



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗΣ ΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ VIBRIO»*



ΜΑΡΙΑ Κ. ΜΠΑΣΔΕΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΦΛΕΜΕΤΑΚΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2018

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

***«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗΣ ΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ VIBRIO»***

ΜΑΡΙΑ Κ. ΜΠΑΣΔΕΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΦΛΕΜΕΤΑΚΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2018

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗΣ ΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ VIBRIO»**

ΜΑΡΙΑ Κ. ΜΠΑΣΔΕΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΦΛΕΜΕΤΑΚΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Επ. Καθηγητής (Επιβλέπων)

Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής (Μέλος)

Ρήγας Σταμάτης, Επίκουρος Καθηγητής (Μέλος)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υδατοκαλλιέργεια είναι ένας αναπτυσσόμενος τομέας με παγκόσμια οικονομική σημασία. Σημαντικό πρόβλημά της αποτελούν οι βακτηριακές λοιμώξεις οι οποίες δημιουργούν σοβαρά οικονομικά ή/και οικολογικά προβλήματα. Η δονακίωση η οποία έχει προληφθεί με περιορισμένη επιτυχία με τη χορήγηση αντιβιοτικών, αποτελεί μία από τις πιο συχνές ασθένειες των εκκολαπτηρίων που οφείλεται στα βακτήρια του γένους *Vibrio*. Σήμερα, τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια αποτελούν ένα παγκόσμιο πρόβλημα που προτρέπει την ανάγκη για ταχεία ανάπτυξη αειφόρων εναλλακτικών στρατηγικών ελέγχου του πληθυσμού τους. Η εναλλακτική προσέγγιση της χρήσης των λυτικών φάγων ή των προϊόντων τους, ως βιολογικό παράγοντα στη θεραπεία ή την πρόληψη των βακτηριακών ασθενειών, έχει κερδίσει το ενδιαφέρον με ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Στην παρούσα εργασία, η *in vitro* λύση ενός κοκτέιλ τεσσάρων θαλάσσιων λυτικών βακτηριοφάγων που διαθέτουν ποικίλους μοριακούς μηχανισμούς διερευνήθηκε. Σκοπός ήταν να ελεγχθεί με βιολογικό τρόπο ο βακτηριακός πληθυσμός του οπορτουνιστικού παθογόνου των ψαριών *Vibrio alginolyticus*. Παρατηρήθηκε αύξηση της αποτελεσματικότητας του βιολογικού ελέγχου του βακτηριακού πληθυσμού σε σχέση με την αποτελεσματικότητα που είχαν μεμονωμένα οι φάγοι και καθυστέρηση στην ανάπτυξη της βακτηριακής αντοχής. Τέλος, διερευνήθηκαν τα φαινόμενα ανταγωνιστικότητας και η λυτική δραστηριότητα των βακτηριοφάγων μέσα από τα οποία παρατηρήθηκε ότι η δράση του κοκτέιλ ήταν συνεργιστική.

Επιστημονική περιοχή μελέτης

Βακτηριοφάγοι

Λέξεις κλειδιά

Βακτηριοφάγοι, δονακίωση, κοκτέιλ φάγων, υδατοκαλλιέργειες, *Vibrio* sp., *Vibrio alginolyticus*.

«STUDY ON THE COMBINATIONAL LYTIC ACTIVITY OF BACTERIOPHAGES IN GENUS VIBRIO BACTERIA»

ABSTRACT

Aquaculture is a sector of economic relevance worldwide. Bacterial infections have been recognized as an important limitation to aquaculture production and trade, as well as can cause ecological problems. Vibriosis is one of the most common diseases in marine aquaculture hatcheries and its causative agents are bacteria of the genus *Vibrio*. Vibriosis has been prevented with limited success by the administration of antibiotics. Recently, drug-resistant bacteria have become a global problem, urging for the prompt development of alternative control population strategies. The alternative approach of using lytic phages or their products, as bioagents for the treatment or prophylaxis of bacterial infectious diseases, has gained interest with promising results. In this study, the *in vitro* solution of a cocktail of four marine lytic bacteriophages with varied molecular tools was investigated in order to control the bacterial population of the opportunistic pathogen *Vibrio alginolyticus*. An increase in the effectiveness of biological control of the bacterial population and a delay in the development of bacterial resistance were observed. Finally, the competitiveness and the lytic activity of the bacteriophages were investigated, concluding that the application of the cocktail was synergistic.

Study area

Bacteriophages

Key-words

Bacteriophage, vibriosis, phage cocktail, aquaculture, *Vibrio sp.*, *Vibrio alginolyticus*.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
Ευχαριστίες	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1. Βακτηριοφάγοι	8
1.2. Ιστορική αναδρομή	11
1.3. Μοντέλα βακτηριοφάγων	13
1.3.1. Ο βακτηριοφάγος T4	13
1.3.2. Ο βακτηριοφάγος KVP40	14
1.3.3. Ο βακτηριοφάγος phiKZ	15
1.3.4. Η οικογένεια <i>Siphoviridae</i>	16
1.4. Εφαρμογές για τον βιολογικό έλεγχο των παθογόνων βακτηρίων	16
1.4.1. Προϊόντα βακτηριοφάγων για ανθρώπινη χρήση	16
1.4.2. Εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και περιβαλλοντικές εφαρμογές	17
1.4.3. Εφαρμογές στην κτηνιατρική	18
1.5. Κοκτέιλ βακτηριοφάγων (phage cocktail)	19
1.6. Βιολογικός έλεγχος των παθογόνων στην υδατοκαλλιέργεια	20
1.7. Οι υδατοκαλλιέργειες στον κόσμο	22
1.8. Οι υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα	23
1.9. Βακτηριακές λοιμώξεις και υδατοκαλλιέργειες	25
1.10. Αντιβιοτικά στις υδατοκαλλιέργειες	27
1.11. Το δονάκιο (<i>Vibrio sp.</i>) στο θαλάσσιο περιβάλλον / Μολυσματικότητα	28
1.12. Το βακτήριο <i>Vibrio alginolyticus</i>	30
1.13. Η περίπτωση της δονακίωσης	32
1.14. Στόχος της εργασίας	34
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	35
2.1. Πειραματικός σχεδιασμός	35
2.2. Θρεπτικά υποστρώματα και μικροβιολογικές τεχνικές	36
2.2.1. Θρεπτικά υποστρώματα	36
2.2.2. Βακτηριακή καλλιέργεια	37
2.2.3. Τεχνική διπλής στιβάδας άγαρ (Double Agar)	38
2.3. Τίτλοδότηση βακτηριοφάγων	39
2.4. Δημιουργία του κοκτέιλ των φάγων (phage cocktail)	40
2.5. Έλεγχος <i>in vitro</i> αποτελεσματικότητας των φάγων	41
2.6. Απομόνωση φαγικού DNA μετά τη συγκαλλιέργεια	42
2.7. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου	43
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	47
3.1. Κοκτέιλ φάγων (phage cocktail)	47
3.2. Έλεγχος <i>in vitro</i> αποτελεσματικότητας των φάγων	48
3.3. Μέτρηση της απορρόφησης των προϊόντων των απομονώσεων DNA	50
3.4. Αποτελέσματα της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου	50
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	54
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

Ευχαριστίες

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία του Τμήματος Βιοτεχνολογίας, υλοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το χρονικό διάστημα 5/2017-2/2018.

Θα ήθελα, ιδιαίτερα, να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Φλεμετάκη του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την αποδοχή της επίβλεψης της διατριβής και τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Δημήτριο Σκληρό για την υποστήριξη και για τις πάντα σημαντικές και εύστοχες παρατηρήσεις του πάνω στο συγγραφικό μέρος της διατριβής.

Επίσης, ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή κ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στο συγκεκριμένο Π.Μ.Σ. καθώς και για την υποστήριξη που μου παρείχε προκειμένου να εκπαιδευτώ σε κάτι το οποίο αποτελούσε ένα όνειρο για εμένα.

Θερμές ευχαριστίες επίσης θα ήθελα να εκφράσω και στους ερευνητές Δρ. Παντελή Καθάριο και Κωνσταντίνα Κόκκαρη για τη βοήθειά τους κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος, θερμές ευχαριστίες στους γονείς μου αλλά και στον Νικόλαο Μάρκου για την υποστήριξη, την αμέριστη βοήθεια και τις διευκολύνσεις που μου παρείχαν στο διάστημα των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο Τμήμα Βιοτεχνολογίας.

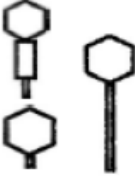
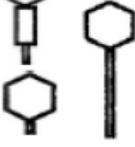
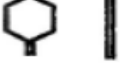
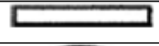
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Βακτηριοφάγοι

Οι βακτηριοφάγοι ή φάγοι (ιοί που μολύνουν βακτήρια) είναι οι πιο άφθονοι οργανισμοί στη βιόσφαιρα (παρασιτική μορφή ζωής) που υπάρχουν με φυσικό τρόπο στα οικοσυστήματα όπως ακριβώς και τα βακτήρια (Clokier *et al.*, 2011). Όπως σε κάθε σχέση παρασίτου με τον ξενιστή του, έτσι και εδώ, η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός των φάγων εξαρτάται άμεσα από την διαθεσιμότητα του ξενιστή του, δηλαδή της τροφής του, στο οικοσύστημα (La Scola *et al.*, 2008). Από τις πυκνότερες φυσικές τους πηγές είναι το θαλασσινό νερό το οποίο περιέχει 9×10^8 ιοσωμάτια / ml νερού ενώ το μέγεθος του συνολικού πληθυσμού τους εκτιμάται περίπου στα 10^{31} (Wommack & Colwell, 2000). Το 96% του συνολικού αριθμού των βακτηριοφάγων ανήκει στην κλάση *Caudovirales* έχουν δίκλωνο DNA και ουρά. Χωρίζονται σε 3 οικογένειες (Εικόνα 1): *Siphoviridae* με μακριές μη-συσταλτές ουρές (60% των *Caudovirales*), *Myoviridae* με μακριές συσταλτές ουρές (25%), *Podoviridae* με κοντές μη-συσταλτές ουρές (15%) (Ackermann, 2007). Το υπόλοιπο 4% του συνολικού αριθμού των βακτηριοφάγων κατατάσσεται σε 10 οικογένειες (Πίνακας 1), ορισμένες από τις οποίες είναι ιδιαίτερα μικρές (Ackermann, 2007).

Προκειμένου να εκτιμηθούν οι ρόλοι των φάγων στη φύση, είναι απαραίτητη η κατανόηση των πιθανών αλληλεπιδράσεών τους με τους ξενιστές τους. Οι κύκλοι ζωής των φάγων (Εικόνα 2), μαζί με την αλληλεπίδραση των φάγων με το φυσικό τους περιβάλλον, υπαγορεύουν το ρόλο τους στη βιολογία των βακτηρίων (Clokier *et al.*, 2011). Με τον λυτικό κύκλο ζωής (αναπαραγωγής), οι φάγοι μολύνουν και καταστρέφουν γρήγορα τα κύτταρα ξενιστών τους, με αποτέλεσμα να διαμορφώνουν τη δυναμική των βακτηριακών πληθυσμών και να βοηθούν περιστασιακά στη μακροπρόθεσμη εξέλιξή τους (Abedon, 2008; Weinbauer & Rassoulzadegan, 2004; Wilhelm & Suttle, 1999). Ο αριθμός που προκύπτει ανά βακτήριο που μολύνεται είναι 50 έως 200 νέοι φάγοι ανάλογα με το είδος και τις συνθήκες (Carlton, 1999). Αντιθέτως, με το λυσιγονικό κύκλο ζωής οι φάγοι αντί να καταστρέφουν άμεσα τους ξενιστές τους ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του ξενιστή τους ή υπάρχουν ως πλασμίδια μέσα στο κύτταρο ξενιστή τους (Little, 2005). Ο λυσιγονικός κύκλος μπορεί να είναι σταθερός για χιλιάδες γενεές και ο βακτηριοφάγος μπορεί να μεταβάλλει τον φαινότυπο του βακτηρίου εκφράζοντας γονίδια που δεν εκφράζονται στη συνηθισμένη πορεία της μόλυνσης (Clokier *et al.*, 2011).

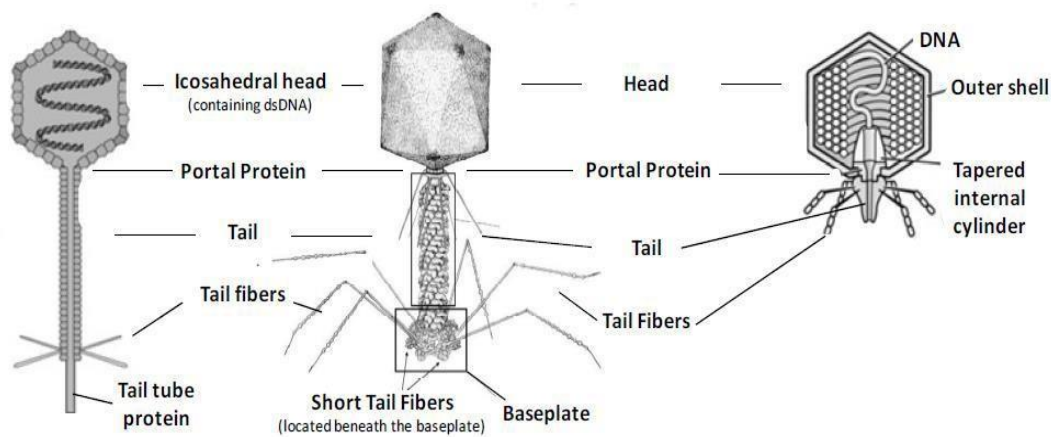
Πίνακας 1: Οι 13 οικογένειες στις οποίες κατατάσσονται οι βακτηριοφάγοι σε σχέση με το γενετικό τους υλικό, τα χαρακτηριστικά τους και την μορφολογία τους. Το 96% ανήκει στις 3 πρώτες οικογένειες και το 4% ανήκει στις υπόλοιπες 7 (Ackermann, 2007).

Family	Nucleic acid	Characteristics	Morphology
<i>Myoviridae</i>	Linear dsDNA	Non-enveloped, contractile tail	
<i>Siphoviridae</i>	Linear dsDNA	Non-enveloped, long non- contractile tail	
<i>Podoviridae</i>	Linear dsDNA	Non-enveloped, short non-contractile tail	
<i>Corticoviridae</i>	Circular dsDNA	Non-enveloped, isometric	
<i>Tectiviridae</i>	Linear dsDNA	Non-enveloped, isometric	
<i>Lipothrixviridae</i>	Linear dsDNA	Enveloped, rod-shaped	
<i>Plasmaviridae</i>	Circular dsDNA	Enveloped, pleomorphic	
<i>Rudiviridae</i>	Linear dsDNA	Non-enveloped, rod-shaped	
<i>Fuselloviridae</i>	Circular dsDNA	Non-enveloped, lemon shaped	
<i>Inoviridae</i>	Circular ssDNA	Non-enveloped, filamentous	
<i>Microviridae</i>	Circular ssDNA	Non-enveloped, isometric	
<i>Leviviridae</i>	Linear ssDNA	Non-enveloped, isometric	
<i>Cystoviridae</i>	Segmented dsRNA	Enveloped, spherical	

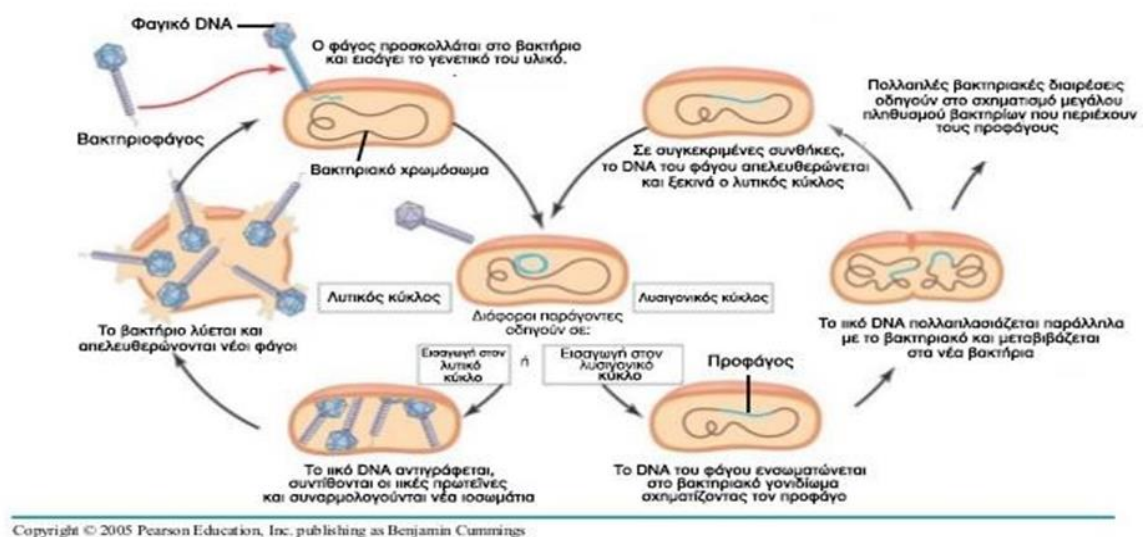
Σήμερα η ανάγκη για μια νέα, φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση στα αντιβιοτικά έχει γίνει περισσότερο από αναγκαία. Η παρουσία βακτηριοφάγων σε περιβάλλοντα όπου εμφανίζονται παθογόνα βακτήρια θα πρέπει να θεωρηθεί ως μια ευκαιρία που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας επιτυχημένης και φιλικής προς το περιβάλλον λύσης, για την άμεση λύση των βακτηρίων αυτών. Η λυτική φύση των φάγων που εμφανίζουν γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης είναι ένα πλεονέκτημα αλλά και μια προϋπόθεση για την ανάπτυξη ασφαλούς ελέγχου των παθογόνων, αφού ο πολλαπλασιασμός των ανθεκτικών βακτηρίων θεωρείται ένα από τα κύρια μειονεκτήματα στη χρήση των βακτηριοφάγων για τον έλεγχο των βακτηρίων (Weigle *et al.*, 2007). Ο λόγος είναι ότι υπάρχει σοβαρή περίπτωση να υπάρξει μεταφορά ανθεκτικών ή μολυσματικών γονιδίων μεταξύ βακτηρίων και βακτηριοφάγων με αποτελέσματα απρόβλεπτα και ανεπιθύμητα. Ωστόσο, οι βακτηριοφάγοι (προληπτικά ή θεραπευτικά) πρέπει πάντα να εφαρμόζονται με μεγάλη προσοχή. Η περαιτέρω γνώση των αλληλεπιδράσεων βακτηριοφάγου-βακτηρίου θα συμβάλει στη χρήση των βακτηριοφάγων ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου (kalatzis *et al.*, 2016).

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι των βακτηριοφάγων είναι σημαντικός ανασταλτικός παράγοντας στην ευρύτερη εφαρμογή του βιολογικού ελέγχου με τη πιθανότητα πρόκλησης επαγωγής, μεταλλάξεων και οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς (Wilson *et al.*, 1996). Αυτά είναι γεγονότα που συμβαίνουν φυσικά στο περιβάλλον τα οποία όμως μπορούν να αυξηθούν και να επιταχυνθούν με την απρόσεκτη χρήση των φάγων, ωστόσο με τη χρήση συνδυασμού βακτηριοφάγων (phage cocktail) υπάρχει η δυνατότητα να καθυστερήσει ή ακόμη και να αποτραπεί η εμφάνιση της ανθεκτικότητας έναντι των φάγων (Lindell *et al.*, 2007; Breitbart *et al.*, 2007). Μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός πως όλα τα βακτηριακά στελέχη (ξενιστές) πρέπει να έχουν πρώτα πλήρως αναγνωριστεί (Carlton, 1999). Στα πλεονεκτήματα του βιολογικού ελέγχου των βακτηρίων περιλαμβάνεται η μεγάλη τους εξειδίκευση (αναγνώριση ειδικών υποδοχέων της βακτηριακής μεμβράνης) (Mathur *et al.*, 2003), η αυτό-περιοριστική τους δράση τους (μειώνονται με τη μείωση των βακτηρίων) με μηδενικό οικολογικό κίνδυνο (Phumkhachorn & Rattanachaiakunsorn, 2010) και η αποτελεσματικότητά τους έναντι στα ανθεκτικά στελέχη των αντιβιοτικών (Levin *et al.*, 2004).

Οι βακτηριοφάγοι χρησιμεύουν ως εργαλεία για την κατανόηση της μοριακής βιολογίας, ως φορείς της οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς και της βακτηριακής εξέλιξης, ως πηγές διαγνωστικών και γενετικών εργαλείων και νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων (Clokier *et al.*, 2011). Σύμφωνα με τον Bushman (2002), σημαντικό τμήμα του βακτηριακού DNA δεν μεταφέρεται κάθετα (από το πατρικό βακτήριο στον απόγονο) αλλά οριζόντια μέσω μετασχηματισμού, βακτηριακής σύζευξης και βακτηριακής μεταγωγής. Η γνώση και ανάπτυξη της βιολογίας των φάγων και της σχέσης τους με τους ξενιστές τους θα συμβάλλουν στη κατανόηση των μικροβιακών συστημάτων και στην εκμετάλλευσή τους (Clokier *et al.*, 2011), άλλωστε αποτελούν το βασικό παράγοντα για τον προσδιορισμό των βακτηριακών πληθυσμών στο περιβάλλον (Clokier *et al.*, 2006; James *et al.*, 2010).



Εικόνα 1: Βασική μορφολογία των 3 οικογενειών των *Caudovirales*, από αριστερά προς τα δεξιά: *Siphoviridae* (μακριές και μη-συσταλτές ουρές), *Myoviridae* (μακριές συσταλτές ουρές) *Podoviridae* (κοντές μη-συσταλτές ουρές) (Ceyssens, 2009).



Εικόνα 2: Λυτικός και Λυσιγονικός τρόπος πολλαπλασιασμού των βακτηριοφάγων (Pearson Education, Inc. Publishing as Benjamin Cummings, 2005).

1.2. Ιστορική αναδρομή

Το 1896 ο Ernest Hankin παρατήρησε στα ύδατα του ποταμού Γάγγη στην Ινδία σημαντική αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα έναντι του *Vibrio cholerae*, την οποία δεν κατάφερε να προσδιορίσει (Hankin, 1896). Σχεδόν ταυτόχρονα, ο Gamaleya παρατήρησε μία παρόμοια δραστηριότητα έναντι του *Bacillus subtilis* (Samsygina & Boni, 1984) καθώς και αρκετοί άλλοι ερευνητές έναντι διαφόρων άλλων βακτηρίων (Van Helvoort,

1992). Το 1915 ο Άγγλος βακτηριολόγος Frederick Twort ανέφερε ένα παρόμοιο φαινόμενο προωθώντας την υπόθεση ότι πιθανότατα οφείλεται σε έναν ιό (Twort, 1915), κάτι που όμως δεν κατάφερε να αποδείξει για διαφόρους λόγους συμπεριλαμβανομένων και των οικονομικών δυσκολιών (Summers, 1999; Twort, 1915). Το 1917 ο Γαλλο-Καναδός μικροβιολόγος Felix d'Herelle παρουσιάζοντας τα αποτελέσματα της μελέτης που διεξήγαγε, αναφέρθηκε σε ιούς οι οποίοι παρασιτούν σε βακτήρια και τα καταστρέφουν (D'Herelle, 1917), τους οποίους είχε καταφέρει να απομονώσει ένα χρόνο πριν, το 1916. Ταυτόχρονα πρότεινε και την ονομασία αυτών σε "βακτηριοφάγους", ένα όνομα το οποίο οφείλουν στις ιδιότητες τους που στη συνέχεια καθιερώθηκε.

Ο d'Herelle συνέχισε να ερευνά τους βακτηριοφάγους πραγματοποιώντας δοκιμές σε ζώα αλλά και σε ανθρώπους. Σειρά από μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε νοσοκομείο του Παρισιού το 1919 (Summers, 1999) για την αντιμετώπιση της δυσεντερίας με αποτελέσματα εκπληκτικά. Εκπληκτικά ήταν επίσης και τα αποτελέσματα από τη χρήση σκευασμάτων βακτηριοφάγων έναντι και άλλων σοβαρών ασθενειών όπως η χολέρα και η πανώλη (Summers, 1999). Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτών των μελετών δεν δημοσιεύθηκαν αμέσως με αποτέλεσμα η πρώτη αναφορά των φάγων για τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών να γίνει το 1921 από τους Bruynoghe και Maisin (1921), οι οποίοι χρησιμοποίησαν βακτηριοφάγους για τη θεραπεία της σταφυλοκοκκικής δερματικής λοίμωξης. Πολλές παρόμοιες υποσχόμενες μελέτες ακολούθησαν (Rice, 1930; Schless, 1932; Stout, 1933) οι οποίες ενθαρρύνονταν από τα πρώτα αποτελέσματα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη μαζική παρασκευή προϊόντων βακτηριοφάγων από τις διάφορες φαρμακευτικές εταιρείες.

Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα των σκευασμάτων βακτηριοφάγων ήταν αμφιλεγόμενη (Eaton & Bayne-Jones, 1934; Krueger & Scribner, 1941) καθώς υπήρξαν και ορισμένες κλινικές αποτυχίες είτε εξαιτίας της μεγάλης εξειδίκευσης που παρουσιάζουν οι φάγοι την οποία οι ερευνητές αγνοούσαν είτε λόγω περιορισμένης καθαρότητας των προϊόντων. Μετά την ανακάλυψη του πρώτου αντιβιοτικού, της πενικιλίνης και μετά την εμφάνιση των πρώτων αντιβιοτικών τη δεκαετία του 1940, η εμπορική παραγωγή θεραπευτικών φάγων σταμάτησε στο μεγαλύτερο μέρος του δυτικού κόσμου αλλά και στις ΗΠΑ. Παρ'όλα αυτά, οι βακτηριοφάγοι συνέχισαν να χρησιμοποιούνται μαζί με τα αντιβιοτικά ή αντί αυτών στην ανατολική Ευρώπη και στην πρώην Σοβιετική Ένωση.

Αρκετά ιδρύματα στις χώρες αυτές συμμετείχαν και συνεχίζουν ενεργά στην έρευνα και στη παραγωγή θεραπευτικών φάγων με τα φαρμακευτικά παρασκευάσματα να διατίθενται προς πώληση σε φαρμακεία και σε εξειδικευμένα ερευνητικά κέντρα και κλινικές. Οι δραστηριότητες επικεντρώνονται στο Ερευνητικό Ινστιτούτο Eliava στην Τιφλίδα της Γεωργίας και στο Ινστιτούτο Ανοσολογίας Hirsfeld στην Πολωνία. Σήμερα η ταχεία και ανησυχητική εμφάνιση των "υπερβακτηρίων" (βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά), έχει αναζωπυρώσει το ενδιαφέρον σχετικά με τη χρήση των φάγων για θεραπευτικούς σκοπούς στο δυτικό κόσμο. Η διαρκώς αυξανόμενη εμφάνιση τους μπορεί να έχει πολύ σοβαρές συνέπειες για τη δημόσια υγεία και μπορεί να έχει και σοβαρές επιπτώσεις στον τρόπο άσκησης της ιατρικής σε μεγάλο μέρος του κόσμου.

1.3. Μοντέλα βακτηριοφάγων

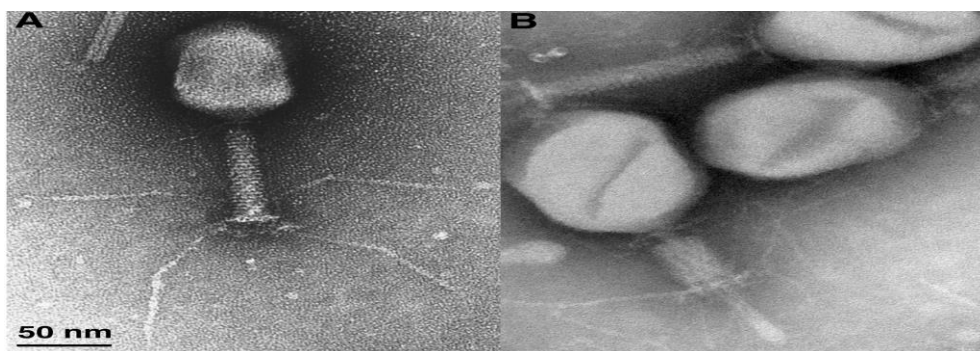
Η ταξινόμηση των βακτηριοφάγων αποτέλεσε αντικείμενο συζήτησης από την ανακάλυψή τους στις αρχές του 20^{ου} αιώνα (Nelson, 2004). Η χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (Ackermann, 2011; Luria *et al.*, 1943; Ruska, 1940) και η ανακάλυψη των διαφορετικών μορφών νουκλεϊνικού οξέος (Lwoff *et al.*, 1962), αποτέλεσαν τη βάση της τρέχουσας κατάταξης των φάγων (Ackermann, 2006).

