|
| <i>Αφθονία αλληλουχιών</i> | 2506 | 2519 | 2515 | 2518 |
| <i>OTUs</i> | 95 | 60 | 89 | 569 |
| <i>Shannon H</i> | 2,7 | 1,8 | 2,9 | 4,5 |
| <i>Evenness J</i> | 0,16 | 0,10 | 0,20 | 0,26 |
| <i>Simpson 1-D</i> | 0,87 | 0,71 | 0,91 | 0,97 |
| <i>Σταθερότητα (S_T)</i> | 2,7 | | | |
| | | 3,5 | | |
| | | | 10,4 | |
| <i>Αφθονότερα OTUs (φθίνουσα αφθονία)</i> | <i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i> | <i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i> | <i>Ruegeria</i> sp. | <i>Phaeobacter italicus</i> |
| | <i>Tenacibaculum litopenaei</i> | <i>Tenacibaculum discolor</i> | <i>Thalassotalea eurytherma</i> | <i>Maritimibacter</i> sp. |
| | <i>Vibrio neptunius</i> | <i>Vibrio harveyi</i> | <i>Maritimibacter</i> sp. | <i>Bacterioplanes sanyensis</i> |
| | <i>Pseudophaeobacter arcticus</i> | <i>Tropicibacter phthalicus</i> | <i>Phaeobacter italicus</i> | <i>Thalassotalea loyana</i> |
| | <i>Vibrio</i> sp. | <i>Ruegeria</i> sp. | <i>Tropicibacter phthalicus</i> | <i>Shimia marina</i> |

Πίνακας 2. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα αλληλούχισης του 16S rRNA γονιδίου και δείκτες ποικιλότητας και σταθερότητας βακτηριακών κοινοτήτων (operational taxonomic units, OTUs) στο νερό εκτροφής και την καλλιέργεια τροχοζώων που χρησιμοποιούνται στην εκτροφή του *Seriola dumerili*.

| | <i>Νερό</i> | <i>Νερό πριν το τάισμα</i> | <i>Νερό μετά το τάισμα</i> | <i>Τροχόζωα</i> |
|---|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Αφθονία αλληλουχιών</i> | 5078 | 5118 | 5159 | 5111 |
| <i>OTUs</i> | 56 | 112 | 139 | 113 |
| <i>Shannon H</i> | 1,8 | 2,0 | 2,5 | 2,2 |
| <i>Evenness</i> | 0,11 | 0,07 | 0,08 | 0,08 |
| <i>Simpson 1-D</i> | 0,71 | 0,71 | 0,75 | 0,72 |
| <i>Σταθερότητα (S_T)</i> | | 3,8 | | |
| <i>Αφθονότερα OTUs (φθίνουσα αφθονία)</i> | <i>Mesoflavibacter profundus</i> | <i>Tenacibaculum discolor</i> | <i>Mesoflavibacter profundus</i> | <i>Phaeobacter italicus</i> |
| | <i>Ruegeria</i> sp. | <i>Thalassobius mediterraneus</i> | <i>Vibrio brasiliensis</i> | <i>Polaribacter aestuariivivens</i> |



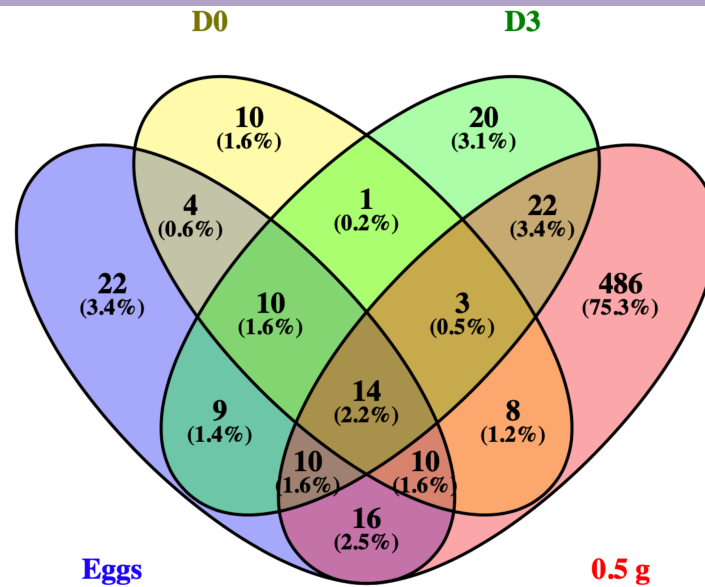
| | | | | |
|--|------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| | <i>Amaricoccus</i> sp. | <i>Oleibacter marinus</i> | <i>Tenacibaculum discolor</i> | <i>Thalassobius mediterraneus</i> |
| | <i>Aquimarina</i> sp. | <i>Celeribacter ethanolicus</i> | <i>Vibrio harveyi</i> | <i>Tenacibaculum pelagium</i> |
| | <i>Demequina lutea</i> | <i>Pseudophaeobacter arcticus</i> | <i>Ruegeria</i> sp. | <i>Tropicibacter phthalicicus</i> |



