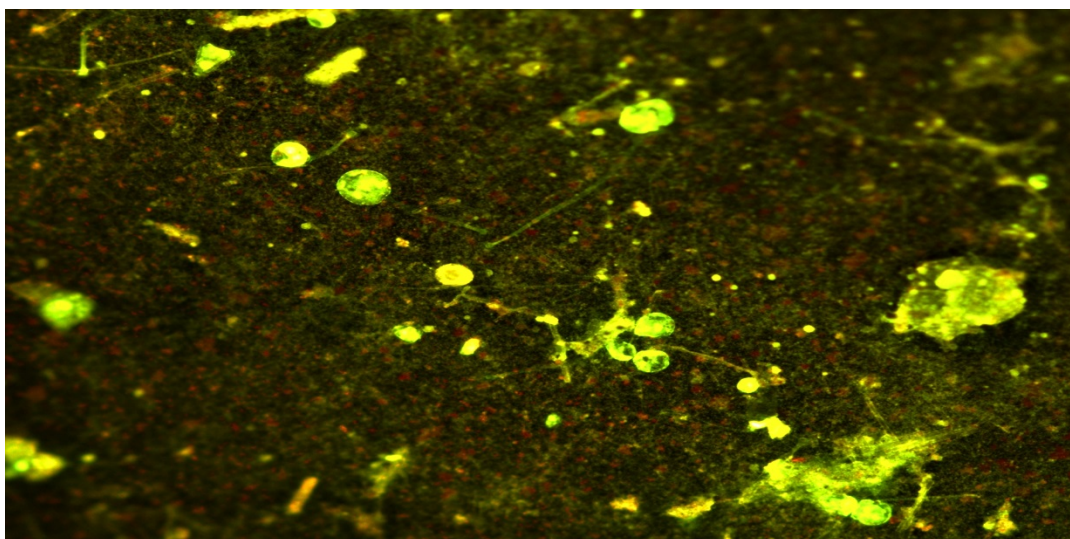


**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΜΣ «ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΒΙΟΪΜΕΝΙΩΝ ΣΕ  
ΜΕΤΑΛΛΙΚΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ, ΣΕ ΚΛΕΙΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ  
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ  
ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ**



***ΣΧΟΙΝΑ Γ. ΕΙΡΗΝΗ***

**ΑΘΗΝΑ  
2019**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Χατζόπουλος Πολυδεύκης**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΒΙΟΪΜΕΝΙΩΝ ΣΕ  
ΜΕΤΑΛΛΙΚΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ, ΣΕ ΚΛΕΙΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ  
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ  
ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ**

**BIOFILM FORMATION ON STAINLESS STEEL  
SURFACES IN AN EXPERIMENTAL MEDITERRANEAN  
RECIRCULATED AQUACULTURE SYSTEM**

***ΣΧΟΙΝΑ Γ. ΕΙΡΗΝΗ***

**Επιβλέπων Καθηγητής : Χατζόπουλος Πολυδεύκης**

**Τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:**

**Χατζόπουλος Πολυδεύκης, Καθηγητής  
Νυχάς Γεώργιος. Ιωάννης, Καθηγητής  
Σκανδάμης Παναγιώτης, Αν. Καθηγητής**

# ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΒΙΟΪΜΕΝΙΩΝ ΣΕ ΜΕΤΑΛΛΙΚΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ, ΣΕ ΚΛΕΙΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

ΣΧΟΙΝΑ ΕΙΡΗΝΗ

*Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 118 55, [eschoina@aaua.gr](mailto:eschoina@aaua.gr)*

## Περίληψη

Η τεχνολογία του ανακυκλούμενου νερού αποτελεί το μέλλον των συστημάτων υδατοκαλλιέργειας. Οι μικροβιακές κοινότητες που αναπτύσσονται στα κλειστά ή ανακυκλούμενα συστήματα υδατοκαλλιέργειας είναι ιδιαίτερος σημαντικός για τη λειτουργία αυτών και τη σταθερότητα της παραγωγής. Η δημιουργία βιοϊμενίων στις επιφάνειες αποτελούν πρόβλημα για την ιχθυοκαλλιέργεια καθώς αφαιρούνται δύσκολα, συμμετέχουν στη βιο-επίστρωση και δύνανται να λειτουργούν ως πηγή παθογόνων βακτηρίων. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της ανάπτυξης βιοϊμενίου σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα ποσοτικά καθώς και σε επίπεδο βακτηριακής σύνθεσης υπό θαλάσσιες συνθήκες.

Μελετήθηκε η μικροβιακή κοινότητα σε ένα πειραματικό σύστημα ανακυκλούμενης υδατοκαλλιέργειας, όπου εκτρέφονταν τσιπούρες και λαβράκια. Αρχικά διερευνήθηκε η επίδραση της μερικής ανανέωσης του νερού του συστήματος επί του πληθυσμού των ετερότροφων θαλάσσιων βακτηρίων για χρονική περίοδο μίας εβδομάδας, υπό τη λειτουργία ή μη συστήματος αποστείρωσης νερού μέσω υπεριώδους ακτινοβολίας, λαμβάνοντας δείγματα από εννέα διαφορετικά σημεία του συστήματος. Ο πληθυσμός των πλαγκτονικών ετερότροφων βακτηρίων δεν αυξήθηκε σημαντικά 24 ώρες μετά την αλλαγή νερού, δε διέφερε μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας και δεν παρατηρήθηκε αρνητική επίδραση του συστήματος αποστείρωσης στην αύξηση των πλαγκτονικών κυττάρων.

Επειτα, μελετήθηκε η ανάπτυξη βιοϊμενίου σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα για ένα χρονικό διάστημα 30 ημερών. Καταγράφηκε η εξέλιξη του πληθυσμού των προσκολλημένων κυττάρων πάνω στις προς εξέταση επιφάνειες, ενώ ταυτόχρονα, καταγράφηκε και η εξέλιξη του πληθυσμιακού μικροβιακού φορτίου στο νερό. Πραγματοποιήθηκε χρήση μοριακών τεχνικών (PCR-DGGE) για τη μελέτη της εξέλιξης των μικροβιακών προφίλ αλλά και τη σύγκριση μεταξύ των μικροοργανισμών που βρίσκονται στο νερό και αυτών που συμμετέχουν στο βιοϊμενίο. Τέλος, με την ίδια τεχνική, ακολούθησε σύγκριση των μικροβιακών προφίλ που λαμβάνουμε από τις κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές (τρυβλία) έναντι αυτών που λαμβάνουμε απ' ευθείας από τα περιβαλλοντικά δείγματα.

Η συγκέντρωση των πλαγκτονικών ετερότροφων βακτηρίων κυμάνθηκε από 3.8 έως 5.4  $\log(\text{CFU ml}^{-1})$  ενώ τα αποτελέσματα της PCR-DGGE έδειξαν ότι η μικροβιακή σύνθεση του νερού παρέμεινε σταθερή, καθώς και ότι υπάρχουν πολλά είδη βακτηρίων που δεν κατάφεραν να αναπτυχθούν στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Εικοσιτέσσερις ώρες κατόπιν τοποθέτησης, οι επιφάνειες είχαν αποικηθεί από βακτήρια πληθυσμού  $4.5 \pm 0.05 \log(\text{CFU cm}^{-2})$ , παραμένοντας στα ίδια επίπεδα μέχρι την 30<sup>η</sup> ημέρα. Τα αποτελέσματα της PCR-DGGE αποκάλυψαν μία δυναμική αλλαγή στη σύνθεση του βιοϊμενίου, η οποία όμως δεν ανιχνεύτηκε από τις κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές.

Η κλασσική μικροβιολογία σε συνδυασμό με μοριακές τεχνικές αποκάλυψαν τη δυναμική στη σύνθεση των βιοϊμενίων που αναπτύχθηκαν σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα, οι οποίες ήταν βυθισμένες στο νερό ενός κλειστού συστήματος Μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας. Η παρούσα εργασία αναδεικνύει τη σημαντικότητα της διενέργειας μελετών *in situ* για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους, για την καλύτερη αξιολόγηση των υλικών ως προς τη δημιουργία βιοϊμενίων πάνω σε αυτά.

**Λέξεις κλειδιά:** βιοϊμενία, σύστημα ανακυκλούμενης υδατοκαλλιέργειας, μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια, PCR-DGGE

# BIOFILM FORMATION ON STAINLESS STEEL SURFACES IN AN EXPERIMENTAL MEDITERRANEAN RECIRCULATED AQUACULTURE SYSTEM

*SCHOINA EIRINI*

*Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens, 118 55, email: [eschoina@aua.gr](mailto:eschoina@aua.gr)*

## **Abstract**

Recirculation is considered to be the future of aquaculture production systems. The microbial communities developed in these systems are of great importance for the function of the system and production stability. The adhesion of microorganisms on surfaces and the consequent biofilm formation is of major concern in the aquaculture sector, since biofilms are difficult to remove, cause biofouling and may act as a reservoir for potentially pathogenic bacteria. The aim of this study was to evaluate qualitative as well as quantitative the formation of biofilms on stainless steel surfaces under seawater conditions

The microbial community dynamics in an experimental Recirculated Aquaculture System (RAS), where gilthead seabream and seabass were reared, was studied. Firstly, the effect of partial water change on the population of planktonic heterotrophic bacteria was evaluated for a week's period comparing two treatments; the first treatment employed the use of UV sterilization system and the second did not. Sampling was conducted in 9 different compartments of the system and water quality parameters were monitored. Bacterial population did not increase significantly after 24h of water change, did not differ among sampling stations and there was no inhibitory effect on the increase of the number of planktonic bacteria when water UV sterilization system was employed.

Then, sterilized stainless steel coupons were placed in an empty aquarium tank, part of the RAS. Sampling for microbiological analysis of tank water for planktonic bacteria and coupons for sessile bacteria was conducted at 24h, 48h, 72h and every three days thereafter until the 30<sup>th</sup> day. The bacterial community composition of the tank water as well as the biofilms and their temporal changes were assessed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) based on the 16S rRNA gene. The microbiological analysis of the tank water revealed that the water microbial load ranged from 3.8 to 5.4 log(CFU ml<sup>-1</sup>). The DGGE profiles revealed that the microbial association of the tank water remained unchanged during the experimental period. Within 24h the biofilm cells on the coupons reached a population of 4.5±0.05 log(CFU cm<sup>-2</sup>), remaining relatively stable until the 30<sup>th</sup> day. On the other hand, DGGE bacterial profiling revealed a dynamic succession of microbial species during biofilm development on stainless steel surfaces.

Conventional microbiological analysis combined with molecular techniques demonstrated the dynamics of the biofilm development on stainless steel surfaces in a Mediterranean RAS. This work highlights the importance of conducting studies *in situ* for prolonged time periods, as an approach for better assessment of the biofilm formation on test surface materials.

**Key words:** biofilms, recirculated aquaculture system, Mediterranean fish culture, PCR-DGGE

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας του τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έχουν δημοσιευθεί ή πρόκειται να δημοσιευθούν στα κάτωθι συνέδρια υπό τη μορφή αναρτημένης δημοσίευσης (poster) :

- 8<sup>th</sup> Conference of the Hellenic Scientific Society of Mikrobiokosmos (MBK8). Πάτρα, Απρίλιος 18-20, 2019.  
“Biofilm formation on stainless steel surfaces in a marine Recirculated Aquaculture System”.
- Aquaculture Europe 2019. Βερολίνο, Οκτώβριος 7-10, 2019.  
“Evaluation of the biofilm formation on stainless steel surfaces in a marine recirculated aquaculture system”.

Φωτογραφία εξωφύλλου: Βιο-επίστρωση σε επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα, που παρέμεινε βυθισμένη σε κλειστό κύκλωμα ιχθυοκαλλιέργειας για 4 εβδομάδες. Έχει γίνει χρώση με Acridine Orange. Φωτογραφία μικροσκοπίου φθορισμού (10X).

**This study was carried out under the frame of IMPAQT project, funded by the EU H2020 research and innovation programme under Grant Agreement No 774109.**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων της παρούσας μελέτης Καθηγητή κ. Γεώργιο-Ιωάννη Νυχιά, για την καθοδήγησή του, την άφογη συνεργασία αλλά κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλο το διάστημα εκπόνησης της μελέτης.

Ευχαριστίες να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κ. Σκαυδάμη Παναγιώτη, Αναπληρωτή Καθηγητή και στον κ. Χατζόπουλο Πολυδεύκη, Καθηγητή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα. Ελεάνα Μήλιου για την παραχώρηση του κλειστού κυκλώματος όπου πραγματοποιήθηκε η μελέτη, καθώς και για τις συμβουλές της πάνω σε βασικά ζητήματα στον τομέα της υδατοκαλλιέργειας.

Να ευχαριστήσω θερμά το προσωπικό του εργαστηρίου Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας, τον κ. Γεώργιο Κωνσταντίνου για τη βοήθειά του στο εργαστήριο και την Δρ. Ευαυθία Χατζόγλου για τη βοήθειά της στις εργαστηριακές αναλύσεις και την καθοδήγησή της στις μοριακές τεχνικές.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, κ. Αναστάσιο Σταματίου και Δρ. Τρυφινόπουλου Πάσχαλίτσα για την άριστη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης. Επίσης, να ευχαριστήσω τους μεταδιδάκτορες του εργαστηρίου, Δρ. Δημοπούλου Μαρούλα, Δρ. Κωνσταντίνου Αλέξανδρο και Δρ. Λιανού Αλεξία για τη συνεργασία αλλά και την πολύτιμη βοήθειά τους στον πειραματικό σχεδιασμό.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες, Λύτου Αναστασία, Μάνθου Εβίτα, Μπονάτσου Ματούλα, Σπυρέλλη Ευγενία και Φέγγου Λένια για την υποστήριξη, τις εύστοχες παρατηρήσεις και για τη βοήθειά τους στην εκμάθηση βασικών μικροβιολογικών και μοριακών τεχνικών. Επίσης, να ευχαριστήσω τις Τζαμουράνη Κατερίνα και Θεοδουλίδου Βαλεντίνα αλλά και τους υπόλοιπους προπτυχιακούς φοιτητές για την υποστήριξη και για το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

Επιπλέον, για τη βοήθειά τους στον πειραματικό σχεδιασμό και την εκμάθηση μοριακών τεχνικών να ευχαριστήσω τη Δρ. Δουλγεράκη Αγάπη, καθώς και τη Μπικούλη Βίκυ από το ΙΤΑΠ του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στους δικούς μου ανθρώπους. Η εμπιστοσύνη τους στις δυνατότητές μου αποτελεί την κινητήρια δύναμη που με ωθεί στο να προοδεύω και να εξελίσσομαι συνέχεια.

Τέλος, καθοριστικής σημασίας ήταν η προτροπή του κ. Δημήτριου Στραβοπόδη, Αναπληρωτή Καθηγητή (ΕΚΠΑ), στην παρακολούθηση του παρόντος ΠΤΜΣ. Οι συμβουλές του αποτελούν εφαλτήριο δύναμη στην εξέλιξή μου ως άνθρωπο και ως επιστήμονα. Του ευχαριστώ θερμά.

Ειρήνη Σχοινιά  
Σεπτέμβριος, 2019

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>A/A</b>	<b>Τίτλος</b>	<b>Σελίδα</b>
<b>A</b>	<b>Θεωρητικό μέρος</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Εισαγωγή</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Υδατοκαλλιέργειες</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Η υδατοκαλλιέργεια στην Ελλάδα</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Κλειστά συστήματα υδατοκαλλιέργειας</b>	<b>2</b>
<b>1.1.3</b>	<b>Βασικά στοιχεία της λειτουργίας των κλειστών συστημάτων υδατοκαλλιέργειας</b>	<b>3</b>
<b>1.1.4</b>	<b>Διαχείριση μικροβιακών πληθυσμών στα κλειστά συστήματα υδατοκαλλιέργειας</b>	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b>Βιοϋμένια</b>	<b>6</b>
<b>1.3</b>	<b>Μεταγενομική</b>	<b>9</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Η μελέτη της μικροβιακής βιοκοινότητας σε περιβαλλοντικά δείγματα</b>	<b>9</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Ορισμός της μεταγενομικής</b>	<b>10</b>
<b>1.3.3</b>	<b>Το γονίδιο 16S rRNA</b>	<b>12</b>
<b>1.3.4</b>	<b>Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)</b>	<b>14</b>
<b>1.4</b>	<b>Σκοπός της εργασίας</b>	<b>15</b>
<b>B</b>	<b>Πειραματικό μέρος</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>Υλικά και Μέθοδοι</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Κλειστό κύκλωμα ιχθυοκαλλιέργειας</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Πειραματικά ζώα</b>	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>Καταγραφή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού</b>	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Δειγματοληψία νερού για μικροβιολογική ανάλυση</b>	<b>18</b>

2.5	Αύξηση του βακτηριακού φορτίου κατόπιν αλλαγής νερού (40%)	19
2.5.1	Με χρήση λαμπτήρων υπεριώδους φωτός στο κύκλωμα	19
2.5.2	Χωρίς χρήση λαμπτήρων υπεριώδους φωτός στο κύκλωμα	19
2.6	Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα μέσα σε δεξαμενή που ανήκει σε κλειστό σύστημα μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας	19
2.7	Μοριακές τεχνικές	20
2.7.1	Απομόνωση των βακτηριακών κυττάρων	20
2.7.2	Απομόνωση γενετικού υλικού (DNA extraction)	21
2.7.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	22
2.7.4	DGGE	22
3	Αποτελέσματα	24
3.1	Η πορεία του μικροβιακού πληθυσμού κατόπιν αλλαγής νερού υπό την παρουσία ή μη υπεριώδους ακτινοβολίας	24
3.1.1	Παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας (2 επαναλήψεις)	24
3.1.2	Απουσία υπεριώδους ακτινοβολίας (1 επανάληψη)	29
3.2	Ανάπτυξη βιοϋμενίων σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα σε κλειστό σύστημα μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας	32
3.3	Ανάλυση της σύνθεσης της μικροβιακής κοινότητας	34
3.3.1	Εξέλιξη της σύνθεσης της μικροβιακής κοινότητας του νερού	34
3.3.2	Εξέλιξη της μικροβιακής κοινότητας του σχηματισθέντος βιοϋμενίου	36
4	Συζήτηση	38
4.1	Η πορεία του μικροβιακού πληθυσμού κατόπιν αλλαγής νερού υπό την παρουσία ή απουσία υπεριώδους ακτινοβολίας	38
4.2	Δημιουργία βιοϋμενίων σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα	39



<b>4.3</b>	<b>Η σύνθεση του βιοϋμενίου</b>	<b>41</b>
<b>4.4</b>	<b>Περιορισμοί της PCR-DGGE</b>	<b>42</b>
<b>4.5</b>	<b>Μελλοντικές εργασίες</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>45</b>

## 1. Εισαγωγή

### 1.1. Ιχθυοκαλλιέργειες

#### 1.1.1. Η υδατοκαλλιέργεια στην Ελλάδα

Η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί έναν από τους τομείς παραγωγής τροφίμων που παρουσιάζει ταχεία ανάπτυξη σε παγκόσμιο επίπεδο. Οι μεταρρυθμίσεις για την αειφόρο διαχείριση της αλιείας αποτελούν μονόδρομο για την αντιμετώπιση του προβλήματος της παγκόσμιας υπεραλίευσης, ενώ προς αυτή την κατεύθυνση συμβάλλει η προώθηση της ανάπτυξης της υδατοκαλλιέργειας, καθώς θεωρείται το μέλλον της παραγωγής ιχθύων. Σύμφωνα με τις προβλέψεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων (FAO) και της Παγκόσμιας Τράπεζας μέχρι το 2030 πάνω από το 65% των αλιευτικών προϊόντων αναμένεται να προέρχονται από την υδατοκαλλιέργεια. Γίνεται εμφανής συνεπώς ο πρωταγωνιστικός ρόλος της υδατοκαλλιέργειας στην κάλυψη της ολοένα αυξανόμενης ζήτησης αλιευτικών προϊόντων.