Συγκεκριμένα το 96% του συνολικού αριθμού των βακτηριοφάγων ανήκει στην κλάση *Caudovirales* έχουν δίκλωνο DNA και ουρά με το χρωμόσωμα τους εντός της κεφαλής τους, αντιπροσωπεύοντας το 20-50% της μάζας τους (Ceyssens, 2009). Χωρίζονται σε 3 οικογένειες: *Siphoviridae* με μακριές εύκαμπτες ουρές (60% των *Caudovirales*), *Myoviridae* με μακριές συσταλτές ουρές (25%), *Podoviridae* με κοντές μη-συσταλτές ουρές (15%) (Ackermann, 2007). Οι φάγοι που χαρακτηρίζονται από σύμβολα χωρίς να γίνεται αναφορά στον ξενιστή, είναι συνήθως ευρύτερα μελετημένοι και αναγνωρισμένοι (Ceyssens, 2009). Σημαντικά μοντέλα βακτηριοφάγων που ανήκουν στην οικογένεια *Myoviridae* αποτελούν οι βακτηριοφάγοι T4, KVP40 και phiKZ.

1.3.1. Ο βακτηριοφάγος T4

Ο βακτηριοφάγος T4 (Εικόνα 3) υπήρξε σημαντικό μοντέλο στην ανάπτυξη της σύγχρονης γενετικής αλλά και της μοριακής βιολογίας από τη δεκαετία του 1940. Το γονιδίωμα του T4 είναι ένας πλούσιος χώρος για την εκτίμηση πλήρων γονιδιωμάτων στο πλαίσιο ενός καλά χαρακτηρισμένου βιολογικού συστήματος (Miller *et al.*, 2003b). Οι T φάγοι

εκμεταλλεύονται ένα ευρύ φάσμα ξενιστών και περιβαλλόντων ενώ παράλληλα παρέχουν σημαντική αντίσταση έναντι σε ένα ευρύ φάσμα αντιϊικών μηχανισμών προερχόμενων από τον ξενιστή (Kutter *et al.*, 1994a; Kutter *et al.*, 1994b; Mosig & Hall, 1994). Ο T4 επίσης παράγει διάφορα ένζυμα με εκτεταμένες εμπορικές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της DNA και της RNA λιγάσης, της πολυνουκλεοτιδικής κινάσης και της DNA πολυμεράσης. Ένα μεγάλο τμήμα των κωδικοποιημένων T4 ενζύμων με γνωστές μεταβολικές λειτουργίες ανήκει στο μεταβολισμό του DNA. Ο T4 δεν κωδικοποιεί μόνο όλα τα συστατικά του δικού του συστήματος αντιγραφής και ανασυνδυασμού αλλά επίσης μεταφράζει τα περισσότερα από τα ένζυμα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό νουκλεοτιδίων για ενσωμάτωση στο DNA (Miller *et al.*, 2003b). Πολλές γνωστές πρωτεΐνες T4 λειτουργούν μόνο ως μέρη μακρομοριακών συμπλεγμάτων (Alberts, 1998). Αυτό ισχύει όχι μόνο για τη συναρμολόγηση της σωματιδιακής σύνθεσης της ισομορφίας των ενζύμων T4 της βιοσύνθεσης των νουκλεοτιδίων, του αναδιπλασιασμού του DNA, του ανασυνδυασμού και της μεταγραφής. Η κατανόηση αυτών των πολύπλοκων πρωτεϊνικών μηχανισμών δεν απαιτεί μόνο εργασία με καθарές πρωτεΐνες, αλλά επίσης την ανάλυση των επιδράσεων των μεταλλάξεων σε αυτές τις πρωτεΐνες *in vivo* και η εξέταση των διαμορφωτικών αλλαγών που συμβαίνουν στις πρωτεΐνες καθώς αλληλεπιδρούν με διαφορετικά συστατικά των συμπλεγμάτων (Miller *et al.*, 2003b).

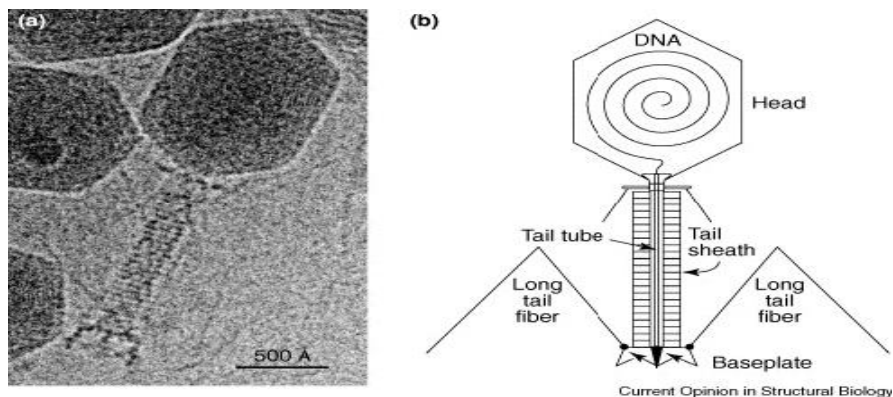


Εικόνα 3: Ηλεκτρονικές μικροσκοπίες βακτηριοφάγου T4 (Miller *et al.*, 2003b)

1.3.2. Ο βακτηριοφάγος KVP40

Ο DNA μεταβολισμός του βακτηριοφάγου KVP40 είναι αρκετά παρόμοιος με το μεταβολισμό του βακτηριοφάγου T4 αλλά έχει κάποιες μικρές σημαντικές διαφορές, ενώ σημαντικές είναι και οι διαφορές στη μορφολογία τους όπως για παράδειγμα το μήκος της κεφαλής τους. Ο KVP40 είναι λιγότερο αποτελεσματικός από τον T4 στην υδρόλυση του DNA του ξενιστή. Από πρακτική άποψη, ο KVP40 (Εικόνα 4) μπορεί να είναι ένας

αποτελεσματικός φάγος σε ένα μεγάλο εύρος ξενιστών (Miller *et al.*, 2003a). Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι μολύνει οκτώ είδη *Vibrio* (Matsuzaki *et al.*, 1992). Ο KVP40 έχει εξωνουκλεάσες που κωδικοποιούνται από συγκεκριμένα γονίδια, τα οποία μπορεί να έχουν πολλαπλές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της αποικοδόμησης του DNA του ξενιστή και του αναδιπλασιασμού και του ανασυνδυασμού στο DNA του φάγου. Ο KVP40 κωδικοποιεί τα περισσότερα από τα χαρακτηρισμένα ένζυμα για μετατροπές τριφωσφορικού δεοξυνουκλεοσιδίου και σύνθεση πυριμιδίνης, ενώ σε αντίθεση με τον T4, δεν τροποποιεί την κυτοσίνη σε υδρόξυ μεθυλιωμένη κυτοσίνη. Στον KVP40, το σύμπλεγμα των γονιδίων αντιγραφής είναι μία από τις δύο εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές που είναι σχεδόν ταυτόσημες με εκείνες στο γονιδίωμα του T4. Τα γονίδια που διανέμονται σε όλο το γονιδίωμα του KVP40 κωδικοποιούν ένζυμα που εμπλέκονται άμεσα στην αντιγραφή DNA και έχουν χαρακτηριστεί καλά στον T4. Πολλά από αυτά έχουν αλληλεπικαλυπτόμενους ρόλους στον ανασυνδυασμό και στην επιδιόρθωση του DNA (Miller *et al.*, 2003a). Λόγο των διαφορών που έχει στα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια σε σχέση με τον T4 και επομένως στη βιοχημεία του κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, έχει δημιουργηθεί μια ξεχωριστή κλάση για τους KVP40-like βακτηριοφάγους, η “schizoT4 like” (Lavigne *et al.*, 2009).



Εικόνα 4: a) Ηλεκτρονική μικροσκοπία βακτηριοφάγου KVP40 και b) η μορφολογία του (Rossmann *et al.*, 2004)

1.3.3. Ο βακτηριοφάγος *phiKZ*

Ο βακτηριοφάγος *phiKZ* του *Pseudomonas aeruginosa* είναι αντιπροσωπευτικός των γιγάντιων φάγων που χαρακτηρίζονται από ασυνήθιστα μεγάλα ιοσωμάτια και γονιδιώματα. Το γονιδίωμα του, μεγέθους 280 kb που κωδικοποιεί 369 γονίδια και που ομαδοποιούνται σε 134 οπερόνια είναι από τα μεγαλύτερα γονιδιώματα φάγων που έχουν

αλληλουχηθεί. Έχει την ικανότητα να μπορεί να ολοκληρώσει τη μόλυνση του βακτηριακού κυττάρου ελλείψει της βακτηριακής RNA πολυμεράσης (RNAP), ενζυμικής δραστηριότητας (Ceyssens *et al.*, 2014). Συγκεκριμένα η RNAP του ξενιστή δεν φαίνεται να συνεισφέρει σημαντικά στην έκφραση των γονιδίων του *φKZ*, καθώς η μόλυνση του φάγου προχωρά κανονικά παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ριφαμπίνης. Οι βακτηριακές RNAP έχουν βασικό ρόλο στη διάρκεια της μόλυνσης των βακτηριακών κυττάρων από τους βακτηριοφάγους. Οι περισσότεροι γνωστοί φάγοι δεν κωδικοποιούν δική τους RNAP, αλλά επαναπρογραμματίζουν τον μηχανισμό μεταγραφής του ξενιστή. Ο βακτηριοφάγος *φKZ* απαιτεί τον μεταφραστικό αλλά όχι τον μεταγραφικό μηχανισμό του ξενιστή του. Η πρώτη μεταγραφή δεν απαιτεί τη σύνθεση πρωτεϊνών υποδεικνύοντας ότι όλοι οι καθοριστικοί παράγοντες της πρώτης μεταγραφής παρέχονται από το ιοσωμάτιο. Η μεταγραφή των μεσαίων και όψιμων υποκινητών απαιτεί τη σύνθεση πρωτεϊνών του φάγου (Ceyssens *et al.*, 2014).

1.3.4. Η οικογένεια Siphoviridae

Είναι η μεγαλύτερη οικογένεια βακτηριοφάγων και περιλαμβάνει μέλη που μολύνουν τα βακτήρια και αρχαία. Σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV) για το 2016 σε αυτή την οικογένεια υπάρχουν 94 γένη και 460 είδη. Έχουν μακριές, λεπτές μη συσταλτές ουρές, και εκπροσωπούνται από τις ομάδες 936, P335 και c2 οι οποίες αντιπροσωπεύουν περίπου το 80, 10 και 5% αντίστοιχα (Spinelli *et al.*, 2014). Η κεφαλή (πρωτεϊνικό έλυτρο) των φάγων είναι εικοσάεδρη με διάμετρο 60 nm και περιέχει 72 καψομερή. Το γονιδίωμα περιλαμβάνει περίπου 70 γονίδια και έχει συνεκτικά άκρα. Το DNA αντιγράφεται ή ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή. Σημαντικοί ξενιστές τους αποτελούν τα γένη *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Mycobacterium*, *Streptococcus* (King *et al.*, 2012).

1.4. Εφαρμογές για τον βιολογικό έλεγχο των παθογόνων βακτηρίων

1.4.1. Προϊόντα βακτηριοφάγων για ανθρώπινη χρήση

Η διεθνής βιβλιογραφία περιέχει αρκετές εκατοντάδες αναφορές σχετικά με τη χρήση των φάγων για θεραπευτικούς σκοπούς στον άνθρωπο, με τις περισσότερες από τις δημοσιεύσεις να είναι από ερευνητές της ανατολικής Ευρώπης και της πρώην Σοβιετικής Ένωσης και λιγότερες από ερευνητές άλλων χωρών (Abdul-Hassan *et al.*, 1990; Lang *et*

al., 1979; Vieu *et al.*, 1979). Κατά τη διάρκεια της μακράς ιστορίας της χρήσης αυτής των φάγων, στην ανατολική Ευρώπη και την πρώην Σοβιετική Ένωση (και στις Ηνωμένες Πολιτείες πριν από την αντιβιοτική εποχή), οι φάγοι χορηγήθηκαν στον άνθρωπο με πολλούς τρόπους χωρίς ουσιαστικές αναφορές για σοβαρές επιπλοκές που συνδέονται με τη χρήση τους. Για παράδειγμα στη Γεωργία, τοπικές λοιμώξεις αντιμετωπίζονται με ένα σκεύασμα που απελευθερώνει αντιβιοτικά και λυτικούς βακτηριοφάγους έναντι των *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* και *Proteus spp.* (Markoishvili *et al.*, 2002).

Οι βακτηριοφάγοι όμως επί του παρόντος δεν κατατάσσονται στην ιατρική νομοθεσία, δεδομένου ότι δεν είναι ούτε ζωντανοί ούτε χημικοί παράγοντες. Συνεπώς, η ρύθμιση και η διεξαγωγή κλινικών δοκιμών και η εμπορευματοποίηση των προϊόντων των βακτηριοφάγων παραμένει μία πολύπλοκη διαδικασία (Fauconnier, 2017). Για να εξασφαλιστεί η αποτελεσματικότητα των παρασκευασμάτων φάγου, πρέπει να παρακολουθείται και να ενημερώνεται συνεχώς τόσο η αποτελεσματικότητά τους όσο και το φάσμα των ξενιστών τους σε σχέση με τα νεοεμφανιζόμενα παθογόνα στελέχη. Συγκεκριμένα τα παρασκευάσματα φάγου τα οποία έχουν εγκριθεί στη Ρωσική Ομοσπονδία και τη Γεωργία ενημερώνονται διαρκώς προκειμένου να στοχεύσουν στα νέα παθογόνα στελέχη που προκύπτουν (Kutter *et al.*, 2010). Δύσκολο παραμένει να καθοριστεί το καθεστώς των παρασκευασμάτων και πιο συγκεκριμένα το εάν θα θεωρηθούν βιομηχανικά φαρμακευτικά προϊόντα (υπόκεινται σε περιορισμούς που σχετίζονται με την άδεια κυκλοφορίας) ή παρασκευάσματα κύριας παραγωγής (παρασκευασμένα στα φαρμακεία) (Commission de la santé publique, de l'environnement et du renouveau de la société, 2016). Στις 26 Οκτωβρίου 2016 συμφωνήθηκε ότι οι βακτηριοφάγοι και τα προϊόντα τους, που δεν συμμορφώνονται πλήρως με τις απαιτήσεις της ευρωπαϊκής οδηγίας για τα φαρμακευτικά προϊόντα ανθρώπινης χρήσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τους φαρμακοποιούς ως πρώτες ύλες (δραστικά συστατικά) σε φαρμακευτικά παρασκευάσματα.

1.4.2. Εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και περιβαλλοντικές εφαρμογές

Οι βακτηριοφάγοι χρησιμοποιούνται από τη δεκαετία του 1980 για τον έλεγχο και την εξάλειψη των παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα που αλλοιώνουν τα τρόφιμα και προκαλούν γαστρεντερικές παθήσεις (Garcia *et al.*, 2008), καθώς και για την απολύμανση ακατέργαστων τροφίμων. Λόγω της ιδιαιτερότητάς τους, οι βακτηριοφάγοι είναι

ελκυστικοί στην εξυγίανση έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων όπως το γάλα, τα λαχανικά και τα προϊόντα κρέατος (Endersen *et al.*, 2014). Από το 2016, το τμήμα γεωργίας των ΗΠΑ (United States Department Of Agriculture, USDA) καθώς και ο οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) έχουν εγκρίνει διάφορα προϊόντα με φάγους με στόχο τα βακτήρια *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella spp.* κ.α. Έτσι, διάφορα προϊόντα σχεδιάστηκαν με στόχο την απολύμανση με ψεκασμό του δέρματος των βοοειδών πριν από τη σφαγή προκειμένου να περιοριστεί η μόλυνση (Goodridge & Abedon, 2008). Άλλα προϊόντα αναπτύχθηκαν για τον έλεγχο της βακτηριακής κηλίδωσης σε φυτά ντομάτας και πιπεριού που προκαλούνται από τα *Xanthomonas campestris* και *Pseudomonas syringae* (Monk *et al.*, 2010). Ενώ τέλος κάποια άλλα σχεδιάστηκαν για την εξάλειψη των παθογόνων βακτηρίων σε τρόφιμα που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο μόλυνσης.

Τα κατάλληλα ανεπτυγμένα παρασκευάσματα μπορούν επίσης να είναι ανεκτίμητα για την εξάλειψη ή τη σημαντική μείωση των επιπέδων στοχευμένων βακτηρίων σε συγκεκριμένες περιβάλλοντα. Συγκεκριμένα δύναται να χρησιμεύουν ως απολυμαντικά στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων, στο χώρο εργασίας και στον εξοπλισμό αλλά και στο χώρο των νοσοκομείων για τη μείωση των λοιμώξεων που προκαλούνται από τα παθογόνα βακτήρια και ιδιαίτερα από βακτήρια που εμφανίζουν ανθεκτικότητα. Μία σειρά από προϊόντα αναπτύχθηκαν για την απολύμανση και την προστασία των εγκαταστάσεων επεξεργασίας τροφίμων (και συνεπώς των ίδιων των τροφίμων) από τα παθογόνα *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* και *E. coli*. Για παράδειγμα, οι φάγοι των βακτηρίων του γένους *Listeria* (3.5×10^8 PFU / ml), ήταν εξίσου αποτελεσματικοί με ένα διάλυμα 20-ppm ενώσεων τεταρτοταγούς αμμωνίου που χρησιμοποιείται ως απολυμαντικό (Roy *et al.*, 1993).

1.4.3. Εφαρμογές στην κτηνιατρική

Η πρώτη γνωστή θεραπευτική χρήση των φάγων στην κτηνιατρική σχετίζεται με τον Felix d' Herelle - στη Γαλλία το 1919 για την πρόληψη και τη θεραπεία μολύνσεων από *Salmonella spp.* στα κοτόπουλα (Sulakvelidze & Barrow, 2005). Οι φάγοι μείωσαν αποτελεσματικά τη θνησιμότητα στα κοτόπουλα, γεγονός που ώθησε άλλους ερευνητές να εξετάσουν την πιθανή χρησιμότητά τους στην πρόληψη και τη θεραπεία άλλων βακτηριακών λοιμώξεων στα ζώα. Οι φάγοι σήμερα αποτελούν μία ασφαλή και αποτελεσματική μέθοδο πρόληψης και θεραπείας κατά των πολυάριθμων βακτηριακών

λοιμώξεων των ζώων που προκαλούνται από *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (Miller *et al.*, 2010).

Η αποτελεσματικότητα των βακτηριοφάγων στα παθογόνα βακτήρια εξαρτάται από τις οικολογικές και περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα από τη μικροβιακή κοινότητα ή από τους αβιοτικούς παράγοντες. Αυτό θα μπορούσε να έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της δραστηριότητας των φάγων και τη θανάτωση των παθογόνων βακτηρίων, με τη παρουσία μη παθογόνων βακτηρίων τα οποία θα επιβάλλουν ισχυρό ανταγωνισμό στους διαθέσιμους πόρους. Πρόσφατα άλλωστε αποδείχθηκε ότι η παρουσία του βακτηρίου *Bacillus amyloliquefaciens* θα μπορούσε να διαμορφώσει τη δράση του βακτηριοφάγου στο παθογόνο των φυτών *Ralstonia solanacearum* (Wang *et al.*, 2016). Ο εντοπισμός των βακτηριοφάγων που εντείνουν τη μολυσματικότητα των παθογόνων με δέσμευση σε διάφορες επιφανειακές δομές, μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την επιλογή των θεραπευτικών βακτηριοφάγων (Buttimer *et al.*, 2017). Στα ζώα, όταν η χρήση γίνεται τοπικά ή δια του στόματος, οι βακτηριοφάγοι σχετίζονται με το δέρμα και το τρίχωμα των ζώων (Patten *et al.*, 1995).

1.5. Κοκτέιλ βακτηριοφάγων (phage cocktail)

Ο χαρακτηρισμός των βακτηριοφάγων φυλογενετικά και βιοχημικά είναι μία απαραίτητη διαδικασία η οποία προηγείται της εφαρμογής τους, για τον έλεγχο του πληθυσμού συγκεκριμένου βακτηριακού παθογόνου. Η αιτία γι' αυτό είναι ο υψηλός βαθμός φαινοτυπικής και γονοτυπικής ποικιλομορφίας εντός των πληθυσμών και των φάγων και των βακτηρίων (Stenholm *et al.*, 2008). Η επιλογή λυτικών φάγων για τον έλεγχο πολύ διαφορετικών βακτηριακών στελεχών είναι ιδιαιτέρως δύσκολη επειδή οι φάγοι συνήθως εμφανίζουν εξειδίκευση στα διάφορα βακτηριακά στελέχη. Αυτό οδηγεί στην ανάγκη δημιουργίας συνδυασμού διαφορετικών βακτηριοφάγων (phage cocktail) (περισσότεροι του ενός) καθώς και στη χρήση αυτού για τον περιορισμό του βακτηριακού πληθυσμού (Nakai, 2010). Επιπλέον με τη χρήση κοκτέιλ φάγων δύναται να καθυστερήσει ή ακόμη και να αποτραπεί η εμφάνιση της ανθεκτικότητας του βακτηρίου έναντι στους φάγους. Σύμφωνα με τους Chan *et al.*, (2013), λιγότερο περίπλοκα κοκτέιλ, για παράδειγμα, δύο έως δέκα διαφορετικοί βακτηριοφάγοι, πιθανώς αποτελούν την καλύτερη επιλογή. Όταν υπάρχουν πολλοί φάγοι σε ένα κοκτέιλ ο αντίκτυπος σε μη στοχευόμενα βακτήρια, είναι μεγάλος αν και στις περισσότερες περιπτώσεις είναι μικρότερος από αυτόν που αναμένεται

από τα αντιβιοτικά (Chan *et al.*, 2013). Σε αυτή την περίπτωση το κόστος αυξάνεται σημαντικά ενώ υπάρχει και η περίπτωση ο ανασυνδυασμός μεταξύ των φάγων να δημιουργήσει νέες ιδιότητες στον ξενιστή (Essoh *et al.*, 2013). Έχοντας πλέον στη διάθεσή μας αρκετή πληροφορία σχετικά με την βιοχημεία που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της μόλυνσης (De Smet *et al.*, 2017), κατανοούμε σιγά σιγά ότι υπάρχει αρκετά μεγάλη διαφορά στους μηχανισμούς δράσης των βακτηριοφάγων, εντός του κυττάρου ανάλογα με τον κλάδο στον οποίο ανήκουν. Αυτό έχει σαν φυσική συνέπεια να σκεφτούμε ότι η ανθεκτικότητα που αναπτύσσεται πιθανά εμφανίζει εξειδίκευση για κάθε κλάδο των βακτηριοφάγων και ότι ένα κοκτέιλ θα πρέπει να αποτελείται από βακτηριοφάγους που ανήκουν σε διαφορετικούς κλάδους. Συγκεκριμένα, σε μοντέλο ποντικού με κερατίτιδα οφειλόμενη στο *Pseudomonas Aeruginosa*, η χορήγηση τόσο ενός μόνο φάγου όσο και ενός κοκτέιλ φάγων κατέστειλαν τη βακτηριακή λοίμωξη και εμπόδισαν την κερατίτιδα (Furusawa *et al.*, 2016). Σε αντίθεση με τις συμβατικές μεθόδους, όπως τα αντιβιοτικά τα οποία διατηρούσαν την επάρκεια στη συγκέντρωση του φαρμάκου για 30 λεπτά, οι φάγοι εμφάνισαν ένα αποτέλεσμα αυτο-δοσολόγησης στη λοίμωξη. Επιπλέον, όταν οι φάγοι συνδυάστηκαν σε κοκτέιλ, είχαν εκτεταμένο εύρος ξενιστών και μείωσαν την εμφάνιση των ανθεκτικών βακτηρίων στους φάγους, βελτιώνοντας έτσι σημαντικά την έκβαση της νόσου (Furusawa *et al.*, 2016). Αυτό επιβεβαιώθηκε και σε ένα μοντέλο ποντικού με έγκαιμα, στο οποίο δεν παρατηρήθηκε αντίσταση μετά από 72 ώρες έναντι του κοκτέιλ που χρησιμοποιήθηκε, το οποίο αποτελούνταν από τρεις φάγους (McVay *et al.*, 2007).

1.6. Βιολογικός έλεγχος των παθογόνων στην υδατοκαλλιέργεια

Η χρήση των φάγων στην πρόληψη της μόλυνσης ή στην αδρανοποίηση των διαφορετικών βακτηριακών παθογόνων των ψαριών είναι καλά τεκμηριωμένη (Nakai *et al.*, 1999; Park & Nakai, 2003; Crothers-Stomps *et al.*, 2010; Merino *et al.*, 1990; Munro *et al.*, 2003; Stevenson & Airdrie, 1984; Wu *et al.*, 1981). Πειράματα σε μοντέλα θαλάσσιων ζώων έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητα της χρήσης αυτής κατά των ασθενειών που προκαλούνται από τα βακτήρια *Pseudomonas aeruginosa*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Enterococcus seriolicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas plecoglossicida* και *Lactococcus garvieae*. Ορισμένα από τα ζωικά μοντέλα περιλαμβάνουν το ψάρι *Seriola quinqueradiata*, τις προνύμφες της γαρίδας *Penaeus monodon*, του ψάρι *Plecoglossus altivelis*, τον σολομό *Salmo salar*, την ιριδίτσουσα πέστροφα *Oncorhynchus mykiss*, το λαβράκι *Dicentrarchus labrax* και την τσιπούρα *Sparus aurata* (Higuera *et al.*, 2013;

Karunasagar *et al.*, 2007; Nakai & Park 2002; Nakai *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000; Park & Nakai, 2003; Shivu *et al.*, 2007; Vinod *et al.*, 2006). Η χρήση των φάγων για τον έλεγχο των βακτηριακών ασθενειών στην υδατοκαλλιέργεια έχει αναφερθεί στα ακτινοπετερίδια (Nakai & Park, 2002; Park & Nakai, 2003; Park *et al.*, 2000) και στις γαρίδες (Karunasagar *et al.*, 2007; Vinod *et al.*, 2006) και τα αποτελέσματα είναι ελπιδοφόρα. Αυτές οι μελέτες έχουν αποδείξει τη δυνατότητα συγκεκριμένων φάγων να ελέγχουν σημαντικά τον πληθυσμό των παθογόνων και σε ορισμένες περιπτώσεις, να μειώνουν τη θνησιμότητα των ψαριών.

Στην υδατοκαλλιέργεια, ο βιολογικός έλεγχος των παθογόνων βακτηρίων με τη χρήση των φάγων μπορεί να εφαρμοστεί προληπτικά έναντι των βακτηριακών λοιμώξεων στις προνύμφες, πριν την απελευθέρωσή τους στις δεξαμενές, βελτιώνοντας έτσι τη συνολική παραγωγή των ενήλικων ψαριών και τη βιωσιμότητα της ιχθυοκαλλιέργειας. Οι προνύμφες των ψαριών διατηρούνται στα εκκολαπτήρια μαζί με τα αυγά επώασης και τα θραύσματα αυτών, με αποτέλεσμα την αύξηση έως και 1000 φορές του αριθμού των βακτηρίων στο νερό της καλλιέργειας (Hansen & Olafsen, 1989). Τα βακτήρια εισέρχονται στο πεπτικό σύστημα στις προνύμφες προτού ξεκινήσει η ενεργός τροφοδοσία μέσω του λεκιθικού σάκου (Olafsen, 2001). Οι μεγαλύτερες προνύμφες μπορούν επίσης να καταπιούν βακτήρια από τα αιωρούμενα σωματίδια και τα θραύσματα των αυγών (Beveridge *et al.*, 1991; Olafsen, 1984; Olafsen & Hansen, 1992).