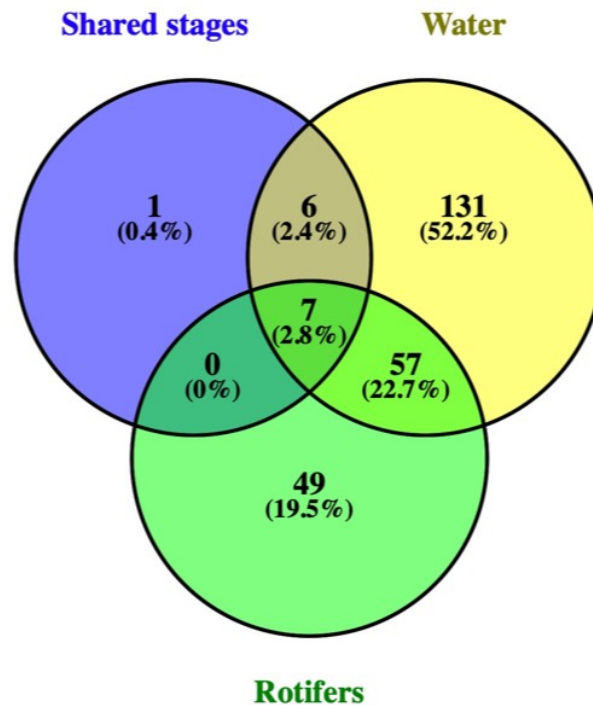
Εικόνα 1. Δενδρόγραμμα ομαδοποίησης (βάσει Bray-Curtis, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια του *Seriola dumerili*. Eggs = αυγά, D = ημέρα, Rotifers = καλλιέργεια τροχοζώων, Water = δείγμα νερού εκτροφής.

Συνολικά, στα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν εμφανίστηκαν 645 OTUs. Από αυτά, τα 14 (2,2%) παρακάτω βακτηριακά τάξα (**Εικ. 2**) ήταν κοινά μεταξύ όλων των αναπτυξιακών σταδίων: *Bacterioplanes sanyensis*, *Thalassotalea eurytherma*, *Pseudoalteromonas carrageenovora*, *Pseudophaeobacter arcticus*, *Ruegeria* sp., *Sulfitobacter sediminilitoris*, *Tenacibaculum aiptasiae*, *Tenacibaculum discolor*, *Thalassobius mediterraneus*, *Tropicibacter phthalicicus*, *Vibrio gigantis*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio neptunius*, *Vibrio parahaemolyticus*.

Από τα 14 αυτά βακτήρια, μόνο το *B. sanyensis* εμφανίστηκε αποκλειστικά στα αναπτυξιακό στάδιο και όχι στο νερό ή την τροφή, ενώ άλλα έξι (*V. gigantis*, *V. neptunius*, *V. parahaemolyticus*, *Thalassotalea eurytherma*, *S. sediminilitoris* και *T. aiptasiae*) ήταν κοινά μεταξύ αναπτυξιακών σταδίων και του νερού εκτροφής. Τέλος, τα υπόλοιπα επτά OTUs ήταν κοινά μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων, του νερού εκτροφής και των τροχοζώων (**Εικ. 3**) και ως εκ τούτου δεν μπορεί να είναι γνωστό εάν αποτελούν αυτόχθονα είδη για κάποιο από τα αναπτυξιακά στάδια που βρέθηκαν.

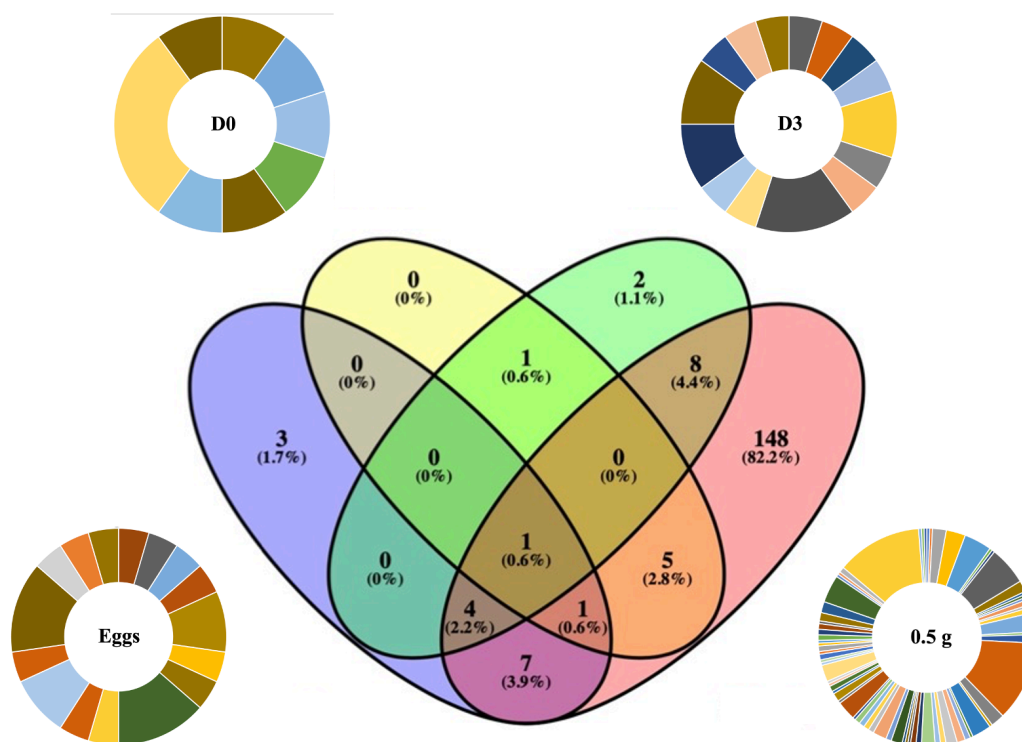


Εικόνα 2. Κοινά και μοναδικά βακτηριακά OTUs που βρέθηκαν μεταξύ των αυγών, προνυμφών κατά την εκκόλαψη (D0), 3 ημέρες μετά την εκκόλαψη (D3) και των ιχθυδίων 0,5 g.