Στην Ελλάδα η υδατοκαλλιέργεια και κυρίως η ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους κλάδους του πρωτογενούς τομέα παραγωγής, συμβάλλοντας σημαντικά στην οικονομική ανάπτυξη της χώρας. Σύμφωνα με τα τελευταία διαθέσιμα στοιχεία του FAO το 2016 εκτιμάται πως το 62% της εγχώριας παραγωγής αλιευτικών προϊόντων προήλθε από την υδατοκαλλιέργεια ενώ το υπόλοιπο 38% από τη συλλεκτική αλιεία, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.1 (ΣΕΘ, 2018).



**Εικόνα 1.1 Η συμβολή της υδατοκαλλιέργειας στην προσφορά αλιευτικών προϊόντων στην Ελλάδα. Το έτος 2016 η υδατοκαλλιέργεια προσέφερε το 62% των αλιευτικών προϊόντων.**

Η σημαντικότερη κατηγορία υδατοκαλλιέργειας στην Ελλάδα είναι η θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια. Τα πλέον εκτρεφόμενα είδη, είναι η τσιπούρα και το λαβράκι, η παραγωγή των οποίων αγγίζει το 97% της συνολικής θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας. Ακολουθούν λιγότερο εκτρεφόμενα είδη όπως το φαγκρί, ο κρανιός και το μυτάκι. Η δεύτερη σημαντικότερη κατηγορία εκτροφής είναι η οστρακοκαλλιέργεια, με κύριο εκτρεφόμενο είδος το Μεσογειακό μύδι, με τις μονάδες παραγωγής να εντοπίζονται κυρίως σε περιοχές της Βόρειας Ελλάδας. Εκτός από τις θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες, ιδιαίτερη θέση κατέχει η υδατοκαλλιέργεια των εσωτερικών υδάτων, αν και στην Ελλάδα αυτή η μορφή ιχθυοκαλλιέργειας συνεισφέρει μόνο στο 8% του συνολικού

όγκου της ετήσιας παραγωγής. Κυριότερο είδος αποτελεί η ιριδίζουσα πέστροφα, ενώ σε μικρότερη κλίμακα εκτρέφονται ο κυπρίνος και το ευρωπαϊκό χέλι. Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται στροφή του κλάδου σε καλλιέργεια υδρόβιων φυτικών οργανισμών με έντονο ενδιαφέρον, όπως το κυανοφύκος σπιρουλίνα και το χλωροφύκος *Ulva sp.*, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής, ως πρώτη ύλη στη βιομηχανία καλλυντικών αλλά και ως βιοκαύσιμα.

### **1.1.2. Κλειστά συστήματα υδατοκαλλιέργειας**

Όπως προαναφέρθηκε, η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί σε παγκόσμιο επίπεδο έναν από τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους κλάδους του τομέα της παραγωγής τροφίμων, έχοντας, επίσης, προοπτική για περαιτέρω ανάπτυξη στο μέλλον ώστε να διαθέτει στο καταναλωτικό κοινό υγιεινά και υψηλής ποιότητας ιχθυοπροϊόντα (Bregnballe, 2015). Η τρέχουσα τάση επικεντρώνεται στην ανάπτυξη της βιωσιμότητας του κλάδου, στη μείωση του κόστους παραγωγής και ταυτόχρονα στις απαιτήσεις των καταναλωτών για ποιοτικά και ασφαλή ιχθυοπροϊόντα (Bregnballe, 2015).

Η μεγάλη ανάπτυξη της βιομηχανίας της υδατοκαλλιέργειας καλείται να αντιμετωπίσει δύο κύρια ζητήματα: τον περιορισμό του διαθέσιμου κατάλληλου χώρου για την εγκαθίδρυση των μονάδων παραγωγής και την ανάγκη για μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων που προκαλούνται από αυτές (Pulkkinen et al., 2018). Αυτά τα ζητήματα έχουν στρέψει τον κλάδο προς τα κλειστά συστήματα υδατοκαλλιέργειας ή όπως αποκαλούνται εναλλακτικά, συστήματα ανακυκλούμενης υδατοκαλλιέργειας (recirculating aquaculture systems - RAS). Τα συστήματα αυτά έχουν τη δυνατότητα να εδράζονται σε χερσαίες περιοχές και κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η χρήση ανακυκλούμενου νερού.

Τα συστήματα ανακυκλούμενης υδατοκαλλιέργειας αποτελούν βασικά μία τεχνολογία για την εκτροφή ιχθύων ή άλλων υδρόβιων οργανισμών που επιτυγχάνεται με την επαναχρησιμοποίηση του νερού κατά την παραγωγική διαδικασία. Η τεχνολογία αυτή βασίζεται στη χρήση μηχανικών και βιολογικών φίλτρων, και κατά βάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτροφή των ήδη εκτρεφόμενων ειδών, όπως ψάρια, γαρίδες, όστρακα κ.α. (Bregnballe, 2015).

Η χρήση αυτών των συστημάτων αυξάνεται ραγδαία σε πολλούς τομείς της ιχθυοπαραγωγής και παρουσιάζουν μεγάλο εύρος εφαρμογής, που εκτείνεται από μεγάλες βιομηχανίες που παράγουν τόνους ψαριών κάθε χρόνο για κατανάλωση μέχρι μικρά εξελιγμένα συστήματα εκτροφής ειδών που απειλούνται με εξαφάνιση και χρησιμοποιούνται στον εμπλουτισμό του περιβάλλοντος. Επίσης, είναι πλέον ορατή η μεταστροφή των ιχθυογεννητικών σταθμών προς αυτήν την τεχνολογία (Martins et al., 2010).

Τα κλειστά συστήματα υδατοκαλλιέργειας προσφέρουν δύο άμεσα πλεονεκτήματα: αποτελεσματικότητα κόστους και μειωμένη επίδραση στο περιβάλλον (Martins et al., 2010; Bregnballe, 2015). Οι αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον που προκαλούνται από τις παραδοσιακές μονάδες παραγωγής, μπορούν να περιοριστούν με τη χρήση της νέας τεχνολογίας. Οι συνεχείς έρευνες για την ανάπτυξη των κλειστών κυκλωμάτων φαίνεται ότι επικεντρώνονται σε δύο άξονες: (1) τεχνικές βελτιώσεις του

κλειστού συστήματος ανακύκλωσης και (2) ανακύκλωση των θρεπτικών (Martins et al., 2010). Οι νέες τεχνολογίες προσφέρουν ευκαιρίες για τη μείωση του νερού που χρησιμοποιείται στην παραγωγή καθώς και για τη βελτίωση της διαχείρισης των αποβλήτων και την ανακύκλωση των θρεπτικών (Martins et al., 2010).

Από περιβαλλοντική σκοπιά, η περιορισμένη ποσότητα του νερού που χρησιμοποιείται σε ένα τέτοιο σύστημα αποτελεί πλεονέκτημα, καθώς το κατάλληλο νερό για εκτροφή αποτελεί πόρο περιορισμένης διαθεσιμότητας σε πολλές περιοχές του πλανήτη. Επιπλέον, η περιορισμένη χρήση του νερού καθιστά ευκολότερη την απομάκρυνση των θρεπτικών στοιχείων που αποβάλλονται από τους εκτρεφόμενους οργανισμούς. Τα θρεπτικά στοιχεία που αποβάλλονται από το σύστημα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα σε παρακείμενες αγροτικές εκτάσεις ή σε συστήματα υδροπονίας. Επίσης, δίνεται η ευχέρεια για την ανεξαρτητοποίηση της ίδρυσης εγκαταστάσεων αποκλειστικά και μόνο κοντά σε περιοχές μεγάλης διαθεσιμότητας νερού. Πλέον η εγκατάσταση των νέων μονάδων μπορεί να γίνει και σε περιοχές με περιορισμένη διαθεσιμότητα καθαρού νερού. Σε γενικές γραμμές, η υδατοκαλλιέργεια κλειστών συστημάτων μπορεί να θεωρηθεί ως ένας φιλικός προς το περιβάλλον τρόπος παραγωγής υδρόβιων οργανισμών με ένα εμπορικά εφικτό και βιώσιμο επίπεδο. Τα συστήματα ανακυκλούμενης υδατοκαλλιέργειας μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με το ρυθμό ανανέωσης του νερού σε: ελεύθερης ροής ή flow through ( $>50\text{m}^3/\text{kg}$  τροφής), επαναχρησιμοποίησης ή re-use ( $1\text{--}50\text{m}^3/\text{kg}$  τροφής), συμβατικής ανακύκλωση ή conventional recirculation ( $0.1\text{--}1\text{m}^3/\text{kg}$  τροφής) και επόμενης γενεάς ή 'next generation'/'innovative' RAS ( $<0.1\text{m}^3/\text{kg}$  τροφής) (Martins et al., 2010).

### **1.1.3. Βασικά στοιχεία της λειτουργίας των κλειστών συστημάτων υδατοκαλλιέργειας**

Τα κλειστά συστήματα υδατοκαλλιέργειας προσφέρουν δυνατότητα αυξημένου ελέγχου της παραγωγικής διαδικασίας (Bregnballe, 2015). Ο έλεγχος των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού, όπως η θερμοκρασία, το pH, τα επίπεδα οξυγόνου, η φωτοπερίοδος, κ.α., διατηρούν ένα σταθερό περιβάλλον ώστε να εξασφαλίζονται οι βέλτιστες συνθήκες εκτροφής των οργανισμών. Ως αποτέλεσμα, μειώνεται η καταπόνηση και αυξάνεται η ευζωία των εκτρεφόμενων ατόμων. Αυτές οι συνθήκες δίνουν στον εκτροφέα τη δυνατότητα να προβλέπει με ακρίβεια το χρόνο που απαιτείται τα εκτρεφόμενα άτομα να φτάσουν στο εμπορεύσιμο μέγεθος, συμβάλλοντας έτσι στην εύρυθμη λειτουργία της παραγωγικής διαδικασίας (Bregnballe, 2015).

Το ημερήσιο σιτηρέσιο διανέμεται πολλές φορές την ημέρα. Η τροφή καταναλώνεται, πέπτεται από τα ψάρια ή τους άλλους εκτρεφόμενους οργανισμούς και χρησιμοποιείται στο μεταβολισμό παρέχοντάς τους ενέργεια και θρεπτικά για ανάπτυξη και άλλες φυσιολογικές λειτουργίες. Το οξυγόνο εισάγεται στον οργανισμό μέσω των βραγχίων και είναι απαραίτητο για την παραγωγή ενέργειας και τον καταβολισμό των πρωτεϊνών, ενώ διοξείδιο του άνθρακα και αμμωνία παράγονται και εκκρίνονται ως παραπροϊόντα από τα βράγχια. Άπεπτη τροφή εκκρίνεται στο νερό ως κόπρανα, γνωστά επίσης και ως διαλυμένα στερεά και οργανική ύλη. Γενικά, τα ψάρια καταναλώνουν

τροφή και οξυγόνο και ρυπαίνουν το νερό με κόπρανα, διοξείδιο του άνθρακα και αμμωνία.

Σε ένα σύστημα ανακυκλούμενων υδάτων δύο είναι οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την τιμή του pH του νερού. Αρχικά, από την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα από τα ψάρια ή τα άλλα ετερότροφα εκτρεφόμενα είδη προκαλείται μείωση της τιμής του pH. Δεύτερον, η βιολογική δραστηριότητα στο βιολογικό φίλτρο, κυρίως η διαδικασία της νιτροποίησης, προκαλεί επίσης μείωση στην τιμή του pH.

Σε ότι αφορά τον κύκλο του αζώτου, τα βακτήρια που εδράζονται στο βιοφίλτρο παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο (Schreier et al., 2010). Τα νιτρώδη ιόντα σχηματίζονται ως ενδιάμεσο στάδιο στη διαδικασία της νιτροποίησης εμφανίζοντας τοξική δράση στα ψάρια σε συγκέντρωση άνω των 2.0 mg/L. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, τα νιτρώδη ιόντα μεταφέρονται μέσω των βραγχίων στο αίμα των ψαριών όπου και παρεμποδίζουν τη δέσμευση του οξυγόνου. Έπειτα, τα νιτρικά ιόντα αποτελούν το τελικό προϊόν της νιτροποίησης και ενώ γενικά θεωρούνται αβλαβή προς τα ψάρια, μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (άνω των 100 mg/L) φαίνεται ότι έχουν αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη και το συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής. Σε ένα κλειστό σύστημα, εάν ο ρυθμός ανανέωσης του νερού κρατείται σε χαμηλά επίπεδα, τότε είναι εύκολο να επιτευχθούν τέτοιες συγκεντρώσεις με επιβλαβείς επιδράσεις στους εκτρεφόμενους οργανισμούς (Crab et al., 2007).

#### **1.1.4. Διαχείριση μικροβιακών πληθυσμών στα κλειστά συστήματα υδατοκαλλιέργειας**

Ένα σημαντικό ζήτημα προς διερεύνηση είναι η μικροβιολογία των κλειστών συστημάτων υδατοκαλλιέργειας (Pulkkinen et al., 2018). Το υδάτινο περιβάλλον στα κλειστά συστήματα υδατοκαλλιέργειας είναι ένα πολύπλοκο σύστημα αποτελούμενο από βιοτικές αλλά και αβιοτικές παραμέτρους και περιλαμβάνει ελεύθερα διαβιούντα και προσκολλημένα σε επιφάνειες ετερότροφα βακτήρια (Rojas-Tirado et al., 2018). Αυτά, δύνανται να καταλαμβάνουν θώκους, οι οποίοι μπορούν να αποτελέσουν καταφύγιο παθογόνων βακτηρίων (Attramadal et al., 2012a; Blancheton et al., 2013), τα οποία μπορούν να επηρεάζουν την υγεία των εκτρεφόμενων οργανισμών, λειτουργώντας άμεσα ως ευκαιριακά παθογόνα ή έμμεσα ως ανταγωνιστές ενάντια αυτότροφων βακτηρίων για οξυγόνο και χώρο, επηρεάζοντας τελικά τη διαδικασία της νιτροποίησης (Blancheton et al., 2013, Michaud et al., 2014).

Στα κλειστά συστήματα υδατοκαλλιέργειας, οι παράμετροι της ποιότητας του νερού ελέγχονται κατά τρόπο τινά ώστε να επιτυγχάνονται σταθερές φυσικοχημικές συνθήκες στο νερό για τη βέλτιστη εκτροφή των οργανισμών. Καθότι τα βακτήρια αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι των κλειστών συστημάτων, είναι σημαντική η ανάγκη κατανόησης των παραγόντων που προκαλούν αλλαγές στη μικροβιολογία του νερού και τον τρόπο που μπορούν αυτοί να ελεγχθούν και να ρυθμιστούν ώστε το νερό να καταστεί βιολογικά σταθερό και υψηλής ποιότητας (Rojas-Tirado et al., 2018).

Σύμφωνα με την οικολογική θεωρία της επιλογής r/K (MacArthur and Wilson, 1967), τα οπορτουνιστικά είδη που ακολουθούν την επιλογή τύπου r έχουν την

ικανότητα γρήγορης αύξησης και ευνοούνται σε περιβάλλοντα ασταθή, με χαμηλό ανταγωνισμό, αποτελώντας τους πρώιμους αποικιστές. Αντίθετα, τα είδη που ακολουθούν την επιλογή τύπου K, έχουν βελτιωμένη ανταγωνιστικότητα για πόρους και ευνοούνται σε σταθερά περιβάλλοντα των οποίων οι βιοκοινωνίες βρίσκονται πληθυσμιακά κοντά στη φέρουσα ικανότητα. Η φέρουσα ικανότητα είναι ο μέγιστος αριθμός ειδών ή ατόμων ενός είδους που μπορεί να υποστηριχθεί σε ένα οικοσύστημα για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Η φέρουσα ικανότητα καθορίζεται από τον περιορισμό των συγκεντρώσεων διάφορων παραμέτρων. Για τα κλειστά συστήματα υδατοκαλλιέργειας η συγκέντρωση των θρεπτικών ουσιών στη μορφή του διαλυμένου οργανικού άνθρακα μπορεί να καθορίσει τη φέρουσα ικανότητα των ετερότροφων βακτηρίων (Attramadal et al., 2012b).