Στις προνύμφες, οι φάγοι μπορούν να χορηγηθούν στην τροφή είτε χρησιμοποιώντας βακτήρια ως φορείς (μολυσμένα με φάγους), είτε με την άμεση απελευθέρωση τους στο νερό της καλλιέργειας (Almeida *et al.*, 2009; Nakai *et al.*, 1999). Η χρήση βακτηρίων ως φορείς θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μια προστατευτική μέθοδος προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι τα σωματίδια φάγου θα μεταφερθούν απευθείας στο μολυσμένο ιστό χωρίς να υποστούν οποιαδήποτε αλλοίωση. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι αυτή η μέθοδος δεν ενισχύει την προστασία των φάγων (Nakai *et al.*, 1999). Με την άμεση απελευθέρωση των φάγων στο νερό της καλλιέργειας οι αντιμικροβιακές τους ιδιότητες εξαρτώνται από τη σταθερότητα τους στο νερό καθώς και από την ικανότητά τους να φθάνουν στους πάσχοντες ιστούς με παθητική διάχυση. Κατά συνέπεια, λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τις ιδιότητες και τη συμπεριφορά του επιλεγμένου φάγου είναι απαραίτητες. Η επιλογή του κατάλληλου βακτηριοφάγου, το στάδιο της ζωής των ψαριών (αυγά, προνύμφες, νεαρά ή ενήλικα άτομα) κατά τη διάρκεια των οποίων θα γίνει η χρήση των φάγων καθώς και ο τρόπος με τον οποίο θα εφαρμοστεί είναι οι καθοριστικοί παράγοντες για την

επιτυχία του βιολογικού ελέγχου. Το μέγεθος της έκρηξης του φάγου (αριθμός φάγων που παράγεται από κάθε κύτταρο ξενιστή) και η λανθάνουσα περίοδος (ο χρόνος από την είσοδο του ιού στο κύτταρο μέχρι την απελευθέρωση των πρώτων απογόνων) είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη όταν επιλέγονται φάγοι. Οι φάγοι με υψηλά μεγέθη έκρηξης και σύντομη λανθάνουσα περίοδο είναι πιο αποτελεσματικοί για την αδρανοποίηση των βακτηρίων. Ωστόσο, τα μεγάλα μεγέθη έκρηξης συσχετίζονται με μια μακρά λανθάνουσα περίοδο (Abedon *et al.*, 2001) η οποία καθιστά δύσκολη την επιλογή για βιολογικό έλεγχο.

Η συντριπτική πλειοψηφία των δημοσιεύσεων επικεντρώνεται στην απομόνωση και τον χαρακτηρισμό φάγων ικανών να μειώσουν τη βιομάζα των βακτηριακών παθογόνων των διαφόρων ειδών *in vitro*. Μεγάλη είναι η ανάγκη για μελέτες *in vivo* προκειμένου να αποδειχθούν πλήρως τα πλεονεκτήματα της χρήσης των φάγων ως μέτρο ελέγχου για την αντίσταση που εμφανίζεται στα αντιβιοτικά. Επίσης για την επιτυχή εφαρμογή του βιολογικού ελέγχου στην αντιμετώπιση της δονακίωσης απαιτείται λεπτομερής κατανόηση των αλληλεπιδράσεων φάγου-ξενιστή τόσο σε μορφές πλακτονικές όσο και σε βιοφίλμ.

1.7. Οι υδατοκαλλιέργειες στον κόσμο

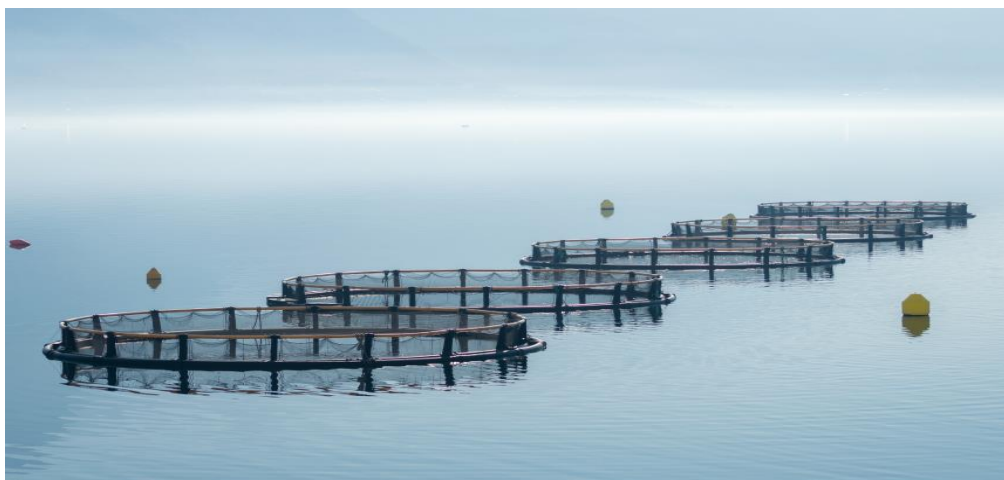
Η **υδατοκαλλιέργεια** σύμφωνα με τον ορισμό του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO), είναι η εκτροφή των υδρόβιων οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των ιχθύων, μαλακίων, καρκινοειδών και υδρόβιων φυτών. Η εκτροφή υπαινίσσεται κάποιο είδος επέμβασης στη διαδικασία ανάπτυξης για την ενίσχυση της παραγωγής, όπως η συχνή εισροή ζωικού κεφαλαίου, η διατροφή, η προστασία από θηρευτές κ.α. Η εκτροφή επίσης υπαινίσσεται ατομική ή εταιρική ιδιοκτησία του ζωικού κεφαλαίου που εκτρέφεται (FAO, 1988).

Η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί έναν αναπτυσσόμενο κλάδο με στόχο την κάλυψη των αναγκών του παγκόσμιου πληθυσμού και την αντιμετώπιση της συνεχούς μείωσης των αλιευτικών αποθεμάτων. Σήμερα αντιπροσωπεύει το 50% των παγκόσμιων ιχθύων που χρησιμοποιούνται για κατανάλωση (FAO, 2016). Απαιτεί συνεχή έρευνα με επιστημονική και τεχνολογική ανάπτυξη και προώθηση της καινοτομίας (Toranzo *et al.*, 2005). Οι υδατοκαλλιέργειες συμβάλλουν στην προστασία των φυσικών υδάτινων πόρων σε τοπικό επίπεδο, δημιουργούν θέσεις εργασίας, παρέχουν δυνατότητες παραγωγής ανταγωνιστικών προϊόντων με εξαγωγικό ενδιαφέρον, προσφέρουν πρόσθετα αλιευτικά προϊόντα στην

κατανάλωση, αλλά και προϊόντα φαρμακευτικού ενδιαφέροντος, ενώ ταυτόχρονα δημιουργούν και σταθερές πηγές πρόσληψης πρωτεϊνών για το μέλλον (Παπουτσόγλου, 1997).

Περίπου 567 είδη υδρόβιων ειδών εκτρέφονται σήμερα σε ολόκληρο τον κόσμο, αντιπροσωπεύοντας έναν πλούτο γενετικής ποικιλότητας τόσο εντός όσο και μεταξύ των ειδών. Η κατανάλωση ψαριών αποτελεί μέρος της παράδοσης της διατροφής πολλών ανθρώπων ενώ ταυτόχρονα τα συστατικά που περιέχουν τα καθιστούν πολύτιμη τροφή. Αποτελούν μια καλή πηγή πρωτεϊνών, βιταμινών, λιπαρών οξέων και μεταλλικών στοιχείων όπως ο φώσφορος το ασβέστιο και το μαγνήσιο (FAO, 2016).

Η παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιέργειας για το 2014 ήταν 80,1 εκατομμύρια τόνοι και η αξία της 158,1 δισ. δολάρια. Συγκεκριμένα αποτελείται από 49,8 εκατ. τόνους ψαριού (99,2 δισ. δολάρια), 16,1 εκατ. τόνους μαλακίων (19 δισ. δολάρια), 6,9 εκατ. τόνους καρκινοειδών (36,2 δισ. δολάρια) και 7,3 εκατ. τόνους άλλων υδρόβιων οργανισμών (3,7 δισ. δολάρια) (FAO, 2016).



Εικόνα 5: Μονάδα θαλάσσιας υδατοκαλλιέργειας (EMODnet, 2016)

1.8. Οι υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα

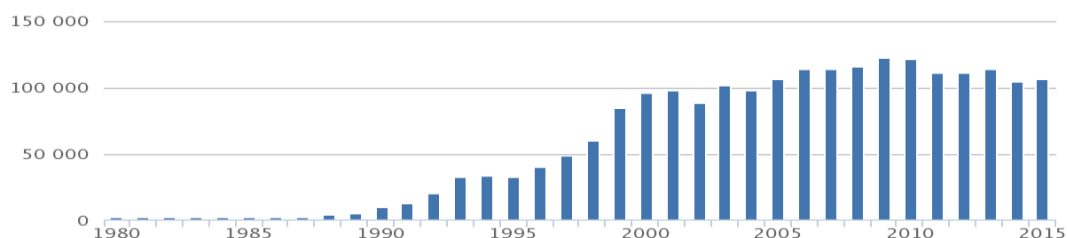
Η υδατοκαλλιέργεια είναι ο ταχύτερα αναπτυσσόμενος αλιευτικός τομέας στην Ελλάδα και θεωρείται μία από τις σημαντικότερες δραστηριότητες με ελπίδα για ανάκαμψη της εθνικής οικονομίας. Οι κυριότεροι παράγοντες είναι οι ευνοϊκές περιβαλλοντικές και κλιματολογικές συνθήκες, η μεγάλη διαθεσιμότητα κατάλληλων περιοχών, η μακρόχρονη

εμπειρία και η επιστημονική τεχνογνωσία, οι υπάρχουσες υποδομές και το εξειδικευμένο ανθρώπινο δυναμικό. (FAO, 2018b).

Η Ελλάδα σήμερα κατέχει σημαντική θέση στην παραγωγή ψαριών παγκοσμίως ενώ μέχρι το 2008 κατείχε την πρώτη θέση στην Ευρώπη (Εικόνα 6). Η ελληνική υδατοκαλλιέργεια κυριαρχείται από την εκτροφή θαλάσσιων ιχθύων σε κλωβούς ανοικτής θαλάσσης, ειδικά από τη τσιπούρα και το λαβράκι με συνολική παραγωγική ικανότητα περίπου 110.000 τόνων για το 2015. Ακολουθεί η εκτροφή μυδιών με ετήσια παραγωγική ικανότητα έως και 35-40.000 τόνους για το 2015. Η παραγωγή νεαρών ατόμων, έφθασε τα 421 εκατομμύρια γόνους το 2014, εκ των οποίων το 98 % ήταν λαβράκι και τσιπούρα και το 2 % ήταν είδη δευτερεύουσας σημασίας (πχ. φαγκρί). Τα είδη των γλυκών υδάτων και η εκτεταμένη υδατοκαλλιέργεια λιμνοθάλασσας έχουν περιορισμένο αναπτυξιακό δυναμικό, κυρίως λόγω της έλλειψης διαθεσιμότητας φυσικών πόρων όπως το νερό και τα αποθέματα (Εικόνα 7), (FAO, 2018b).

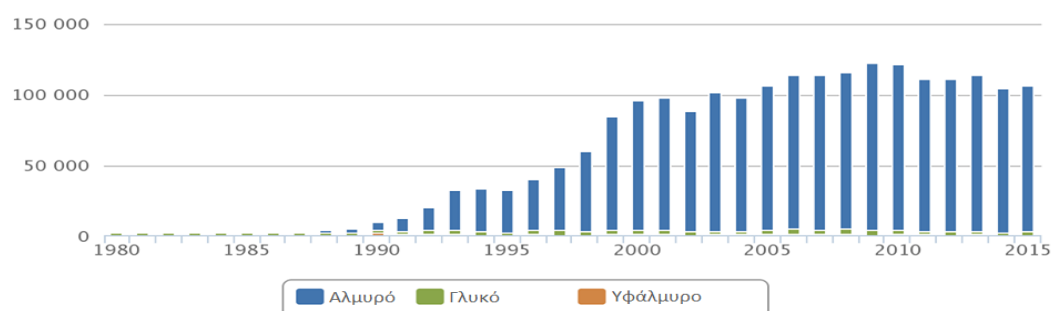
Το θαλάσσιο ψάρι είναι το κορυφαίο ελληνικό εξαγόμενο ζωικό προϊόν και συμβάλλει περίπου στο 11% των συνολικών εθνικών γεωργικών εξαγωγών (οι οποίες μαζί αντιπροσωπεύουν το 19% των συνολικών ελληνικών εξαγωγών). Μετά από πολλές κρίσεις κυρίως λόγω ανισορροπίας μεταξύ προσφοράς και ζήτησης, ο τομέας των θαλάσσιων ιχθύων έχει αναδιαρθρωθεί, με σκοπό τον διπλασιασμό της παραγωγής του έως το 2030. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος, οι στρατηγικές περιλαμβάνουν: στοχευμένη έρευνα, ανάπτυξη και καινοτομίες για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής, διαφοροποίηση των προϊόντων και οι σχετικές ενέργειες μάρκετινγκ μέσω της ανάπτυξης νέων συστημάτων (FAO, 2018b).

Συνολική παραγωγή υδατοκαλλιέργειας (τόνοι) στην Ελλάδα



Εικόνα 6: Συνολική παραγωγή υδατοκαλλιέργειας (τόνοι) στην Ελλάδα (FAO, 2018a).

Παραγωγή υδατοκαλλιέργειας (τόνοι) στην Ελλάδα σε αλμυρό, γλυκό και υφάλμυρο νερό



Εικόνα 7: Παραγωγή υδατοκαλλιέργειας (τόνοι) στην Ελλάδα σε αλμυρό, γλυκό και υφάλμυρο νερό (FAO, 2018a).

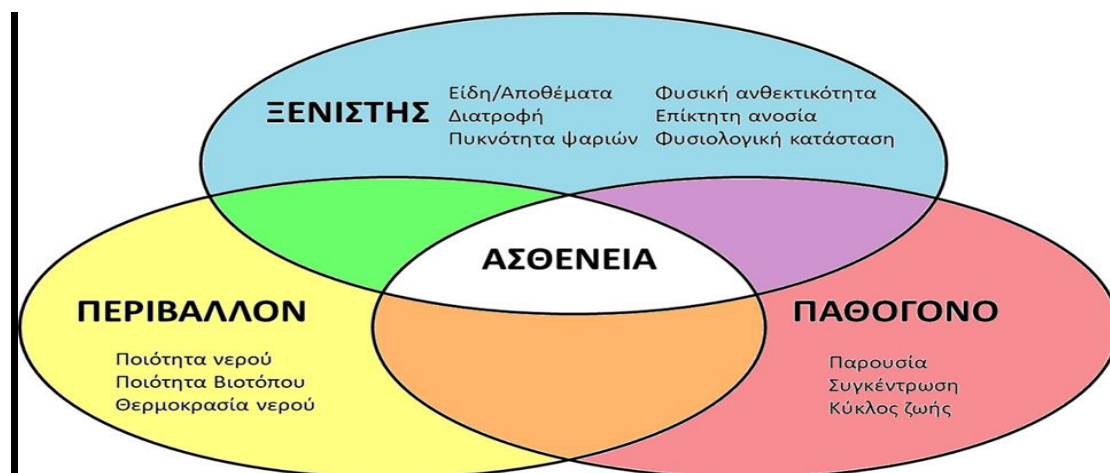
1.9. Βακτηριακές λοιμώξεις και υδατοκαλλιέργειες

Τα ψάρια είναι ζώα ιδιαίτερα ευπαθή, τόσο σε ασθένειες όσο και στις αλλαγές των περιβαλλοντολογικών τους συνθηκών (Moeller, 2001). Η εμφάνιση και η ανάπτυξη της ασθένειας στα ψάρια είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ παθογόνου, ξενιστή και του περιβάλλοντός του (Εικόνα 8) (Toranzo *et al.*, 2005).

Τα περισσότερα βακτήρια και μύκητες που προκαλούν τέτοια προβλήματα, υπάρχουν έτσι κι αλλιώς μέσα στο νερό σαν μέρος της φυσικής χλωρίδας και πανίδας του, χωρίς να είναι παθογόνα. Στο φυσικό περιβάλλον επιφέρουν σπάνια τη θνησιμότητα. Σε συνθήκες όμως αιχμαλωσίας όταν συμβούν κάποιες αλλαγές στις συνθήκες του νερού (θερμοκρασίας, pH, κ.λπ.) ή στις συνθήκες εκτροφής (εντατικοποίηση της παραγωγής, υψηλή ιχθυοφόρτιση και καταπόνηση) δημιουργείται στρες στα ψάρια με αποτέλεσμα να γίνονται ευάλωτα σε τέτοιες παθήσεις (Toranzo *et al.*, 2005). Άλλες διεργασίες που συμβάλλουν στην εκδήλωση των ασθενειών στις υδατοκαλλιέργειες είναι το διεθνές εμπόριο των ψαριών και των αλιευτικών προϊόντων, η κλιματική αλλαγή και η ανταλλαγή παθογόνων μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων πληθυσμών η οποία όμως είναι και αναπόφευκτη. Τα παθογόνα μπορούν να εξαπλωθούν στη στήλη του νερού μεταξύ των κλωβών ή των δεξαμενών μέσα σε μία μονάδα υδατοκαλλιέργειας αλλά και μεταξύ των μονάδων. Έτσι, η υδατοκαλλιέργεια παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον για την ύπαρξη, την εμφάνιση, την εγκατάσταση και τη μετάδοση των παθογόνων (Murray & Peeler, 2005).

Η αρχική διάγνωση της ασθένειας περιλαμβάνει την παρατήρηση των εξωτερικά εμφανών συμπτωμάτων (δύσκολη εξαιτίας των παρόμοιων συμπτωμάτων που παρουσιάζουν οι περισσότερες από τις ασθένειες των ψαριών). Έτσι, όταν αργήσει να διαγνωστεί δυσκολεύει την αντιμετώπιση της ασθένειας. Η τελική διάγνωση περιλαμβάνει τη λήψη δειγμάτων από τους οργανισμούς, την καλλιέργεια τους, την χρώση και την μικροσκοπική μελέτη των παθογόνων μικροοργανισμών. Αφού προσδιοριστεί το είδος του παθογόνου, ακολουθεί η θεραπεία (Moeller, 2001). Σύμφωνα με τη Haenen (2017), οι σημαντικότερες βακτηριακές ασθένειες στην υδατοκαλλιέργεια το 2016 προκλήθηκαν από: α) gram(-) βακτήρια του γένους *Vibrio*, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Flavobacterium* και β) gram(+) βακτήρια του γένους *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Renibacterium*.

Οι ασθένειες στις υδατοκαλλιέργειες δημιουργούν σοβαρά οικονομικά ή περιβαλλοντικά προβλήματα. Οι σοβαρές οικονομικές επιπτώσεις προκύπτουν εξαιτίας της μείωσης της παραγωγής των εκτρεφόμενων ειδών ή της αύξησης του κόστους παραγωγής (θάνατος οργανισμών ή αλλοίωση της ποιότητας σε μικρό ή μεγάλο βαθμό μεταβάλλοντας και την εμπορευσιμότητα του προϊόντος). Ενώ οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις από την αλληλεπίδρασή τους με τους άγριους πληθυσμούς (Murray & Peelerb, 2005). Προληπτικά μέτρα απαιτούνται για τον περιορισμό του κινδύνου εμφάνισης και εξάπλωσης των ασθενειών προκειμένου να διασφαλιστεί ότι η υδατοκαλλιέργεια είναι οικονομικά αποτελεσματική και να προκαλεί ελάχιστες επιπτώσεις στο περιβάλλον (Murray & Peelerb, 2005).



Εικόνα 8: Παράγοντες που επηρεάζουν την εκδήλωση των ασθενειών στα ψάρια (Toranzo *et al.*, 2005).

1.10. Αντιβιοτικά στις υδατοκαλλιέργειες

Τα αντιβιοτικά είναι χημειοθεραπευτικά φάρμακα τα οποία αναστέλλουν ή εξαλείφουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες ή πρωτόζωα (Kümmerer, 2009). Δρουν είτε παρεμποδίζοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, είτε προκαλώντας διαταραχές στη λειτουργία της πλασματικής μεμβράνης είτε παρεμβαίνοντας σε αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του γενετικού υλικού είτε αναστέλλοντας τον μεταβολισμό των μικροοργανισμών (Γκούβας, 1986). Είναι μη-τοξικά για τον ξενιστή και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών σε ανθρώπους, ζώα και φυτά. Κάποια αντιβιοτικά μεταβολίζονται περισσότερο και κάποια λιγότερο τόσο από τους ανθρώπους όσο και από τα ζώα (Kümmerer & Henninger, 2003). Τα ψάρια δεν μεταβολίζουν αποτελεσματικά τα αντιβιοτικά με αποτέλεσμα τη μεταφορά τους το περιβάλλον μέσω περιττωμάτων. Συγκεκριμένα το 75% των αντιβιοτικών με το οποίο τροφοδοτούνται τα ψάρια εκκρίνεται στο νερό (Burridge *et al.*, 2010).

Στην υδατοκαλλιέργεια, τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται κυρίως για θεραπευτικούς σκοπούς καθώς και προληπτικά (Serrano, 2005). Αρχικά, στον αναπτυσσόμενο τομέα των υδατοκαλλιεργειών υπήρξαν πολλά κρούσματα ασθενειών, καθώς τα άγρια είδη διατηρήθηκαν για πρώτη φορά σε αιχμαλωσία. Η θεραπεία με αντιβιοτικά ήταν εξαιρετικά επιτυχημένη σε επίπεδο αύξησης της απόδοσης και αποφυγής περισσότερο δαπανηρών στρατηγικών ελέγχου των ασθενειών. Δυστυχώς η εντατικοποίηση στην παραγωγή έχει προωθήσει την ανάπτυξη πολλών βακτηριακών λοιμώξεων, που οδηγούν στην αύξηση της χρήσης αντιμικροβιακών ουσιών (Defoirdt *et al.*, 2011). Τα αντιβιοτικά τα οποία είναι εγκεκριμένα για χρήση στην υδατοκαλλιέργεια είναι τα oxytetracycline, florfenicol, premix, sarafloxacin, erythromycin sulphonamides ενισχυμένα με trimethoprim ή ormethoprim (Serrano, 2005). Η ποσότητα και το είδος των αντιβιοτικών και των άλλων ενώσεων που χρησιμοποιούνται στην υδατοκαλλιέργεια διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των χωρών (Burridge *et al.*, 2010).

Τα αντιβιοτικά στα ψάρια χορηγούνται κυρίως ως συστατικό της τροφής τους, και περιστασιακά με εμβάπτιση και ενέσεις (Markestad & Grave, 1997; Sørum, 2006). Τα υπολείμματα τροφής και τα περιττώματα των ψαριών που περιέχουν αντιβιοτικά περνούν στο ίζημα στο κάτω μέρος των κλωβών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα αντιβιοτικά να διαχέονται στο ίζημα και στη στήλη του νερού και να μεταφέρονται μέσω ρευμάτων ακόμα και σε απομακρυσμένες περιοχές όπου καταναλώνονται και από διάφορους άλλους

οργανισμούς (Hektoen *et al.*, 1995; Kerry *et al.*, 1996; Coyne *et al.*, 1997; Holten *et al.*, 1999; Guardabassi *et al.*, 2000; Sørum, 2000; Sørum & L'Abée-Lund, 2002; Boxall *et al.*, 2004; Sørum, 2006). Τα εναπομείναντα αντιβιοτικά παραμένουν στο ίζημα, τροποποιούν τη σύνθεση της μικροχλωρίδας του ιζήματος και ευνοούν την ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων αλλά και αυξάνουν την ανθεκτικότητα των παθογόνων των ψαριών στα αντιβιοτικά (Kruse & Sørum, 1994; Hektoen *et al.*, 1995; Davison, 1999; Miranda *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Sørum, 2006). Η αντοχή αυτή στα αντιβιοτικά έχει τη δυνατότητα να μεταδίδεται με οριζόντια μεταφορά γονιδίων σε βακτήρια του χερσαίου περιβάλλοντος, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπινων και ζωικών παθογόνων (Kruse & Sørum, 1994; Sandaa & Enger, 1994; L'Abée-Lund & Sørum, 2001; Sørum, 2006).

Ένα άλλο πρόβλημα που δημιουργείται από την υπερβολική χρήση αντιβιοτικών στην υδατοκαλλιέργεια είναι η παρουσία υπολειμμάτων αντιβιοτικών στα εμπορικά προϊόντα (Grave *et al.*, 1996; 1999; Goldberg *et al.*, 2001; Cabello, 2003; 2004; Angulo *et al.*, 2004; Sørum, 2006). Τα μη ανιχνεύσιμα αντιβιοτικά που καταναλώνονται μέσω των προϊόντων αυτών έχουν ως αποτέλεσμα την αλλοίωση της φυσιολογικής χλωρίδας (ευαισθησία σε βακτηριακές λοιμώξεις με βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά) όπως και προβλήματα αλλεργιών και τοξικότητας (Grave *et al.*, 1996; 1999; Alderman & Hastings, 1998; McDermot *et al.*, 2002; Greenlees, 2003; Cabello, 2004; Salyers *et al.*, 2004). Μπορεί επίσης να δημιουργηθεί αλλεργία στα αντιβιοτικά και προβλήματα τοξικότητας και στους εργαζόμενους στον κλάδο της υδατοκαλλιέργειας με τη χρήση μεγάλων ποσοτήτων αντιβιοτικών που έρχονται σε επαφή (Grave *et al.*, 1996; 1999; Lillehaug *et al.*, 2003).

Για τους παραπάνω λόγους υπάρχει η ανάγκη διερεύνησης αιφώρων, καινοτόμων προσεγγίσεων σε όλους τους τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας, οι οποίες θα εξασφαλίσουν πως η χρήση των αντιβιοτικών δεν θα είναι αλόγιστη. Μία από αυτές τις εναλλακτικές προσεγγίσεις είναι και ο βιολογικός έλεγχος των παθογόνων βακτηρίων με τη χρήση βακτηριοφάγων, που ειδικά στην υδατοκαλλιέργεια φαίνεται να αποτελεί μία σοβαρά υποψήφια προσέγγιση για περισσότερη έρευνα και ανάπτυξη.

1.11. Το δονάκιο (*Vibrio* sp.) στο θαλάσσιο περιβάλλον / Μολυσματικότητα

Τα βακτήρια του γένους *Vibrio* της οικογένειας Vibrionaceae (Εικόνα 9) είναι Gram αρνητικοί βάκιλλοι, μικρού μεγέθους, διαμέτρου 0.5-0.8 μm και μήκους 1.4-2.6 μm με έντονη κινητικότητα λόγω των μαστιγίων που διαθέτουν. Ως προς τις απαιτήσεις τους σε

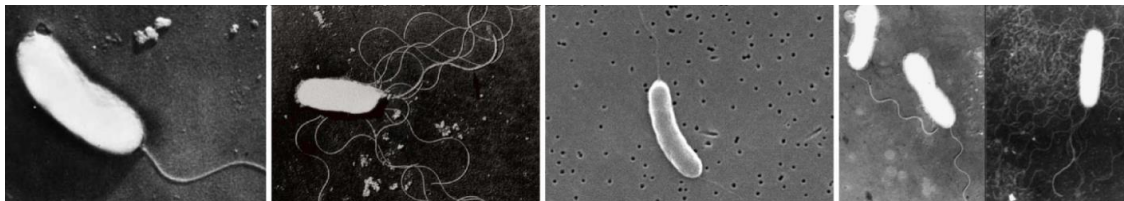
οξυγόνο, είναι δυνητικά αναερόβια και επίσης, δεν έχουν την δυνατότητα απονιτροποίησης (Farmer *et al.*, 2005). Στη πλειοψηφία τους οι οικολογικές θέσεις που καταλαμβάνουν συνδέονται με την προσκόλληση σε ζωντανούς οργανισμούς, που τους παρέχουν προστασία και θρεπτικά συστατικά (Simidu *et al.*, 1971; Hollants *et al.*, 2013). Ωστόσο, εμφανίζονται και ως ελεύθερα κύτταρα στη στήλη του νερού (Froelich *et al.*, 2013; Lyons *et al.*, 2007). Βρίσκονται σε αφθονία σε παράκτιες περιοχές αλλά και στις εκβολές των ποταμών (Austin, 2010). Ο χρόνος επιβίωσης τους είναι περίπου 10 ώρες, η δε μολυσματική τους δόση αρκετά υψηλή (10^6 - 10^{11}) (Μαυρίδου & Παπαπετροπούλου, 1995). Η μεταβολή στη συνολική αφθονία των *Vibrio* στη στήλη του νερού σχετίζεται με τις μεταβολές σε θερμοκρασία και αλατότητα (Takemura *et al.*, 2014; Thompson *et al.*, 2004). Συγκεκριμένα η υψηλή θερμοκρασία ενισχύει σημαντικά την ανάπτυξη τους ενώ η διαρκής αύξηση στη θερμοκρασία της επιφάνειας της θάλασσας προωθεί μια μακροπρόθεσμη αύξηση της αφθονίας των *Vibrio* (Vezzulli *et al.*, 2015; 2016). Δεν απομονώνονται σε θερμοκρασίες κάτω των 13-15 °C (Μαυρίδου & Παπαπετροπούλου, 1995).