Εικόνα 3. Κοινά και μοναδικά OTUs των 14 OTUs κορμού όλων των αναπτυξιακών σταδίων που μελετήθηκαν με τα OTUs του νερού εκτροφής και των τροχοζώων).

Τα τέσσερα αναπτυξιακά στάδια είχαν μόνο μία οικογένεια βακτηρίων κοινή (Rhodobacteriaceae) από τις 171 που συνολικά βρέθηκαν και στα τέσσερα στάδια που μελετήθηκαν (Εικ. 4). Στο στάδιο των αυγών βρέθηκαν τρεις οικογένειες (Halieaceae, Alcanivoracaceae, Thiotrichaceae) που δεν βρέθηκαν σε άλλο στάδιο. Κατά την εκκόλαψη δεν εμφανίστηκε κάποια μοναδική οικογένεια ενώ στις 3 ημέρες αποκλειστικά εμφανίστηκαν οι οικογένειες Neisseriaceae και Crocinitomicaceae. Τέλος, το στάδιο των 0.5 g ιχθυδίων χαρακτηρίστηκε από 148 μοναδικές οικογένειες.

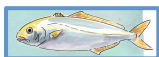


Εικόνα 4. Μοναδικές και κοινές οικογένειες βακτηρίων στις οποίες ανήκουν τα αντίστοιχα OTUs των αναπτυξιακών σταδίων που μελετήθηκαν. Κάθε χρώμα στα διαγράμματα-πίτες αντιστοιχεί σε διαφορετική οικογένεια στο αντίστοιχο δείγμα

Οι διαφορές στη δομή και σύσταση των βακτηριακών κοινοτήτων κατά τη μετάβαση από το στάδιο του αυγού στο στάδιο των 3 ημερών, οφείλονται στις διαφορετικές αλλαγές της σχετικής αφθονίας των σημαντικότερων πληθυσμιακά (σχετική αφθονία $\geq 80\%$) OTUs των αυγών (Εικ. 5). Τα OTUs που εμφάνισαν τις μεγαλύτερες αλλαγές μεταξύ των σταδίων ήταν τα *Pseudoalteromonas carrageenovora*, *Tenacibaculum discolor*, *Tenacibaculum litopenaei*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio neptunius*, *Ruegeria* sp., *Tropicibacter phthalicus*, *Pseudophaeobacter arcticus* και *Thalassotalea eurytherma*.