Η διαχείριση των ασθενειών αποτελεί πρόκληση σε ένα κλειστό σύστημα υδατοκαλλιέργειας, μέσα στο οποίο μία υγιής και σταθερή μικροβιακή κοινότητα συμβάλλει στον καθαρισμό και την ποιότητα του νερού εκτροφής. Η αποστείρωση του εισερχόμενου νερού στα ανοικτά συστήματα αλλά και του ανακυκλούμενου νερού στα κλειστά συστήματα ιχθυοκαλλιέργειας πραγματοποιείται με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας ή/και αερίου όζοντος (Martins et al., 2010; Attramadal et al., 2012a; Bregnballe, 2015). Στόχος των συγκεκριμένων μεθόδων είναι η μείωση και ο έλεγχος του πληθυσμού των βακτηρίων αλλά και η βελτίωση των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού εκτροφής. Με τη συνδυασμένη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας και όζοντος φαίνεται ότι επιτυγχάνεται αποτελεσματικά η μείωση του μικροβιακού φορτίου (ετερότροφα βακτήρια και coliforms), αλλά και η βελτίωση του νερού εκτροφής, σε ότι αφορά τη μείωση των ολικών αιωρούμενων σωματιδίων, καθώς και τη βελτίωση του χρώματος του νερού (Summerfelt et al., 2009).

Η αποστείρωση με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας λειτουργεί καταστρέφοντας το γενετικό υλικόν των οργανισμών. Στην υδατοκαλλιέργεια πρωταρχικός στόχος είναι τα παθογόνα βακτήρια καθώς και άλλοι μονοκύτταροι οργανισμοί. Η εφαρμογή της ακτινοβολίας διεξάγεται εκτός των δεξαμενών εκτροφής, πριν την εισαγωγή του νερού σε αυτές τις δεξαμενές. Είναι σημαντικό να γίνει κατανοητό ότι ο ρυθμός αύξησης των βακτηρίων είναι τόσο ραγδαίος σε περιβάλλοντα που είναι γεμάτα οργανική ύλη, οπότε ο έλεγχός τους σε παραδοσιακές ιχθυοκαλλιέργειες έχει μηδαμινό αποτέλεσμα. Ο καλύτερος έλεγχος του μικροβιακού πληθυσμού μπορεί να επιτευχθεί με συνδυασμό εφαρμογής μηχανικής φίλτρανσης, με ένα κατάλληλο βιοφίλτρο ώστε να αφαιρείται αποτελεσματικά η οργανική ύλη από το νερό και ταυτόχρονη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Η δόση της υπεριώδους ακτινοβολίας εκφράζεται σε micro Watt - seconds ανά  $\text{cm}^2$  ( $\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ ). Η αποδοτικότητα της υπεριώδους ακτινοβολίας εξαρτάται από την κατηγορία του οργανισμού στόχου καθώς και από τη θολερότητα του νερού εκτροφής. Για τον έλεγχο των βακτηρίων και των ιών στο νερό εκτροφής απαιτείται δοσολογία από 2.000 έως 10.000  $\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$  για την εξάλειψη του 90% του πληθυσμού τους, ενώ για του μύκητες χρειάζεται μεγαλύτερη δόση ακτινοβολίας από 10.000 έως 100.000 και για τα μικρά παράσιτα από 50.000 έως 200.000  $\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$  (Bregnballe, 2015).

## 1.2. Βιοϋμένια

Τα βιοϋμένια, ως μορφή μικροβιακής ανάπτυξης, βρίσκονται παρόντα σε πολλά οικοσυστήματα, συμπεριλαμβανομένων των ευκαρυωτικών ιστών, καθώς και σε επιφάνειες φυσικής ή ανθρωπογενής προελεύσεως (Costerton et al. 1994). Τα ανεπιθύμητα αποτελέσματα που οφείλονται στο σχηματισμό βιοϋμενίων είναι ήδη γνωστά στους τομείς α) της ιατρικής, επί παραδείγματι πνευμονία λόγω κυστικής ίνωσης, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα, ωτίτιδα, περιοδοντίτιδα και μολύνσεις ιατρικών συσκευών (Donlan and Costerton 2002), β) του περιβάλλοντος, όπως για παράδειγμα τα βιοϋμένια που σχηματίζονται στις σωληνώσεις του νερού προκαλώντας ασθένειες μεταδιδόμενες μέσω του νερού, γ) των θαλασσιών συγκοινωνιών, όπως για παράδειγμα η βιο-επίστρωση που αναπτύσσεται στα έρμα των πλοίων προκαλώντας αυξημένη τριβή στο νερό, αύξηση στην κατανάλωση καυσίμων και μειωμένη ταχύτητα πλεύσης.

Ειδικότερα στο θαλάσσιο περιβάλλον, όλες η βυθισμένες επιφάνειες (φυσικές ή τεχνητές) αποικούνται από μία σειρά οργανισμών, με το τελικό αποτέλεσμα να είναι γνωστό ως «βιο-επίστρωση» ή 'biofouling' (Mieszkin et al., 2013) όπως είναι γνωστός ο όρος στη διεθνή βιβλιογραφία. "Το biofouling αναφέρεται στην ανεπιθύμητη συσσώρευση βιοτικής προέλευσης εναποθέσεων πάνω σε μία επιφάνεια" (Characklis, 1989). Ο ορισμός αυτός μπορεί να εφαρμοστεί στην επίστρωση που προκαλείται από μακροσκοπικούς οργανισμούς ζωικούς ή φυτικούς (πχ. δίθυρα μαλάκια, θυσσανόποδα, σπόγγοι, κνιδόζωα, μακροφύκη) αλλά και από μικροοργανισμούς, η οποία αναφέρεται ως «μικροβιακή βιο-επίστρωση» (Flemming, 2011b).

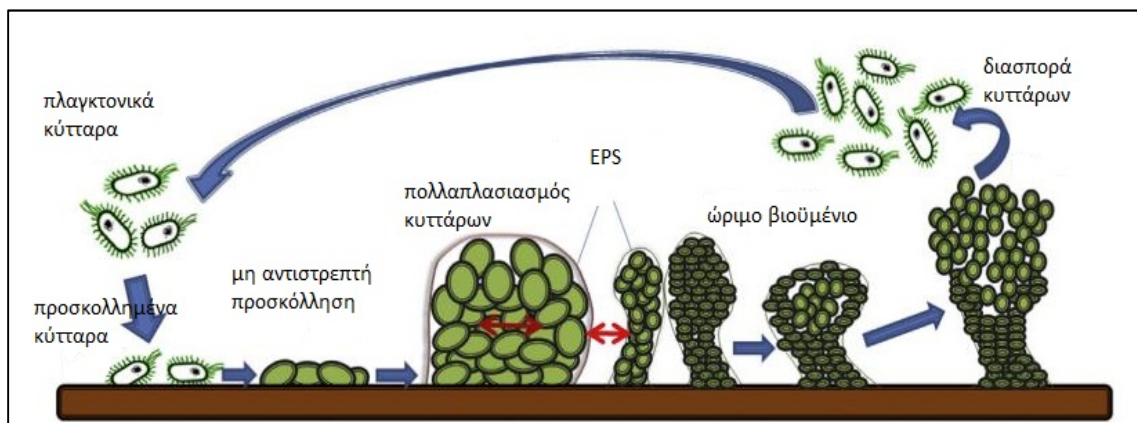
Η διαδοχή των οργανισμών που συμμετέχουν στη βιο-επίστρωση πραγματοποιείται γενικά σε τέσσερα κύρια στάδια:

1. Προσρόφηση ανόργανων και οργανικών μακρομορίων αμέσως μετά τη βύθιση στο υγρό μέσο της επιφάνειας
2. Μεταφορά των μικροβιακών κυττάρων στην επιφάνεια και εδραίωση αυτών
3. Η προσκόλληση των βακτηρίων σταθεροποιείται μέσω της παραγωγής εξωκυττάρων πολυμερών ουσιών, σχηματίζοντας ένα μικροβιακό υμένιο στην επιφάνεια
4. Ανάπτυξη μίας πολυπλοκότερης βιοκοινότητας με την παρουσία μακρο- οργανισμών.

Ο σχηματισμός του βιοϋμενίου είναι μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία εμπλέκονται ένας αριθμός γονιδίων, ενώ πιθανή συσχέτιση μηχανισμών για την προσκόλληση σε βιοτικές ή αβιοτικές επιφάνειες περιλαμβάνουν: (i) την παρουσία EPS ή fimbriae; (ii) την υδροφοβικότητα της επιφάνειας του βακτηριακού τοιχώματος (φορτίο) (iii) τις δίοδους δισθενών κατιόντων (iv) τα βακτηριακά στελέχη (v) τη δομή της επιφάνειας (τραχεία ή λεία) και (iv) την παρουσία θρεπτικών.

Η ανάπτυξη του βιοϋμενίου και γενικά της βιο-επίστρωσης σε μία επιφάνεια εξαρτάται από μία σειρά φυσικών, χημικών αλλά και βιολογικών παραγόντων όπως: η θερμοκρασία, το pH, το διαλυμένο οξυγόνο, το περιεχόμενο της διαλυμένης οργανικής ύλης, το υλικό της επιφάνειας, την τραχύτητα αυτής, το φορτίο της και της υδροφοβικότητάς της, τις υδροδυναμικές συνθήκες, την τοποθεσία, το βάθος, την εποχή κ.α. (Simões et al., 2010).

Τα βακτήρια θεωρούνται ως οι πρώτοι αποικιστές των επιφανειών, οι οποίοι σχηματίζουν βιοϋμένια ή βακτηριακά συσσωματώματα που προσκολλώνται στα βυθισμένα υποστρώματα μέσα σε διάστημα ωρών μέχρι ημερών (Mieszkin et al., 2013), έχοντας επιπλέον σημαντική επιρροή στην προσκόλληση των επακόλουθων οργανισμών και την τελική φύση του βιοϋμενίου (Fletcher, 1994). Ως οι πρώτοι «άποικοι», οι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν εκμεταλλευόμενοι βιοδιασπώμενες ουσίες από την υδάτινη στήλη, τις οποίες μετατρέπουν σε μεταβολικά προϊόντα και βιομάζα. Η βιο-επίστρωση στα θαλάσσια ύδατα ξεκινά με την προσκόλληση των μικροοργανισμών, οι οποίοι σχηματίζουν το μικροβιακό βιοϋμένιο, γνωστό και ως γλίτσα (“slime”), πάνω στο οποίο άλλοι οργανισμοί έχουν την ικανότητα να προσκολληθούν, να εδραιωθούν και να αναπτυχθούν. Οι μικροοργανισμοί παράγουν και εκκρίνουν εξωκυτταρικές ουσίες πολυμερής φύσεως (extracellular polymeric substances -EPS), οι οποίες τους δίνουν τη δυνατότητα να παραμένουν προσκολλημένοι στην ίδια την επιφάνεια, μεταξύ τους αλλά και να προσθέτουν όγκο στο στρώμα της επίστρωσης (Flemming, 2011a). Τα βιοϋμένια παρουσιάζονται με μία πολύπλοκη δομή, με περιοχές μεγάλης ή μικρής πυκνότητας κυττάρων, ακανόνιστα διάσπαρτες περιοχές πλούσιες σε EPS και κανάλια που διατρέχουν το βιοϋμένιο επιτρέποντας την κίνηση του νερού βαθιά μέσα στη μήτρα (matrix) του βιοϋμενίου (Fletcher, 1994). Η ανάπτυξη των βιοϋμενίων είναι στενά συνδεδεμένη με την παραγωγή και την έκκριση των EPS, οι οποίες παίζουν κύριο ρόλο στη δομική αλλά και λειτουργική ακεραιότητα των βιοϋμενίων ενώ ταυτόχρονα επηρεάζουν τα φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά τους (West et al., 2012).



**Εικόνα 1.2 Ο σχηματισμός του βιοϋμενίου. Προσαρμοσμένη εικόνα από τους Mizan et al. (2015).**

Συνοπτικά, οι διαδικασίες που διέπουν τη δημιουργία των βιοϋμενίων έχουν αναγνωριστεί και περιλαμβάνουν τα παρακάτω στάδια όπως περιγράφονται από τους (Simões et al., 2010): 1. Προετοιμασία της επιφάνειας προσκόλλησης είτε από μακρομόρια που είναι παρόντα στο υγρό μέσο ή από τα ήδη υπάρχοντα που καλύπτουν την επιφάνεια, 2. Μεταφορά των πλαγκτονικών κυττάρων από το υγρό μέσο προς την επιφάνεια, 3. Προσρόφιση των κυττάρων στην επιφάνεια, 4. Απομάκρυνση των αναστρέψιμα προσροφημένων κυττάρων, 5. Μη αναστρέψιμη προσρόφιση των βακτηριακών κυττάρων στην επιφάνεια, 6. Παραγωγή σηματοδοτικών μορίων, 7.



Μεταφορά ενώσεων-υποστρωμάτων προς το βιοϋμένιο, 8. Μεταβολισμός των υποστρωμάτων από τα κύτταρα του βιοϋμένιου και μεταφορά των μεταβολικών προϊόντων εκτός αυτού, 9. Απομάκρυνση του βιοϋμένιου από την επιφάνεια κατόπιν αποκόλλησης ή απόρριψης.

Τα μικροβιακά βιοϋμένια φαίνεται ότι επιδρούν στους επακόλουθους οργανισμούς της βιο- επίστρωσης. Παραδείγματος χάριν, η μελέτη μεταξύ των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα μικροβιακά βιοϋμένια και τα θαλάσσια μακροφύκη αποκαλύπτει το ευρύ φάσμα των αλληλεπιδράσεων που μπορεί να επηρεάσουν τη στρατολόγηση, τη μορφολογία αλλά ακόμα και το ρυθμό ανάπτυξης των φυκών, ενώ παράλληλα αποκαλύπτονται και οι στρατηγικές που ακολουθούνται από τα φύκη για τη διατάραξη ή την αναστολή της δημιουργίας βακτηριακών βιοϋμενίων (Mieszkin et al., 2013). Επιπρόσθετα, παρόμοια εξάρτηση από τη σύνθεση του υποκείμενου βακτηριακού βιοϋμένιου έχουν παρατηρηθεί κατά την εδραίωση του μυδιού *Mytilus coruscus* (J. Yang et al., 2014).

Η βακτηριακή βιο-επίστρωση αποτελεί μείζον θέμα για τον τομέα της υδατοκαλλιέργειας για δύο κύριους λόγους. Πρώτον, τα βιοϋμένια μπορούν να δράσουν ως πηγή συνεχούς ανατροφοδότησης παθογόνων βακτηρίων προκαλώντας βακτηριακές λοιμώξεις στα εκτρεφόμενα είδη. Δεύτερον, παρουσιάζουν μεγάλη δυσκολία στην απομάκρυνσή τους. Κατόπιν του σχηματισμού τους, τα βιοϋμένια εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα απολυμαντικά και τους παράγοντες καταπόνησης (Mizan et al., 2015), έχοντας ως αποτέλεσμα την αποτυχία στις προσπάθειες απομάκρυνσής τους από τις επιφάνειες. Σχεδόν πάντα, κάποια βακτήρια των βιοϋμενίων επιζούν, αναπληρώνοντας τους πληθυσμούς στο υμένιο και διασπείρονται στην υδάτινη φάση μόλις η συγκέντρωση του απολυμαντικού παράγοντα ή των αντιβιοτικών μειωθεί (Fletcher, 1994).

Οι μέθοδοι που στοχεύουν στην αντιμετώπιση της βιο-επίστρωσης (antifouling) μπορούν να χωριστούν σε 3 κύριες κατηγορίες: φυσικές, χημικές και βιολογικές όπως τις παραθέτουν οι Satheesh et al. (2016). Οι φυσικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τη μεταβολή της επιφάνειας, ηλεκτρόλυση αλλά και ακτινοβολία. Οι χημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τεχνικές όπου απελευθερώνονται σταδιακά στρώματα επιφανείας, βιοκτόνα που βασίζονται στο χλώριο ή στο χαλκό, τα οποία εφαρμόζονται στις επιφάνειες και είναι γνωστά ως υφαλοχρώματα (antifouling paints). Από την άλλη πλευρά, βιολογικές μέθοδοι, όπως η επικάλυψη με διαλύματα που περιέχουν ένζυμα ή άλλα φυσικά προϊόντα, μπορούν να αποτελέσουν εναλλακτική ως προς τα τοξικά υφαλοχρώματα που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί νέες επιστρώσεις από πολυμερή υλικά για την καταστολή της βιο-επίστρωσης και της διάβρωσης των υλικών που προκαλείται στο θαλάσσιο περιβάλλον. Αυτές οι επιστρώσεις αντιμετωπίζουν το πρόβλημα της βιο-επίστρωσης μέσω μηχανισμών φιλικών προς το περιβάλλον καθώς δεν απελευθερώνουν βιοκτόνα στο υγρό μέσο (W. J. Yang et al., 2014).

Νέες στρατηγικές οι οποίες στοχεύουν στον έλεγχο και την αναστολή της δημιουργίας βιοϋμενίων, αποτελούνται από καινοτόμα βιοκτόνα και αντιμικροβιακές ουσίες, όπως αιθέρια έλαια ή ακόμα και ουσίες που προέρχονται από βακτήρια ή συνθετικές πηγές, οι οποίες λειτουργούν ως αναστολείς της μικροβιακής προσκόλλησης

πάνω στις επιφάνειες και τελικά στη δημιουργία του βιοϋμενίου, όπως αναστολείς του quorum sensing (Giaouris et al., 2014). Τα αιθέρια έλαια περιγράφονται ως “generally regarded as safe” (GRAS), παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση και επιπλέον έχουν αντιβακτηριακές ιδιότητες in vitro και in vivo (Viuda-Martos et al., 2010). Τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων ως ενισχυτικά γεύσης αλλά και ως συντηρητικά. Επιπλέον, μελέτες έχουν ήδη διεξαχθεί πάνω στην ανασταλτική τους δράση στη δημιουργία βιοϋμενίων (Giaouris et al., 2014).