Η σχετικά υψηλή αφθονία τους στο θαλασσινό νερό (που συχνά φθάνει τα 10^3 - 10^4 κύτταρα / ml) καθώς και η βιομάζα τους (Yooseph *et al.*, 2010), τα καθιστούν σημαντικούς παράγοντες στους θαλάσσιους βιογεωχημικούς κύκλους. Τα βασικά χαρακτηριστικά τους είναι (α) η ικανότητά τους να επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε συνθήκες με περιορισμένα θρεπτικά συστατικά (Ramaiah *et al.*, 2002; Armada *et al.*, 2003), (β) η ικανότητά τους να διατηρούν υψηλή περιεκτικότητα ριβοσωμάτων, το οποίο τα βοηθά να επιτύχουν γρήγορη ανάκαμψη μόλις οι πηγές άνθρακα είναι διαθέσιμες (Flardh *et al.*, 1992; Kramer & Singleton, 1992; Eilers *et al.*, 2000) και γ) η χημειοτακτική απόκριση τους στην εύρεση θρεπτικών ουσιών (Yu *et al.*, 1993; Gosink *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2004; Grimes *et al.*, 2009).

Στο θαλασσινό νερό υπάρχουν 2 κατηγορίες *Vibrio*. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει **αυτόχθονους** μικροοργανισμούς του θαλάσσιου περιβάλλοντος. Για παράδειγμα, το *Vibrio parahaemolyticus* το οποίο προκαλεί γαστρεντερίτιδες μετά από κατανάλωση οστρακοειδών ή επιμολύνσεις τραυμάτων μετά από επαφή με το θαλασσινό νερό (φυσική μικροχλωρίδα του εντέρου διαφόρων θαλάσσιων ζώων) και το *Vibrio alginolyticus* το οποίο προκαλεί ωτίτιδες και λοιμώξεις τραυμάτων μετά από επαφή με το θαλασσινό νερό και τα ιζήματα. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει **αλλόχθονους** μικροοργανισμούς του θαλάσσιου περιβάλλοντος με μολυσματικό χαρακτήρα προερχόμενοι των αποβλήτων. Για

παράδειγμα το *Vibrio cholerae* που προκαλεί χολέρα και τα NAG *Vibrio* (Non agglutinable) τα οποία προκαλούν γαστρεντερίτιδες μετά από κατανάλωση μολυσμένων οστρακοειδών (Μαυρίδου & Παπαπετροπούλου, 1995). Τα *Vibrio* εμφανίζουν παγκόσμια εξάπλωση και κάποια είδη μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τόσο τον άνθρωπο όσο και τις διάφορες χρήσεις των οικοσυστημάτων, όπως για παράδειγμα τις υδατοκαλλιέργειες (Pruzzo *et al.*, 2005). Περισσότερα από 80 είδη έχουν περιγραφεί και τουλάχιστον 12 από αυτά είναι παθογόνα του ανθρώπου, με σημαντικότερα εξ' αυτών τα *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* (Oliver *et al.*, 2013; Plaza *et al.*, 2018).

Στα ψάρια, τα *Vibrio* εισέρχονται μέσω του δέρματος όταν έρχεται σε επαφή με τα βακτήρια που υπάρχουν στο νερό και μέσω του πεπτικού σωλήνα, μετά από κατάποση βακτηρίων που υπάρχουν στο νερό (Muroga & De La Cruz, 1987; Kanno *et al.*, 1989; Spanggaard *et al.*, 2000) αλλά και μέσω των πτερυγίων και των βραγχίων (Toranzo & Barja, 1993). Κύριο εμπόδιο στη εισβολή των *Vibrio* είναι η βλέννα που καλύπτει το δέρμα, προστατεύοντας έτσι το ψάρι. Τα *Vibrio* μπορούν επίσης να εκμεταλλευτούν πληγές που έχουν προκληθεί στο δέρμα από άλλα παράσιτα και να εισέλθουν στον οργανισμό προκαλώντας δευτερογενείς λοιμώξεις (Rodgers & Burke, 1988).



Εικόνα 9: Ηλεκτρονική μικροσκοπία (από αριστερά προς δεξιά) *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*. Παρατηρούνται τα πολικά μαστίγια τα οποία προσδίδουν στα βακτήρια έντονη κινητικότητα (Farmer *et al.*, 2005).

1.12. Το βακτήριο *Vibrio alginolyticus*

Το *Vibrio alginolyticus* (Εικόνα 10) είναι ένα από τα πιο συχνά είδη βακτηρίων που απαντώνται στο θαλάσσιο περιβάλλον (σε νερό και ιζήματα) με μεγάλη γεωγραφική κατανομή το οποίο έχει συνδεθεί με ασθένειες στα υδρόβια ζώα αλλά και στους ανθρώπους, προκαλώντας βλάβες στους ιστούς στο δέρμα, στο αυτί και στα εσωτερικά όργανα (Sabir *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2008; Scheftel *et al.*, 2006). Το *V. alginolyticus* είναι επίσης ένα από τα πιο συχνά είδη που απαντώνται στις θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες

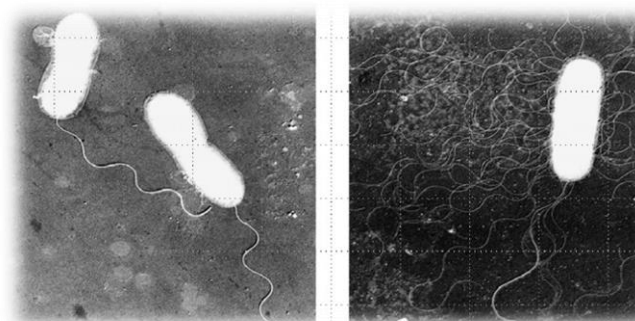
(Skjermo & Vadstein, 1993; Villamil *et al.*, 2003). Θεωρείται σημαντικό οπορτουνιστικό παθογόνο που μολύνει θαλάσσια ασπόνδυλα όπως το *Penaeus monodon* (Lee *et al.*, 1996) και το *Macrobrachium rosenbergii* (Jayaprakash *et al.*, 2006) αλλά και σπονδυλωτά (Kong *et al.*, 2015; Gomez-Gil *et al.*, 2014), ιδιαίτερα επειδή εισβάλλει στους ήδη κατεστραμμένους ιστούς (Austin & Austin, 2012; Balebona *et al.*, 1998).

Η αύξηση της συγκέντρωσής του επηρεάζεται κυρίως από την αύξηση της θερμοκρασίας με τις μέγιστες συγκεντρώσεις να παρουσιάζονται τις θερμότερες εποχές (Sabir *et al.*, 2011). Η αλατότητα είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου που μπορεί να επιβιώσει το χειμώνα και ο πολλαπλασιασμός του να ξαναρχίσει όταν οι θερμοκρασίες φτάσουν τουλάχιστον στους 15 ° C (Su & Liu, 2007). Προσαρμόζεται γρήγορα στις αλλαγές του περιβάλλοντος (Fischer Le Saux *et al.*, 2002) και δύναται να επιβιώσει ακόμη και υπό συνθήκες στρες εξαιτίας της έλλειψης θρεπτικών διατηρώντας ταυτόχρονα τις ιδιότητές του (Ben Kahla-Nakbi *et al.*, 2007). Αναπτύσσεται σε αλκαλικό pH μεταξύ 7,5 και 9, σε υψηλή συγκέντρωση NaCl, και δεν παρεμποδίζεται από την προσθήκη διαφόρων αναστολέων όπως το κιτρικό νάτριο και το θειοθειικό νάτριο (Sabir *et al.*, 2013).

Σημαντικές είναι οι αναφορές για θνησιμότητα σε μεγάλο αριθμό εκτρεφόμενων οργανισμών ιδιαίτερα στην τσιπούρα *Sparus aurata*, ιδιαίτερα κατά τα πρώτα στάδια της ζωής οφειλόμενη στο *V. alginolyticus* (Colorni *et al.*, 1981; Balebona *et al.*, 1998; Zorilla *et al.*, 2003; Akayli *et al.*, 2008; Varvarigos, 2007). Το *V. alginolyticus* μόνο του, ή σε συνέργεια με άλλα βακτήρια όπως το *Aeromonas hydrophila*, αποτελεί τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα της εντεροπάθειας στις προνύμφες και μειώνει τα ποσοστά επιβίωσης (Varvarigos, 2007).

Στις υδατοκαλλιέργειες το *V. alginolyticus* εισέρχεται στο σύστημα μέσω ζωντανής τροφής (*Artemia* και *Rotifers*) η οποία χορηγείται στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια των ψαριών (Snoussi *et al.*, 2006; Prol-García *et al.*, 2010; Munro *et al.*, 1993). Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ως το κυρίαρχο μέλος της βακτηριακής κοινότητας της καλλιεργούμενης *Artemia* (Villamil *et al.*, 2003; Snoussi *et al.*, 2006; Thomson *et al.*, 2005; Høj *et al.*, 2009). Οι ζωντανές τροφές συσσωρεύουν βακτηρίδια από τη στήλη του νερού και στη συνέχεια μεταφέρουν παθογόνες ουσίες στις εγκαταστάσεις όπου πραγματοποιείται η εκκόλαψη (Goulden *et al.*, 2013). Το *V. alginolyticus* έχει βρεθεί ότι είναι πιο άφθονο στο έντερο υγείων προνυμφών των ψαριών από ό, τι σε εκείνα τα οποία νοσούν

(Tanasomwang & Muroga, 1988; Grisez *et al.*, 1997), γεγονός που υποδηλώνει ότι το είδος αυτό προστατεύει τις προνύμφες των ψαριών από τον αποικισμό παθογόνων βακτηρίων.



Εικόνα 10: Ηλεκτρονική μικροσκοπία του *Vibrio alginolyticus* σε υγρό και στερεό υπόστρωμα αντίστοιχα (Farmer *et al.*, 2005).

1.13. Η περίπτωση της δονακίωσης

Η δονακίωση είναι μια συστηματική βακτηριακή ασθένεια θαλάσσιων και ευρύαλων ψαριών, που έχει παρατηρηθεί όμως και σε είδη γλυκών νερών. Είναι μία από τις πιο συχνές ασθένειες των ψαριών που οφείλεται στα βακτήρια του γένους *Vibrio* (Gomez-Gil *et al.*, 2014). Αποτελούν μέρος της φυσικής χλωρίδας του εντέρου και του δέρματος των ψαριών (Sera & Ishida, 1972; Yoshimizu & Kimura, 1976). Ορισμένα από τα είδη *Vibrio* που εμπλέκονται στη δονακίωση είναι τα *V. alginolyticus* (Colorni *et al.*, 1981; Bordas *et al.*, 1998), *V. anguillarum* (Toranzo *et al.*, 1983), *V. harveyi* (Lunder *et al.*, 1995), *V. ordalii* (Schiewe *et al.*, 1981), *V. salmonicida* (Egidius *et al.*, 1986), *V. Splendidus* (Pazos *et al.*, 1993) και *V. vulnificus* (Muroga *et al.*, 1976). Τα *V. anguillarum* και *V. salmonicida* εμφανίζονται ως κύρια παθογόνα, ενώ τα άλλα είδη φιλοξενούν ορισμένα μολυσματικά στελέχη που επηρεάζουν τους οργανισμούς υπό την πίεση των συνθηκών που επικρατούν αλλά και ανάλογα με την κατάσταση στην οποία οι οργανισμοί βρίσκονται (Gomez-Gil *et al.*, 2014).

Τα παθογόνα *Vibrio* συνδέονται με οξείες βακτηριακές σηψαιμίες ή χρόνιες εστιακές βλάβες (Hjeltnes & Roberts, 1993). Τα συμπτώματα της δονακίωσης είναι παρόμοια με αυτά άλλων βακτηριακών παθήσεων. Στα αρχικά στάδια παρατηρείται λήθαργος και απώλεια ορέξεως. Με την πρόοδο της ασθένειας το δέρμα αποχρωματίζεται, κοκκινίζει και νεκρώνεται. Φουσκάλες μπορούν να εμφανιστούν στο σώμα, που κατά περιπτώσεις

περνούν μέσα από το δέρμα δημιουργώντας ανοιχτές πληγές. Ερυθρές κηλίδες αίματος εμφανίζονται συχνά γύρω από τα πτερύγια και το στόμα (Εικόνα 11). Όταν η ασθένεια γίνει συστημική (όταν περνούν στο πεπτικό σύστημα), μπορεί να έχουμε εξωφθαλμώση και υγρό και αίμα στην κοιλιά του ψαριού (Moeller, 2001). Όλα αυτά τα συμπτώματα μπορούν να προκληθούν και από άλλες βακτηριακές παθήσεις και δεν είναι απόδειξη της προσβολής από *Vibrio* (Rucker, 1963). Η διάγνωση της δονακίωσης στα ψάρια βασίζεται στην απομόνωση και στον προσδιορισμό του είδους *Vibrio* από τα σπλάχνα (π.χ. ήπαρ ή νεφρό) πρόσφατα θανατωμένων ψαριών (Gomez-Gil *et al.*, 2014).

Τα *Vibrio* αποτελούν μείζονος σημασίας πρόβλημα για την υδατοκαλλιέργεια στα θαλάσσια, στα παράκτια ύδατα και στα ύδατα στις εκβολές των ποταμών. Μερικά είδη όπως το *V. anguillarum*, έχουν σχεδόν παγκόσμια διανομή ενώ άλλα επικεντρώνονται σε ψυχρότερα όπως το *V. salmonicida* ή σε θερμότερα περιβάλλοντα όπως το *V. damsela*. Λόγω του ότι προκαλούν το θάνατο των καλλιεργούμενων οργανισμών σε μεγάλη κλίμακα, μεγάλη είναι η προσπάθεια που έχει καταβληθεί για την ανάπτυξη κατάλληλων διαγνωστικών μέτρων καθώς και μέτρων ελέγχου. Έτσι, αναπτύχθηκε και ένα ευρύ φάσμα σύγχρονων μοριακών διαγνωστικών μεθόδων αλλά και μέτρων ελέγχου όπως η χρήση εμβολίων (Austin & Austin, 2016) καθώς και η χορήγηση προβιοτικών, ανοσοδιεγερτικών και βιταμινών. Η θεραπεία της δονακίωσης γίνεται με τη χορήγηση κατάλληλων αντιβιοτικών (Higuera *et al.*, 2013).



Εικόνα 11: Δονακίωση στο λαβράκι *Dicentrarchus labrax* (αρχείο Δρ. Παντελής Καθάριος)

1.14. Στόχος της εργασίας

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι να γίνει συγκριτική λυτική διερεύνηση θαλάσσιων βακτηριοφάγων που δυνητικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν ένα κοκτέιλ φάγων κατά του οπορουνιστικού παθογόνου των ψαριών *Vibrio alginolyticus*. Για τον στόχο αυτό δημιουργήθηκε ένα κοκτέιλ βακτηριοφάγων που έχουν ήδη απομονωθεί στο εργαστήριο μοριακής βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και έχουν χαρακτηριστεί φυλογενετικά και βιοχημικά με σύγχρονες μοριακές τεχνικές (Kalatzis *et al.*, 2016; Skliros *et al.*, 2015; Διδακτορική Διατριβή Δημητρίου Γ. Σκληρού, 2018).

Μετά τη δημιουργία και την εφαρμογή του κοκτέιλ μελετήθηκε με ποσοτική αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (QPCR) το μέγεθος του πληθυσμού κάθε βακτηριοφάγου, πληροφορία που θα συμβάλλει στην κατανόηση των φαινομένων ανταγωνιστικότητας, ανθεκτικότητας και πιο αποδοτικής βιοχημικής στρατηγικής και εν τέλει σε δυνητικά καλύτερο βιολογικό έλεγχο των παθογόνων στους ιχθυοκλωβούς.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

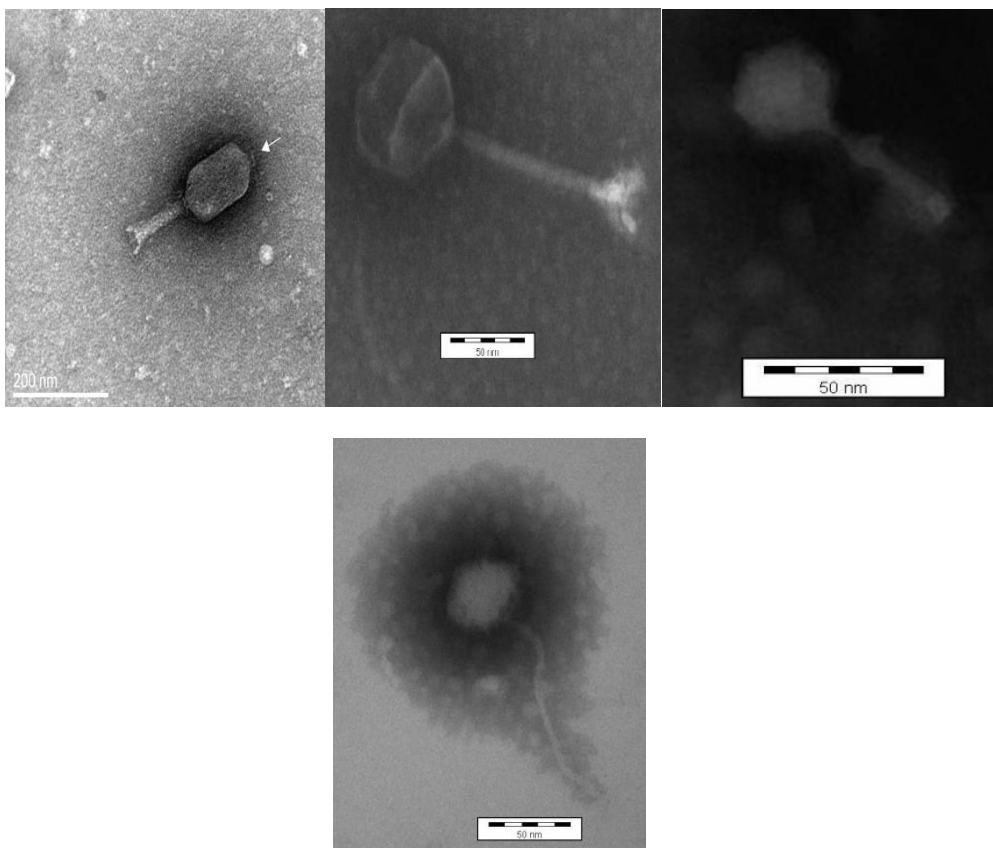
Προκειμένου να γίνει συγκριτική λυτική διερεύνηση των θαλάσσιων βακτηριοφάγων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν ένα κοκτέιλ φάγων κατά του οπορτουνιστικού παθογόνου των ψαριών *Vibrio alginolyticus*, τέσσερις βακτηριοφάγοι επιλέχθηκαν. Οι βακτηριοφάγοι αυτοί έχουν ήδη απομονωθεί στο εργαστήριο μοριακής βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και έχουν χαρακτηριστεί φυλογενετικά και βιοχημικά με σύγχρονες μοριακές τεχνικές (Kalatzis *et al.*, 2016; Skliros *et al.*, 2015; Διδακτορική διατριβή Δημητρίου Σκληρού, 2018). Και οι τέσσερις είναι λυτικοί έναντι του *V. alginolyticus* στελέχους V1.

Οι βακτηριοφάγοι *φSt2* (KT919973), *Aphrodite1* (MG720308), *Athena1* (MG640035) και ο *Ares1* (MG720309), (Εικόνα 12) που επιλέχθηκαν ανήκουν στην τάξη των *Caudovirales* στις οικογένειες *Myoviridae* και *Siphoviridae* (με δίκλωνο DNA) και διαφέρουν αρκετά ως προς την λυτική στρατηγική κατά τη διάρκεια της μόλυνσης του βακτηριακού κυττάρου η οποία εξαρτάται από την γονιδιακή δεξαμενή που διαθέτουν. Ταυτόχρονα έχουν επιλεγεί ανάλογα και με το μέγεθος του γονιδιώματός τους. Το μέγεθος της έκρηξης τους καθώς και ο χρόνος απορρόφησης τους δείχνει την καταλληλότητα της χρήσης τους για βιολογικό έλεγχο των παθογόνων. Δοκιμές *in vitro* έδειξαν ότι μπορούν να καταστείλουν τους πληθυσμούς των βακτηρίων για τουλάχιστον 8 ώρες μετά τη μόλυνση, αποδεικνύοντας ότι αυτοί οι φάγοι δύναται να αποτελούν ένα ισχυρό "όπλο" εναντίον των παθογόνων *Vibrio* στις υδατοκαλλιέργειες. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά των τεσσάρων βακτηριοφάγων

Βακτηριο-φάγοι	Οικογένεια	Μήκος κεφαλής	Μήκος ουράς	Λανθάνουσα περίοδος	Μέγεθος έκρηξης	Χρόνος απορρόφησης κατά 95%
<i>φSt2</i>	<i>Myoviridae</i>	138 nm	132 nm	30 λεπτά	97 φάγοι/βακτήριο	15 λεπτά
<i>Aphrodite1</i>	<i>Myoviridae</i>	65 nm	125 nm	80 λεπτά	65 φάγοι/βακτήριο	12 λεπτά
<i>Athena1</i>	<i>Myoviridae</i>	30 nm	52,5 nm	30 λεπτά	70φάγοι/βακτήριο	3 λεπτά

Ares1	<i>Siphoviridae</i>	41 nm	135 nm	30 λεπτά	17 φάγοι/ βακτήριο	6 λεπτά
--------------	---------------------	-------	--------	----------	-----------------------	---------



Εικόνα 12: Μορφολογία των ιοσωματίων των βακτηριοφάγων έπειτα από παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Από αριστερά προς τα δεξιά: *φSt2* (Kalatzis *et al.*, 2016), *Aphrodite1*, *Athena1*, *Ares1*, (Διδακτορική διατριβή Δημητρίου Σκληρού, 2018).

2.2. Θρεπτικά υποστρώματα και μικροβιολογικές τεχνικές

2.2.1. Θρεπτικά υποστρώματα

Τα τρία θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του *Vibrio alginolyticus* είχαν την ίδια σύσταση σε θρεπτικά αλλά διαφορετική πυκνότητα (Higuera *et al.*, 2013) (Πίνακας 3).

Συγκεκριμένα σε ογκομετρικό κύλινδρο με ποσότητα απιονισμένου νερού (dH₂O) προστίθεται ποσότητα NaCl, Tryptone, Yeast και αλάτων (MgSO₄ και CaCl₂) για την παρασκευή υγρού θρεπτικού υποστρώματος. Ενώ για τη μετατροπή τους σε στερεά προστίθεται και ποσότητα άγαρ, ενός σύνθετου υδατάνθρακα (πολυσακχαρίτη) που

προέρχεται από ορισμένα θαλάσσια φύκη του γένους *Gelidium* (Benson, 1999). Ακολουθεί η ανάδευση και η τοποθέτηση των θρεπτικών υποστρωμάτων σε γυάλινα σκευάσματα (μπουκάλια, κωνικές φιάλες) καθώς και η αποστείρωση αυτών σε κλίβανο στους 121°C για 20 λεπτά απαραίτητα πριν από τη χρήση τους για την καλλιέργεια του βακτηρίου.

Τα άλατα $MgSO_4$ και $CaCl_2$ που προστίθενται στα θρεπτικά υποστρώματα είναι απαραίτητα αρχικά για τον πολλαπλασιασμό των βακτηριοφάγων και μετέπειτα για την υποβοήθηση της μόλυνσης του ξενιστή διότι ενισχύουν την ωσμωτική πίεση εσωτερικά του καψιδίου καθώς απαιτείται μεγάλη διαφορά σε σχέση με το βακτηριακό κυτταρόπλασμα (Jeembaeva *et al.*, 2008; Keynan *et al.*, 1974).

Πίνακας 3: Τύποι θρεπτικών υποστρωμάτων, η σύσταση και η ποσότητα που τους αντιστοιχεί ανά λίτρο.

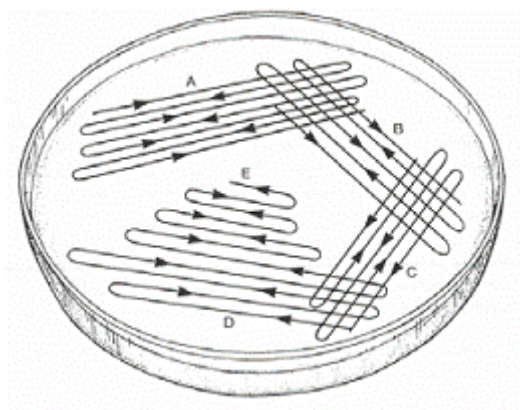
Θρεπτικό υπόστρωμα	Σύσταση	Ποσότητα
Υγρό LB	1% w/v tryptone 1% w/v NaCl 0.5% w/v yeast extract $MgSO_4$ (1 M) $CaCl_2$ (1 M)	10 gr/L NaCl 10 gr/L Tryptone 5 gr/L Yeast 1 ml/L $MgSO_4$ 1ml/L $CaCl_2$
Στερεό άγαρ Solid agar (BOTTOM agar)	1% w/v tryptone 1% w/v NaCl 0.5% w/v yeast extract 1.2% w/v agar $MgSO_4$ (1 M) $CaCl_2$ (1 M)	10 gr/L NaCl 10 gr/L Tryptone 5 gr/L Yeast 12 gr/L agar 1 ml/L $MgSO_4$ 1ml/L $CaCl_2$
Άγαρ κορυφής- ημίρρευστο LB Soft agar (TOP agar)	1% w/v tryptone 1% w/v NaCl 0.5% w/v yeast extract 0.7% w/v agar $MgSO_4$ (1 M) $CaCl_2$ (1 M)	10 gr/L NaCl 10 gr/L Tryptone 5 gr/L Yeast 7 gr/L agar 1 ml/L $MgSO_4$ 1ml/L $CaCl_2$

2.2.2. Βακτηριακή καλλιέργεια

Το βακτήριο *Vibrio alginolyticus* (στέλεχος V1) το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως ξενιστής έχει απομονωθεί από το Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε) στις Γούρνες του Ηρακλείου Κρήτης μετά από επεισόδια δονακίωσης σε καλλιεργούμενες τσιπούρες *Sparus aurata* (οικογένεια *Sparidae*). Το βακτηριακό στέλεχος φυλάσσεται σε θερμοκρασία -80°C σε 20% γλυκερόλη.

Η ανακαλλιέργειά του (στερεή καλλιέργεια) έγινε με τη μέθοδο της επίστρωσης σε γραμμές (streak plate), διαδικασία που επαναλαμβάνονταν κάθε δύο εβδομάδες (φρέσκια καλλιέργεια) (control). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, οι μικροοργανισμοί επιστρώνονται με κρικοφόρο στυλεό (μικροβιολογικός κρίκος ή κρίκος εμβολιασμού) αρχικά στην επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος στην άκρη του τρυβλίου Petri το οποίο περιέχει ~ 10-20 ml στερεό άγαρ. Στη συνέχεια ακολουθούνται τουλάχιστον 3 διαφορετικές κινήσεις (Εικόνα 13), με ενδιάμεση αποστείρωση του κρίκου σε φλόγα, με στόχο την αραιώση και το διαχωρισμό των κυττάρων για τον σχηματισμό μοναδικών αποικιών. Τέλος αφήνονται στον επωαστικό θάλαμο στους 30 °C.

Για την προκαλλιέργεια του βακτηρίου (από στερεή σε υγρή), ποσότητα LB σε Eppendorf με ~1000 μl ή σε Falcon με ~ 5ml εμβολιάζεται με αποικίες βακτηρίου από τη στερεή καλλιέργεια και στη συνέχεια αφήνεται στο Shaker overnight (για 24 ώρες). Για την καλλιέργεια του βακτηρίου (από υγρή σε υγρή), ποσότητα LB σε Falcon με ~ 5-7 ml εμβολιάζεται με ~100-200 μl προκαλλιέργειας και στη συνέχεια αφήνεται στο Shaker για ~1 ώρα (μέχρι η καλλιέργεια να φθάσει στην εκθετική της φάση με την απορρόφηση να είναι ~0,2).