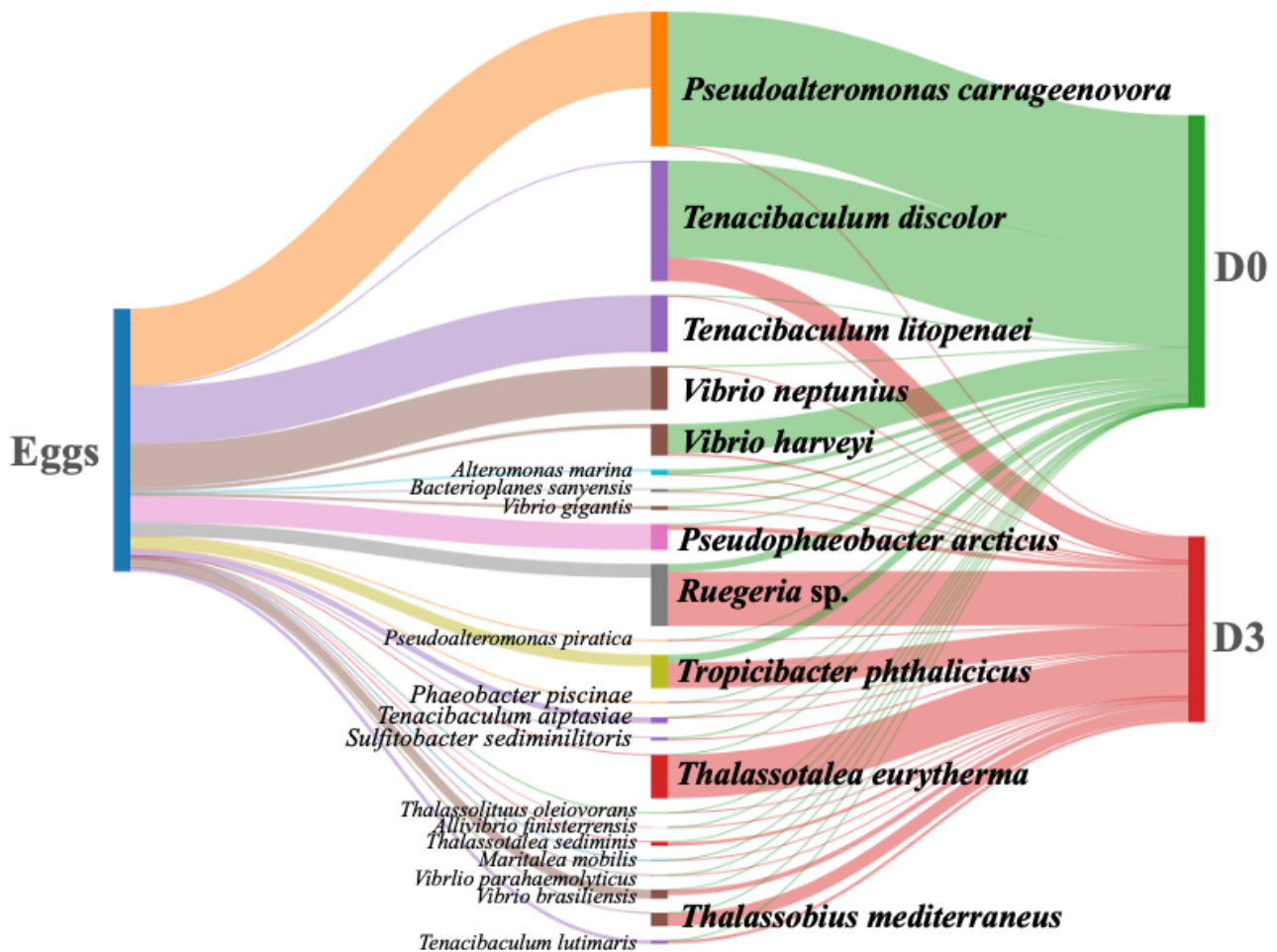
Συζήτηση

Μικροβιώτες πρώτων αναπτυξιακών σταδίων. Το στάδιο των αυγών διαθέτει μια χαρακτηριστική βακτηριακή κοινότητα, με μικρή επικάλυψη (Εικ. 1) με το περιβάλλον νερό και την παρερχόμενη τροφή (Πίνακας 2, Εικ. 3), όπως έχει ήδη παρατηρηθεί και στα αυγά της τσιπούρας (Nikouli et al. 2019) υποδεικνύοντας ότι ακόμη από τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια το μαγιάτικο διαθέτει μηχανισμούς επιλογής ή/και αποφυγής αρκετών μικροοργανισμών του περιβάλλοντος εκτροφής του. Οι βακτηριακές κοινότητες του νερού εμφάνισαν τυπικά είδη που απαντώνται στο θαλασσινό νερό που σχετίζονται με βακτήρια που ζουν είτε ελεύθερα ή προσκολλημένα σε οργανικά θρύμματα (Πίνακας 2). Οι κυρίαρχοι μικροβιώτες στο στάδιο των αυγών (Πίν. 1), που θεωρούνται ως τα θεμελιώδη είδη σε κάθε δείγμα, είναι είδη που σχετίζονται με προσκόλληση σε αβιοτικές και βιολογικές επιφάνειες. Πιο συγκεκριμένα, το πιο άφθονο βακτήριο *Pseudoalteromonas carrageenovora* (Akagawa-Matsushita et al. 1992, Gauthier et al. 1995) αν και δεν έχει αναφερθεί να σχετίζεται με ιχθύς, είναι ένα είδος γνωστό για το σχηματισμό βιοϋμενίων στο θαλασσινό νερό (Ganguil et al. 2009), ιδιότητα που θεωρείται απαραίτητη για τα αυτόχθονα βακτήρια των αυγών. Είναι γνωστό, ότι κατά το στάδιο του αυγού των ιχθύων, βακτήρια από το περιβάλλον νερό αποικίζουν την εξωτερική επιφάνεια του σχηματίζοντας βιοϋμένια και κάποια από αυτά τα βακτήρια μπορεί να αποικήσουν τόσο εξωτερικές επιφάνειες όσο και κυτταρικά επιθήλια εσωτερικών οργάνων των



προנוμφών (Hansen & Olafsen 1999). Το είδος αυτό διαθέτει ορισμένες μεταβολικές ιδιότητες που είναι σημαντικές για τα αυγά αλλά και μεταγενέστερα στάδια, όπως αποδόμηση πολύπλοκων πολυσακχαριτών (Zou et al. 2020), έκλυση βιοενεργών ενώσεων χωρίς κυτταροτοξική δράση (Kalinovskaya et al. 2004) ενώ φαίνεται να έχει και ανασταλτική δράση στην αύξηση ειδών τοξικών μικροφυκών (Lovejoy et al. 1998). Άλλα είδη του γένους *Pseudoalteromonas* έχουν βρεθεί σε RAS εκκολαπτήρια γλώσσας (Almeida et al. 2021).

Η λεπτομερής ανάλυση των προβλέψιμων μεταβολικών μονοπατιών ενός μικροβιακού δείγματος βασίζεται στην πρόβλεψη των μεταβολικών μονοπατιών γνωστών -χαρακτηρισμένων- μικροοργανισμών (Douglas et al. 2020). Στην παρούσα μελέτη όμως αυτή η ανάλυση ήταν αδύνατη για τα περισσότερα δείγματα καθώς το ποσοστό εμφάνισης μη ταξινομήσιμων OTUs ήταν ιδιαίτερος υψηλό και εξαιρετικά υψηλό στο δείγμα των ιχθυδίων 0,5 g. Ο υψηλός αριθμός OTUs που βρέθηκε στο στάδιο αυτό σχετίζεται περισσότερο με το πεπτικό σύστημα που έχει ήδη αρχίσει να αναπτύσσεται. Στα πρώτα στάδια ανάπτυξης 3-5 μέρες μετά την εκκόλαψη η ενζυμική δραστηριότητα σχετίζεται περισσότερο με την λεκιθοτροφική περίοδο, παρά με την εξωγενή τροφή όπως επιβεβαιώθηκε και με τα αποτελέσματα από την ανάλυση των μικροβιωτών. Επίσης, παρατηρείται και υψηλότερη δραστηριότητα της πρωτεάσης ως προς την λιπάση, συνεπώς η πρωτεΐνη είναι η κύρια πηγή ενέργειας σε αυτό το στάδιο. Οι γαστρικοί αδένες ολοκληρώνονται στις 20 ημέρες μετά την εκκόλαψη και σηματοδοτούν την αρχή της ανάπτυξης ενός λειτουργικού στομαχιού, οδηγώντας στην μετάβαση των ιχθυονομφών σε νεανικά άτομα μαγιάτικου. Η ανάπτυξη ενός ενήλικου συστήματος πρωτεϊνικής πέψης συνδέεται αδιαμφισβήτητα με την δραστηριότητα της πεψίνης (20-30 ημέρες μετά την εκκόλαψη) να αυξάνεται και της πρωτεάσης να μειώνεται (Gisbert et al. 2009). Σε μελλοντική έρευνα, το πρόβλημα του υψηλού αριθμού μη ταξινομήσιμων βακτηρίων μπορεί να αντιμετωπιστεί μέσω μεταγονιδιωματική ανάλυσης σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια καθώς η προσέγγιση αυτή στοχεύει στη λειτουργική ποικιλότητα ανεξαρτήτως από την ταξινομική σύσταση των μικροοργανισμών του βιολογικού δείγματος.