Το quorum sensing ή εναλλακτικά η αίσθηση απαρτίας, είναι ένας όρος που αναφέρεται στην επικοινωνία ανάμεσα στα βακτήρια, η οποία επιτυγχάνεται με τη χρήση σηματοδοτικών μορίων. Αποτελεί μία διαδικασία η οποία δίνει τη δυνατότητα στα βακτήρια να αντιλαμβάνονται και να αντιδρούν στα ερεθίσματα που δέχονται από το εξωτερικό τους περιβάλλον, κατά τρόπο τινά ώστε να ρυθμίζουν τη γονιδιακή τους έκφραση (Daniels et al., 2004). Αυτή η διαδικασία της επικοινωνίας επιτρέπει στα βακτήρια να ελέγχουν και να απαντούν στην πυκνότητα του πληθυσμού τους. Επιπλέον, το quorum sensing ρυθμίζει και άλλες βακτηριακές δραστηριότητες, όπως η δημιουργία βιοϋμενίου, η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και βιοκτόνα, η βιοφωταύγεια και η βακτηριακή λοιμογόνος ικανότητα (Turan et al., 2017). Ο μηχανισμός του quorum sensing βασίζεται στη συσσώρευση, έκκριση και αναγνώριση εξωκυττάρων μορίων-σημάτων, τα οποία ονομάζονται αυτό-επαγωγείς (auto-inducers-AIs). Η δράση των αυτό-επαγωγέων έχει ως αποτέλεσμα τη γονιδιακή ρύθμιση κατά τέτοιο τρόπο ώστε να ευνοείται η προσαρμογή των βακτηρίων σε ένα διαρκώς μεταβαλλόμενο και εχθρικό περιβάλλον (Turan et al., 2017).

Η μελέτη των βιοϋμενίων είναι χρήσιμο να πραγματοποιείται μέσω πειραματικών διαδικασιών in vitro καθώς και in situ (δημιουργία, απομάκρυνση, ανθεκτικότητα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και φυσιολογία), εξετάζοντας διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, συμπεριλαμβάνοντας πιθανά σενάρια κυτταρικής προσαρμογής σε στρεσογόνες καταστάσεις, πριν και κατά τη διάρκεια της δημιουργίας του βιοϋμενίου. Ταυτόχρονες μελέτες επί του quorum sensing, θα ρίξουν περισσότερο φως πάνω στις στρατηγικές που ακολουθούν τα βακτήρια κατά της δημιουργία βιοϋμενίου, οδηγώντας, επίσης, στην ανάπτυξη έμμεσων μεθοδολογιών για την αναστολή της ανάπτυξης ή ακόμα και των έλεγχου των βιοϋμενίων (Chorianopoulos et al., 2010).

### **1.3. Μεταγενομική**

#### **1.3.1. Η μελέτη της μικροβιακής βιοκοινότητας σε περιβαλλοντικά δείγματα**

Η συντριπτική πλειοψηφία των μικροοργανισμών που είναι παρόντες στα φυσικά περιβάλλοντα δε δύναται να ανακτηθούν με τις παραδοσιακές τεχνικές μικροβιακής καλλιέργειας (Streit and Schmitz, 2004). Αυτή η συνειδητοποίηση της αδυναμίας απομόνωσης των μικροοργανισμών υπό εργαστηριακές συνθήκες σε καθαρές καλλιέργειες, οδήγησε στην αναγνώριση του μεγέθους της άγνοιας που μας διακατέχει σε ότι αφορά το εύρος της μικροβιακής ποικιλότητας (Handelsman and Handelsman, 2004).

Η μικροσκοπική παρατήρηση και η καλλιέργεια σε θρεπτικά υποστρώματα αποτελούσαν στο παρελθόν αλλά και μέχρι σήμερα τις πιο κοινά χρησιμοποιούμενες μεθόδους απομόνωσης και αναγνώρισης βακτηρίων από το φυσικό περιβάλλον, παρόλο που πλέον θεωρούνται ανεπαρκής για αυτό το σκοπό (Watanabe and Baker, 2000). Η απλή μικροσκοπική παρατήρηση των βακτηρίων συνοδεύεται με προβλήματα όπως ότι πρώτον, η μορφολογία τους είναι πολύ απλή και δε μπορεί να χρησιμοποιείται ως βασικό στοιχείο μίας σίγουρης αναγνώρισης και ταξινόμησης των βακτηρίων και δεύτερον, η μορφολογία των μικροοργανισμών μπορεί να μεταβληθεί, προσαρμοζόμενη σε διαφορετικά περιβάλλοντα ανάπτυξης (Watanabe and Baker, 2000).

Επιπλέον, οι μέθοδοι καλλιέργειας όπως η απαρίθμηση βιώσιμων αποικιών και η μέθοδος του περισσότερο πιθανού αριθμού (most-probable-number -MPN), εφαρμόζονται στην ποσοτικοποίηση των ενεργών ζωντανών κυττάρων στα περιβαλλοντικά δείγματα. Όμως, τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται ευνοούν την ανάπτυξη συγκεκριμένων μικροοργανισμών και εμφανίζουν μεροληψία ως προς τα αποτελέσματα (cultivation bias). Ακόμα, ζώντα κύτταρα τα οποία όμως βρίσκονται υπό συνθήκες καταπόνησης αδυνατούν να πολλαπλασιαστούν και τελικά δεν απαριθμούνται. Τα προβλήματα των μεθόδων αυτών ανέκυψαν όταν παρατηρήθηκε ότι οι αριθμοί των βακτηρίων που μετρούνταν απ' ευθείας στο μικροσκόπιο από βακτήρια υδάτινου δείγματος ή δείγματος από χώμα, ξεπερνούσαν κατά πολύ τις μετρήσεις των αποικιών από τρυβλία στα οποία είχαν επωαστεί τα ίδια δείγματα, όπως συνοψίζουν οι Watanabe and Baker (2000).

### **1.3.2 Ορισμός της μεταγενομικής**

Ο όρος μεταγένομα (metagenome) χρησιμοποιήθηκε αρχικά από τους Handelsman et al., 1998 ως «το γονιδίωμα όλων των μικροοργανισμών που απαντώνται στη φύση» και αναφέρεται στα δεδομένα αλληλουχιών που λαμβάνονται απ' ευθείας από τα περιβάλλοντα (Handelsman et al., 1998). Η μεταγενομική, δηλαδή η μελέτη του μεταγενομάτος, βοηθάει στην κατανόηση των διάφορων οπτικών ενός περιβαλλοντικού δείγματος και επιτρέπει το χαρακτηρισμό των μικροοργανισμών σε ένα δεδομένο δείγμα (Mineta and Gojobori, 2016). Βοηθάει, επίσης, στην ταυτοποίηση των ειδών που είναι παρόντα σε μία βιοκοινωνία και επιπλέον παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις μεταβολικές δραστηριότητες και τους λειτουργικούς ρόλους των μικροοργανισμών σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα (Langille et al., 2013).

Η μεταγενομική ανάλυση χρησιμοποιείται συχνά για τη μελέτη των μικροβιακών κοινοτήτων από περιβαλλοντικά δείγματα, χωρίς να συμπεριλαμβάνεται η καλλιέργεια ή η απομόνωση μεμονωμένων μικροοργανισμών (Ghosh, 2018). Ο ρόλος των μικροοργανισμών στα οικοσυστήματα είναι πολύ σημαντικός, χωρίς όμως να μπορούμε να τον χαρακτηρίσουμε με λεπτομέρεια (Ghosh, 2018). Οι σύγχρονες αυτές προσεγγίσεις έχουν επιτρέψει την κατανόηση περίπλοκων ιδιοτήτων των βιοκοινωνιών των μικροοργανισμών, τη δυναμική τους και το ρόλο τους στο οικοσύστημα. Οι μεταγενομικές προσεγγίσεις απαντούν σε βασικά ερωτήματα όπως ποιοι οργανισμοί είναι παρόντες (Ταξινομική ποικιλότητα- Taxonomic diversity) και ποιος είναι ο λειτουργικός τους ρόλος (Functional metagenomics) (Vieites et al., 2008). Με άλλα λόγια, το μεταγένομα αποτελεί μία αποτελεσματική μέθοδο μελέτης της ποικιλότητας

της μικροβιακής κοινωνίας. Λόγω του μεγάλου εύρους εφαρμογής, η μεταγενομική έχει εξελιχθεί σε δημοφιλή μέθοδο, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται ταυτόχρονα με τεχνολογίες αλληλούχησης νέας γενεάς (Mineta and Gojobori, 2016).

Η εφαρμογή της μεταγενομικής καλύπτει ένα ευρύ φάσμα ερευνητικών πεδίων, από κλινικά δείγματα, περιβαλλοντικά δείγματα, δείγματα που σχετίζονται με την ασφάλεια τροφίμων, τα βιομηχανικά απόβλητα καθώς και την αναγνώριση παθογόνων οργανισμών (Ghosh, 2018). Επιπλέον, η χρήση της μεταγενομικής, της μετατρανσκριπτομικής (metatranscriptomics) και της μεταπρωτεομικής (metaproteomics) ευνοεί την ανακάλυψη νέων ενζύμων (Madhavan et al., 2017). Επίσης, η χρήση της μεταγενομικής επικουρεί σημαντικά στην αναγνώριση μικροοργανισμών με κοσμοπολίτικη εξάπλωση οι οποίοι παίζουν ενεργό ρόλο σε μολυσμένα περιβάλλοντα, αποτελώντας πιθανά τα βέλτιστα εργαλεία της φύσης για την αποικοδόμηση τοξικών ενώσεων (Devarapalli and Kumavath, 2015).

Η ανάπτυξη των τεχνολογιών της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και της αλληλούχησης του DNA ώθησαν τη μικροβιακή μελέτη διάφορων περιβαλλόντων στα οποία συναθροίζονται πληθώρα μικροοργανισμών οι οποίοι δε μπορούν να μελετηθούν με μεθόδους που βασίζονται στην καλλιέργεια. Μοριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούν PCR συνήθως ανιχνεύουν τα συντηρημένα γονίδια (house keeping genes) των βακτηρίων. Το γονίδιο του 16S ριβοσωμικού RNA (16S rRNA) αποτελεί το πιο δημοφιλές γονίδιο-στόχο σε πολλές μοριακές μεθόδους καθώς η νουκλεοτιδική αλληλουχία του χρησιμοποιείται στην ταξινόμηση των οργανισμών (Fukuda et al., 2016).

Η χρήση του 16S rDNA ή rRNA αποτελεί την πλέον χρησιμοποιούμενη προσέγγιση για την ανάλυση των μικροβιακών βιοκοινωνιών (Dahlhöf, 2002; Ghosh, 2018). Σε γενικές γραμμές, οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA παρέχουν εκτενής πληροφόρηση σε ότι αφορά τα taxa και τα είδη μικροοργανισμών που βρίσκονται παρόντα σε ένα περιβάλλον (Streit and Schmitz, 2004). Βέβαια, τα δεδομένα που αποκομίζουμε από αυτές τις αναλύσεις παρέχουν ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με το λειτουργικό ρόλο των μικροοργανισμών μέσα στη βιοκοινωνία καθώς και τη γενετική πληροφορία που περιέχουν. Τουναντίον, η μεταγενομική αποτελεί έναν νέο ανερχόμενο κλάδο, ο οποίος έχει ως στόχο την ανάλυση των περίπλοκων γονιδιωμάτων που ανευρίσκονται σε μικροβιακούς θάκους.

Ένας αριθμός προσεγγίσεων έχουν αναπτυχθεί για να βελτιώσουν τις μεθόδους αναγνώρισης και ανάλυσης που έχουν ως στόχο το γονίδιο 16S rRNA. Αυτές περιλαμβάνουν τεχνικές όπως: fluorescence in situ hybridization (FISH), terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) και denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Fukuda et al., 2016). Παρόλο που αυτές οι τεχνικές δεν απαιτούν διαδικασίες αλληλούχησης, μπορούν να ξεκαθαρίσουν τις διαφορές στη σύνθεση των μικροβιακών κοινωνιών ανάμεσα σε διαφορετικά περιβαλλοντικά δείγματα (Dahlhöf, 2002; Fukuda et al., 2016). Από την άλλη πλευρά, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από αυτές τις τεχνικές είναι ανεπαρκή για να συζητήσουμε τη φυλογενετική ποικιλότητα με λεπτομέρεια. Όπου απαιτείται συγκεκριμένη πληροφορία για τη φυλογενετική των μικροοργανισμών, ακολουθούνται άλλες στρατηγικές οι οποίες περιλαμβάνουν την κατασκευή βιβλιοθήκης κλώνων τμημάτων του γονιδίου 16S

rRNA. Αυτή η προσέγγιση δίνει τη δυνατότητα να καθοριστεί με ακρίβεια η ταυτότητα των επικρατέστερων taxa των μελών της βιοκοινότητας. Την σήμερα ημέρα, τεχνολογίες αλληλούχησης νέας γενιάς (next-generation sequencing, NGS), είναι διαθέσιμες και χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των μικροβιακών κοινωνιών (Fukuda et al., 2016).

### 1.3.3 Το γονίδιο 16S rRNA

Η ενίσχυση μέσω PCR του γονιδίου του 16S rRNA από μικροοργανισμούς οι οποίοι δε μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο, έχει ανοίξει το δρόμο προς την κατανόηση του τρόπου δόμησης των βιοκοινωνιών, ειδικά αυτών που εδράζονται σε ακραία περιβάλλοντα, όπου οι συνθήκες ανάπτυξης είναι δύσκολο ή αδύνατο να προσομοιαστούν με τα σύγχρονα μέσα που διαθέτει ένα μικροβιολογικό εργαστήριο (Baker et al., 2003).

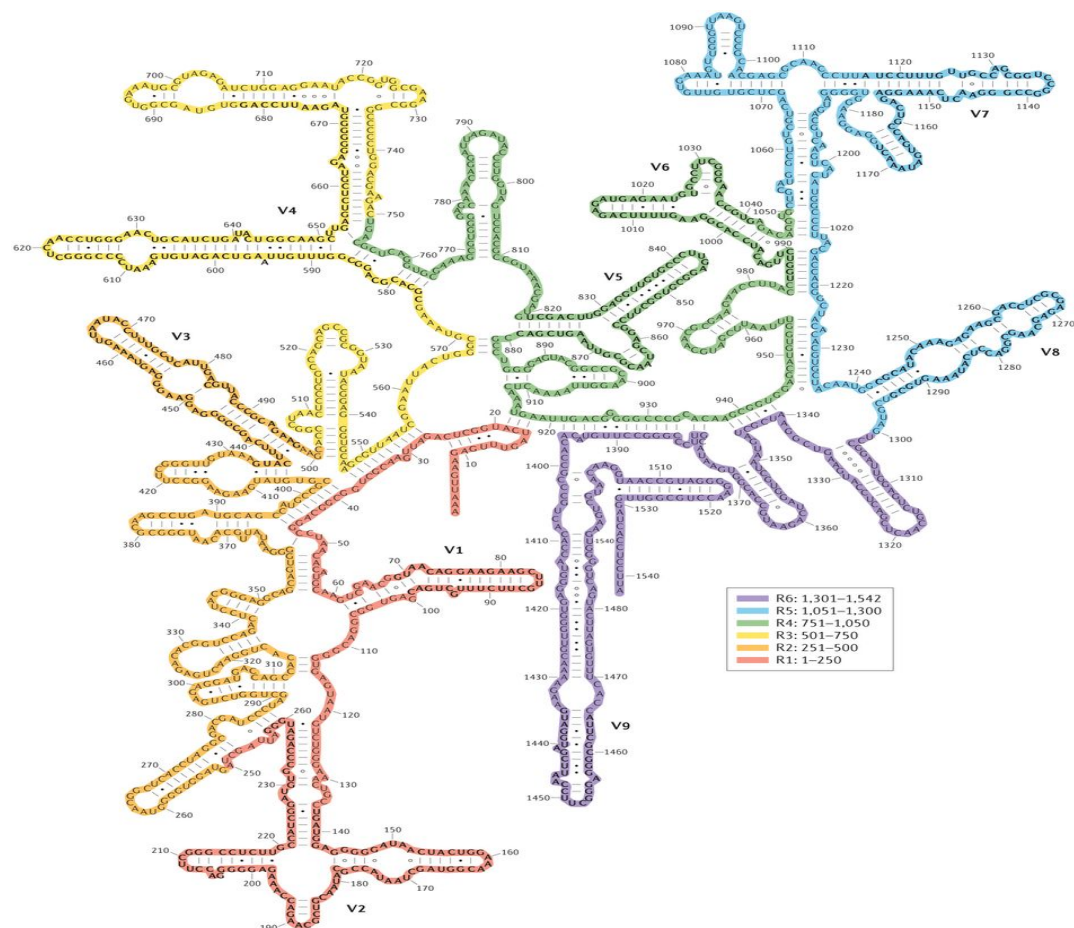
Το ριβόσωμα είναι ένα κυτταροπλασματικό σωματίδιο το οποίο αποτελείται από ένα σύμπλοκο από υπομονάδες πρωτεϊνών και RNAs. Απαντάται σε όλα τα κύτταρα (προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά) και παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στη διαδικασία της πρωτεϊνικής σύνθεσης (μετάφραση). Το ριβόσωμα συγκροτείται από δύο κύρια συστατικά, τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα και τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα. Το μέγεθος των ριβοσωμάτων εκφράζεται σε μονάδες Svedberg (S, μονάδα μέτρησης του ρυθμού καθίζησης σε υπερφυγοκέντρωση και επομένως μεγαλύτερο S σημαίνει μεγαλύτερη μάζα) και είναι περίπου 70S στα προκαρυωτικά ριβοσώματα, με τη μεγάλη υπομονάδα να είναι στα 50S και τη μικρή στα 30S. Σε ένα λειτουργικό ριβόσωμα οι δύο υπομονάδες συνεργάζονται μεταξύ τους, αλλά η κάθε μία έχει ανεξάρτητο και ειδικό ρόλο στη μετάφραση του mRNA (Watson et al., 2011).