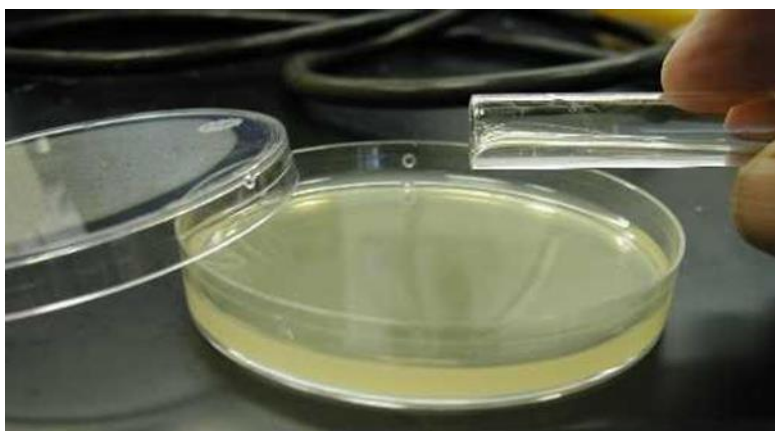


Εικόνα 13: Διαδικασία επίστρωσης με τη χρήση μικροβιολογικού κρίκου (Benson, 1999).

2.2.3. Τεχνική διπλής στιβάδας άγαρ (Double Agar)

Η τεχνική διπλή στιβάδας άγαρ στην οποία ποσότητα καλλιέργειας βακτηρίου αναμειγνύεται με άγαρ κορυφής και απλώνεται σε στέρεο θρεπτικό υπόστρωμα (Εικόνα 14), έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό βακτηριακής χλόης στο τρυβλίο. Χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων όπου μετά και από την

εναπόθεση σταγόνων με συγκεκριμένες αραιώσεις των φάγων στο τρυβλίο και την τοποθέτηση αυτών στον επωαστικό θάλαμο για 16 ώρες, προέκυψαν διακριτές και μετρήσιμες αποικίες χαρακτηριστικές μορφολογικά του κάθε φάγου.

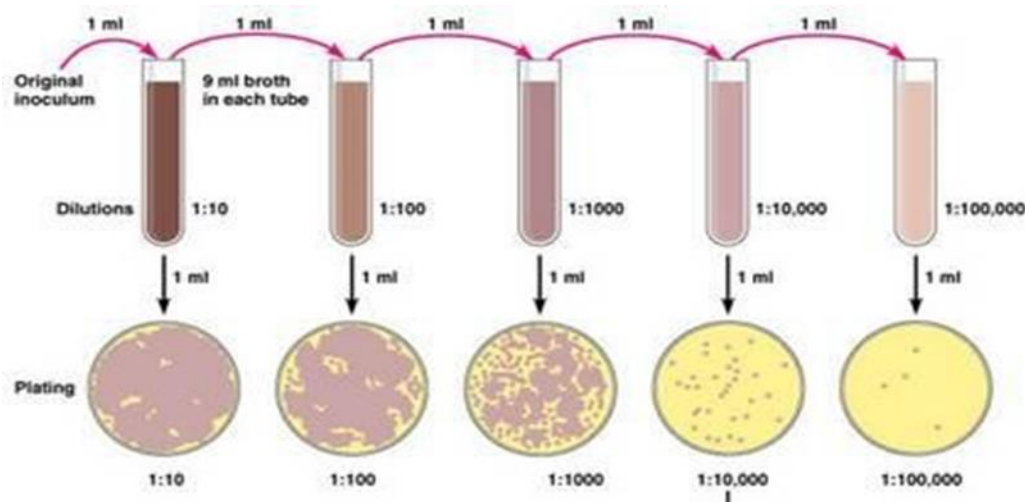


Εικόνα 14: Τεχνική διπλής στιβάδας άγαρ (Fankhauser, 1994).

2.3. Τίτλοδότηση βακτηριοφάγων

Η τίτλοδότηση των βακτηριοφάγων δηλαδή η εύρεση της συγκέντρωσης τους έγινε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Ο τίτλος τους εκφράζεται ως ο αριθμός των λυτικών τους πλακών (Plaque Forming Unit - PFU) ανά ml.

Συγκεκριμένα μετά την προκαλλιέργεια και την καλλιέργεια του βακτηρίου *V. alginolyticus* οι βακτηριοφάγοι προστέθηκαν σε διαφορετικές καλλιέργειες και τοποθετήθηκαν στο shaker overnight για λύση των βακτηρίων. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 9.000 rpm προκειμένου να μείνουν οι βακτηριοφάγοι στο υπερκείμενο. Ακολουθεί το φιλτράρισμα του υπερκείμενου μέσα από φίλτρα διαμέτρου πόρου 0.2 μm προκειμένου να ληφθούν καθαροί και πυκνοί οι βακτηριοφάγοι. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις (Εικόνα 15) των φάγων σε eppendorf των 1,5 ml και η έντονη ανάδευση αυτών (vortex). Συγκεκριμένα επτά αραιώσεις για τον κάθε φάγο: 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} .



Εικόνα 15: Η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων (EPFL, 2017).

Η επίστρωση στα τρυβλία πραγματοποιήθηκε με την τεχνική διπλής στιβάδας άγαρ όπου 50 μ l καλλιέργειας βακτηρίου αναμειγνύονται με άγαρ κορυφής και απλώνονται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Στη συνέχεια 3 σταγόνες των 10 - 20 μ l εναποτέθηκαν με συγκεκριμένες αραιώσεις των φάγων στα τρυβλία τα οποία με τη σειρά τους τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο στους 25 °C για 16 ώρες. Στο τέλος καταμετρήθηκαν οι αρνητικές πλάκες που διακρίνονταν.

2.4. Δημιουργία του κοκτέιλ φάγων (phage cocktail)

Για τη δημιουργία του κοκτέιλ των φάγων κατά του οπορτουνιστικού παθογόνου των ψαριών *V. alginolyticus*, τέσσερις βακτηριοφάγοι επιλέχθηκαν (ϕ St2, Aphrodite1, Athena1, Ares1) λόγω της διαφορετικής τους φυλογένειας. Αρχικά έγινε συγκαλλιέργεια βακτηρίου και βακτηριοφάγων προκειμένου να γίνει λύση των βακτηρίων και να ληφθεί καθαρή ποσότητα και των τεσσάρων βακτηριοφάγων, υψηλής συγκέντρωσης και στη συνέχεια η ακριβής τιτλοδότηση αυτών (Εικόνα 16). Κάθε βακτηριοφάγος περιείχονταν στο τελικό κοκτέιλ με τίτλο 1×10^8 PFU/ml. Όλοι οι φάγοι μαζί στο κοκτέιλ ήταν 4×10^8 PFU/ml.



Εικόνα 16: Ενδεικτική τιτλοδότηση των βακτηριοφάγων. Από αριστερά προς δεξιά Ares1 και Aphrodite1.

2.5. Έλεγχος *in vitro* αποτελεσματικότητας των φάγων

Ο έλεγχος *in vitro* της αποτελεσματικότητας των βακτηριοφάγων ϕ St2, Aphrodite1, Athena1, Ares1 καθώς και του συνδυασμού (κοκτέιλ) των ανωτέρω φάγων έναντι του *V. alginolyticus* πραγματοποιήθηκε σε υγρές βακτηριακές καλλιέργειες με αναλογία βακτηρίων/βακτηριοφάγων MOI = 100. Στόχος ήταν να διαπιστωθεί αν θα περιορίζονταν η ανάπτυξη του *V. alginolyticus* αλλά και για πόσο χρονικό διάστημα. Η συνολική διάρκεια της διαδικασίας ελέγχου της αποτελεσματικότητας ήταν 22 ώρες με τέσσερις επαναλήψεις.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε σε 96 αποστειρωμένες πλάκες πηγαδιών χρησιμοποιώντας τη συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκων TECAN (Infinite PRO 200) που ήταν εφοδιασμένη με έλεγχο θερμοκρασίας. 24 πηγάδια χρησιμοποιήθηκαν για κάθε επανάληψη. Στα πηγάδια μεταφέρθηκε 1 μ l φρέσκιας βακτηριακής καλλιέργειας όταν η οπτική απορρόφηση (optical density σε $\lambda=600\text{nm}$, OD600) ήταν ~ 0.18 . Η πλάκα τοποθετήθηκε στη συσκευή ανάγνωσης και επώαστηκε στους 25 °C με τροχιακή αναδιανομή. Όλοι οι φάγοι αραιώθηκαν σε 10^8 PFU / ml και 1ml αυτών προστέθηκε στα πηγαδάκια όταν OD600=0.4 περίπου 50 λεπτά μετά την 1η μέτρηση. Η καμπύλη ανάπτυξης των καλλιεργειών παρακολουθήθηκε σε πραγματικό χρόνο για 25 ώρες.

2.6. Απομόνωση φαγικού DNA μετά τη συγκαλλιέργεια

Η απομόνωση του γονιδιώματος των βακτηριοφάγων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου εξαγωγής νουκλεϊκών οξέων φαινόλης-χλωροφόρμιου. Μετά από τη συγκαλλιέργεια βακτηρίου και κοκτέιλ βακτηριοφάγων, και τη λύση των βακτηρίων έγινε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε 13000 rpm και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο μέσα από φίλτρα διαμέτρου πόρου 0.2 μm .

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του DNA ήταν το εξής:

- Επώαση για 24 ώρες στους 4 °C 1.6 ml φάγων και 400 μl πολυαιθυλενική γλυκόλη (Polyethylene glycol –PEG) και 10 λεπτά στον πάγο
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 50 min
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl NaCl (150 mM)
- Ένωση 100 μl και 100 μl από 2 tubes = 200 μl κοκτέιλ βακτηριοφάγων
- Προσθήκη 20 μl DNase και 20 μl DNase buffer
- Επώαση για 1-2 ώρες στους 37 °C στο υδατόλουτρο (διάλυση εναπομείναντων βακτηριακών κυττάρων)
- Προσθήκη 20 μl πρωτεάσης K (protease) και 200 μl Buffer AL (για εξαγωγή του DNA) και έντονη ανάδευση (vortex) για 15 δευτερόλεπτα.
- Επώαση για 30 λεπτά στους 56 °C στο υδατόλουτρο (Η protease υδρολύει την DNase)
- Προσθήκη 200 μl Ethanol 100% , ανάδευση και μεταφορά στις στήλες
- Φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό απορρίπτοντας αυτό που πέρασε από τις στήλες
- Προσθήκη 500 μl AW1 και φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό
- Προσθήκη 500 μl AW2 και φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 3 λεπτά
- Απόρριψη αυτού που πέρασε από τις στήλες και φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό
- Τοποθέτηση στήλης στο eppendorf
- Προσθήκη 25 μl dd H₂O και φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό
- Μέτρηση απορρόφησης στο σπεκτροφωτόμετρο (Nanodrop)
- Αποθήκευση στους 4 °C

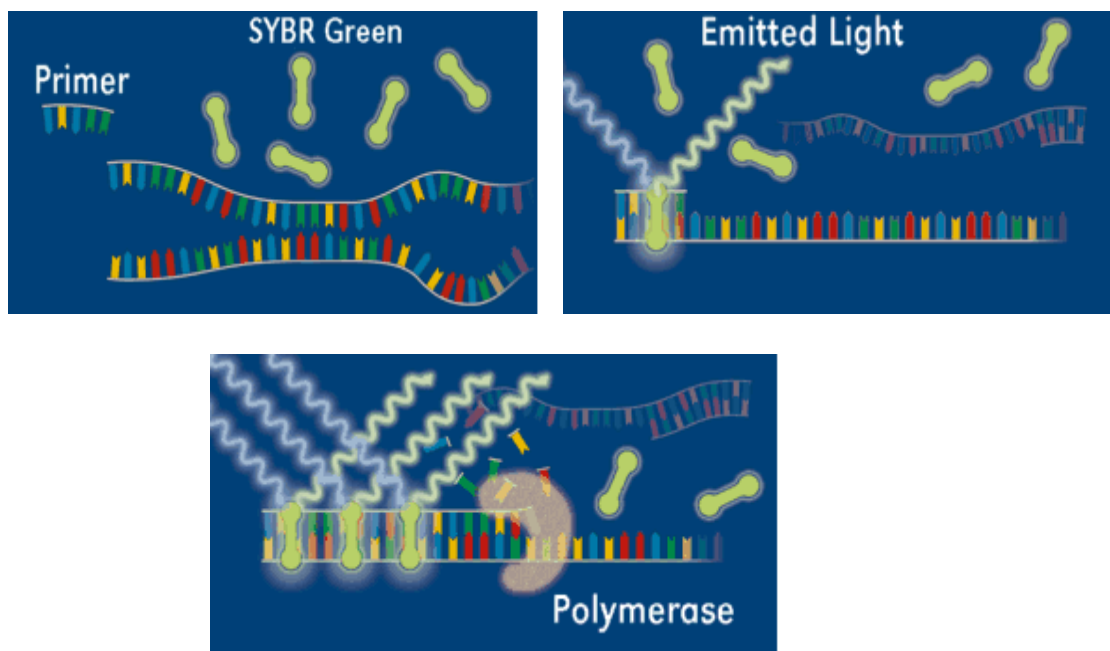
2.7. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative real time - Polymerase Chain Reaction - **qPCR**) είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης (παρακολούθηση της αντίδρασης της PCR σε πραγματικό χρόνο). Με την qPCR δύναται να ποσοτικοποιηθεί η οποιαδήποτε ποσότητα προϊόντος PCR (DNA, cDNA, RNA) με ιδιαίτερα μεγάλη ακρίβεια.

Σε αντιδράσεις όπου δεν απαιτείται ειδικότητα ως προς το προϊόν της αντίδρασης, βασίζεται στην ανίχνευση και στην ποσοτικοποίηση του φθορισμού. Εκπέμπεται όταν κάποιο μόριο αναφοράς, η χρωστική SYBR Green εισχωρεί στην αύλακα της δίκλωνης έλικας ενός μορίου DNA (προϊόντος της PCR). Με την πρόοδο της αντίδρασης ο φθορισμός που παράγεται από το μόριο αναφοράς αυξάνει ως αποτέλεσμα της συσσώρευσης των προϊόντων της PCR μετά από κάθε κύκλο ενίσχυσης. Με τον τρόπο αυτό παρακολουθείται η εξέλιξη της αντίδρασης. Η χρωστική SYBR Green παράγει φθορισμό με την πρόσδεσή της σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA, όπως στον υβριδισμό μεταξύ των εκκινητών (διμερή) καθώς και στα ανεπιθύμητα προϊόντα της αντίδρασης του PCR (Εικόνα 17). Για το λόγο αυτό, απαιτείται προσεκτικός σχεδιασμός των εκκινητών και προσεκτικοί χειρισμοί κατά την διάρκεια των πειραμάτων για την αποφυγή λανθασμένων μετρήσεων φθορισμού.

Η qPCR πραγματικού χρόνου επιτρέπει την ανίχνευση των προϊόντων από τα πρώτα στάδια της αντίδρασης της PCR (η ενίσχυση παρακολουθείται συνεχώς σε κάθε κύκλο). Εμφανίζει σύντομους θερμοδυναμικούς κύκλους (30 λεπτά - 2 ώρες), η μέτρηση των δειγμάτων γίνεται με μεγάλες διαφορές αρχικού νουκλεϊκού φορτίου, επεξεργάζεται πολλά δείγματα ταυτόχρονα και ο κίνδυνος των επιμολύνσεων είναι ιδιαίτερα χαμηλός καθώς δεν υφίσταται καμία διαδικασία μετά το τέλος της αντίδρασης. Τέλος εμφανίζει αυξημένη ειδικότητα, ευαισθησία και επαναληψιμότητα.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το SYBR select master mix (μείγμα πολυμεράσης με τη χρωστική green) και η χρωστική ROX (Applied Biosystems, Austin, TX, USA), για την εξομάλυνση των διαφορών μεταξύ των αντιδράσεων. Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).



Εικόνα 17: Λειτουργία της μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I (Molecular Probes, Inc., 2000).

Σε αντίδραση με τελικό όγκο τα 10 μ l αναμιγνύονται:

- Μήτρα DNA, cDNA $\rightarrow$ 1 μ l
- SYBR Select Master Mix (μείγμα πολυμεράσης) $\rightarrow$ 5 μ l
- Εκκινητής 1 (0,5 μ M) $\rightarrow$ 2 μ l
- Εκκινητής 2 (0,5 μ M) $\rightarrow$ 2 μ l

Οι συνθήκες πραγματοποίησης της qPCR πραγματικού χρόνου ήταν:

- Αρχική αποδιάταξη με ενεργοποίηση της πολυμεράσης στους 95°C για 10 λεπτά
- Αποδιάταξη στους 95°C για 45 δευτερόλεπτα (40 κύκλοι)
- Υβριδισμός εκκινητών στους 60°C για 1 λεπτό
- Επιμήκυνση στους 60°C για 1 λεπτό

Στο τέλος κάθε κύκλου λαμβάνονταν οι τιμές απορρόφησης για τις χρωστικές SYBR Green και ROX. Όταν ολοκληρώνονται οι 40 κύκλοι τα ενισχυμένα τμήματα αποδιατάσσονται σταδιακά με αύξηση της θερμοκρασίας κάθε 30 δευτερόλεπτα κατά 0,5°C από τους 60°C έως τους 95°C και λαμβάνεται η καμπύλη τήξης του καθενός προκειμένου να ελιγωθεί ή εξειδικευση των εκκινητών (όταν ενισχύεται ένα μόνο προϊόν η

καμπύλη έχει μια κορυφή). Τα δείγματα αναλύθηκαν και σε πήκτωμα αγαρόζης 4 % (w/v) για την επιβεβαίωση της παρουσίας μοναδικού προϊόντος.

Για τη σχετική ποσοτικοποίηση της παρουσίας του DNA, γίνεται χρήση της μεθοδολογίας σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή όπου το γενομικό DNA (gDNA) και τα πλασμίδια τα οποία περιέχουν κλωνοποιημένες αλληλουχίες-στόχους, συνήθως χρησιμοποιούνται ως πρότυπα στην ποσοτική PCR. Πιο συγκεκριμένα, μαζί με τα δείγματα γίνεται χρήση ενός πλασμιδίου γνωστού αριθμού αντιγράφων, που φέρει ένα γονίδιο. Χρησιμοποιήθηκε η κατασκευή με το πλασμίδιο *pet28a* (Εικόνα 18) που έφερε ένα γονίδιο για το οποίο είχαν σχεδιαστεί εκκινητές (Πίνακας 4) για να ενισχύσουν ένα μέγεθος περίπου 300 βάσεων. Γνωρίζοντας ακριβώς τον αριθμό των πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση και πραγματοποιώντας αρκετές διαδοχικές αραιώσεις, δύναται να γίνει αντιστοίχιση των αποτελεσμάτων των κύκλων της qPCR (C_t) με την σχετική ποσότητα των αντιγράφων του γονιδίου που έφερε ο πλασμιδιακός φορέας. Επειδή κάθε βακτηριοφάγος, φέρει ένα αντίγραφο από τα γονίδια που επιλέχτηκαν για ενίσχυση, έγινε και σχετική ποσοτικοποίηση των ιοσωματιδίων σε κάθε δείγμα για κάθε βακτηριοφάγο χωριστά.

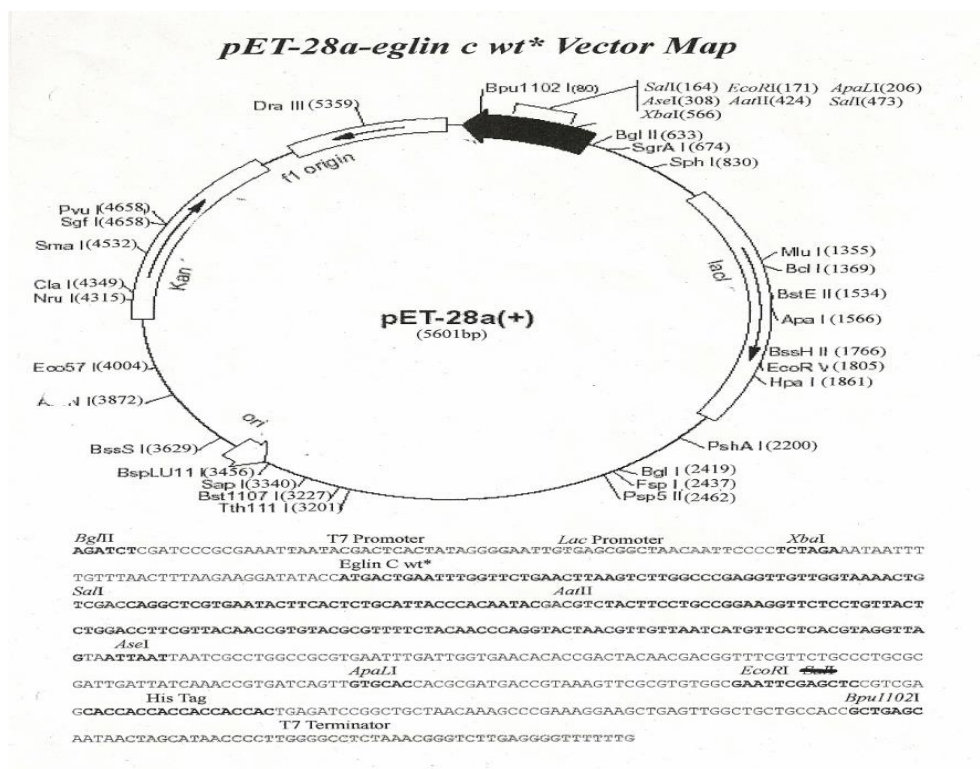
Επίσης έγινε πέψη για το συγκεκριμένο πλασμίδιο με το ένζυμο *EcoR V* προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στις αντιδράσεις ως ευθύγραμμο τμήμα DNA και όχι ως κυκλικό πλασμίδιο. Πιο συγκεκριμένα η πέψη έλαβε χώρα ως εξής:

Σε σωλήνα *erppendorf* τοποθετήθηκε το πλασμίδιο, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για την δράση του ενζύμου και τέλος ddH_2O μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Μία τυπική αντίδραση πέψης σε τελικό όγκο 30 μ l περιλαμβάνει:

- Πλασμίδιο 1-5 μ l (έως 1 μ g περίπου)
- 10X ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 3 μ l
- ddH_2O έως τελικό όγκο 28.5 μ l
- Προστίθεται 1.5 μ l ενδονουκλεάση περιορισμού. Συνήθως χρησιμοποιείται μία μονάδα ενζύμου (1 unit) ανά μικρογραμμάριο δείγματος DNA.
- Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται για 3 ώρες περίπου στην κατάλληλη θερμοκρασία για κάθε ένζυμο που στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν οι 37° C

Πίνακας 4: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη qPCR πραγματικού χρόνου.

Εκκινητές (Primers)	Γονίδιο Στόχος	Αλληλουχίες	Μέγεθος Ενίσχυσης (bp)
MCPSt2-F MCPSt2-R	MCP, major capsid protein	CGACCAATACGCAGTGAACG CACACCTGCGTCCATTTTCAG	70
MCPAphrodite1-F MCPAphrodite1-R	MCP, major capsid protein	TCAGGACTACGCATCTGACC CAAGTGGGTGAGAGTTGCCT	70
HypAthena1-F HypAthena1-R	Hypothetical protein	CGTAACTCTCCGCCGAATTG GCTTGCTTGCTCACCGATAA	70
MCPAres1-F MCPAres1-R	MCP, major capsid protein	GCGATCCGTGGTGATACAAC TAGTGCGCTTCAACCAACCA	70
Πλασμιδίου Μάρτυρα	<i>T7F</i> <i>T7R</i>	TAATACGACTCACTATAGGG GCTAGTTATTGCTCAGCGG	300



Εικόνα 18: Ο πλασμιδιακός χάρτης του pet28a που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο στην qPCR πραγματικού χρόνου.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Κοκτέιλ φάγων (phage cocktail)

Προκείμενου να γίνει η συνδυαστική αξιολόγηση του φαγικού κοκτέιλ σχεδιάστηκαν συγκεκριμένες πειραματικές διαδικασίες, ώστε να γίνει έλεγχος κάθε βακτηριοφάγου ξεχωριστά, αλλά και συνδυαστικά.

Πίνακας 5: Οι βακτηριοφάγοι που συνδυάστηκαν για τη δημιουργία του κοκτέιλ.

Βακτηριοφάγος	Κλάδος	Μέγεθος Γονιδιώματος	Αριθμός Καταχώρησης (Accession Number)
ϕ St2	schizoT4like	250.485 bp	KT919973
Aphrodite1	phiKZlikevirus	237.722 bp	MG720308
Athena1	myophage	39.826 bp	MG640035
Ares1	siphophage	80.500 bp	MG720309

Το πρώτο αποτέλεσμα που λήφθηκε κατά την πειραματική διαδικασία αποτελούσε τον τελικό τίτλο του φαγικού κοκτέιλ μετά την *in vitro* λύση. Πιο συγκεκριμένα, κοκτέιλ φάγων δημιουργήθηκε με τίτλο 4×10^8 PFU/ml. Μετά την *in vitro* λύση των βακτηρίων (περίπου 16 ώρες μετά), ο τελικός τίτλος του κοκτέιλ (Εικόνα 19) αυξήθηκε και έφθασε τα 2×10^{11} PFU/ml.

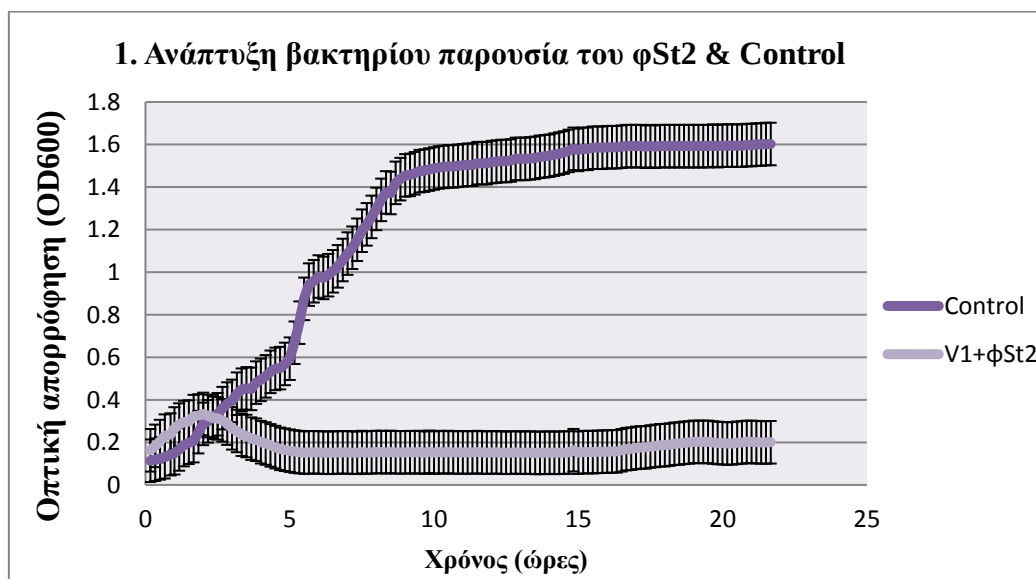


Εικόνα 19: Τελική τιτλοδότηση του φαγικού κοκτέιλ.