Εικόνα 5. Οι πιο άφθονες (σχετική αφθονία $\geq 80\%$ ανά δείγμα) βακτηριακές ταξινομικές ομάδες που βρέθηκαν στα στάδια του αυγού, της εκκόλαψης (D0) και των 3 ημερών μετά την εκκόλαψη (D3).

Βακτήρια του γένους *Tenacibaculum*, όπως το *T. litopenaei* που βρέθηκε άφθονο στα αυγά και το *T. discolor* που βρέθηκε στο στάδιο της εκκόλαψης, έχουν θεωρηθεί ως ευκαιριακά παθογόνα (Toranzo et al. 2005, Avendaño-Herrera et al. 2016) μόνο σε περιπτώσεις που έχει παρατηρηθεί κάποια λοιμώδης ασθένεια στα εκτρεφόμενα άτομα. Ωστόσο, είδη του γένους *Tenacibaculum* διαθέτουν αποδομητική δράση πολυσακχαριτών που εμπλέκονται σε διαδικασίες quorum sensing παθογόνων βακτηρίων (Romero et al. 2014) και ως εκ τούτου θεωρούνται ωφέλιμα καθώς εμποδίζουν τη χημική επικοινωνία μεταξύ των παθογόνων κυττάρων και κατ' επέκταση την αύξηση τους.

Ανάμεσα στα πλέον άφθονα βακτήρια των αυγών βρέθηκαν και δύο είδη *Vibrio* εκ των οποίων το ένα αναγνωρίστηκε ως το *V. neptunius* (Thompson et al. 2003), γνωστό παθογόνο μαλακίων (Dubert et al. 2016, Galvis et al. 2021) και ιχθύων (Austin et al. 2005, Li et al. 2015) αλλά μόνο σε περιπτώσεις ασθένειας των εκτρεφόμενων ατόμων. Το *V. harveyi*, που στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ως κοινό μεταξύ νερού εκτροφής – τροχοζώων – οργανισμών, θεωρείται ως ένα από τα σημαντικότερα παθογόνα στην εκτροφή του μαγιάτικου (Rigos et al. 2021). Καθώς το γένος *Vibrio* διαθέτει πολλά είδη και στελέχη, παθογόνα και μη, ακόμη και ωφέλιμα (Thompson et al. 2004), η εμφάνιση των ειδών αυτών σε οποιοδήποτε στάδιο της εκτροφής θα πρέπει να παρακολουθείται συστηματικά και με στοχευμένη μεθοδολογία.

Τα κυρίαρχα στο στάδιο των αυγών βακτηριακά είδη (Πίνακας 1) άλλαξαν σημαντικά στα επόμενα τρία στάδια που μελετήθηκαν (Εικ. 1 και 5). Τα προαναφερθέντα είδη βακτηρίων των αυγών έχουν σχεδόν εξαφανιστεί στα επόμενα τρία στάδια (Εικ. 5). Κατά την εκκόλαψη, μειώθηκε σημαντικά η αφθονία των ειδών για να αυξηθεί πάλι στο στάδιο των 3 ημερών. Στο στάδιο αυτό αν και παρέμεινε άφθονο το



Pseudoalteromonas carrageenovora εμφανίστηκαν δύο νέα είδη *Tenacibaculum* και *Vibrio* -αλλά πολύ συγγενικά με τα προηγούμενα γένη. Επίσης, σημαντικά άφθονα ήταν το είδος *Tropicibacter phthalicicus* κι ένα *Ruegeria* sp. Το *Tropicibacter phthalicicus* αναγνωρίστηκε πρόσφατα από καλλιέργεια τοξικού δινομαστιγωτού (Wang et al. 2020) ενώ άλλα είδη του γένους αυτού δεν έχουν αναφερθεί να σχετίζονται με εκτρεφόμενους ιχθύς. Αντίθετα, το γένος *Ruegeria* σχετίζεται με αρκετά είδη ιχθύων (Vidal et al. 2020). Θεωρείται από τα πλέον ωφέλιμα είδη καθώς παράγει τον αντιμικροβιακό παράγοντα tropodithietic acid (TDA) (D'Alvise et al. 2010, 2011, Porsby et al. 2011) όπως και είδη του γένους *Phaeobacter* (D'Alvise et al. 2016), πιθανόν όπως αυτό που βρέθηκε άφθονο στο επόμενο αναπτυξιακό στάδιο του μαγιάτικου. Η κυριαρχία αφθονίας του *Ruegeria* sp. στο στάδιο των 3 ημερών, μπορεί να θεωρηθεί ως απόκριση του οργανισμού για αντιμικροβιακή προστασία, επιλέγοντας το βακτήριο αυτό το οποίο είναι κοσμοπολίτικο και σχετικά άφθονο στο θαλασσινό νερό και διαθέτει αντιμικροβιακές ιδιότητες (Sonnenschein et al. 2017). Τα υπόλοιπα άφθονα βακτήρια του σταδίου των 3 ημερών, *Thalassotalea eurytherma* (Wang et al. 2018) και *Maritimibacter* sp. (Lee et al. 2007) είναι τυπικοί οργανισμοί του θαλασσινού νερού που δεν έχουν αναφερθεί ως αυτόχθονοι μικροοργανισμοί εκτρεφόμενων ή φυσικών πληθυσμών ιχθύων.