Κάθε υπομονάδα περιέχει ένα ή περισσότερα ριβοσωμικά RNA (rRNA), τα οποία απαντούν σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων στο γονιδίωμα των κυττάρων, καθώς και μία πληθώρα ριβοσωμικών πρωτεϊνών. Το μέγεθος των ριβοσωμικών RNAs εκφράζεται και σε μονάδες S. Στα βακτήρια, η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα περιέχει ένα μόριο 16S rRNA το οποίο είναι παρών σε όλα τα προκαρυωτικά κύτταρα (Ευβακτήρια και Αρχαία), ενώ η μεγάλη υπομονάδα περιέχει ένα μόριο 23S και ένα μόριο 5S. Τα γονίδια που κωδικοποιούν συστατικά των ριβοσωμάτων είναι συντηρημένα, δηλαδή έχουν αλλάξει ελάχιστα με την πάροδο του χρόνου και της εξέλιξης, καθώς επιτελούν σημαντικό και απαραίτητο ρόλο στη μετάφραση των πρωτεϊνών, ενώ χαρακτηρίζονται και ως “house keeping genes” (Watson et al., 2011).

Το 16S rRNA συμμετέχει ενεργά στην έναρξη της μετάφρασης. Κοντά στο 3' άκρο του 16S rRNA βρίσκεται αλληλουχία που είναι συμπληρωματική με την αλληλουχία Shine-Dalgarno η οποία βρίσκεται λίγες βάσεις πριν το κωδικόνιο έναρξης στο mRNA. Η δημιουργία της δίκλωνης περιοχής μεταξύ των δύο μορίων RNA προσδίδει σταθερότητα στο σύμπλοκο έναρξης της μετάφρασης (Watson et al., 2011). Το γονίδιο του 16S rRNA αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο για την αναγνώριση και ταξινόμηση των βακτηρίων για διάφορους λόγους. Καταρχάς, το μήκος του είναι σχετικά μικρό και περιορίζεται περίπου στα 1500 ζεύγη βάσεων (Εικόνα 1.3) Δεύτερον, η αλληλουχία του γονιδίου μπορεί να καταταμηθεί σε 10 περιοχές

συντηρημένες μεταξύ των βακτηρίων (conserved regions), οι οποίες όμως διαχωρίζουν 9 υπερμετάβλητες περιοχές (hypervariable regions). Τρίτον, οι γονιδιακές αλληλουχίες που είναι εγγεγραμμένες σε δημόσια αποθετήρια (databases) συνεχώς αυξάνονται, καθώς η αλληλουχία αυτού του γονιδίου αποτελεί πληροφορία κλειδί για την αναγνώριση και ταξινόμηση βακτηριακών οργανισμών και απαιτείται για την καταχώριση στα δημόσια αποθετήρια όπως είναι η DNA Data Bank of Japan (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>), η GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), η European Molecular Biology Laboratory (EMBL) (<http://www.embl.org>), κ.α. (Fukuda et al., 2016).

Η ενίσχυση συγκεκριμένων γονιδίων στόχων όπως οι περιοχές V1-V9 του γονιδίου 16S rRNA, με τη βοήθεια της τεχνικής PCR πριν την αλληλούχηση των βάσεων, επιτρέπει την ανάλυση της ποικιλότητας (Morgan and Huttenhower, 2012). Βέβαια, η σχετική αφθονία των πιο άφθονων μικροοργανισμών σε μία ομάδα μικροοργανισμών δε σχετίζεται απαραίτητα με κάποια σημαντικό ρόλο στη λειτουργία αυτής της βιοκοινότητας. Ο μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη ποσοτική παρουσία δεν είναι απαραίτητο ότι παίζει τον πιο σημαντικό ρόλο στη βιοκοινότητα (Ghosh, 2018).



Εικόνα 1.3 Η δομή του 16S rRNA

### 1.3.4 Denaturing-gradient gel electrophoresis (DGGE)

Μοριακές μέθοδοι που δεν απαιτούν αλληλούχηση του γονιδιώματος, όπως οι FISH, Q-PCR, T-RFLP, και DGGE, όπως ήδη αναφέρθηκε, χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των μικροβιακών βιοκοινωνιών σε δείγματα προερχόμενα από το περιβάλλον. Μία τεχνική που χρησιμοποιείται συχνά για τη μελέτη των μικροβιακών προφίλ είναι η denaturing/temperature gradient gel electrophoresis (D/TGGE). Ο διαχωρισμός των τμημάτων του DNA μέσω των D/TGGE βασίζεται στη μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα μερικά τηγμένων μορίων DNA διπλής έλικας σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου που περιέχουν μία γραμμική διαβάθμιση αποδιατακτικών παραγόντων του DNA (DGGE) ή χρησιμοποιούν τη διαβάθμιση της θερμοκρασίας (TGGE). Μόρια με διαφορετικές αλληλουχίες παρουσιάζουν διαφορές στη θερμοκρασία τήξης και μεταναστεύουν σε διαφορετικές θέσεις στο πήκτωμα κατά την ηλεκτροφόρηση. Αυτή η μέθοδος είναι αρκετά χρήσιμη στην ανάλυση της χρονικής ή χωροταξικής διαφοροποίησης της δομής των μικροβιακών πληθυσμών (Watanabe and Baker, 2000).

Τα προϊόντα της PCR που προκύπτουν ύστερα από ενίσχυση τμημάτων από απομονωμένο DNA, τα οποία χρησιμοποιούν γενικευμένους εκκινητές (universal primers) για το γονίδιο 16S rRNA, περιέχουν επιπλέον μία αλληλουχία πλούσια σε Γουανίνη-Κυτοσίνη (GC-clump) στο 5' άκρο του εμπρόσθιου εκκινητή. Τα προϊόντα αυτά ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που περιέχει υπό διαβαθμιζόμενη συγκέντρωση παράγοντες που προκαλούν αποδιάταξη στη διπλή έλικα του DNA, όπως μίγμα ουρίας και φορμαμιδίου. Οι διαφορές στην αλληλουχία ανάμεσα στα διαφορετικά προϊόντα της PCR καθορίζει το σημείο τήξης κάθε διαφορετικής αλληλουχίας, με αποτέλεσμα να σταματούν σε διαφορετικό σημείο πάνω στο πήκτωμα. Μέσω αυτής της μεθόδου επιτυγχάνεται γρήγορη ανάλυση και αναγνώριση της βιοποικιλότητας μέσα σε μία βακτηριακή κοινωνία καθώς και τη διαφορετική σύνθεση των βιοκοινωνιών μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων.

Η τεχνική της PCR-DGGE έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στη μελέτη των βακτηριακών κοινοτήτων στο θαλάσσιο περιβάλλον, για παράδειγμα αυτών που σχετίζονται με τους σπόγγους (Simister et al., 2011; Bauvais et al., 2015). Επιπλέον, η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί εκτενώς στον τομέα της υδατοκαλλιέργειας, στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς (Brunvold et al., 2007; Høj et al., 2009; McIntosh et al., 2008; van der Meeren et al., 2011), σε χερσαίες δεξαμενές ανοικτού τύπου (Attramadal et al., 2016), σε συστήματα ανακυκλούμενης ιχθυοκαλλιέργειας (Martins et al., 2013; Wold et al., 2014) αλλά και στη σύγκριση των μικροβιακών κοινοτήτων σε συστήματα ανακυκλούμενης ή ανοικτού τύπου ιχθυοκαλλιέργειας (Attramadal et al., 2014). Επιπρόσθετα, η PCR-DGGE βρίσκει εφαρμογή στη μελέτη της ανάπτυξης των βιοϋμενίων σε χερσαίες δεξαμενές υδατοκαλλιέργειας (Bourne et al., 2006; Wietz et al., 2009). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί και στον τομέα της ιχθυοπαθολογίας, για ανεύρεση των υποειδών του παθογόνου είδους *Photobacterium damsela* από δείγματα περιβάλλοντος έναντι δειγμάτων από κλειστό κύκλωμα (Martins et al., 2015) αλλά και στην ανεύρεση των βακτηρίων που σχετίζονται με τα βράγχια του σολομού (Steinum et al., 2009).

#### 1.4 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μικροβιολογική μελέτη ενός κλειστού συστήματος πειραματικής μεσογειακής υδατοκαλλιέργειας με έμφαση στην ανάπτυξη βιοϋμενίου σε μεταλλικές επιφάνειες.

Αρχικά διερευνήθηκε η επίδραση της μερικής ανανέωσης του νερού του συστήματος (40%) σε ότι αφορά το μικροβιολογικό φορτίο σε χρονικά διαστήματα μίας εβδομάδας. Εξετάστηκαν δύο περιπτώσεις, πρώτον, όταν στο κύκλωμα λειτουργούσε σύστημα αποστείρωσης του νερού μέσω υπεριώδους ακτινοβολίας και δεύτερον, όταν δεν υπήρχε καμία μέθοδος αποστείρωσης. Ταυτόχρονα, εξετάστηκαν οι διαφορές σε επίπεδο μικροβιακού πληθυσμού που τυχόν υπάρχουν σε διαφορετικά σημεία του συστήματος.

Έπειτα, μελετήθηκε η ανάπτυξη βιοϋμενίου σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα για ένα χρονικό διάστημα 30 ημερών. Καταγράφηκε η εξέλιξη του πληθυσμού του μικροβιακού φορτίου που δημιουργήσε βιοϋμένιο στις προς εξέταση επιφάνειες, ενώ ταυτόχρονα, καταγράφηκε και η εξέλιξη του πληθυσμιακού μικροβιακού φορτίου στο νερό.

Πραγματοποιήθηκε χρήση μοριακών τεχνικών (PCR-DGGE) για τη μελέτη της εξέλιξης των μικροβιακών προφίλ αλλά και τη σύγκριση μεταξύ των μικροοργανισμών που βρίσκονται στο νερό και αυτών που συμμετέχουν στο βιοϋμένιο. Τέλος, με την ίδια τεχνική, ακολούθησε σύγκριση των μικροβιακών προφίλ που λαμβάνουμε από τις κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές (τρυβλία) έναντι αυτών που λαμβάνουμε απ' ευθείας από τα περιβαλλοντικά δείγματα.



## 2 Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Κλειστό κύκλωμα ιχθυοκαλλιέργειας

Οι πειραματικοί χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε δεξαμενές που αποτελούν τμήμα κλειστού κυκλώματος θαλασσινού νερού στο Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το κύκλωμα, συνολικού όγκου  $5,9 \text{ m}^3$ , περιελάμβανε μηχανικό και βιολογικό φίλτρο για τον καθαρισμό του νερού εκτροφής καθώς και σύστημα αποστείρωσης του νερού μέσω λαμπτήρων υπεριώδους ακτινοβολίας για τη μείωση του μικροβιακού φορτίου. Πλέον του κυκλώματος, υπήρχε τσιμεντένια δεξαμενή θαλασσινού νερού, από όπου γίνονταν η αναπλήρωση του νερού.

Οι δεξαμενές που περιείχαν τους ιχθύες οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, είχαν διαστάσεις  $42\text{cm}(\text{Μ}) * 49 \text{ cm}(\text{Π}) * 83 \text{ cm}(\text{Υ})$ , ήτοι  $171 \text{ L}$  (Εικόνα 2.1). Κάθε δεξαμενή διέθετε σωλήνα εισροής νερού με ρυθμιζόμενη παροχή, σωλήνα εκροής νερού και σύστημα παροχής ατμοσφαιρικού αέρα. Η παροχή του νερού ρυθμίστηκε έτσι ώστε σε κάθε δεξαμενή να πραγματοποιείται ανανέωση μία φορά ανά ώρα του συνολικού της όγκου και ελέγχονταν εβδομαδιαίως. Το σύστημα παροχής αέρα περιελάμβανε ελαστικό σωλήνα μικρής διατομής που κατέληγε σε μια βυθιζόμενη αερόπετρα για τη διάσπαση του αέρα σε μικροσκοπικές φυσαλίδες και την αποτελεσματικότερη διάχυσή του στο νερό.



Εικόνα 2.1 Δεξαμενές με ιχθύες του κλειστού συστήματος ιχθυοκαλλιέργειας

Οι δεξαμενές που λειτουργούσαν ως βιολογικό φίλτρο ήταν συνολικού όγκου  $0,23 \text{ m}^3$ , ενώ το υλικό που χρησιμοποιήθηκε στο φίλτρο ήταν χαλίκι. Πλέον αυτών, στο κύκλωμα συμπεριλαμβάνονταν 2 δεξαμενές συλλογής του νερού αφότου περνούσε το βιολογικό φίλτρο. Η πρώτη, όγκου  $0,54 \text{ m}^3$ , περιείχε λαμπτήρες υπεριώδους φωτός (UV) συνδεδεμένοι με μία μεγαλύτερη που βρίσκονταν σε υψηλότερο επίπεδο, όγκου  $2,2 \text{ m}^3$ , και το νερό προωθούνταν σε αυτή με τη χρήση αντλίας νερού. Σε αυτή τη δεύτερη δεξαμενή γινόταν η προσθήκη επιπλέον θαλασσινού ή/ και γλυκού νερού για την αναπλήρωση του νερού στο κύκλωμα.

Ο φωτισμός των δεξαμενών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πολλαπλών λαμπτήρων φωτισμού στην οροφή της αίθουσας εκτροφής, ενώ η φωτοπερίοδος διατηρήθηκε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (12 ώρες φως- 12 ώρες σκοτάδι).

Κάθε πρωί πραγματοποιούνταν έλεγχος σε όλες τις δεξαμενές για νεκρούς ιχθύες και τραυματισμούς. Ταυτόχρονα, σε κάθε δεξαμενή ελέγχονταν η σωστή λειτουργία της αερόπετρας, η παροχή του νερού και τυχόν διαρροές που εμφανίζονταν στο κύκλωμα. Ύστερα από διάστημα αναμονής μισής ώρας από τη χορήγηση του σιτηρεσίου, απομακρύνονταν τα υπολείμματα της τροφής με σιφωνισμό. Κατόπιν, καθαρίζονταν τα μηχανικά φίλτρα του συστήματος καθαρισμού όλου του κυκλώματος.

Επιπλέον, την ημέρα έναρξης των δοκιμασιών πραγματοποιούνταν καθαρισμός των δεξαμενών με χρήση σπόγγου στα εσωτερικά τοιχώματα της δεξαμενής ώστε να απομακρυνθούν τα οργανικά κατάλοιπα από τις επιφάνειες. Ταυτόχρονα, απορρίπτονταν το 40% όγκου νερού των δεξαμενών. Η αναπλήρωση του απορριπτόμενου όγκου νερού και του όγκου νερού που εξατμιζόταν, πραγματοποιούνταν με θαλασσινό νερό προερχόμενο από την κεντρική δεξαμενή καθώς και με γλυκό νερό από το δίκτυο ύδρευσης.

## 2.2 Πειραματικά ζώα

Τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τσιπούρες (*Sparus aurata*) και λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) τα οποία είχαν εγκλιματιστεί σε αυτές τις συνθήκες εκτροφής τουλάχιστον ένα χρόνο νωρίτερα. Δημιουργήθηκαν 3 δεξαμενές για κάθε είδος. Για κάθε δεξαμενή με τσιπούρες προστέθηκαν 8-10 άτομα μέσου βάρους  $154,0 \pm 18,6$  g, ώστε η μέση ιχθυοπυκνότητα να είναι στα  $8,4 \pm 0,8$  kg/ m<sup>3</sup>. Στις δεξαμενές με τα λαβράκια προστέθηκαν 17-18 άτομα μέσου βάρους  $77,1 \pm 13,9$  g με μέση ιχθυοπυκνότητα  $7,8 \pm 0,6$  kg/ m<sup>3</sup>.

Πριν από κάθε χειρισμό (αναισθητοποίηση, ζύγιση) προηγούνταν ασιτία 48h. Η εφαρμογή της ασιτίας πριν από κάποιο χειρισμό εξυπηρετεί ώστε να εκκενωθεί ο πεπτικός σωλήνας, να μειωθεί ο μεταβολισμός και η ανάγκη για κατανάλωση οξυγόνου καθώς και να μειωθεί η παραγωγή αποβλήτων. Πέρα από τη συνεισφορά της στην ευζωία, αυτή η μείωση του μεταβολισμού επιδρά στην ποιότητα της σάρκας (Gines et al., 2002; Alvarez et al., 2008).

Η χορήγηση της τροφής πραγματοποιούνταν με το χέρι σε ένα γεύμα τρεις φορές εβδομαδιαίως (Δευτέρα- Τετάρτη- Παρασκευή) τηρώντας σταθερή ώρα σίτισης. Η τροφή που χορηγήθηκε ήταν εμπορική τροφή σε μορφή συμπύκτων διαμέτρου 4,5 mm. Σε κάθε περίπτωση η ποσότητα της τροφής κυμαίνονταν από 400 έως 500 g για το σύνολο των ιχθύων.

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου όλοι οι χειρισμοί (καθαρισμοί, τάισμα, μικροβιολογικές δειγματοληψίες, καταγραφή φυσικοχημικών παραμέτρων) πραγματοποιούνταν σε προκαθορισμένα τακτικά χρονικά διαστήματα και κάτω από τις ίδιες συνθήκες για την ελαχιστοποίηση πρόκλησης stress στους ιχθύες.