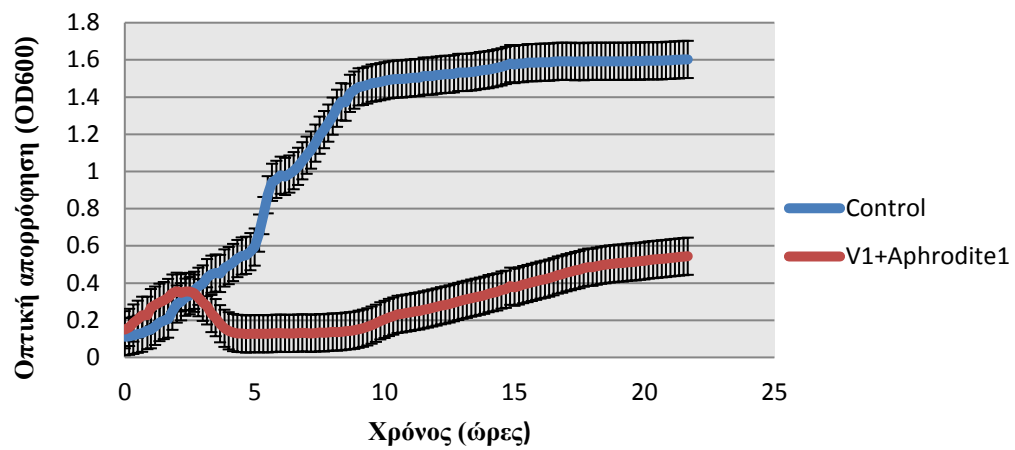
3.2. Έλεγχος *in vitro* αποτελεσματικότητας των φάγων

Ο *in vitro* έλεγχος της αποτελεσματικότητας των βακτηριοφάγων ϕ St2, Aphrodite1, Athena1, Ares1 καθώς και του κοκτέιλ των ανωτέρω φάγων έναντι του *V. alginolyticus* (V1) με αναλογία βακτηρίων/βακτηριοφάγων MOI = 100, έδειξε ότι η βακτηριακή ανάπτυξη μειώθηκε σημαντικά. Στην καλλιέργεια ελέγχου (control) το βακτήριο αναπτύχθηκε κανονικά. Σύμφωνα με τις μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης (optical density σε $\lambda=600\text{nm}$, OD600) της βακτηριακής καλλιέργειας για 22 ώρες προέκυψαν τα οι παρακάτω καμπύλες (Διαγράμματα 1-5).

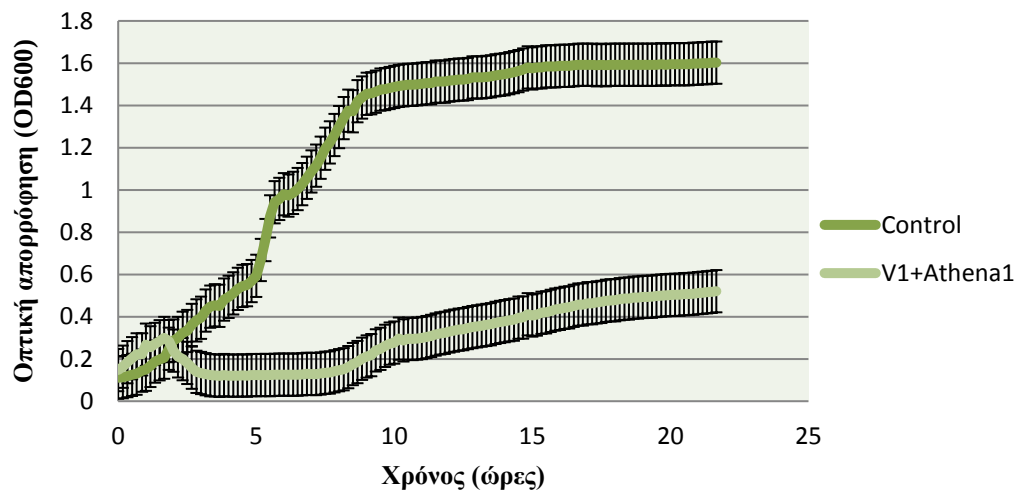
Η ανάπτυξη του βακτηρίου *V. alginolyticus* (V1) παρουσία του ϕ St2 (με το μεγαλύτερο μέγεθος έκρηξης) έδειξε ότι παραμένει σταθερή σε χαμηλά επίπεδα για ένα διάστημα περίπου 10 ωρών. Αντίθετα, η ανάπτυξή του παρουσία τόσο του Ares1, του Aphrodite1 όσο και του Athena1 (με μικρότερα μεγέθη έκρηξης) παραμένει σταθερή σε χαμηλότερα επίπεδα για 5 ώρες. Τέλος, η ανάπτυξη του βακτηρίου παρουσία του κοκτέιλ των φάγων έδειξε ότι παραμένει σταθερή σε χαμηλά επίπεδα για ένα διάστημα περίπου 18 ωρών (διαφορές μεταξύ των φάγων στα μεγέθη έκρηξης, στο χρόνο απορρόφησης και στη λανθάνουσα περίοδο).



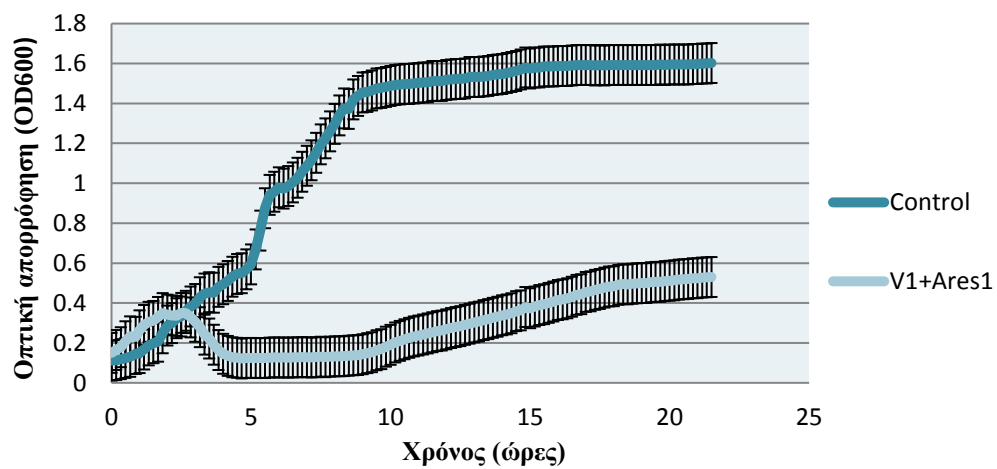
2. Ανάπτυξη βακτηρίου παρουσία του Aphrodite1 & Control

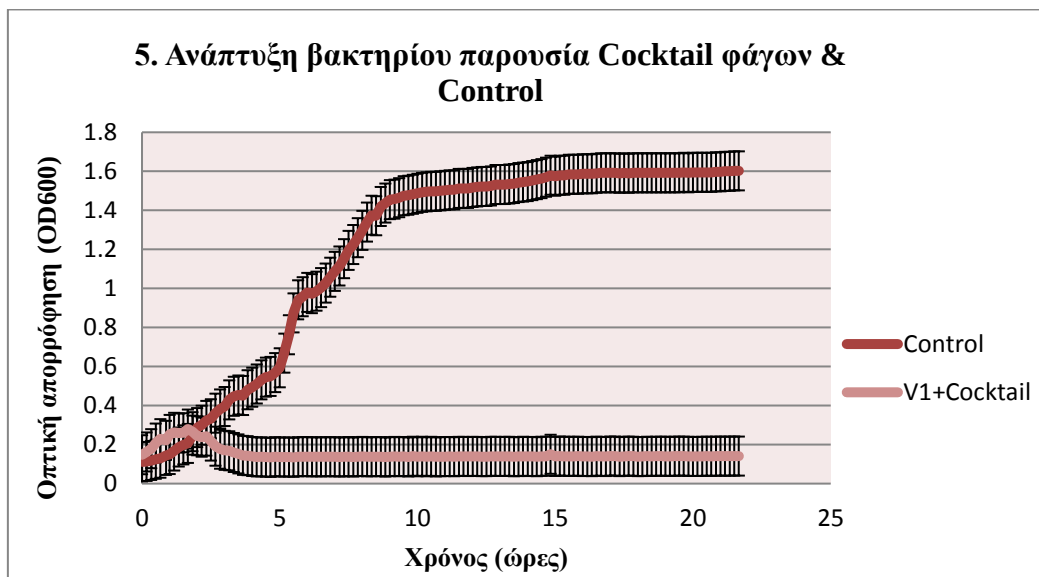


3. Ανάπτυξη βακτηρίου παρουσία του Athena1 & Control



4. Ανάπτυξη βακτηρίου παρουσία του Ares1 & Control





Διαγράμματα 1-5: Καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου *V. alginolyticus* στην πορεία του χρόνου (22 ώρες). Γραφική απεικόνιση μέσου όρου των τεσσάρων επαναλήψεων και της τυπικής τους απόκλισης στη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (optical density σε $\lambda=600\text{nm}$, OD600) της βακτηριακής καλλιέργειας παρουσία των φάγων ϕSt2 , Aphrodite1, Athena1, Ares1 και του cocktail των παραπάνω ιών (MOI=100).

3.3. Μέτρηση της απορρόφησης των προϊόντων των απομονώσεων DNA

Πριν από την αντίδραση της Real Time PCR προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του προϊόντος του γενετικού υλικού από τις απομονώσεις (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Ποιοτική και ποσοτική απεικόνιση δειγμάτων νουκλεϊκών οξέων

Δείγμα	Λόγος απορροφήσεων 260 nm/280 nm	Λόγος απορροφήσεων 260 nm/230 nm	Συγκέντρωση
A	1.86	1.83	123.84 ng/μl
B	1.82	1.65	52 ng/μl

3.4 Αποτελέσματα ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου

Τα αποτελέσματα της αντίδρασης qPCR πραγματικού χρόνου καταγράφονται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης (Πίνακας 8), μετρώντας την μεταβολή του φθορισμού και τα αποτελέσματα απεικονίζονται με την μορφή εκθετικής καμπύλης παρουσιάζοντας έτσι την

ανάλογη αύξηση των προϊόντων. Η τιμή Ct (Threshold cycle Ct) είναι ο κύκλος κατά τη διάρκεια του οποίου το δείγμα φτάνει το σημείο στο οποίο ξεχωρίζει έντονα (Threshold) το φθορίζον σήμα των προϊόντων της qPCR από τη χρωστική μάρτυρα (ROX). Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας DNA στο κάθε δείγμα τόσο νωρίτερα θα εμφανιστεί η τιμή Ct για κάθε δείγμα, δηλαδή η τιμή Ct θα είναι μικρότερη (Wong & Medrano, 2005).

Χρησιμοποιώντας ένα πλασμίδιο γνωστού ως μάρτυρα και γνωρίζοντας τη συγκέντρωσή του μπορέσαμε να ποσοτικοποιήσουμε τα αντίγραφα DNA κάθε γονιδίου που μελετήθηκε (Πίνακας 7). Γενικά γνωρίζοντας το μοριακό βάρος κάθε πλασμιδίου (660 MW/bp περίπου) και λαμβάνοντας υπόψη ότι κάθε αντίγραφο του γονιδίου περιέχεται 2 φορές σε κάθε πλασμίδιο, είμαστε σε θέση να υπολογίσουμε τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου που μας ενδιαφέρει που περιέχονται σε κάθε αραιώση.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων των αραιώσεων του πλασμιδίου και του γονιδίου που έχει γίνει ένθεση.

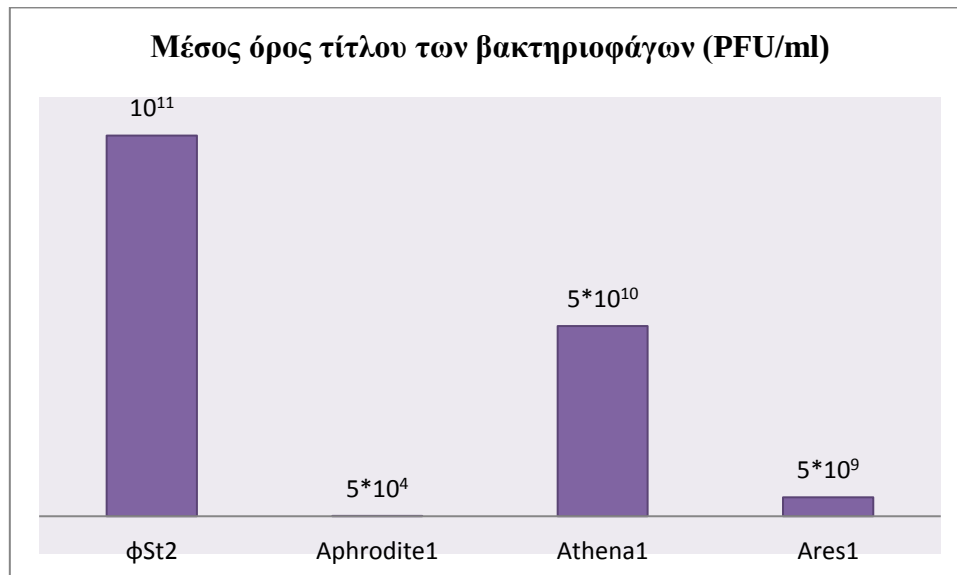
Αραίωση	Συγκέντρωση πλασμιδίου ng/μl	Συγκέντρωση γονιδίου (ng/μl)	Εκτιμώμενα αντίγραφα γονιδίου	Ct
0	55	3	300000	27,2
10 ⁻¹	5,5	0,3	30000	31,7
10 ⁻²	0,055	0,03	3000	35,8
10 ⁻³	0,0055	0,003	300	Μη διαθέσιμο
10 ⁻⁴	0,00055	0,0003	30	Μη διαθέσιμο
10 ⁻⁵	0,000055	0,00003	3	Μη διαθέσιμο
10 ⁻⁶	0,0000055	0,000003	0,3	Μη διαθέσιμο
10 ⁻⁷	0,00000055	0,0000003	0,03	Μη διαθέσιμο

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σύμφωνα με το μέσο όρο του τίτλου που έχει ο κάθε βακτηριοφάγος μετά το πέρας της *in vitro* λύσης (Διάγραμμα 6) προκύπτει πως ο φSt2 φάγος με 10¹¹ (PFU/ml) έχει τη μεγαλύτερη συνεισφορά στην καταστολή της βακτηριακής ανάπτυξης. Εξίσου σημαντική είναι και η συνεισφορά του Athena1 με τελικό τίτλο 5*10¹⁰ (PFU/ml). Σε αντίθεση, τη μικρότερη συνεισφορά στην καταστολή της βακτηριακής ανάπτυξης εμφανίζει ο Aphrodite1 με τον μικρότερο τελικό τίτλο στο τέλος της *in vitro*

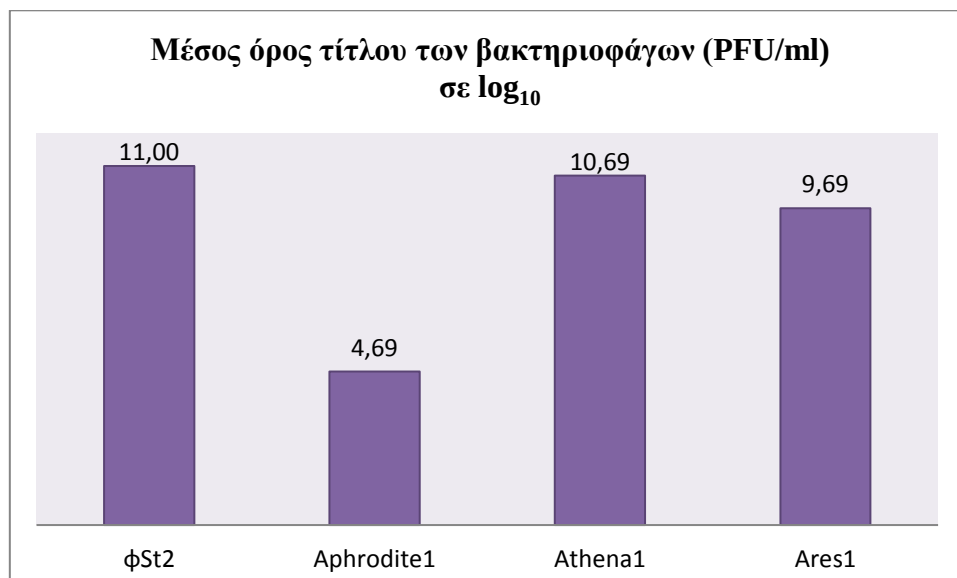
λύσης. Για την καλύτερη οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων δημιουργήθηκαν καμπύλες (Διάγραμμα7) που εμφανίζουν τον τίτλο σε λογαριθμική απεικόνιση.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα της qPCR real time με δύο βιολογικές (A & B) και δύο τεχνικές επαναλήψεις.

	Ct	Average	STE	STVE	Εκτιμώμενος μέσος όρος τίτλου (PFU/ml)
ΦSt2 A	4,667905	5,250818	0,28244	0,564879346	$\sim 10^{11}$
ΦSt2 A	4,714535				
ΦSt2 B	5,916879				
ΦSt2 B	5,703952				
Aphrodite1 A	32,99032	32,2879	0,613909	1,227818318	$\sim 5 \cdot 10^4$
Aphrodite1 A	33				
Aphrodite1 B	33				
Aphrodite1 B	30,16126				
Athena1 A	7,422787	7,769785	0,214836	0,429672404	$\sim 5 \cdot 10^{10}$
Athena1 A	7,370975				
Athena1 B	8,443439				
Athena1 B	7,841937				
Ares1 A	10,25236	10,47647	0,115668	0,231335321	$\sim 5 \cdot 10^9$
Ares1 A	10,23944				
Ares1 B	10,73286				
Ares1 B	10,68121				



Διάγραμμα 6: Μέσος όρος τίτλου κάθε βακτηριοφάγου (PFU/ml) μετά το πέρας της *in vitro* λύσης.



Διάγραμμα 7: Μέσος όρος τίτλου κάθε βακτηριοφάγου (PFU/ml) μετά το πέρας της *in vitro* λύσης σε $\log_{10}$ για καλύτερη απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η υδατοκαλλιέργεια είναι ένας από τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους τομείς στον κόσμο που κατέχει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην οικονομία. Ωστόσο, οι απώλειες που συνδέονται με βακτηριακές λοιμώξεις, όπως η δονακίωση, οδηγούν σε τεράστιο οικονομικό κόστος (FAO, 2009; Oliveira *et al.*, 2012). Τα *Vibrio* βρίσκονται στην θάλασσα με φυσικό τρόπο καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, όμως η αύξηση των πληθυσμών τους συνδέεται άμεσα με την αύξηση της θερμοκρασίας. Συνεπώς, επεισόδια δονακίωσης εκδηλώνονται κατά τους θερινούς μήνες (Pruzzo *et al.*, 2005). Η χρήση των αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση των βακτηριακών λοιμώξεων στην υδατοκαλλιέργεια, είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών, τα οποία συμβάλλουν και στην αναποτελεσματικότητά τους (Inglis, 2000). Προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης και εξάπλωσης της μικροβιακής αντοχής και να καταπολεμηθούν οι ασθένειες των ψαριών στην υδατοκαλλιέργεια, εναλλακτικές στρατηγικές είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν (Defoirdt *et al.*, 2011).

Ο βιολογικός έλεγχος των παθογόνων με τη χρήση βακτηριοφάγων θεωρείται ότι αποτελεί μια βιώσιμη εναλλακτική λύση έναντι των αντιβιοτικών για την πρόληψη και την καταπολέμηση των παθογόνων βακτηρίων στην υδατοκαλλιέργεια (Higuera *et al.*, 2013; Karunasagar *et al.*, 2007; Martínez-Díaz & Hipólito-Morales, 2013; Nakai & Park, 2002; Nakai *et al.*, 1999; Park & Nakai, 2003; Park *et al.*, 2000; Shivu *et al.*, 2007; Verner-Jeffreys *et al.*, 2007; Vinod *et al.*, 2006). Η αντοχή όμως των βακτηρίων και στους φάγους αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα (Levin & Bull, 2004; Merrill *et al.*, 2006; Nakai *et al.*, 2010; Sandeep, 2006; Scott *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2013; Skurnik & Strauch, 2006; Tanji *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014), που συνήθως οφείλεται σε μεταλλάξεις που επηρεάζουν τους υποδοχείς πρόσδεσης των φάγων (Heller, 1992; Labrie *et al.*, 2010). Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των βακτηρίων, στον βιολογικό έλεγχο που πραγματοποιείται με έναν φάγο έχει ήδη αναφερθεί (Levin & Bull, 2004; Merrill *et al.*, 2006; Nakai *et al.*, 2010; Sandeep, 2006; Scott *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2013; Skurnik & Strauch, 2006; Tanji *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2012), όμως η χρήση κοκτέιλ φάγων δύναται να ξεπεράσει αυτό το πρόβλημα (Chan *et al.*, 2013; Crothers-Stomps *et al.*, 2010; Filippov *et al.*, 2011). Σύμφωνα με τους Chan *et al.*, (2013) και Mateus *et al.*, (2014) η αντιμετώπισης της δονακίωσης στην υδατοκαλλιέργεια καθώς και άλλων βακτηριακών ασθενειών μπορεί να είναι εξαιρετικά αποτελεσματική με τη χρήση συνδυασμού βακτηριοφάγων. Η χρήση αυτή στις υδατοκαλλιέργειες στοχεύει στην πρόληψη και στη διατήρηση των *Vibrio* σε χαμηλά

επίπεδα όπου σε συνδυασμό και με τον προσεκτικό χειρισμό των ψαριών, να προλαμβάνονται τα επεισόδια δονακίωσης.

Σκοπός της εργασίας ήταν να διερευνηθεί η *in vitro* λύση ενός κοκτέιλ τεσσάρων θαλάσσιων λυτικών βακτηριοφάγων που δυνητικά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί έναντι του οπορουνιστικού παθογόνου των ψαριών *Vibrio alginolyticus*. Ταυτόχρονα, μετά την εφαρμογή του, δύναται να διερευνηθούν τα φαινόμενα ανταγωνιστικότητας και λυτικής δραστηριότητας των βακτηριοφάγων. Οι βακτηριοφάγοι οι οποίοι είχαν πλήρως χαρακτηριστεί φυλογενετικά και βιοχημικά (KT919973, MG720308, MG640035, MG720309), επιλέχθηκαν με βάση τους διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς λύσης που διαθέτουν. Το μέγεθος του γονιδιώματος της οικογένειας των *Siphoviridae* βρίσκεται εντός της κανονικής κλίμακας και του μέσου μεγέθους των φάγων (Brussow & Desiere, 2001). Σε αντίθεση, τα μέλη της οικογένειας *Myoviridae* έχουν μεγαλύτερο μέγεθος γονιδιώματος σε σύγκριση με αυτό των *Siphoviridae* (Shivu *et al.*, 2007). Ταυτόχρονα το μέγεθος της έκρηξης, η λανθάνουσα περίοδος καθώς και ο χρόνος απορρόφησης από τον ξενιστή τους δείχνει την καταλληλότητα για τη χρήση τους στον έλεγχο του βακτηριακού πληθυσμού (Kalatzis *et al.*, 2016; Adams, 1959). Οι τέσσερις βακτηριοφάγοι συνδυάστηκαν σε υψηλό και όμοιο τίτλο. Μετά όμως από την *in vitro* λύση των βακτηρίων (μετά από 16 ώρες), ο τελικός τίτλος του κοκτέιλ αυξήθηκε τουλάχιστον 1000 φορές, το οποίο επιβεβαίωσε και τη μείωση του βακτηριακού πληθυσμού (Εικόνα 19/Διάγραμμα 5).

Η χρήση κοκτέιλ με τους κατάλληλα επιλεγμένους φάγους αυξάνει την αποτελεσματικότητα του βιολογικού ελέγχου (πιο αποτελεσματική και ταχύτερη λύση των βακτηρίων), καθυστερώντας την ανάπτυξη αντοχής των βακτηρίων (Barrow & Soothill, 1997; Alagappan *et al.*, 2010; Martínez-Díaz & Hipólito-Morales, 2013; Higuera *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013; Lomelí-Ortega & Martínez Díaz, 2014; Alagappan *et al.*, 2016; Stalin & Srinivasan, 2016b), αλλά επιτρέπει επίσης και τη ταυτόχρονη θεραπεία πολλαπλών παθογόνων (Cairns *et al.*, 2009; Kunisaki & Tanji, 2010; Merabishvili *et al.*, 2009). Ιδιαίτερα σημαντικά στην επιλογή είναι το εύρος του ξενιστή η λανθάνουσα περίοδος το μέγεθος της έκρηξης και η επιβίωση στο περιβάλλον (Silva *et al.*, 2014; Stalin & Srinivasan, 2016b). Στην παρούσα εργασία προκειμένου να ελεγχθεί βιολογικά ο βακτηριακός πληθυσμός, ο ϕ St2 με το μεγαλύτερο μέγεθος γονιδιώματος, ένα ευρύ φάσμα ξενιστών, σύντομο λυτικό κύκλο (λανθάνουσα περίοδο) και το μεγαλύτερο μέγεθος έκρηξης, πλεονεκτεί έναντι των υπολοίπων βακτηριοφάγων που επιλέχθηκαν. Ο

Aphrodite1 εμφανίζει μεγάλο λυτικό κύκλο και μεγάλο μέγεθος έκρηξης, ο Athena1 με το μικρότερο μέγεθος γονιδιώματος, εμφανίζει σύντομο λυτικό κύκλο και μεγάλο μέγεθος έκρηξης ενώ ο Ares1 εμφανίζει σύντομο λυτικό κύκλο αλλά μικρό μέγεθος έκρηξης.

Η χρήση κοκτέιλ βακτηριοφάγων δεν εμποδίζει τη βακτηριακή ανάπτυξη εκ νέου μετά το πέρας της διαδικασίας του ελέγχου του βακτηριακού πληθυσμού διότι τα βακτήρια μπορούν να αναπτύξουν ανθεκτικότητα σε όλους τους φάγους. Ωστόσο, η καθυστέρηση στην ανάπτυξη της αντίστασης είναι ένα σημαντικό επίτευγμα (Mateus *et al.*, 2014). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι τα βακτήρια που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στους φάγους, περιόρισαν ή έχασαν την μολυσματικότητά τους (Anonymous, 1983; Capparelli *et al.*, 2010; Fillippon *et al.*, 2011; Wagner & Waldor, 2002). Η *in vivo* λύση των βακτηρίων είναι αποδοτικότερη με τη χρήση συνδυασμού βακτηριοφάγων, ωστόσο η *in vitro* αποτελεσματικότητα των φάγων δεν αποτελεί πάντα ένδειξη για την *in vivo* αποτελεσματικότητα τους (Abedon, 2013; Maura *et al.*, 2012; Bull *et al.*, 2012; Loc Carillo *et al.*, 2005). Πριν όμως από τον οποιονδήποτε έλεγχο αποτελεσματικότητας, είτε *in vivo* είτε *in vitro* απαραίτητη προϋπόθεση είναι να έχουν χαρακτηριστεί πλήρως οι φάγοι που θα χρησιμοποιηθούν (Kocharunchitt *et al.*, 2009; Martínez-Díaz & Hipólito-Morales, 2013; Oliveira *et al.*, 2012). Οι Fillippon *et al.*, (2011) έδειξαν ότι το πρόβλημα της βακτηριακής αντοχής μπορεί να ξεπεραστεί μόνο όταν οι φάγοι εκμεταλλεύονται διαφορετικούς υποδοχείς. Στην παρούσα εργασία όπου ο βακτηριακός πληθυσμός ελέγχθηκε *in vitro*, παρατηρήθηκε ανάπτυξη ανθεκτικότητας αρκετά αργότερα από τη συνολική διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας των 22 ωρών.

Η μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των βακτηριοφάγων σημαίνει πιθανά και διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς μόλυνσης, αλλά και λύσης. Αυτή η ποικιλομορφία κατά τη διαδικασία μόλυνσης πιθανά συνεπάγεται και καθυστέρηση στην ανάπτυξη της βακτηριακής αντοχής σε όλους του βακτηριοφάγους ταυτόχρονα. Οι διαφορετικοί μοριακοί μηχανισμοί που διαθέτουν, πιθανότατα προσδίδουν στους φάγους, χαρακτηριστικά τα οποία δυσκολεύουν το βακτηριακό κύτταρο να αναπτύξει ανθεκτικότητα (Skliros *et al.*, 2016). Συγκεκριμένα, ο έλεγχος της *in vitro* αποτελεσματικότητας του κοκτέιλ των βακτηριοφάγων ϕ St2, Aphrodite1, Athena1 και Ares1, έδειξε σημαντική μείωση της βακτηριακής ανάπτυξης για 18 ώρες περίπου σε αντίθεση με την αποτελεσματικότητα που είχαν μεμονωμένα οι φάγοι. Οι διαφορές στους τελικούς τίτλους όπως προέκυψαν από την qPCR εξηγούνται πιθανά από τα βιολογικά τους χαρακτηριστικά. Ο φάγος ϕ St2 (κλάδος “schizoT4like”), ο οποίος καταστέλλει τη

βακτηριακή ανάπτυξη για το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Διάγραμμα 1), έχει ένα μεγάλο γονιδίωμα (250,485 bp) και εμπεριέχει βιοχημικά εργαλεία που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση NAD^+ , συγκεκριμένα για να αυξήσει την κυτταρική περιεκτικότητα σε NAD^+ (Skliros *et al.*, 2016). Πιθανά ένας τέτοιος μοριακός μηχανισμός μπορεί να προσδώσει πλεονέκτημα έναντι των άλλων βακτηριοφάγων.