Το πιο διακριτό στάδιο αναφορικά με τη βακτηριακή κοινότητά του ήταν αυτό των ιχθυδίων 0,5 g (**Πίνακας 1, Εικ. 1**) καθώς είχε τον υψηλότερο αριθμό μοναδικών OTUs (Εικ. 2) υποδηλώνοντας μεγάλη αλλαγή στους μικροβιώτες του σταδίου αυτού σχέση με τα προηγούμενα στάδια. Σε αντίστοιχη μελέτη στην τσιπούρα (Nikouli et al. 2019) είχε επίσης βρεθεί στα τελευταία στάδια που άρχισαν να μοιάζουν με τα ενήλικα άτομα (Nikouli et al. 2018). Αποκλειστικά στο στάδιο αυτό παρατηρήθηκε επικράτηση βακτηριακών οικογενειών που σχετίζονται με το πεπτικό σύστημα ενώ τα προηγούμενα στάδια δεν έχουν τέτοια τάξα (**Εικ. 4**). Το κυρίαρχο είδος στο στάδιο αυτό είναι το *Phaeobacter italicus*, ένα γένος με αρκετά ωφέλιμα στελέχη για τους ιχθύς με γνωστή προβιοτική δράση (Sonnenschein et al. 2021, Makridis et al. 2021) ενώ επίσης άφθονο και ωφέλιμο θεωρείται και το *Tenacibaculum pelagium* (βλ. παραπάνω). Τα υπόλοιπα από τα άφθονα βακτήρια, *Polaribacter aestuariivivens* (Park et al. 2019) και *Thalassobius mediterraneus* (Arahal et al. 2005), είναι τυπικά είδη του θαλάσσιου περιβάλλοντος χωρίς να είναι γνωστό μέχρι σήμερα ότι μπορεί να σχετίζονται με εκτρεφόμενους ή ιχθύς από φυσικούς πληθυσμούς.

Συμπεράσματα

- Τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια του μαγιάτικου χαρακτηρίζονται από διακριτά προφίλ των μικροβιωτών τους.
- Ορισμένα μόνο βακτήρια από το στάδιο του αυγού περνάνε και στα επόμενα στάδια.
- Υπήρξε μικρή επικάλυψη μικροβιωτών μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων-νερού-τροχοζώων.
- Προτείνεται συστηματική παρακολούθηση της αύξησης των βακτηρίων του γένους *Vibrio* στο νερό της εκτροφής, και ειδικότερα των πιθανώς παθογόνων, κατά τη διάρκεια των πρώτων 33 ημερών
- Από τα αφθονότερα με δυνητικώς ωφέλιμο ρόλο για τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια αναγνωρίστηκαν τα *Pseudoalteromonas carrageenovora*, *Phaeobacter* sp. και *Ruegeria* sp. τα οποία μπορεί να αποτελέσουν οργανισμούς-στόχους για προβιοτική χρήση τους στην εκτροφή του *Seriola dumerili*.

Βιβλιογραφία

Akagawa-Matsushita M, Matsuo M, Koga Y, Yamasato K (1992) *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., Bacteria That Decompose Algal Polysaccharides. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 42:621-627

Almeida DB, Magalhães C, Sousa Z, Borges MT, Silva E, Blanquet I, Mucha AP (2021) Microbial community dynamics in a hatchery recirculating aquaculture system (RAS) of sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 539:736592

Arahal DR, Macián MC, Garay E, Pujalte MJ (2005) *Thalassobius mediterraneus* gen. nov., sp. nov., and reclassification of *Ruegeria gelatinovorans* as *Thalassobius gelatinovorans* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:2371-2376