### 2.3 Καταγραφή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού

Πριν από τη χορήγηση της τροφής, λαμβάνονταν μετρήσεις των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού (pH, αλατότητα, θερμοκρασία, δεσμευμένο οξυγόνο στο νερό) σε κάθε δεξαμενή δειγματοληψίας ξεχωριστά. Το δεσμευμένο οξυγόνο (DO, ppm και % κορεσμού) καθώς και η θερμοκρασία (σε °C) προσδιορίζονταν με τη χρήση φορητού οξυγονόμετρου με ενσωματωμένο ψηφιακό θερμόμετρο (Hach, LDO101). Η μέτρηση του pH γινόταν με χρήση φορητού μετρητή (Hach, pH101) και της αλατότητας με τη χρήση διαθλασίμετρου. Ταυτόχρονα, λαμβάνονταν δείγματα νερού από κάθε πειραματική δεξαμενή. Τα δείγματα νερού φιλτράρονταν σε διηθητικό χαρτί για την απομάκρυνση αιωρούμενων σωματιδίων και φυλάσσονταν σε πλαστικές φιάλες στην κατάψυξη στους -20 °C. Ύστερα από απόψυξη χρησιμοποιούνταν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων ( $\text{NO}_2^-$ , ppm) και της ολικής αμμωνίας ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ , ppm). Ο προσδιορισμός τους πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτομετρικές μεθόδους (Greenberg et al., 1992a, 1992b), χρησιμοποιώντας δύο φασματοφωτόμετρα (Cintra 40 UV-Visible Spectrometer και Biotek Synergy HT).

Η συγκέντρωση της τοξικής αμμωνίας στο θαλασσίνο νερό υπολογίστηκε από το μαθηματικό τύπο (Bower and Bidwell, 1978):

$$\text{Τοξική } \text{NH}_3 = [\text{ολική αμμωνία}] \times \frac{1}{1 + \text{anti log}[pK_aS(T) - \text{pH}]} \text{ ppm}$$

[ολική αμμωνία] = η συγκέντρωση της ολικής αμμωνίας σε ppm

$pK_aS(T) = pK_aS(T=298 \text{ }^\circ\text{K}) + 0.0324 (298-T \text{ }^\circ\text{K})$

$pK_aS(T=298 \text{ }^\circ\text{K})$  = σταθερά που εξαρτάται από την αλατότητα, τη θερμοκρασία και το pH

T = θερμοκρασία σε °K

### 2.4 Δειγματοληψία νερού για μικροβιολογική ανάλυση

Επιλέχθηκαν 9 σημεία δειγματοληψίας στο κλειστό κύκλωμα. Τρία σημεία σε δεξαμενές που περιείχαν ιχθύες τσιπούρας, 3 σε δεξαμενές που περιείχαν ιχθύες λαβρακιού, 1 σημείο αμέσως μετά το μηχανικό φίλτρο, 1 σημείο στο μέσο των δεξαμενών του βιολογικού φίλτρου καθώς και στην δεξαμενή αναδιανομής του νερού του κυκλώματος που έπεται του συστήματος αποστείρωσης με τους λαμπτήρες υπεριώδους φωτός. Επίσης, κατά την έναρξη κάθε εβδομαδιαίας δειγματοληψίας, πραγματοποιούνταν δειγματοληψία νερού και στην κεντρική δεξαμενή παροχής φρέσκου θαλασσινού νερού. Το νερό συλλέγονταν σε αποστειρωμένες γυάλινες φιάλες (Duran), μεταφέρονταν στο εργαστήριο εντός 45 λεπτών και φυλάσσονταν στο ψυγείο μέχρι τη δειγματοληψία τους. Μετά τη δειγματοληψία του νερού πραγματοποιούνταν μέτρηση της θερμοκρασίας, του pH και της συγκέντρωσης του οξυγόνου σε κάθε σημείο δειγματοληψίας. Επίσης, πραγματοποιούνταν μέτρηση της αλατότητας στην κεντρική δεξαμενή του κυκλώματος.

Το θρεπτικό υπόστρωμα που επιλέχθηκε για την καταμέτρηση του βακτηριακού φορτίου ήταν το Marine agar (Conda), το οποίο είναι εξειδικευμένο για την ανάπτυξη ετερότροφων θαλάσσιων βακτηρίων και κατόπιν δοκιμών έδωσε τα καλύτερα

αποτελέσματα έναντι άλλων γενικών υποστρωμάτων. Μετά από κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις με τη χρήση διαλυτικού μέσου MRD (8,5 g/L NaCl, 1g/L Bacteriological Peptone (Lab M) ), επιστρώθηκαν τρυβλία Petri κάνοντας χρήση 100 μL εμβολίου από κάθε αραιώση σε 3 επαναλήψεις. Το χρονικό διάστημα επώασης των τρυβλίων ήταν 72 ώρες σε θερμοκρασία 25 °C και απαριθμήθηκαν όλες οι σχηματιζόμενες αποικίες. Η έκφραση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σε  $\log_{10}$  CFU mL<sup>-1</sup>.

## 2.5 Αύξηση του βακτηριακού φορτίου κατόπιν αλλαγής νερού (40%)

### 2.5.1 Με χρήση λαμπτήρων υπεριώδους φωτός στο κύκλωμα

Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός και αλλαγή νερού. Μία ώρα μετά την αλλαγή νερού έγινε η δειγματοληψία στα 9 σημεία του κυκλώματος καθώς και στην κεντρική δεξαμενή παροχής θαλασσινού νερού (ημέρα 0). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε 2 επαναλήψεις με χρονική απόσταση ενός μήνα. Καθημερινές δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν μέχρι την 7<sup>η</sup> ημέρα.

### 2.5.2 Χωρίς χρήση λαμπτήρων υπεριώδους φωτός στο κύκλωμα

Ενδιάμεσα των δύο προηγούμενων δοκιμασιών, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός, αλλαγή νερού και απενεργοποίηση των λαμπτήρων υπεριώδους φωτός. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφονται στα παραπάνω εδάφια.

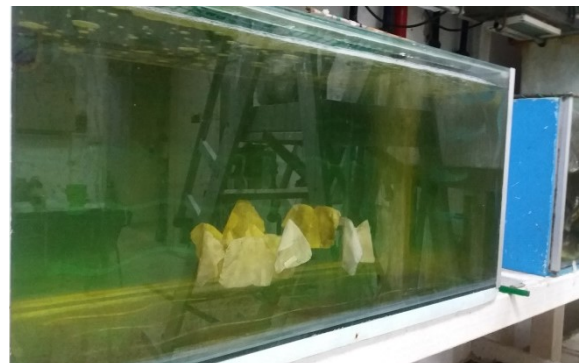
## 2.6 Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα μέσα σε δεξαμενή που ανήκει σε κλειστό σύστημα μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας.

Κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα διαστάσεων 2,5 cm × 1,0 cm × 0,1cm (τύπου AISi-304, Χαλυβουργική Α.Ε., Αθήνα, Ελλάδα), συνολικού εμβαδού 5,7 cm<sup>2</sup>, αποστειρώθηκαν δις σε αυτόκαυστο (15 λεπτά στους 121 °C) και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες, ειδικά διαμορφωμένες πλαστικές σίτες με άνοιγμα ματιού 4 mm<sup>2</sup>. Σε κάθε τέτοιο «σακουλάκι» τοποθετήθηκαν, υπό ασηπτικές συνθήκες, 3 κουπόνια με τρόπο τέτοιο ώστε να μην έρχονται σε επαφή μεταξύ τους (Εικόνα 2.2).

Όλα τα σακουλάκια τοποθετήθηκαν ταυτόχρονα στη δεξαμενή και κρεμάστηκαν κατά τρόπον τινά ώστε να ισαπέχουν μεταξύ τους και από τον πάτο της δεξαμενής. Η ανακύκλωση του νερού ρυθμίστηκε έτσι ώστε να ανανεώνεται ο όγκος της δεξαμενής μία φορά ανά ώρα. Επίσης, με τη χρήση αερόπετρας επιτεύχθηκε ελαφριά συνεχόμενη κίνηση στα σακουλάκια (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.2 «Σακουλάκι με 3 κουπόνια»



Εικόνα 2.3 Η δεξαμενή στην οποία  
19 τοποθετήθηκαν τα κουπόνια

Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες νερού μέσα σε ένα χρονικό διάστημα 30 ημερών από την τοποθέτηση των κουπονιών. Εν ολίγοις, πραγματοποιήθηκαν 13 δειγματοληψίες νερού και 12 κουπονιών. Η συχνότητα ορίστηκε ανά 24 ώρες για τις πρώτες 3 ημέρες και κατόπιν ανά 3 ημέρες μέχρι την 30<sup>η</sup> ημέρα.

Συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

- Συλλογή νερού σε αποστειρωμένη γυάλινη φιάλη Duran χωρητικότητας 250 mL η οποία μεταφέρονταν σε ψυγείο εντός 30 λεπτών.
- Συλλογή νερού σε αποστειρωμένη γυάλινη φιάλη Duran χωρητικότητας 100 mL για άμεση μικροβιολογική ανάλυση και φυσικοχημική ανάλυση.
- Κατόπιν, μεταφέρονταν ένα σακουλάκι σε αποστειρωμένη γυάλινη φιάλη Duran χωρητικότητας 250 mL μαζί με μία ποσότητα νερού, τέτοια ώστε τα κουπόνια να είναι πλήρως βυθισμένα.
- Καταγραφή φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού της δεξαμενής.

Μετά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο πραγματοποιούνταν άμεσα μικροβιολογική ανάλυση του δείγματος νερού (όπως περιγράφηκε παραπάνω) και δειγματοληψία του βιοϋμενίου των κουπονιών ακολουθώντας το πρωτόκολλο των Kostaki et al. (2012). Εν συντομία, κάθε μεταλλικό κουπόνι εκπλένονταν με 5 mL MRD ανά πλευρά, με στόχο να απομακρυνθούν τα πλαγκτονικά και τα ελαφρώς προσκολλημένα κύτταρα. Έπειτα, τα κουπόνια μεταφέρονταν με λαβίδα ασηπτικά σε αποστειρωμένο πλαστικό σωλήνα falcon που περιείχε 6 mL αποστειρωμένου διαλύματος MRD και 10 γυάλινα σφαιρίδια (glass beads). Ακολουθούσε στροβιλισμός για 2 λεπτά με τη χρήση vortex, ώστε να αποκολληθούν όλα τα βιοϋμενικά κύτταρα που βρίσκονταν προσκολλημένα στην επιφάνεια του κουπονιού. Στη συνέχεια, ακολούθησαν δεκαδικές αραιώσεις, με χρήση του διαλύματος MRD, του βακτηριακού εναιωρήματος και επίστρωση σε τρυβλία με Marine Agar εμβολίων όγκου 100  $\mu$ L κατάλληλων αραιώσεων. Για κάθε αραιώση χρησιμοποιήθηκε τριπλή επανάληψη τρυβλίων. Η επώαση των τρυβλίων πραγματοποιήθηκε για 72 ώρες στους 25 °C και ακολούθησε απαρίθμηση όλων των σχηματιζόμενων αποικιών. Η έκφραση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σε  $\log_{10}$  CFU  $\text{cm}^{-2}$  της επιφάνειας του κουπονιού.

## 2.7 Μοριακές τεχνικές

### 2.7.1 Απομόνωση των βακτηριακών κυττάρων

Για τα δείγματα του νερού ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: φυγοκέντρηση 100mL νερού για 10 λεπτά, στους 4 °C στις 5000g. Κατόπιν, απόχυση του υπερκείμενου, ξέπλυμα και επαναιώρηση σε 10 mL αλατούχου διαλύματος (1/4 strength διαλύματος Ringer, Lab M) και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, εις διπλούν. Το ίζημα φυλάσσεται στην κατάψυξη στους -20 °C.

Για τα δείγματα από το διάλυμα όπου είχαν αποκολληθεί τα προσκολλημένα κύτταρα του βιοϋμενίου ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: vortex για ένα λεπτό ώστε να αποκολληθούν και να αιωρηθούν όλα τα κύτταρα από την επιφάνεια του μεταλλικού κουπονιού, των γυάλινων σφαιριδίων και του falcon. Λήφθηκαν 4 mL από το

βακτηριακό εναιώρημα και διαμοιράστηκαν σε 2 Eppendorf tubes χωρητικότητας 2 mL. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4 °C στα 10000 g. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και η βιομάζα ξεπλύθηκε και επαναιωρήθηκε σε 1 mL Ringer και τελικά έγινε συνένωση της βιομάζας από τα αντίστοιχα tubes. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και ξέπλυμα εις διπλούν. Το ίζημα αποθηκεύθηκε στην κατάψυξη στους -20 °C.

Η απομόνωση των αποικιών από τα τρυβλία πραγματοποιήθηκε την ημέρα της καταμέτρησης αυτών. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής (Biosafety cabinet level 2). Αποστειρωμένο διάλυμα MRD με 20% γλυκερόλη χρησιμοποιήθηκε ως μέσο διατήρησης. Σε κάθε τρυβλίο εισήχθη 1 mL του διαλύματος, με απαλές κινήσεις και με αποστειρωμένο μεταλλικό τρίγωνο αποκολλήθηκαν οι αποικίες από το θρεπτικό υπόστρωμα. Προστέθηκε ακόμα 1 mL διαλύματος και το σύνολο του διαλύματος με τις αποικίες μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο cryovial για φύλαξη σε συνθήκες κατάψυξης (-20 °C).

### **2.7.2 Απομόνωση γενετικού υλικού (DNA extraction)**

Η διαδικασία απομόνωσης γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται παρακάτω (Doulgeraki et al., 2011):

- Το πέλετ κάθε δείγματος επαναιωρείται σε 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει 1M sorbitol, 0.1 M EDTA (pH 7,5) και 25 mg/mL λυσοζύμη.
- Επώαση για 2 ώρες στους 37 °C (vortex ανά μισή ώρα).
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 17000g στους 4 °C και απόχυση υπερκείμενου.
- Επαναιώρηση του πέλετ σε 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει 50mM Tris-HCl και 20 mM EDTA (pH 7.4).
- Προσθήκη 50 μL 10% SDS και επώαση στους 65 °C για 30 λεπτά.
- Προσθήκη 0,2 mL potassium acetate 5M.
- Επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 17000g στους 4 °C και συλλογή του υπερκείμενου σε καθαρό micro tube (εις διπλούν).
- Προσθήκη 700 μL ισοπροπανόλης (-20 °C).
- Ανάδευση με κίνηση 360° (40 φορές) και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 17000g στους 4 °C και απόχυση υπερκείμενου.
- Προσθήκη 0,5 mL 70% ethanol (-20 °C) και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 17000g στους 4 °C και απόχυση υπερκείμενου (εις διπλούν).
- Το πέλετ αφήνεται να στεγνώσει overnight.
- Επαναιώρηση του πέλετ σε 25-50 μL ddH<sub>2</sub>O ή elution buffer στο οποίο προστίθεται 1 μL RNase ανά δείγμα και επώαση στους 40 °C για 30 λεπτά.
- Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του γενετικού υλικού μετά την απομόνωση.

Τα δείγματα παρέμειναν στην κατάψυξη (-20 °C) μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

Για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του απομονωμένου DNA και την αξιολόγηση της ποιότητας αυτού χρησιμοποιήθηκε το εξειδικευμένο φασματοφωτόμετρο NanoPhotometer™ (Implen). Η καθαρότητα του DNA αξιολογείται από το λόγο των απορροφήσεων  $A_{260}/A_{280}$  και το λόγο  $A_{260}/A_{230}$  (Eland et al., 2012). Ο λόγος των απορροφήσεων στα μήκη κύματος 260nm προς 280nm μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης παρουσίας DNA σε σχέση με επιμολύνσεις που απορροφούν στα 280nm, συνήθως πρωτεΐνες. Ένας λόγος μεγαλύτερος από 1,80 υποδηλώνουν ότι το εξαγόμενο γενετικό υλικό είναι υψηλής ποιότητας και κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί για επόμενες τεχνικές. Είναι συχνό ότι το γενετικό υλικό που εξάγεται από περιβαλλοντικά δείγματα έχουν αρκετά χαμηλό λόγο. Ομοίως, ο λόγος των απορροφήσεων  $A_{260}/A_{230}$  χρησιμοποιείται στην ποσοτικοποίηση του επιπέδου άλλων επιμολυντών, όπως χουμικά οξέα, συνήθη στα περιβαλλοντικά δείγματα. Τιμές λόγου άνω του 2 υποδηλώνουν υψηλής ποιότητας εξαγόμενο γενετικό υλικό, ενώ χαμηλότερες τιμές υποδεικνύουν την παρουσία επιμολυντών που απορροφούν στα 230nm, όπως πολυσακχαρίτες, φαινόλες και χουμικά οξέα (Sambrook et al., 2001).

### 2.7.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Η διαδικασία της ενίσχυσης γονιδιακών τμημάτων μέσω PCR εκτελέστηκε συνδυάζοντας τα πρωτόκολλα των Simister et al. (2011) και Bauvais et al. (2015). Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι: 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') και 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'), για το γονίδιο του 16S rRNA. Στο 5' άκρο του 341F εκκινητή ενσωματώθηκε αλληλουχία πλούσια σε γουανίνη και κυτοσίνη (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCCG-3'). Το τμήμα που στοχεύθηκε με αυτούς τους εκκινητές είναι οι υπερμετάβλητες περιοχές V3-V5 και το προϊόν της αντίδρασης είχε μήκος περίπου 580 bp.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε έναν τελικό όγκο 25  $\mu$ L. Η αντίδραση περιείχε: 1 U KAPA Taq DNA πολυμεράση (KAPA Biosystems), 2.5  $\mu$ L 10X KAPA Taq buffer A (με τελική συγκέντρωση  $MgCl_2$  1,5mM), 0,8 mM dNTP's, 0.4  $\mu$ M από κάθε εκκινητή, καθώς και 30-50 ng DNA από κάθε δείγμα. Η PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή PCR ProFlex System (ThermoFisher) και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακόλουθο: αρχική αποδιάταξη στους 94 °C για 5 λεπτά, ακολουθούμενο από 35 κύκλους (αποδιάταξη στους 94 °C για 30 s, υβριδισμός εκκινητών στους 55 °C για 30 s, επιμήκυνση στους 72 °C για 1 min), και μία τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 5 λεπτά.