Ο βακτηριοφάγος Aphrodite1 (κλάδος “phiKZlikevirus”), αν και ανήκει και αυτός στην οικογένεια *Myoviridae*, πιθανά διαθέτει διαφορετικούς μηχανισμούς μόλυνσης και λύσης του ξενιστή. Διαθέτει γονιδίωμα 237.722 bp και εμπεριέχει βιοχημικά εργαλεία που σχετίζονται με την μεταγραφή των γονιδίων του από δύο δικές του RNAP. Πιθανά ένας τέτοιος διαφορετικός μηχανισμός λύσης να ευθύνεται και για τον υψηλό χρόνο λύσης που έχει. Αυτό το βιολογικό χαρακτηριστικό που διαθέτει φαίνεται ότι ευθύνεται και για τον μικρό τίτλο στο τέλος της *in vitro* λύσης (Διάγραμμα 6), και επομένως συνεισφέρει λιγότερο στην καταστολή της βακτηριακής ανάπτυξης. Είναι πιθανό ότι κατά τη διάρκεια των 80 λεπτών που χρειάζεται για να λύσει τον ξενιστή, το βακτήριο να μολύνεται και από άλλον βακτηριοφάγο με μικρότερο χρόνο λύσης και να μην προλαβαίνει να αντιγραφεί αποδοτικά ο ίδιος. Αν και ο T4 βακτηριοφάγος έχει φανεί ότι δεν αφήνει να μολυνθεί ο ξενιστής από άλλον ιό την ώρα του πολλαπλασιασμού του, παρόλα αυτά δε γνωρίζουμε αν το ίδιο συμβαίνει και για τους “phiKZlikevirus”.

Ο βακτηριοφάγος Athena1 της ίδιας οικογένειας, διαθέτει γονιδίωμα 39.826 bp. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ανοιχτών αναγνωστικών του πλαισίων είναι μη αναγνωρισμένο. Αυτή η κατηγορία φάγων φαίνεται πώς έχει συνεξελιχθεί στενά με συγκεκριμένους κύριους ξενιστές (Comeue *et al.*, 2012) έχοντας και πολύ καλή αποδοτικότητα με μικρό χρόνο λύσης. Φαίνεται ότι συνεισφέρει αρκετά και εκείνος στην καταστολή της βακτηριακής ανάπτυξης χωρίς όμως να υπερβαίνει τη συνεισφορά του φSt2 (Διάγραμμα 6) που έχει περισσότερα μοριακά εργαλεία διαθέσιμα.

Τέλος ο βακτηριοφάγος Ares1 ο οποίος ανήκει στην οικογένεια *Siphoviridae* και έχει γονιδίωμα 80.500 bp χρησιμοποιεί μηχανισμούς μόλυνσης αρκετά διαφορετικούς από αυτούς της οικογένειας *Myoviridae* που πιθανά μοιάζουν με αυτούς του βακτηριοφάγου λ που είναι καλά χαρακτηρισμένοι αν και πρόκειται για ήπιο φάγο της ίδιας οικογένειας. Πιο συγκεκριμένα πιθανά χρησιμοποιεί διαφορετικούς υποδοχείς από ότι οι υπόλοιποι βακτηριοφάγοι λόγω και της διαφορετικής οικογένειας που ανήκει. Ένας τέτοιος διαφορετικός μηχανισμός μόλυνσης πιθανά συνεισφέρει και στην δυσκολία ανάπτυξης επίκτητης ανθεκτικότητας στα βακτήρια.

Όταν οι φάγοι συνδυάζονται, δρουν είτε σε συνέργεια είτε σε ανταγωνισμό. Όταν οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις είναι ανταγωνιστικές, ο συνδυασμός τους δημιουργεί χειρότερα αποτελέσματα από αυτά του καλύτερου φάγου που δρα μόνος του (Schmerer *et al.*, 2014). Η συνέργεια μεταξύ των φάγων πιθανά απαιτεί συγκεκριμένους μοριακούς μηχανισμούς που επιτρέπουν σε έναν φάγο να αυξήσει την ανάπτυξη του άλλου. Οι φάγοι μπορούν επίσης να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, όπως είναι καλά τεκμηριωμένο στο ενδοκυτταρικό επίπεδο με αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους έκρηξης ενός (Delbruck, 1945; Adams, 1959). Παρά τη συνέργεια, ένας φάγος μπορεί να ξεπεράσει και να εκτοπίσει τον άλλο. Μία λύση αυτού του προβλήματος στον βιολογικό έλεγχο των παθογόνων θα μπορούσε να αποτελεί η εφαρμογή των φάγων σε υψηλές συγκεντρώσεις. Η δυναμική της μόλυνσης των βακτηριοφάγων *in vivo* είναι άμεσα εξαρτώμενη με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, και πιθανά το ίδιο εξαρτώμενη είναι και η συνέργειά τους. Οι πληθυσμοί των βακτηρίων μπορεί να είναι ετερογενείς σε σχέση με την ευαισθησία του φάγου. Η ετερογένεια αυτή μπορεί να είναι χωρική, χρονική ή τυχαία λόγω διακύμανσης της γονιδιακής έκφρασης που επάγεται από τη θερμοκρασία, τους πόρους, το υπόστρωμα και τη φάση ανάπτυξης του βακτηριακού κυττάρου (Schmerer *et al.*, 2014). Στην παρούσα εργασία, η συνεργιστική δράση του κοκτέιλ των φάγων *in vitro* ήταν αναμφίβολα εμφανής αφού μετά το συνδυασμό τους αυξήθηκε ο χρόνος στον οποίο η ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας παρέμενε κατασταλμένη.

Ο συνδυασμός των τριών βακτηριοφάγων από την οικογένεια *Myoviridae* και ενός από την οικογένεια *Siphoviridae* (Πίνακας 5) αύξησε την αποτελεσματικότητα του βιολογικού ελέγχου του βακτηριακού πληθυσμού *V. alginolyticus* (Διάγραμμα 5), από ότι όταν εφαρμόστηκαν μεμονωμένα οι φάγοι (Διαγράμματα 1-4), καθυστερώντας την ανάπτυξη της αντοχής από τον βακτηριακό ξενιστή. Ταυτόχρονα, η χρήση φάγων με μεγάλα μεγέθη έκρηξης και σύντομους λυτικούς κύκλους, αύξησαν επίσης την αποτελεσματικότητα του βιολογικού ελέγχου. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με παρόμοιους αριθμούς φάγων, ανέδειξαν τη σημασία του κοκτέιλ για τη χρήση του στην υδατοκαλλιέργεια για θεραπευτικούς σκοπούς όπως ο συνδυασμός τριών φάγων για τον έλεγχο του *V. harveyi* σε συστήματα καλλιέργειας γαρίδας (Stalin & Srinivasan, 2017) καθώς και ο συνδυασμός δύο αλλά και τριών φάγων για τον έλεγχο του πληθυσμού του *V. parahaemolyticus* σε συστήματα υδατοκαλλιεργειών (Mateus *et al.*, 2014). Η γνώση και κατανόηση της βιολογίας, της οικολογίας και της εξέλιξης των φάγων, δύναται να συμβάλει στην αντιμετώπιση πολλών βακτηριακών ασθενειών. Οι προσδοκίες εύλογες, πως νέοι,

αποτελεσματικοί φάγοι από το περιβάλλον θα είναι συνεχώς διαθέσιμοι επ'αορίστου κατά των περισσότερων βακτηριακών στόχων (Örmälä & Jalasvuori, 2013).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική

Γκούβας, Χ., 1986. *Αντιμικροβιακά Φάρμακα και Λοιμώξεις*. Εκδόσεις Πασχαλίδη, Αθήνα.

Μαυρίδου, Α., Παπαπετροπούλου, Μ., 1995. *Μικροβιολογία του υδάτινου περιβάλλοντος: Βασικές αρχές*. Εκδόσεις Τραυλός, Αθήνα.

Παπουτσόγλου, Ε., 1997. *Εισαγωγή στις Υδατοκαλλιέργειες*. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα

Ξενόγλωσση

Abdul-Hassan, H. S., El-Tahan, E., Massoud, B., Gomaa, R., 1990. Bacteriophage therapy of pseudomonas burn wound sepsis. *Annals of the Mediterranean Burn Club*, 3, 262-264.

Abedon, S.T., 2008. *Bacteriophage Ecology: Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses*. Cambridge University Press, Cambridge.

Abedon, S.T., 2013. Bacteriophages as drugs: the pharmacology of phage therapy. In: *Phage Therapy: Current Research and Applications*. Borysowski J., Międzybrodzki R. and Górski A. (eds.). Caister Academic Press, UK, In press.

Abedon, S.T., Herschler, T.D., Stopar, D., 2001. Bacteriophage latent-period evolution as a response to resource availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 13, 4233-4241.

Ackermann, H.W., 2006. Classification of bacteriophages. p. 8-17. In: *The Bacteriophages*. Calendar R. (Ed.). Oxford University Press, New York, USA .

Ackermann, H.W., 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152(2), 227-43.

Ackermann, H.W., 2011. Visualization of bacteriophage lysis in the hypermicroscope. *Bacteriophage*, 1, 183-187.

Adams, M.H., 1959. *Bacteriophages*. Interscience Publishers, New York.

Akayli, T., Timur, G., Aydemir, B., Kiziler, A.R., Coskun, O., Albayrak, G., et al., 2008. Characterization of *Vibrio alginolyticus* isolates from diseased cultured gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Israeli journal of aquaculture*, 60, 89-94.

Alagappan, K., Deivasigamani, B., Somasundaram, S.T., Kumaran, S., 2010. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Specific Phages from Shrimp Ponds in East Coast of India. *Current Microbiology*, 61, 235-240.

Alagappan, K., Karuppiah, V., Deivasigamani, B., 2016. Protective effect of phages on experimental *Vibrio parahaemolyticus* infection and immune response in shrimp (Fabricius, 1798). *Aquaculture* 453, 86-92.

Alberts, B., 1998. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell*, 92, 291-294.

Alderman, D.J., Hastings, T.S., 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance – potential for consumer health risks. *International Journal of Food Science and Technology*, 33, 139-155.

- Almeida, A., Cunha, A., Gomes, N.C.M., Alves, E., Costa, L., Faustino, M.A.F.,** 2009. Phage therapy and photodynamic therapy: Low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. *Marine Drugs*, 7, 268-313.
- Angulo, F.J., Nargund, V.N., Chiller, T.C.,** 2004. Evidence of an association between use of antimicrobial agents in food animals and antimicrobial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *Journal of Veterinary Medicine*, 51, 374-379.
- Anonymous,** 1983. Phage therapy. *The Lancet*, 1287-1288.
- Armada, S.P., Farto, R., Pérez, M.J., Nieto, T.P.,** 2003. Effect of temperature, salinity and nutrient content on the survival responses of *Vibrio splendidus* biotype I. *Microbiology*, 149, 369-375.
- Austin, B.,** 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 310-317.
- Austin, B., Austin, D.A.,** 2012. Vibrionaceae representatives. *Bacterial Fish Pathogens*, 357-411.
- Austin, B., Austin, D.A.,** 2016. *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish*. Switzerland, 5th ed, 499-601.
- Azeredo, J., Sutherland, I.W.,** 2008. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(4), 261-266.
- Balebona, M.C., Andreu, M.J., Bordas, M.A., Zorrilla, I., Morin˜igo, M.A., Borrego, J.J.,** 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for culture gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Applied Environmental Microbiology*, 64, 4269-4275.
- Barrow, P.A., Soothill, J.S.,** 1997. Bacteriophage therapy and prophylaxis: Rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends in Microbiology*, 5, 268-271.
- Ben Kahla-Nakbi, A., Besbes, A., Chaieb, K., Rouabhia, M., Bakhrouf, A.,** 2007. Survival of *Vibrio alginolyticus* in seawater and retention of virulence of its starved cells. *Marine Environmental Research*, 46, 469-478.
- Benson, H.J.,** 1999. *Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology*, WCB Publishing, 7th edition.
- Beveridge, M.C.M., Sikdar, P.K., Frerichs G.N., Millar, S.,** 1991. The ingestion of bacteria in suspension by the common carp *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Biology*, 39, 825-831.
- Bordas, M.A., Balebona, M.C., Rodriguez-Maroto, J.M., Borrego, J.J., Morin˜igo, M.A.,** 1998. Chemotaxis of pathogenic *Vibrio* strains towards mucus surfaces of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Applied Environmental Microbiology*, 64, 1573-1575.
- Boxall, A.B., Fogg, L.A., Blackwell, P.A., Kay, P., Pemberton, E.J., Croxford, A.,** 2004. Veterinary medicines in the environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 180, 1-91.
- Breitbart, M., Thompson, L.R., Suttle, C.A., Sullivan, M.B.,** 2007. Exploring the Vast Diversity of Marine Viruses. *Oceanography*, 20(2), 135-139.
- Brussow, H., Desiere, F.,** 2001. Comparative phage genomics and the evolution of Siphoviridae: insights from dairy phages. *Molecular Microbiology*, 39, 213-223.
- Bruynoghe, R., Maisin, J.,** 1921. Essais de the´rapeutique au moyen du bacteriophage. *C. R. Societe Biologie*, 85, 1120-1121.
- Bull, J.J., Otto, G., Molineux, I.J.,** 2012. *In vivo* growth rates are poorly correlated with phage therapy success in a mouse infection model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2), 949-954.

- Bull, J.J., Vimr, E.R., Molineux, I.J.,** 2010. A tale of tails: sialidase is key to success in a model of phage therapy against k1-capsulated *Escherichia coli*. *Virology*, 398(1), 79-86.
- Burridge, L., Weis, J., Cabello, F., Pizarro, J.,** 2010. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. In: *Aquaculture*, 306(1- 4), 7-23, Elsevier, B.V.
- Bushman, F.,** 2002. *Lateral DNA Transfer*. Cold Spring Harbor Laboratory press, New York.
- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C., O'Mahony, J., Coffey, A.,** 2017. Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 8, 34.
- Cabello, F.C.,** 2003. Antibiotics and aquaculture. An analysis of their potential impact upon the environment, human and animal health in Chile. *Fundacion Terram*, 17, 1-16.
- Cabello, F.C.,** 2004. Antibiotics and aquaculture in Chile: implications for human and animal health. *Revista Medica De Chile*, 132(8), 1001-1006.
- Cairns, B.J., Timms, A.R., Jansen, V.A., Connerton, I.F., Payne, R.J.,** 2009. Quantitative models of *in vitro* bacteriophage host dynamics and their application to phage therapy. *PLOS Pathogens*, 5, 1-10.
- Carlton, R.M.,** 1999. Phage therapy: past history and future prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 47(5), 267-274.
- Capparelli, R., Nocerino, N., Lanzetta, R., Silipo, A., Amoresano, A., Giangrande, C., Becker, K., Blaiotta, G., Evidente, A., Cimmino, A.,** 2010. Bacteriophage-resistant *Staphylococcus aureus* mutant confers broad immunity against staphylococcal infection in mice. *PLoS ONE*, 5, 1-13.
- Ceyssens, P.J.,** 2009. *Isolation and characterization of lytic bacteriophages infecting Pseudomonas aeruginosa*. Unpublished BSc (Hons) dissertation, University of Leuven.
- Ceyssens, P.J., Minakhin, L., Van den Bossche, A., Yakunina, M., Klimuk, E., Blasdel, B., De Smet, J., Noben, J.P., Bläsi, U., Severinov, K., Lavigne, R.,** 2014. Development of Giant Bacteriophage KZ is Independent of the Host Transcription Apparatus. *Journal of Virology*, 88(18), 10501-10.
- Chan, B.K., Abedon, S.T., Loc-Carrillo, C.,** 2013. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology*, 8(6), 769-83.
- Clokier, M.R.J., Millard, A.D., Letarov, A.V., Heaphy, S.,** 2011. Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31-45.
- Clokier, M.R.J., Shan, J.Y., Bailey, S., Jia, Y., Krisch, H.M., West, S., et al.,** 2006. Transcription of a 'photosynthetic' T4-type phage during infection of a marine cyanobacterium. *Environmental Microbiology*, 8(5), 827-35.
- Colorni, A., Paperna, I., Gordin, H.,** 1981. Bacterial infections in gilt-head sea bream *Sparus aurata* culture in Elat. *Aquaculture*, 23(1-4), 257-267.
- Comeau, A.M., Tremblay, D., Moineau, S., Rattei, T., Kushkina, A.I., Tovkach, F.I., Krisch, H.M., Ackermann, H.W.,** 2012. Phage morphology recapitulates phylogeny: The comparative genomics of a new group of myoviruses. *PLoS ONE*, 7(7), e40102.
- Coyne, R., Hiney, M., Smith, P.,** 1997. Transient presence of oxytetracycline in blue mussels (*Mytilus edulis*) following its therapeutic use at a marine Atlantic salmon farm. *Aquaculture*, 149(3-4), 175-181.
- Crothers-Stomps, C., Høj, L., Bourne, D.G., Hall, M.R., Owens, L.,** 2010. Isolation of lytic bacteriophage against *Vibrio harveyi*. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), 1744-50.
- Davison, J.,** 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*, 42(2), 73-91.

- D' Herelle, F.**, 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences*, 165(11), 373-375.
- De Smet, J., Hendrix, H., Blasdel, B.G., Danis-Włodarczyk, K., Lavigne, R.**, 2017. *Pseudomonas* predators: understanding and exploiting phage-host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 517-530.
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P.**, 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 251-258.
- Delbruck, M.**, 1945. Interference between bacterial viruses: III. The mutual exclusion effect and the depressor effect. *Journal of Bacteriology*, 50, 151-170.
- Eaton, M.D., Bayne-Jones, S.**, 1934. Bacteriophage therapy. Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections. *JAMA*, 23, 1769-1939.
- Egidius, E., Wiik, R., Andersen, K., Hoff, K.A., Hjeltne, B.**, 1986. *Vibrio salmonicida* sp nov., a new fish pathogen. *International journal of systematic bacteriology*, 36, 518-520.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Amann, R.**, 2000. Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: A close look at cultivation-induced shifts. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 4634-4640.
- EMODnet**, 2016. Human Activities Blog, Why is the implementation of maritime spatial planning a necessity for marine aquaculture? Available at: <http://www.emodnet-humanactivities.eu/blog/?p=119>
- Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R.P., McAuliffe, O., Coffey, A.**, 2014. Phage Therapy in food industry. *Annual Review in Food Science and Technology*, 5, 327-349.
- EPFL**, 2017. Protocols: Wet-lab on eGFP-expressing *E.coli*. Available at: <https://wiki.epfl.ch/biodesign-realworld/protocols>.
- Essoh, C., Blouin, Y., Loukou, G., Cablanmian, A., Lathro, S., Kutter, E., Thien, H., Vergnaud, G., Pourcel, C.**, 2013. The susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients to bacteriophages. *PLoS One*, 8(4), 1-12.
- Fankhauser, D.**, 1994. Agar Overlay Technique. Lab protocols, lecture notes. Available at: <https://fankhauserblog.wordpress.com/1994/05/04/agar-overlay-technique/>.
- FAO**, 1988. *The state of food and agriculture 1987-88*. Agriculture Series, no. 21, Rome.
- FAO**, 2009. *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome, 180 pp.
- FAO**, 2016. *The state of world fisheries and aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all*. Rome, 200 pp.
- FAO**, 2018a. FishStatJ-software for fishery statistical time series. Available at: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>
- FAO**, 2018b. National Aquaculture Sector Overview. Greece. Available at: http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_greece/en
- Farmer, J., Janda, M., Brenner, F.W., Cameron, D.N., Birkhead, K.M.**, 2005. Genus I. *Vibrio* Pacini 1854, 411AL. p. 494-546. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2, The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (eds.). Springer, New York.
- Fauconnier, A.**, 2017. Regulating phage therapy: The biological master file concept could help to overcome regulatory challenge of personalized medicines. *EMBO Reports*, 18, 198-200.

- Filippov, A.A., Sergueev, K.V., He, Y., Huang, X.Z., Gnade, B.T., Mueller, A.J., Fernandez- Prada, C.M., Nikolich, M.P.,** 2011. Bacteriophage-resistant mutants in *Yersinia pestis*: identification of phage receptors and attenuation for mice. *PLoS ONE*, 6, 1-11.
- Fischer Le Saux, M., Hervio, H.D., Loaec, S., Colwell, R., Pommepuy, M.,** 2002. Detection of cyto toxin hemolysin mRNA in non culturable populations of environmental and clinical *Vibrio vulnificus* strains in artificial seawater. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 5641-5646.
- Flardh, K., Cohen, P.S., Kjelleberg, S.,** 1992. Ribosomes exist in large excess over the apparent demand for protein synthesis during carbon starvation in marine *Vibrio* sp. strain CCUG 15956. *Journal of Bacteriology*, 174, 6780-6788.
- Froelich, B., Ayrapetyan, M., Oliver, J.D.,** 2013. Integration of *Vibrio vulnificus* into marine aggregates and its subsequent uptake by *Crassostrea virginica* oysters. *Applied Environmental Microbiology*, 79, 1454-1458.
- Furusawa, T., Iwano, H., Hiyashimizu, Y., Matsubara, K., Higuchi, H., Nagahata, H., Niwa, H., Katayama, Y., et al.,** 2016. Phage therapy is effective in a mouse model of bacterial equine keratitis. *Applied Environmental Microbiology*, 82, 5332-5339.
- Garcia, P.B., Martinez, B., Obeso, J.M., Rodriguez, A.,** 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 479-485.
- Goldburg, R.J., Elliott, M.S., Naylor, R.L.,** 2001. Marine Aquaculture in the United States: Environmental Impacts and Policy Options. *Pew Oceans Commission*. Arlington, VA (USA).
- Gomez-Gil, B., Thompson, C.C., Matsumura, Y., Sawabe, T., Iida, T., Christen, R., Thompson, F., Sawabe, T.,** 2014. Family Vibrionaceae. p 659-747. In: *The Prokaryotes*. Rosenberg E., DeLong E.F., Thompson F.L., Lory S. and Stackebrandt E. (eds.). 4th edition, Springer, New York.
- Goodridge, L.D., Abedon, S.T.,** 2008. Bacteriophage biocontrol: the technology matures. *Microbiology Australia*, 48-49.
- Gosink, K.K., Kobayashi, R., Kawagishi, I., Häse, C.C.,** 2002. Analyses of the roles of the three cheA homologs in chemotaxis of *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 184, 1767-1771.
- Goulden, E.F., Høj, L., Hall, M.R.,** 2013. *Advances in aquaculture hatchery technology: Microbial management for bacterial pathogen control in invertebrate aquaculture hatcheries*. Woodhead n.242, 49pp.
- Grave, K., Lingaas, E., Bangen, M., Rønning, M.,** 1999. Surveillance of the overall consumption of antibacterial drugs in humans, domestic animals and farmed fish in Norway in 1992 and 1996. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43, 243-252.
- Grave, K., Markestad, A., Bangen, M.,** 1996. Comparison in prescribing patterns of antibacterial drugs in salmonid farming in Norway during the periods 1980-1988 and 1989-1994. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19, 184-191.
- Greenlees, K.J.,** 2003. Animal drug human food safety toxicology and antimicrobial resistance - the square peg. *International Journal of Toxicology*, 22, 131-134.
- Grimes, D.J., Johnson, C.N., Dillon, K.S., Flowers, A.R., Noriega, N.F., Berutti, T.,** 2009. What genomic sequence information has revealed about *Vibrio* ecology in the ocean-a review. *Microbial Ecology*, 58, 447-460.
- Grisez, L., Reyniers, J., Verdonck, L., Swings, J., Ollevier, F.,** 1997. Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. *Aquaculture*, 15(5), 387-399.

- Guardabassi, L., Dalsgaard, A., Raffatellu, M., Olsen, J.E.,** 2000. Increase in the prevalence of oxolinic acid resistant *Acinetobacter* spp. observed in a stream receiving the effluent from a freshwater trout farm following the treatment with oxolinic acid-medicated feed. *Aquaculture*, 188, 205-218.
- Haenen, O.,** 2017. Major bacterial diseases affecting aquaculture, *Aquatic AMR Workshop by FAO* 1, 10-11, Mangalore, India.
- Hankin, E.H.,** 1896. L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. *Annales De l'Institut Pasteur*, 10, 511.
- Hansen G.H., Olafsen, J.A.,** 1989. Bacterial colonization of cod (*Gadus morhua* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture. *Applied Environmental Microbiology*, 55, 1435-1446.
- Hektoen, H., Berge, J.A., Hormazabal, V., Yndestad, M.,** 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture*, 133, 175-184.
- Heller, K.J.,** 1992. Molecular interaction between bacteriophage and the gram-negative cell envelope. *Archives of Microbiology*, 158, 235-248.
- Higuera, G., Bastías, R., Tsertsvadze, G., Romero, J., Espejo, R.T.,** 2013. Recently discovered *Vibrio anguillarum* phages can protect against experimentally induced vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 392-395, 128-133.
- Hjeltnes, B., Roberts, R.J.,** 1993. Vibriosis. p. 109-121. In: *Bacterial diseases of fish*. Roberts R.J., Bromage N.R. and Inglis V. (eds). Blackwell Scientific, Oxford.
- Høj, L., Bourne, D.G., Hall, M.R.,** 2009. Localization, abundance and community structure of bacteria associated with *Artemia*: Effects of nauplii enrichment and antimicrobial treatment. *Aquaculture*, 293, 278-285.
- Hollants, J., Leliaert, F., De Clerck, O., Willems, A.,** 2013. What we can learn from sushi: A review on seaweed-bacterial associations. *FEMS Microbiology Ecology*, 83, 1-16.
- Holten Lützhøft, H.C., Halling-Sørensen, B., Jørgensen, S.E.,** 1999. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36, 1-6.
- Hughes, K.A., Sutherland, I.W., Clark, J., Jones, M.V.,** 1998. Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases, novel tools for study of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 85(3), 583-590.
- ICTV,** 2016. International Committee on Taxonomy of Viruses. Available at: <https://talk.ictvonline.org/>.
- Inglis, V.,** 2000. Antibacterial chemotherapy in aquaculture: review of practice, associated risks and need for action. p. 7-22. In: *Use of Chemicals in Aquaculture in Asia: Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia 20-22 May 1996*. Arthur J.R., Lavilla-Pitogo C.R., and. Subasinghe R.P (eds.). Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, Tigbauan, Iloilo, Philippines.
- James, T.D., Cashel, M., Hinton, D.M.,** 2010. A mutation within the β subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase impairs transcription from bacteriophage T4 middle promoters. *Journal of Bacteriology*, 192(21), 5580-7.
- Jayaprakash, N.S., Rejish Kumar, V.J., Philip, R., Bright Singh, I.S.,** 2006. Vibriosis associated with *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) larvae from three hatcheries on the Indian southwest coast. *Aquaculture Research*, 37, 351-358.