- Austin B, Austin D, Sutherland R, Thompson F, Swings J (2005) Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*. *Environmental Microbiology* 7:1488-1495
- Avendaño-Herrera R, Irgang R, Sandoval C, Moreno-Lira P, Houel A, Duchaud E, Poblete-Morales M, Nicolas P, Ilardi P (2016) Isolation, Characterization and Virulence Potential of *Tenacibaculum dicentrarchi* in Salmonid Cultures in Chile. *Transboundary and Emerging Diseases* 63:121-126
- Conceição LEC, Yúfera M, Makridis P, Morais S, Dinis MT (2010) Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research* 41:613-640
- D'Alvise Paul W, Melchiorson J, Porsby Cisse H, Nielsen Kristian F, Gram L (2010) Inactivation of *Vibrio anguillarum* by Attached and Planktonic *Roseobacter* Cells. *Appl Environ Microbiol* 76:2366-2370
- D'Alvise Paul W, Phippen Christopher BW, Nielsen Kristian F, Gram L, Voordouw G (2016) Influence of Iron on Production of the Antibacterial Compound Tropodithetic Acid and Its Noninhibitory Analog in *Phaeobacter inhibens*. *Appl Environ Microbiol* 82:502-509
- Dimitroglou A, Merrifield DL, Carnevali O, Picchiatti S, Avella M, Daniels C, Güroy D, Davies SJ (2011) Microbial manipulations to improve fish health and production – A Mediterranean perspective. *Fish & Shellfish Immunology* 30:1-16
- Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld JR, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, Huttenhower C, Langille MGI (2020) PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology* 38:685-688
- Dubert J, Nelson DR, Spinard EJ, Kessner L, Gomez-Chiarri M, Costa Fd, Prado S, Barja JL (2016) Following the infection process of vibriosis in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) larvae through GFP-tagged pathogenic *Vibrio* species. *Journal of Invertebrate Pathology* 133:27-33
- Galvis F, Ageitos L, Rodríguez J, Jiménez C, Barja JL, Lemos ML, Balado M (2021) *Vibrio neptunius* Produces Piscibactin and Amphibactin and Both Siderophores Contribute Significantly to Virulence for Clams. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11, 750567
- Ganguli R, Mehrotra V, Dunn B (2009) Bioinspired living skins for fouling mitigation. *Smart Materials and Structures* 18:104027
- Gauthier G, Gauthier M, Christen R (1995) Phylogenetic Analysis of the Genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* Using Genes Coding for Small-Subunit rRNA Sequences and Division of the Genus *Alteromonas* into Two Genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and Proposal of Twelve New Species Combinations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 45:755-761
- Gisbert E, Giménez G, Fernández I, Kotzamanis Y, Estévez A (2009) Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture* 287:381-387
- Gómez GD, Balcázar JL (2008) A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 52:145-154
- Hansen GH, Olafsen JA (1999) Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish. *Microbial Ecology* 38:1-26
- Egerton S, Culloty S, Whooley J, Stanton C, Ross RP (2018) The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology* 9,873
- Kalinovskaya NI, Ivanova EP, Alexeeva YV, Gorshkova NM, Kuznetsova TA, Dmitrenok AS, Nicolau DV (2004) Low-Molecular-Weight, Biologically Active Compounds from Marine *Pseudoalteromonas* Species. *Current Microbiology* 48:441-446
- Kumon M, Iida T, Fukuda Y, Arimoto M, Shimizu K (2002) Blood Fluke Promotes Mortality of Yellowtail Caused by *Lactococcus garvieae*. *Fish Pathology* 37:201-203
- Lovejoy C, Bowman John P, Hallegraef Gustaaf M (1998) Algicidal Effects of a Novel Marine *Pseudoalteromonas* Isolate (Class Proteobacteria, Gamma Subdivision) on Harmful Algal Bloom



- Species of the Genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Appl Environ Microbiol* 64:2806-2813
- Lee K, Choo Y-J, Giovannoni SJ, Cho J-C (2007) *Maritimibacter alkaliphilus* gen. nov., sp. nov., a genome-sequenced marine bacterium of the *Roseobacter* clade in the order *Rhodobacterales*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:1653-1658
- Legrand TPRA, Wynne JW, Weyrich LS, Oxley APA (2020) A microbial sea of possibilities: current knowledge and prospects for an improved understanding of the fish microbiome. *Reviews in Aquaculture* 12:1101-1134
- Li F, Wang K, Luo W, Huang L, Lin Q (2015) Comparison of the Intestinal Bacterial Flora in Healthy and Intestinal-diseased Seahorses *Hippocampus trimaculatus*, *Hippocampus erectus*, and *Hippocampus spinosissimus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 46:263-272
- Lovejoy C, Bowman John P, Hallegraef Gustaaaf M (1998) Algicidal Effects of a Novel Marine *Pseudoalteromonas* Isolate (Class *Proteobacteria*, Gamma Subdivision) on Harmful Algal Bloom Species of the Genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Appl Environ Microbiol* 64:2806-2813
- Luna GM, Quero GM, Kokou F, Kormas K (2022) Time to integrate biotechnological approaches into fish gut microbiome research. *Current Opinion in Biotechnology* 73:121-127
- 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* 9:128
- Minich JJ, Nowak B, Elizur A, Knight R, Fielder S, Allen EE (2021) Impacts of the marine hatchery built environment, water and feed on mucosal microbiome colonization across ontogeny in yellowtail kingfish, *Seriola lalandi*. *Frontiers in Marine Science* 8,516
- Minich JJ, Power C, Melanson M, Knight R, Webber C, Rough K, Bott NJ, Nowak B, Allen EE (2020) The Southern Bluefin Tuna Mucosal Microbiome Is Influenced by Husbandry Method, Net Pen Location, and Anti-parasite Treatment. *Frontiers in Microbiology* 11:2015
- Nikouli E, Meziti A, Antonopoulou E, Mente E, Kormas K (2018) Gut bacterial communities in geographically distant populations of farmed sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Microorganisms* 6,92
- Nikouli E, Meziti A, Antonopoulou E, Mente E, Kormas KA (2019) Host-associated bacterial succession during the early embryonic stages and first feeding in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Genes* 10,483
- Park S, Park J-M, Lee J-S, Yoon J-H (2019) Description of *Polaribacter aestuariivivens* sp. nov., isolated from a tidal flat. *FEMS Microbiology Letters* 366:fnz185
- Patrick G, Tarnecki AM, Rhody N, Schloesser R, Main K, Yanong R, Francis-Floyd R (2019) Disinfection of almaco jack (*Seriola rivoliana* Valenciennes) eggs: Evaluation of three chemicals. *Aquaculture Research* 50:3793-3801
- Porsby Cisse H, Webber Mark A, Nielsen Kristian F, Piddock Laura JV, Gram L (2011) Resistance and Tolerance to Tropodithietic Acid, an Antimicrobial in Aquaculture, Is Hard To Select. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55:1332-1337
- Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, Gordon JI (2006) Reciprocal Gut Microbiota Transplants from Zebrafish and Mice to Germ-free Recipients Reveal Host Habitat Selection. *Cell* 127:423-433
- Rigos G, Katharios P, Kogiannou D, Cascarano CM (2021) Infectious diseases and treatment solutions of farmed greater amberjack *Seriola dumerili* with particular emphasis in Mediterranean region. *Reviews in Aquaculture* 13:301-323