Η επιτυχία της αντίδρασης ελέγχθηκε κατόπιν ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2%, διάρκειας 1 ώρας στα 80 V. Το πήκτωμα βάφθηκε με εμβάπτιση, διάρκειας 20 λεπτών, σε υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου συγκεντρώσεως 0.5 mg/mL και φωτογραφήθηκε κάτω από υπεριώδες φως χρησιμοποιώντας το σύστημα GelDoc XR (Biorad).

### 2.7.4 DGGE

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης DGGE με τη χρήση της συσκευής DCode Universal Mutation Detection System (Biorad). Συνοπτικά, τα

δείγματα φορτώθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 6% (w/v), το οποίο περιείχε ουρία και φορμαμίδιο σε διαβαθμισμένη συγκέντρωση 20-60%. Σημειώνεται ότι το 100% αντιστοιχεί σε 7 M ουρίας και 40% (w/v) φορμαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία, στους 60°C. Αρχικά εφαρμόστηκε τάση 50 V για 10 min και κατόπιν η ηλεκτροφόρηση «έτρεξε» στα 200V για 4h. Στη συνέχεια, το πήκτωμα βάφηκε εμβαπτιζόμενο σε υδατικό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου για 20 λεπτά σε πλαστικό δοχείο και φωτογραφήθηκε κάτω από υπεριώδες φως χρησιμοποιώντας το σύστημα GelDoc XR (Biorad).

Τα ηλεκτροφορητικά προφίλ από τη DGGE αναλύθηκαν με το λογισμικό Bionumerics (Applied Maths). Υπολογίστηκε ο αριθμός των μπαντών που εμφανίζονται σε κάθε δείγμα, κάθε μία από τις οποίες αντιπροσωπεύει μία μοναδική λειτουργική ταξινομική ομάδα (operational taxonomic unit -OTU).



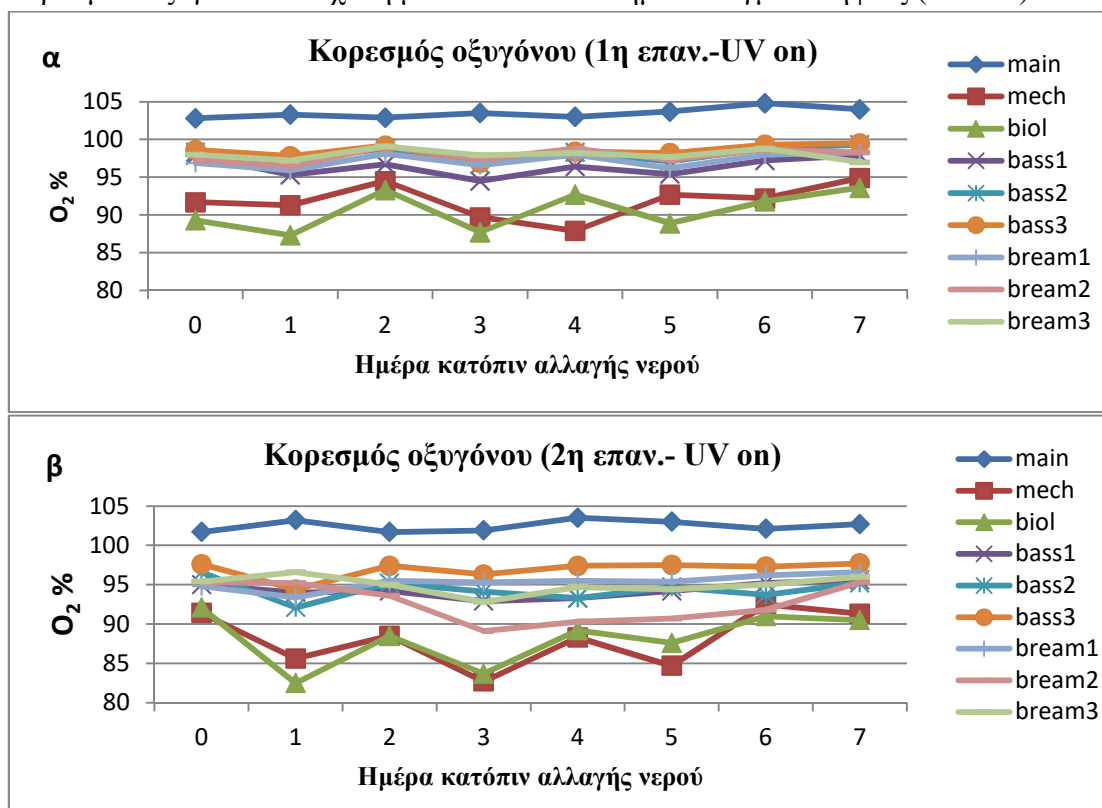
### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Η πορεία του μικροβιακού πληθυσμού κατόπιν αλλαγής νερού υπό την παρουσία ή μη υπερϊόδους ακτινοβολίας.

##### 3.1.1 Παρουσία υπερϊόδους ακτινοβολίας (2 επαναλήψεις)

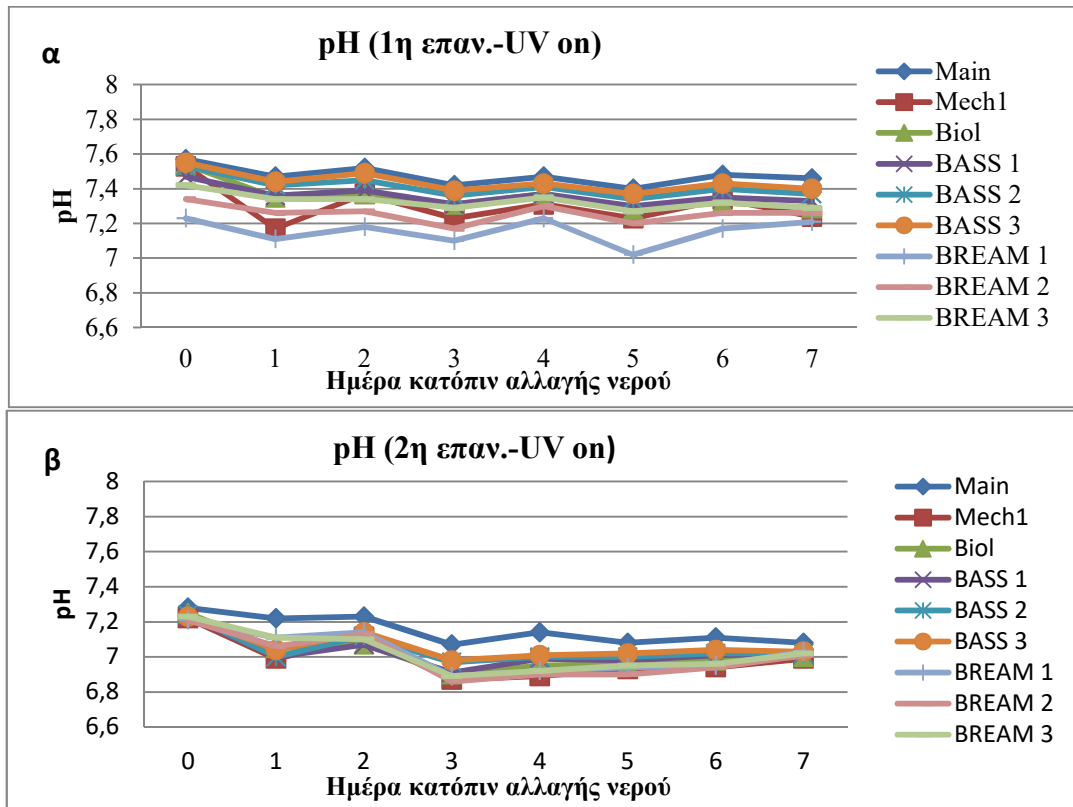
Όπως περιγράφηκε στα Υλικά και Μέθοδοι, το πείραμα επαναλήφθηκε εις διπλούν με χρονική απόσταση ενός μήνα. Αναφορικά με τις φυσικοχημικές παραμέτρους του νερού, στην πρώτη επανάληψη η μέση θερμοκρασία του κυκλώματος ήταν  $23.4 \pm 0.5$  °C, χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 9 σημείων δειγματοληψίας ( $P > 0.05$ ). Επίσης, η μέση αλατότητα για το χρονικό διάστημα των 8 ημερών ήταν  $35.13 \pm 0.3$  psu. Στη δεύτερη επανάληψη, η μέση θερμοκρασία ήταν  $23.4 \pm 0.2$  °C χωρίς να παρατηρηθεί στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας ( $P > 0.05$ ) και η μέση τιμή της αλατότητας ήταν  $35.50 \pm 0.5$  psu

Σε ότι αφορά το οξυγόνο (Διάγραμμα 3.1), η μέση τιμή του κορεσμού οξυγόνου στην κεντρική δεξαμενή (Main) βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερη ( $P < 0.05$ ) σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα σημεία δειγματοληψίας και στις δύο επαναλήψεις, καθώς το νερό εισέρχεται μέσω αντλίας με πίεση στη συγκεκριμένη δεξαμενή, προκαλώντας έντονη αναταραχή στην επιφάνεια και αποδοτικότερο εμπλουτισμό του νερού σε οξυγόνο. Επίσης, τα σημεία δειγματοληψίας στο βιολογικό και το μηχανικό φίλτρο βρέθηκαν να έχουν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη τιμή κορεσμού οξυγόνου σε σχέση με τα υπόλοιπα σημεία δειγματοληψίας ( $P < 0.05$ ).



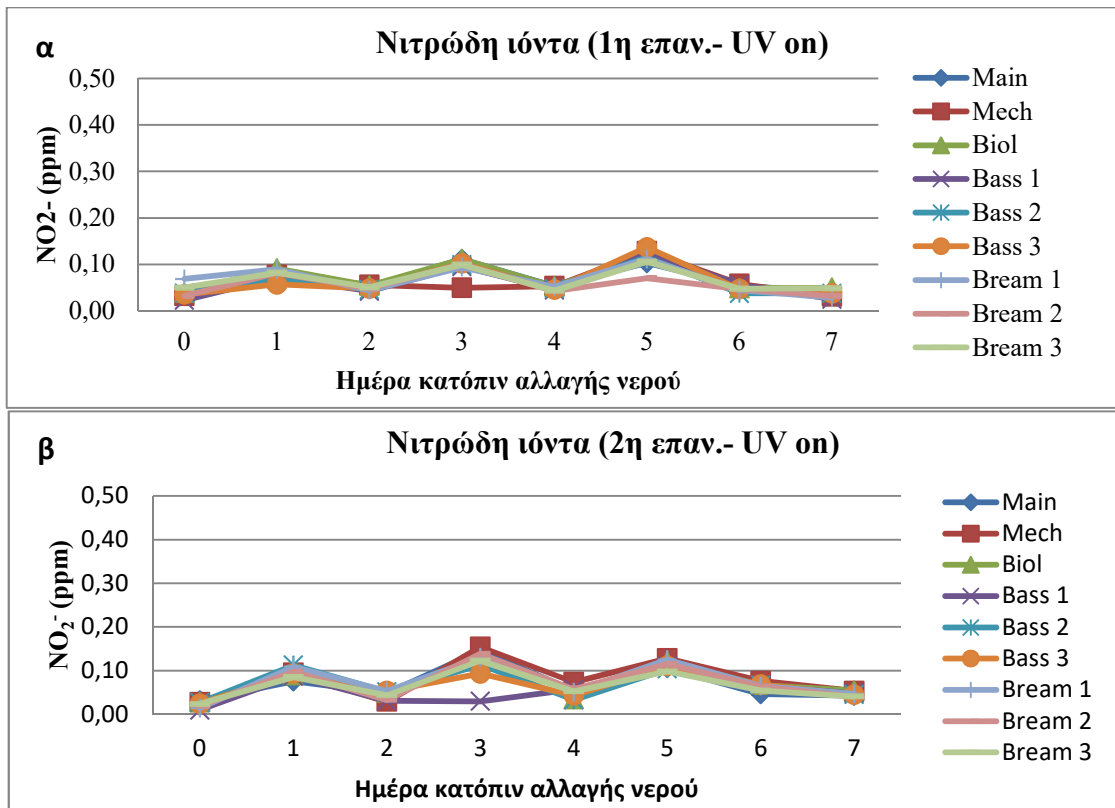
Διάγραμμα 3.1 : Κορεσμός οξυγόνου (%) σε κάθε σημείο δειγματοληψίας ανά ημέρα. (α) 1<sup>η</sup> επανάληψη, (β) 2<sup>η</sup> επανάληψη του πειράματος

Οι τιμές του pH παρουσίασαν μία τάση αυξομείωσης σε όλα τα σημεία δειγματοληψίας και στις δύο επαναλήψεις (Διάγραμμα 3.2). Η μείωση της τιμής του pH παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά τη χορήγηση τροφής, υποδηλώνοντας αύξηση στην παραγωγή CO<sub>2</sub>. Σημειώνεται ότι και στις δύο επαναλήψεις η χορήγηση της τροφής πραγματοποιήθηκε τις ημέρες 0, 2, 4 και 7.

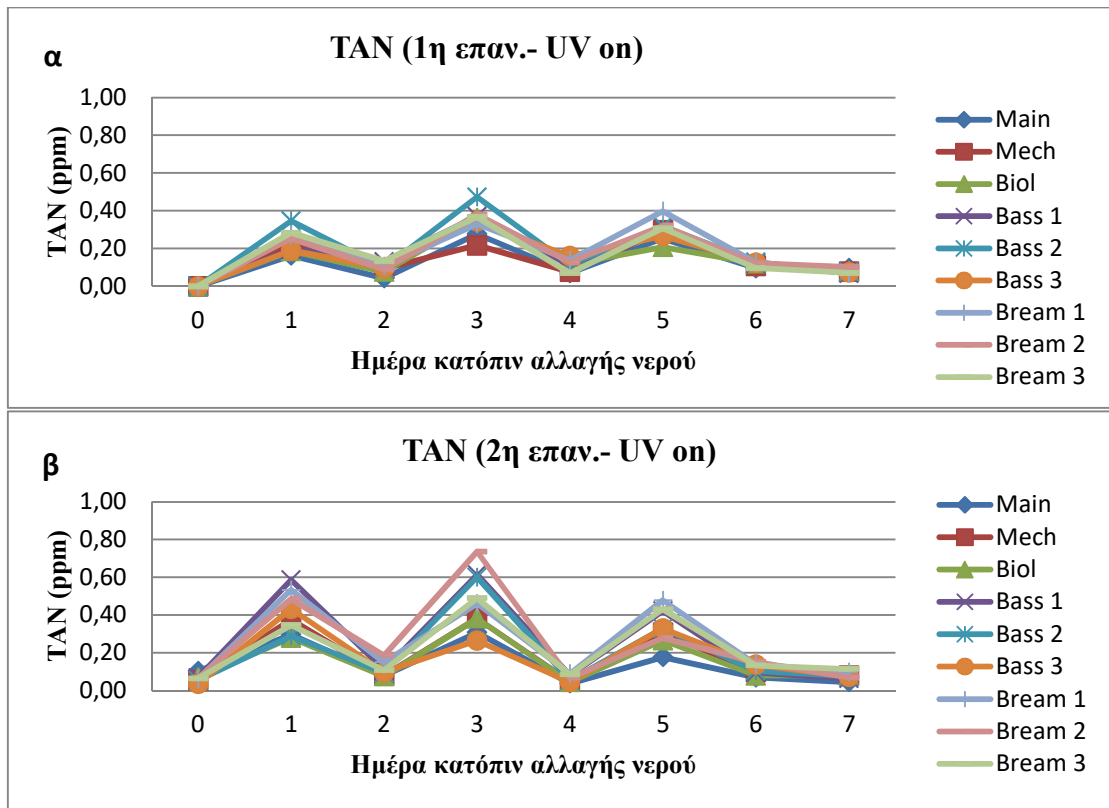


Διάγραμμα 3.2 : Η τιμή του pH σε κάθε σημείο δειγματοληψίας ανά ημέρα. (α) 1<sup>η</sup> επανάληψη, (β) 2<sup>η</sup> επανάληψη του πειράματος.

Η συγκέντρωση των νιτροδών ιόντων και της ολικής αμμωνίας/αμμωνίου παρουσίασαν επίσης αυξομείωση ακολουθώντας το πρόγραμμα χορήγησης του σιτηρεσίου και στις δύο επαναλήψεις (Διαγράμματα 3.3 και 3.4). Σε κάθε περίπτωση, η συγκέντρωσή τους παρέμεινε κάτω από τα τοξικά όρια για την εκτροφή των ιχθύων.