- Jeembaeva, M., Castelnovo, M., Larsson, F., Evilevitch, A.,** 2008. Osmotic pressure: resisting or promoting DNA ejection from phage. *Journal of Molecular Biology*, 381(2), 310-323.
- Kalatzis, P.G., Bastías, R., Kokkari, C., Katharios, P.,** 2016. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages, ϕ St2 and ϕ Grn1; phage therapy application for biological control of *Vibrio alginolyticus* in aquaculture live feeds. *PLoS One*, 11(3), e0151101.
- Kanno, T., Nakai, T., Muroga, K.,** 1989. Mode of Transmission of Vibriosis among Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1(1), 2-6.
- Karunasagar, I., Shivu, M.M., Girisha, S.K., Krohne, G.,** 2007. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture*, 268, 288-292.
- Kerry, J., Coyne, R., Gilroy, D., Hiney, M., Smith, P.,** 1996. Spatial distribution of oxytetracycline and elevated frequencies of oxytetracycline resistance in sediments beneath a marine salmon farm following oxytetracycline therapy. *Aquaculture*, 145, 31-39.
- Keynan, A., Nealon, K., Sideropoulos, H., Hastings, J.W.,** 1974. Marine transducing bacteriophage attacking a luminous bacterium. *Journal of Virology*, 14(2), 333-40.
- Kim, S.R., Nonaka, L., Suzuki, S.,** 2004. Occurrence of tetracycline resistance genes tet(M) and tet(S) in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 147-156.
- King, A., Lefkowitz, E., Adams, M.J., Carstens, E.B.,** 2012. *Virus Taxonomy*, Family Siphoviridae, Elsevier.
- Kocharunchitt, C., Ross, T., McNeil, D.L.,** 2009. Use of bacteriophages as biocontrol agents to control Salmonella associated with seed sprouts. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 453-459.
- Kong, W., Huang, L., Su, Y., Qin, Y., Ma, Y., Xu, X., et al.,** 2015. Investigation of possible molecular mechanisms underlying the regulation of adhesion in *Vibrio alginolyticus* with comparative transcriptome analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107(5), 1197-1206.
- Kramer, J.G., Singleton, F.L.,** 1992. Variations in rRNA content of marine *Vibrio* spp. during starvation-survival and recovery. *Applied Environmental Microbiology*, 58, 201-207.
- Krueger, A.P., Scribner, E.J.,** 1941. Bacteriophage therapy. II. The bacteriophage: its nature and its therapeutic use. *JAMA*, 19, 2160-2277.
- Kruse, H., Sørum, H.,** 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 4015-4021.
- Kümmerer, K.,** 2009. Antibiotics in the aquatic environment. *Chemosphere*, 75(4), 417-434.
- Kümmerer, K., Henninger, A.,** 2003. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. *Clinical Microbiology and Infection*, 9, 1203-1214.
- Kunisaki, H., Tanji, Y.,** 2010. Intercrossing of phage genomes in a phage cocktail and stable coexistence with *Escherichia coli* 0157:H7 in anaerobic continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1533-1540.
- Kutter, E., De Vos, D., Gvasalia, G., Alavidze, Z., Gogokhia, L., Kuhl, S., Abedon, S.T.,** 2010. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11, 69-86.
- Kutter, E., Guttman, B., Carlson, K.,** 1994a. The transition from host to phage metabolism after T4 infection. p. 343-346. In: *Molecular biology of bacteriophage T4*. Karam J., Drake J. W., Kreuzer K. N.,

- Mosig G., Hall D. H., Eiserling F. A., Black L. W., Spicer E. K., Kutter E., Carlson K. and Miller E. S. (eds.). American Society for Microbiology, Washington.
- Kutter, E., White, T., Kashlev, M., Uzan, M., McKinney, J., Guttman, B., 1994b.** Effects on host genome structure and expression. p. 357-368. In: *Molecular biology of bacteriophage T4*. Karam J., Drake J.W., Kreuzer K. N., Mosig G., Hall D. H., Eiserling F. A., Black L. W., Spicer E. K., Kutter E., Carlson K. and Miller E.S. (eds.). American Society for Microbiology, Washington.
- L’Abee-Lund, T.M., and Sørum, H., 2001.** Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. *Microbial Drug Resistance*, 7, 263-272.
- La Scola, B., Desnues, C., Pagnier, I., Robert, C., Barrassi, L., Fournous, G., Merchat, M., Suzan-Monti, M., Forterre, P., Koonin, E., Raoult, D., 2008.** The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature*, 455(7209), 100-4.
- Labrie, S.J., Samson, J.E., Moineau, S., 2010.** Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 317-327.
- Lang, G., Kehr, P., Mathevon, H., Clavert, J.M., Sejourne, P., Pointu, J., 1979.** Bacteriophage therapy of septic complications of orthopaedic surgery. *Revue De Chirurgie Orthopedique Et Reparatrice De L'Appareil Moteur*, 1, 33-37.
- Larsen, M.H., Blackburn, N., Larsen, J.L., Olsen, J.E., 2004.** Influences of temperature, salinity and starvation on the motility and chemotactic response of *Vibrio anguillarum*. *Microbiology*, 150, 1283-1290.
- Lavigne, R., Darius, P., Summer, E.J., Seto, D., Mahadevan, P., Nilsson, A.S., Ackermann, H.W., Kropinski, A.M., 2009.** Classification of *Myoviridae* bacteriophages using protein sequence similarity. *BMC Microbiology*, 26(9), 224.
- Lee, D.Y., Moon, S.Y., Lee, S.O., Yang, H.Y., Lee, H.J., Lee, M.S., 2008.** Septic shock due to *Vibrio alginolyticus* in a cirrhotic patient: The first case in Korea. *Yonsei Medical Journal*, 49, 329-332.
- Lee, K.K., Yu, S.R., Chen, F.R., Yang, T.I., Liu, P.C., 1996.** Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Current Microbiology*, 32, 229-231.
- Levin, B.R., Bull, J.J., 2004.** Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 166-173.
- Lillehaug, A., Lunestad, B.T., Grave, K., 2003.** Epidemiology of bacterial diseases in Norwegian aquaculture - a description based on antibiotic prescription data for the ten-year period 1991 to 2000. *Diseases of Aquatic Organisms*, 53, 115-125.
- Lindell, D., Jaffe, J.D., Coleman, M.L., Futschik, M.E., Axmann, I.M., Rector, T., et al., 2007.** Genome wide expression dynamics of a marine virus and host reveal features of co-evolution. *Nature*, 449, 83-6.
- Little, J.W., 2005.** Lysogeny, Prophage Induction, and Lysogenic Conversion. p. 37-54. In: *Phages Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology*. Waldor M.K., Friedman D.I., Adhya S. (eds.). ASM Press, Washington.
- Loc Carrillo, C., Atterbury, R.J., El Shibiny, A., et al., 2005.** Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6554-6563.
- Lomeli-Ortega, C.O., Martínez-Díaz, S.F., 2014.** Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture*, 434, 208-211.

- Lunder, T., Evensen, O., Holstad, G., Hastein, T.,** 1995. Winter ulcer' in the Atlantic salmon *Salmo salar*. Pathological and bacteriological investigations and transmission experiments. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23(1), 39-49.
- Luria, S.E., Delbrück, M., Anderson, T.F.,** 1943. Electron microscope studies of bacterial viruses. *Journal of Bacteriology*, 46, 57-77.
- Lwoff, A., Horne, R., Tournier, P.,** 1962. A system of viruses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 27, 51-55.
- Lyons, M.M., Lau, Y.T., Carden, W.E., Ward, J.E., Roberts, S.B., Smolowitz, R., Vallino, J., Allam, B.,** 2007. Characteristics of marine aggregates in shallow-water ecosystems: Implications for disease ecology. *Ecohealth*, 4, 406-420.
- Markestad, A., Grave, K.,** 1997. Reduction of antibacterial drug use in Norwegian fish farming due to vaccination. *Developments in Biological Standardization*, 90, 365-369.
- Markoishvili, K., Tsitlanadze, G., Katsarava, R., Morris, J.G., Sulakvelidze, A.,** 2002. A novel sustained- release matrix based on biodegradable polyester amides and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *International Journal of Dermatology*, 41, 453-458.
- Martha, R.J., Clokie, M.R.J., Millard, A.D., Letarov, A.V., Heaphy, S.,** 2011. Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31-45. Landes Bioscience.
- Martínez-Díaz, S.F., Hipólito-Morales, A.,** 2013. Efficacy of phage therapy to prevent mortality during the vibriosis of brine shrimp. *Aquaculture*, 400-401, 120-124.
- Mateus, L., Costa, L., Silva, Y.J., Pereira, C., Cunha, A., Almeida, A.,** 2014. Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. *Aquaculture*, 424-425, 167-173.
- Mathur, M.D., Vidhani, S., Mehndiratta, P.L.,** 2003. Bacteriophage therapy: An alternative to conventional antibiotics. *Journal of Association of Physicians of India*, 51 pp.
- Matsuzaki, S., Tanaka, S., Koga, T., Kawata, T.,** 1992. Abroad-host-range vibriophage, KVP40, isolated from sea water. *Microbiology and Immunology*, 36, 93-97.
- Maura, D., Galtier, M., Le, B.C., Debarbieux, L.,** 2012. Virulent bacteriophages can target O104: H4 entero aggregative *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(12), 6235-6242.
- McDermott, P.F., Zhao, S., Wagner, D.D., Simjee, S., Walker, R.D., White, D.G.,** 2002. The food safety perspective of antibiotic resistance. *Animal Biotechnology*, 13, 71-84.
- McVay, C.S., Velásquez, M., Fralick, J.A.,** 2007. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 1934-1938.
- Merabishvili, M., Pirnay, J.-P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., Glonti, T., Krylov, V., Mast, J., Parys, L.V., Lavigne, R., Volckaer, G., Mattheus, W., Verween, G., Corte, P.D., Rose, T., Jennes, S., Zizi, M., Vos, D.D., Vanechoutte, M.,** 2009. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS ONE*, 4, e4944.
- Merino, S., Camprubi, S., Tomas, J.M.,** 1990. Isolation and characterization of bacteriophage PM2 from *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiology Letters*, 68, 239-244.
- Merril, C.R., Scholl, D., Adhya, S.,** 2006. Phage therapy. p. 725-741. In: *The Bacteriophage*. Calendar, R. (eds.). Oxford University Press, New York.

- Miller, E.S., Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Durkin, A.S., Ciecko, A., Feldblyum, T.V., White, O., Paulsen, I.T., Nierman, W.C., Lee, J., Szczypinski, B., Fraser, C.M., 2003a.** Complete genome sequence of the broad-host-range vibriophage KVP40: comparative genomics of a T4-related bacteriophage. *Journal of Bacteriology*, 185(17), 5220-33.
- Miller, E.S., Kutter, E., Mosig, G., Arisaka, F., Kunisawa T., Ruger, W., 2003b.** Bacteriophage T4 Genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 86-156.
- Miller, R.W., Skinner, E.J., Sulakvelidze, A., Mathis, G.F., Hofacre, C.L., 2010.** Bacteriophage therapy for control of necrotic enteritis of broiler chickens experimentally infected with *Clostridium perfringens*. *Avian Diseases*, 54(1), 33-40.
- Miranda, C.D., Kehrenberg, C., Ulep, C., Schwarz, S., Roberts, M.C., 2003.** Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 883-888.
- Moeller, R.B., 2001.** *Diseases of Fish*. California Animal Health and Food Safety Laboratory System, University of California. Tulare, California.
- Monk, A.B., Rees, C.D., Barrow, P., Hagens, S., Harper, D.R., 2010.** Bacteriophage applications: where are we now? *Letters in Applied Microbiology*, 51, 363-369.
- Mosig, G., Hall, D.H., 1994.** Gene expression: a paradigm of integrated circuits. p. 127-131. In: *Molecular Biology of Bacteriophage T4*. Karam J., Drake J.W., Kreuzer K.N., Mosig G. and Hall D.H. (eds.). American Society for Microbiology, Washington.
- Munro, J., Oakey, J., Bromage, E., Owens, L., 2003.** Experimental bacteriophage-mediated virulence in strains of *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 54, 187-194.
- Munro, P.D., Birkbeck, T.H., Barbour, A., 1993.** Influence of rate of bacterial colonisation of the gut of turbot larvae on larval survival. p. 85-92. In: *Fish Farming Technology*. Reinertsen H., Dahle L.A., Jørgensen L. and Tvinnereim K. (Eds.). Balkema, Rotterdam.
- Muroga, K., De La Cruz, M.C., 1987.** Fate and location of *Vibrio anguillarum* in tissues of artificially infected ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Fish Pathology*, 22(2), 99-103.
- Muroga, K., Jo, Y., Nishibuchi, M., 1976.** Pathogenic *Vibrio* isolated from cultured eels I. Characteristics and taxonomic status. *Fish Pathology*, 11, 141-145.
- Murray, A.G., Peeler, E.J., 2005.** A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine* 67, 223-235.
- Nakai, T., 2010.** Application of bacteriophages for control of infectious diseases in aquaculture. p. 257-272. In: *Bacteriophages in the control of food- and waterborne pathogens*. Sabour P.M. and Griffiths M.W. (eds.). American Society for Microbiology Press, Washington.
- Nakai T., Park, S.C., 2002.** Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in Microbiology*, 153, 13-18.
- Nakai, T., Sabour, P., Griffiths, M., 2010.** Application of bacteriophages for control of infectious diseases in aquaculture. p. 257-272. In: *Bacteriophages in the Control of Food and Waterborne Pathogens*. Sabour P.M., Griffiths M.W. (Eds.). American Society for Microbiology Press, Washington.
- Nakai, T., Sugimoto, R., Park, K., Matsuoka, S., Mori K., Nishioka, T., 1999.** Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37, 33-41.
- Nelson, D., 2004.** Phage taxonomy: we agree to disagree. *Journal of Bacteriology*, 186(21), 7029-7031.

- Olafsen, J.A.**, 1984. Ingestion of bacteria by cod *Gadus morhua* L. larvae. p. 627-643. In: *The Propagation of Cod, Gadus morhua* L. Institute of Marine Research, Bergen.
- Olafsen, J.A.**, 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, 200, 223-247.
- Olafsen, J.A., Hansen, G.H.**, 1992. Intact antigen uptake by intestinal epithelial cells of marine fish larvae. *Journal of Fish Biology*, 40, 141-156.
- Oliver, J.D., Pruzzo, C., Vezzulli, L., Kaper, J.B.**, 2013. *Vibrio* species. p. 401-440. In: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers 4th edition*. Doyle M.P. and Buchanan R.S. (eds.). Washington.
- Oliveira, J., Castilho, F., Cunha, A., Pereira, M.**, 2012. Bacteriophage therapy as a bacterial control strategy in aquaculture. *Aquaculture International*, 20, 879-910.
- Örmälä, A.M., Jalasvuori, M.**, 2013. Phage therapy: Should bacterial resistance to phages be a concern, even in the long run? *Bacteriophage*, 3(1), e24219.
- Park, S., Nakai, T.**, 2003. Bacteriophage control of *Pseudomonas plecoglossicida* infection in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 53, 33-39.
- Park, S., Shimamura, I., Fukunaga, M., Mori, K.I., Nakai, T.**, 2000. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 1416-1422.
- Patten, K., Kurtböke, D., Lindsay, D.**, 1995. Isolation of *Dermatophilus congolensis* phage from the 'Lumpy Wool' of sheep in Western Australia. *Letters in Applied Microbiology*, 199-203.
- Pazos, F., Santos, Y., Magarinos, B., Bandin, I., Nunez, S., Toranzo, A.E.**, 1993. Phenotypic characteristics and virulence of *Vibrio anguillarum*-related organisms. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 2969-2976.
- Phumkhachorn, P., Rattanachakunsopon, P.**, 2010. Isolation and partial characterization of a bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*. *African Journal of Microbiology Research*, 4(16), 1794-1800.
- Plaza, N., Castillo, D., Pérez-Reytor, D., Higuera, G., García, K., Bastías, R.**, 2018. Bacteriophages in the control of pathogenic *Vibrios*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 31, 24-33.
- Prol-García, M.J., Planas, M., Pintado, J.**, 2010. Different colonization and residence time of *Listonella anguillarum* and *Vibrio splendidus* in the rotifer *Brachionus plicatilis* determined by real-time PCR and DGGE. *Aquaculture*, 302, 26-35.
- Pruzzo, C., Huq, A., Colwell, R.R., Donelli, G.**, 2005. Pathogenic *vibrio* species in marine and estuarine environment. p. 217-252. In: *Ocean and Health pathogens in the marine environment*. Belkin S. and Colwell R.R. (eds.). Springer, Heidelberg.
- Ramaiah, N., Ravel, J., Straube, W.L., Hill, R.T., Colwell, R.R.**, 2002. Entry of *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischeri* into the viable but non culturable state. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 108-116.
- Rice, T.B.**, 1930. Use of bacteriophage filtrates in treatment of suppurative conditions: report of 300 cases. *The American Journal of the Medical Sciences*, 179, 345-360.
- Rodgers, L.J., Burke, J.B.**, 1988. Etiology of red spot disease (vibriosis) with special reference to the ectoparasitic digenean *Prototransversotrema steeri* (Angel) and the sea mullet, *Mugil cephalus* (Linnaeus). *Journal of Fish Biology* 32, 655-663.

- Rossmann, M.G., Mesyanzhinov, V.V., Arisaka, F., Leiman, P.G.,** 2004. The bacteriophage T4 DNA injection machine. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(2), 171-180.
- Roy, B., Ackermann, H.W., Pandian, S., Picard, G., Goulet, J.,** 1993. Biological inactivation of adhering *Listeria monocytogenes* by listeria bacteriophages and a quaternary ammonium compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2914-2917.
- Rucker, R.R.,** 1963. Status of fish diseases and relation to production. *Report of the Second Governor's Conference on Pacific Salmon*, Seattle, 98-101.
- Ruska, H.,** 1940. Die Sichtbarmachung der bakteriophagen Lyse im Übermikroskop. *Naturwissenschaften*, 28(3), 45-46.
- Sabir, M., Cohen, N., Boukhanjer, A., Ennaji, M.M.,** 2011. Occurrence and survival of *Vibrio alginolyticus* in Tamouda Bay (Morocco). *Cellular and Molecular Biology*, 57, 1592-1599.
- Sabir, M., Ennaji Moulay, M., Cohen, N.,** 2013 *Vibrio Alginolyticus*: An Emerging Pathogen of Foodborne Diseases. *International Journal of Science & Technology*, 2, 302-309.
- Salyers, A.A., Gupta, A., Wang, Y.,** 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends in Microbiology*, 12, 412-416.
- Samsygina, G.A., Boni, E.G.,** 1984. Bacteriophages and phage therapy in pediatric practice. *Jornal de Pediatria*, 4, 67-70.
- Sandaa, R.A., Enger, Ø.,** 1994. Transfer in marine sediments of the naturally occurring plasmid pRAS1 encoding multiple antibiotic resistance. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 4234-4238.
- Sandeep, K.,** 2006. Bacteriophage precision drug against bacterial infections. *Current Science*, 90, 631-33.
- Scheftel, J.M., Ashkar, K., Boeri, C., Monteil, H.,** 2006. Phlegmon au doigt à *Vibrio alginolyticus* consécutif à une blessure chez un patient de retour du Maroc. *Journées Francophones de Microbiologie des Milieux Hydriques*, 23-24.
- Schiewe, M.H., Trust, T.J., Crosa, J.H.,** 1981. *Vibrio ordalii* sp. nov.: a causative agent of vibriosis in fish. *Current Microbiology*, 6, 343-348.
- Schless, R.A.,** 1932. *Staphylococcus aureus* Meningitis, treatment with specific bacteriophage. *American Journal of Diseases of Children*, 44, 813-822.
- Schmerer, M., Molineux, I.J., Bull, J.J.,** 2014. Synergy as a rationale for phage therapy using phage cocktails. *PeerJ*, 2, e590.
- Scott, A.E., Timms, A.R., Connerton, P.L., Carrillo, C.L., Radzum, K.A., Connerton, I.F.,** 2007. Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *PloS Pathogens*, 3, 1142-1151.
- Sera, H., Ishida, Y.,** 1972. Bacterial flora in the digestive tract of marine fish-II. Change of bacterial flora with time lapse after ingestion of diet. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 38, 633-637.
- Serrano, P.H.,** 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper* 469, 97 pp., Rome.
- Shivu, M.M., Rajeeva, B.C., Girisha, S.K., Karunasagar I., Krohne, G.,** 2007. Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India. *Environmental Microbiology*, 9, 322-331.

- Silva, Y.J.C., Costa, L., Pereira, C., Cunha, A., Calado, R., Gomes, N.C.M., Almeida, A.,** 2014. Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture. *Microbial Biotechnology*, in press.
- Simidu, U., Ashino, K., Kaneko, E.,** 1971. Bacterial flora of phyto- and zoo- plankton in the inshore water of Japan. *Canadian Journal of Microbiology*, 19, 1157-1160.
- Silva-Aciares, F., Moraga, D., Auffret, M., Tanguy, A., Riquelme, C.,** 2013. Transcriptomic and cellular response to bacterial challenge (pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*) in farmed juvenile *Haliotis rufescens* fed with or without probiotic diet. *Journal of Invertebrate Pathology*, 113, 163-176.
- Skjermo, J., Vadstein, O.,** 1993. Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 255(1), 185-191.
- Skliros, D., Kalatzis, P.G., Katharios, P., Flemetakis, E.,** 2015. Characterization of three newly isolated lytic bacteriophages with potential therapeutic use in aquaculture. *European Bioremediation conference*, Chania, Crete, Greece. (POSTER).
- Skliros, D., Kalatzis, P.G., Katharios, P., Flemetakis, E.,** 2016. Comparative Functional Genomic Analysis of Two *Vibrio* Phages Reveals Complex Metabolic Interactions with the Host Cell. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1807.
- Skurnik, M., Strauch, E.,** 2006. Phage therapy: facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 5-14.
- Snoussi, M., Chaieb, K., Mahmoud, R., Bakhrouf, A.,** 2006. Quantitative study, identification and antibiotics sensitivity of some Vibrionaceae associated to a marine fish hatchery. *Annals of Microbiology*, 56, 289-293.
- Sørum, H.,** 2000. Farming of Atlantic salmon - an experience from Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 93, 129-134.
- Sørum, H.,** 2006. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. p. 213-238. In: *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Aarestrup, F.M. (eds.). ASM Press, Washington.
- Sørum, H., L'Abée-Lund, T.M.,** 2002. Antibiotic resistance in food-related bacteria - a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 43-56.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Nielsen, T., Gram, L.,** 2000. Proliferation and location of *Vibrio anguillarum* during infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 23(6), 423-427.
- Spinelli, S., Veessler, D., Bebeacua, C., Cambillau, C.,** 2014. Structures and host-adhesion mechanisms of lactococcal isophages. *Frontiers in Microbiology*, 5, 3
- Stalin, N., Srinivasan, P.,** 2016b. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phage from shrimp pond in Palk Strait, South East coast of India. *Biologicals*, 1-8.
- Stalin, N., Srinivasan, P.,** 2017. Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. *Veterinary Microbiology*, 207, 83-96.
- Stenholm, A.R., Dalsgaard, I., Middelboe, M.,** 2008. Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied Environmental Microbiology*, 74(13), 4070-4078.
- Stevenson, R.M.W., Airdrie, D.W.,** 1984. Isolation of *Yersinia ruckeri* bacteriophages, *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 1201-1205.

- Stout, B.F.**, 1933. Bacteriophage therapy. *Texas State Journal of Medicine*, 29, 205-209.
- Su, Y.C., Liu, C.**, 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiology*, 24, 549-548.
- Sulakvelidze, A., Barrow, P.**, 2005. Phage therapy in animals and agribusiness. p. 335-380. In: *Bacteriophages: Biology and Applications*. Kutter E. and Sulakvelidze A. (eds.). CRC Press, Boca Raton.
- Summers, W.C.**, 1999. Felix d'Herelle and the origins of molecular biology. *Yale University Press*, 248 pp.
- Sutherland, I.W.**, 1995. Polysaccharide lyases. *FEMS Microbiology Reviews*, 16(4), 323-347.
- Takemura, A.F., Chien, D.M., Polz, M.F.**, 2014. Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-26.
- Tanasomwang, V., Muroga, K.**, 1988. Intestinal Microflora of Larval and Juvenile Stages in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Pathology*, 23(2), 77-83.
- Tanji, Y., Shimada, T., Fukudomi, H., Miyanaga, K., Nakai, Y., Unno, H.**, 2005. Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 280-287.
- Thomson, R., Macpherson, H.L., Riaza, A., Birkbeck, T.H.**, 2005. *Vibrio splendidus* biotype 1 as a cause of mortalities in hatchery-reared larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 243-250.
- Thompson, R., Randa, M.A., Marcelino, L.A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E., Polz, M.F.**, 2004. Diversity and dynamics of a north atlantic coastal *Vibrio* community. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4103-4110.
- Toranzo, A.E., Barja, J.L.**, 1993. Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3(0), 5-36.
- Toranzo, A.E., Barja, J.L., Potter, S.A., Colwell, R.R., Hetrick, F.M., Crosa, J.H.**, 1983. Molecular factors associated with virulence of marine vibrios isolated from striped bass in Chesapeake Bay. *Infection and Immunity*, 39, 1220-1227.
- Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L.**, 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246(1-4), 37-61.
- Twort, F.W.**, 1915. An investigation on the nature of ultra - microscopic viruses. *The Lancet*, 186, 1241-1243.
- Van Helvoort, T.**, 1992. Bacteriological and physiological research styles in the early controversy on the nature of the bacteriophage phenomenon. *Medical History*, 3, 243-270.
- Varvarigos, P.**, 2007. *Vibrio alginolyticus* combined with the motile Aeromonads *Aeromonas sobria* and *Aeromonas hydrophila* comprise the main bacterial taxa responsible for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larval enteropathy (LE). *European Aquaculture Fish Pathology 13th International Conference of Fish and Shellfish diseases*, 126 pp.
- Verner-Jeffreys, D.W., Algoet, M., Pond, M.J., Virdee, H.K., Bagwell, N.J., Roberts, E.G.**, 2007. Furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is not readily controllable by bacteriophage therapy. *Aquaculture*, 270, 475-484.
- Vezzulli, L., Grande, C., Reid, P.C., Hélaouët, P., Edwards, M., Höfle, M.G., Brettar, I., Colwell, R.R., Pruzzo, C.**, 2016. Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, E5062-E5071. USA.

- Vezzulli, L., Höfle, M., Pruzzo, C., Pezzati, E., Brettar, I.**, 2015. Effects of global warming on *Vibrio* ecology. *Microbiology Spectrum*, 3.
- Vieira, A., Silva, Y., Cunha, A., Gomes, N., Ackermann, H.W., Almeida, A.**, 2012. Phage therapy to control multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* skin infections: *in vitro* and *ex vivo* experiments. *European Journal of Clinical Microbiology*, 31, 3241-3249.
- Vieu, J. F., Guillermet, F., Minck, R., Nicolle, P.**, 1979. Donnees actuelles sur les applications therapeutiques des bacteriophages. Bulletin de L'Académie Nationale de Médecine, 163, 61.
- Villamil, L., Figueras, A., Planas, M., Novoa, B.**, 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture*, 219, 43-56.
- Vinod, M.G., Shivu, M.M., Umesha, K.R., Rajeeva, B.C., Krohne, G.**, 2006. Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture*, 255, 117-124.
- Wagner, P.L., Waldor, M.K.**, 2002. Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infection and Immunity*, 70, 3985-3993.
- Wang, X., Wei, Z., Li, M., Wang, X., Shan, A., Mei, X., Jousset, A., Shen, Q., Xu, Y., Friman, V.P.**, 2016. Parasites and competitors suppress bacterial pathogen synergistically due to evolutionary trade-offs. *Evolution*, 71, 733-746.
- Weigele, P.R., Pope, W.H., Pedulla, M.L., Houtz, J.M., Smith, A.L., Conway, J.F., et al.**, 2007. Genomic and structural analysis of Syn9, a cyanophage infecting marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Environmental Microbiology*, 9, 1675-1695.
- Weinbauer, M.G., Rassoulzadegan, F.**, 2004. Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology*, 6, 1-11.
- Wilhelm, S.W., Suttle, C.A.**, 1999. Viruses and nutrient cycles in the sea: Viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs. *Bioscience*, 49, 781-788.
- Wilson, W.H., Carr, N.G., Mann, N.H.**, 1996. The effect of phosphate status on the kinetics of cyanophage infection in the oceanic cyanobacterium *Synechococcus* spp. *Journal of Phycology*, 32, 506-516.
- Wong, M.L., Medrano, J.F.**, 2005. Real Time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.
- Wommack, K.E., Colwell, R.R.**, 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 69-114.
- Wu, J.L., Lin, H.M., Jan, L., Hsu, Y.L., Chang, L.H.**, 1981. Biological control of fish pathogen *Aeromonas hydrophila* by bacteriophage AH1. *Fish Pathology*, 15, 271-276.
- Yooseph, S., Nealson, K.H., Rusch, D.B., McCrow, J.P., Dupont, C.L., Kim, M., Johnson, J., Montgomery, R., Ferreira, S., Beeson, K., et al.**, 2010. Genomic and functional adaptation in surface ocean planktonic prokaryotes. *Nature*, 468, 6066.
- Yoshimizu, M., Kimura, T.**, 1976. Study on the intestinal microflora of salmonids. *Fish Pathology*, 10, 243-259.
- Yu, C., Bassler, B.L., Roseman, S.**, 1993. Chemotaxis of the marine bacterium *Vibrio furnissii* to sugars: A potential mechanism for initiating the chitin catabolic cascade. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 9405-9409.

Yu, Y.P., Gong, T., Jost, G., Liu, W.H., Ye, D.Z., Luo, Z.H., 2013. Isolation and characterization of five lytic bacteriophages infecting a *Vibrio* strain closely related to *Vibrio owensii*. *FEMS Microbiology Letters*, 348, 112-119.

Zorilla, I., Chabrillon, M., Arijo, S., Diaz-Rozales, P., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M.C., et al., 2003. Bacteria recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain. *Aquaculture*, 218, 11-20.