- Romero M, Muras A, Mayer C, Buján N, Magariños B, Otero A (2014) In vitro quenching of fish pathogen *Edwardsiella tarda* AHL production using marine bacterium *Tenacibaculum* sp. strain 20J cell extracts. *Diseases of Aquatic Organisms* 108:217-225
- Rønnestad I, Yúfera M, Ueberschär B, Ribeiro L, Sæle Ø, Boglione C (2013) Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Reviews in Aquaculture* 5:S59-S98
- Sayes C, Leyton Y, Riquelme CE (2017) Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. potential probiotic for larval fish culture. 2017 44:9
- Sonnenschein EC, Jimenez G, Castex M, Gram L, Stabb Eric V (2021) The Roseobacter-Group Bacterium *Phaeobacter* as a Safe Probiotic Solution for Aquaculture. *Appl Environ Microbiol* 87:e02581-02520
- Sonnenschein EC, Nielsen KF, D'Alvise P, Porsby CH, Melchiorson J, Heilmann J, Kalatzis PG, López-Pérez M, Bunk B, Spröer C, Middelboe M, Gram L (2017) Global occurrence and heterogeneity of the Roseobacter-clade species *Ruegeria mobilis*. *The ISME Journal* 11:569-583
- Stuart KR, Keller M, Drawbridge M (2010) Efficacy of formalin and povidone–iodine disinfection techniques on the eggs of three marine finfish species. *Aquaculture Research* 41:e838-e843
- Sullam KE, Essinger SD, Lozupone CA, O'Connor MP, Rosen GL, Knight ROB, Kilham SS, Russell JA (2012) Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Molecular Ecology* 21:3363-3378
- Thompson Fabiano L, Iida T, Swings J (2004) Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68:403-431
- Thompson FL, Li Y, Gomez-Gil B, Thompson CC, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Rupp GS, Pereira A, De Bem MM, Sorgeloos P, Swings J (2003) *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:245-252
- Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246:37-61
- Verner-Jeffreys DW, Nakamura I, Shields RJ (2006) Egg-associated microflora of Pacific threadfin, *Polydactylus sexfilis* and amberjack, *Seriola rivoliana*, eggs. Characterisation and properties. *Aquaculture* 253:184-196
- Verner-Jeffreys DW, Nakamura I, Shields RJ (2007) Surface disinfection of Pacific threadfin, *Polydactylus sexfilis*, and amberjack, *Seriola rivoliana*, eggs. *Aquaculture Research* 38:605-612
- Veyrand-Quirós B, Guzmán-Villanueva LT, Reyes AG, Rodríguez-Jaramillo C, Salas-Leiva JS, Tovar-Ramírez D, Balcázar JL, Quiroz-Guzmán E (2021) Assessment of bacteriophage vB_Pd_PDCC-1 on bacterial dynamics during ontogenetic development of the longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*). *Applied Microbiology and Biotechnology* 105:2877-2887
- Veyrand-Quirós B, Gómez-Gil B, Lomeli-Ortega CO, Escobedo-Fregoso C, Millard AD, Tovar-Ramírez D, Balcázar JL, Quiroz-Guzmán E (2020) Use of bacteriophage vB_Pd_PDCC-1 as biological control agent of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* during hatching of longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) eggs. *Journal of Applied Microbiology* 129:1497-1510
- Vidal LMR, Venas TM, Gonçalves ARP, Mattsson HK, Silva RVP, Nóbrega MS, Azevedo GPR, Garcia GD, Tschoeke DA, Vieira VV, Thompson FL, Thompson CC (2020) Rapid screening of marine bacterial symbionts using MALDI-TOF MS. *Archives of Microbiology* 202:2329-2336
- Wang X, Zhu J, Feng J, Sardar A, Hu Z, Wang H (2020) *Tropicibacter alexandrii* sp. nov., a novel marine bacterium isolated from the phycosphere of a dinoflagellate, *Alexandrium minutum*. *Antonie van Leeuwenhoek* 113:311-320



- Wang Y, Liu T, Ming H, Sun P, Cao C, Guo M, Du J, Zhou C, Zhu W (2018) *Thalassotalea atypica* sp. nov., isolated from seawater, and emended description of *Thalassotalea eurytherma*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68:271-276
- Wilkes Walburn J, Wemheuer B, Thomas T, Copeland E, O'Connor W, Booth M, Fielder S, Egan S (2019) Diet and diet-associated bacteria shape early microbiome development in Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*). *Microbial Biotechnology* 12:275-288
- Yukgehnaish K, Kumar P, Sivachandran P, Marimuthu K, Arshad A, Paray BA, Arockiaraj J (2020) Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Reviews in Aquaculture* 12:1903-1927
- Zou Y, Robbins J, Heyndrickx M, Debode J, Raes K (2020) Quantification of Extracellular Proteases and Chitinases from Marine Bacteria. *Current Microbiology* 77:3927-3936

Διαφοροποιήσεις από ΤΠΕ: -



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRAS



GALAXIDI
Marine Farm S.A.



ARGOSARONIKOS
FISHFARMS S.A.