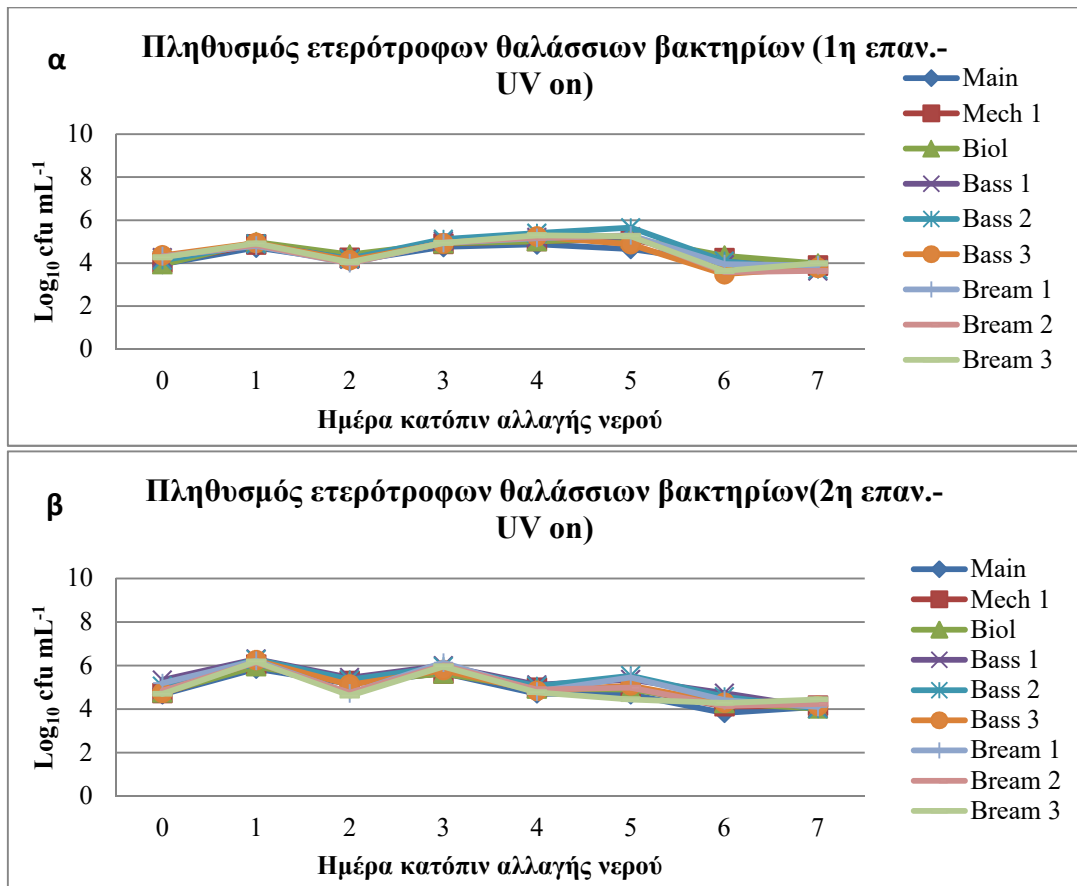


Διάγραμμα 3.3 : Η συγκέντρωση των νιτρωδών ιόντων ανά σημείο δειγματοληψίας ανά ημέρα. (α) 1<sup>η</sup> επανάληψη, (β) 2<sup>η</sup> επανάληψη του πειράματος.



**Διάγραμμα 3.4 :** Η συγκέντρωση της ολικής αμμωνίας ( $\text{NH}_3$  και  $\text{NH}_4^+$ ) σε κάθε σημείο δειγματοληψίας ανά ημέρα. (α) 1<sup>η</sup> επανάληψη, (β) 2<sup>η</sup> επανάληψη του πειράματος.

Κατόπιν της κατά 40% αλλαγής του νερού στο σύστημα, το μικροβιακό φορτίο την επόμενη ημέρα φαίνεται να αυξάνεται κατά περίπου μία λογαριθμική μονάδα. Σε σχέση με τον πληθυσμό των ετερότροφων θαλάσσιων βακτηρίων, παρατηρούνται μικρές αυξομειώσεις, οι οποίες ακολουθούν τη συχνότητα της χορήγησης της τροφής (Διάγραμμα 3.5). Επίσης, όπως προαναφέρθηκε, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού ακολουθούν και αυτά το πρόγραμμα του σιτηρεσίου.



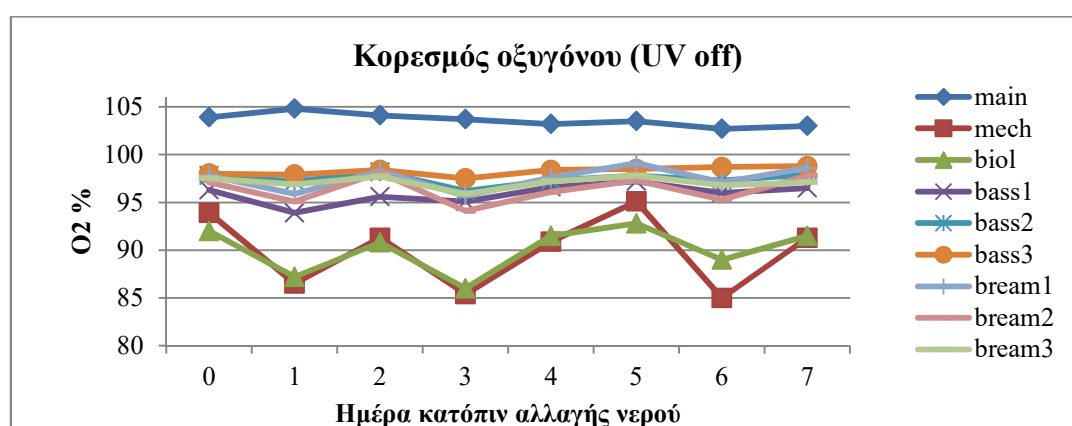
Διάγραμμα 3.5 : Ο μικροβιακός πληθυσμός των θαλάσσιων ετερότροφων πλαγκτονικών βακτηρίων σε κάθε σημείο δειγματοληψίας ανά ημέρα. Οι τιμές αναφέρονται σε  $\log(\text{CFU mL}^{-1})$ . (α) 1<sup>η</sup> επανάληψη, (β) 2<sup>η</sup> επανάληψη του πειράματος.

### 3.1.2 Απουσία υπερϊόδους ακτινοβολίας (1 επανάληψη)

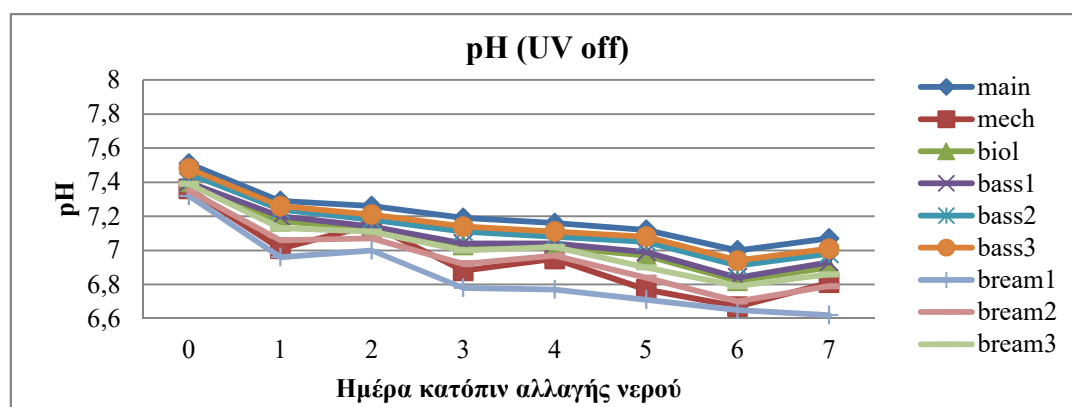
Αναφορικά με τις φυσικοχημικές παραμέτρους του νερού, η μέση τιμή της θερμοκρασίας του κυκλώματος ήταν  $23.4 \pm 0.5$  °C, χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 9 σημείων δειγματοληψίας ( $P > 0.05$ ). Επίσης, η μέση τιμή της αλατότητας για το χρονικό διάστημα των 8 ημερών ήταν  $35.25 \pm 0.43$  psu.

Σε ότι αφορά το οξυγόνο (Διάγραμμα 3.6), η μέση τιμή του κορεσμού οξυγόνου στην κεντρική δεξαμενή (Main) βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερη ( $P < 0.05$ ) σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα σημεία δειγματοληψίας καθώς, όπως προαναφέρθηκε, υπάρχει έντονη αναταραχή στην επιφάνεια του νερού και αποδοτικότερος εμπλουτισμός του νερού σε οξυγόνο. Επίσης, τα σημεία δειγματοληψίας στο βιολογικό και το μηχανικό φίλτρο βρέθηκαν να έχουν στατιστικά σημαντική χαμηλότερη τιμή κορεσμού οξυγόνου σε σχέση με τα υπόλοιπα σημεία δειγματοληψίας ( $P < 0.05$ ).

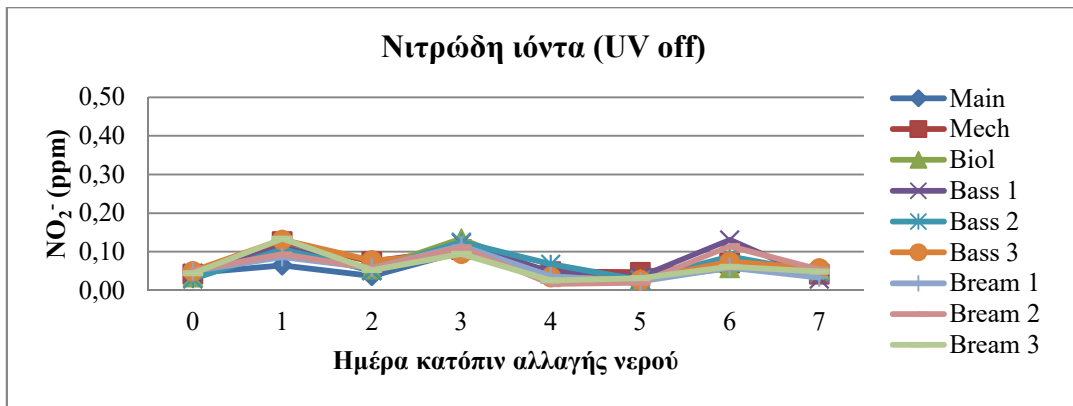
Η τιμή του pH επέδειξε πτωτική τάση σε όλα τα σημεία δειγματοληψίας (Διάγραμμα 3.7). Η συγκέντρωση των νιτροδών ιόντων (Διάγραμμα 3.8) και της ολικής αμμωνίας (Διάγραμμα 3.9) δεν ξεπέρασε τα τοξικά όρια, παρουσιάζοντας όμως διακυμάνσεις στις τιμές αυτών, οι οποίες δύναται να συσχετιστούν με τη χρονική απόσταση από την τελευταία χορήγηση τροφής. Σημειώνεται ότι η χορήγηση της τροφής πραγματοποιήθηκε τις ημέρες 0, 2, 5 και 7.



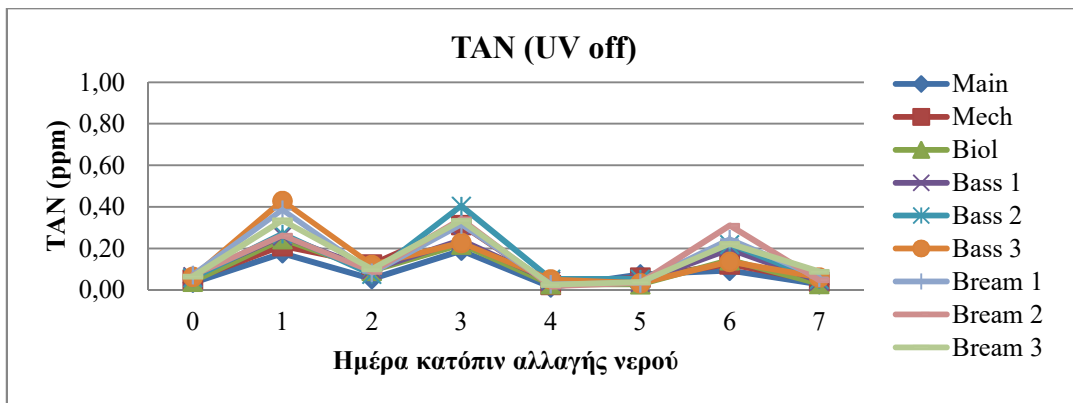
Διάγραμμα 3.6 : Κορεσμός οξυγόνου (%) σε κάθε σημείο δειγματοληψίας ανά ημέρα.



Διάγραμμα 3.7 Η τιμή του pH σε κάθε σημείο δειγματοληψίας ανά ημέρα.

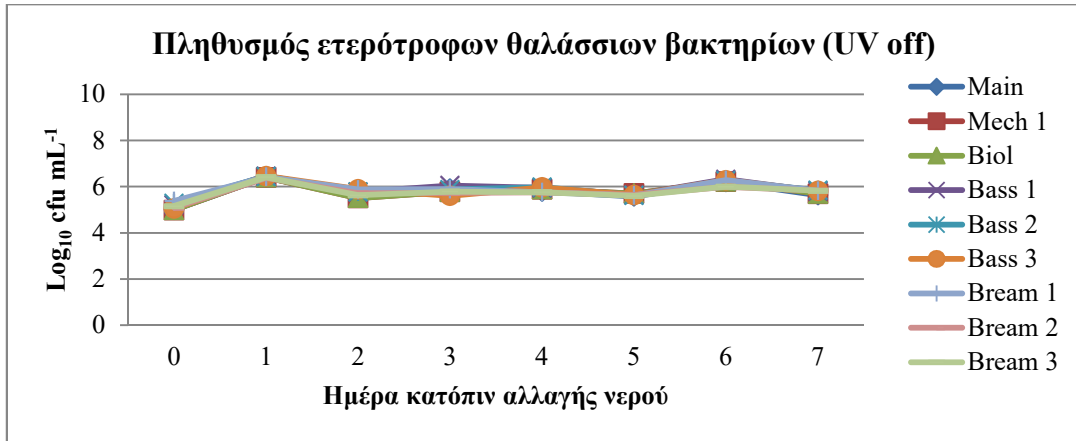


Διάγραμμα 3.8 Η συγκέντρωση των νιτρώδων ιόντων σε κάθε σημείο δειγματοληψίας ανά ημέρα.



Διάγραμμα 3.9 : Η συγκέντρωση της ολικής αμμωνίας (NH<sub>3</sub> και NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) σε κάθε σημείο δειγματοληψίας ανά ημέρα.

Ο πληθυσμός των ετερότροφων θαλάσσιων βακτηρίων καταγράφηκε στα ίδια επίπεδα ( $P > 0.05$ ) σε όλα τα σημεία δειγματοληψίας και σε κάθε χρονική στιγμή. Το μικροβιακό φορτίο μία ώρα μετά την κατά 40% αλλαγή νερού ήταν  $5.1 \pm 0.12 \log(\text{CFU mL}^{-1})$ . Εικοσιτέσσερις ώρες αργότερα, αφού έχει μεσολαβήσει χορήγηση τροφής, ο πληθυσμός αυξάνεται κατά περίπου μία λογαριθμική μονάδα φθάνοντας σε μία μέγιστη μέση τιμή των  $6.4 \pm 0.03 \log(\text{CFU mL}^{-1})$ , όπως απεικονίζεται στο Διάγραμμα 3.10.

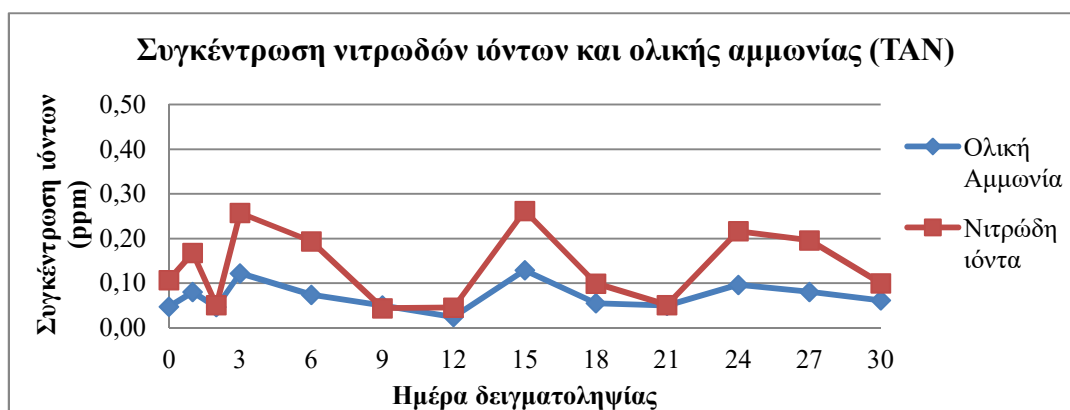


Διάγραμμα 3.10 : Ο μικροβιακός πληθυσμός των θαλάσσιων ετερότροφων πλαγκτονικών βακτηρίων σε κάθε σημείο δειγματοληψίας ανά ημέρα. Οι τιμές αναφέρονται σε  $\log(\text{CFU mL}^{-1})$ .



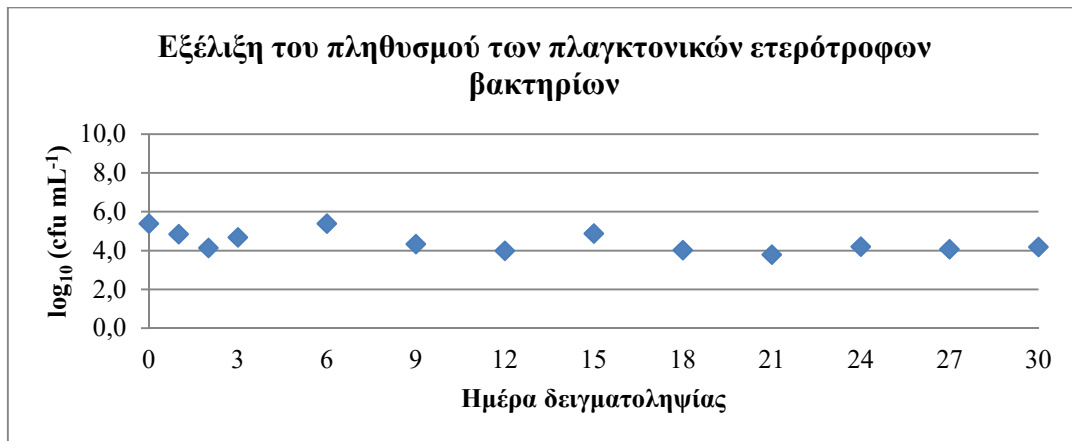
### 3.2 Δημιουργία βιοϋμενίων σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα σε κλειστό σύστημα υδατοκαλλιέργειας

Αναφορικά με τις φυσικοχημικές παραμέτρους του νερού, αυτές κυμάνθηκαν σε επίπεδα ασφαλή για την εκτροφή των ιχθύων. Η θερμοκρασία παρέμεινε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος στους  $23,5 \pm 0,4$  °C. Η αλατότητα παρέμεινε επίσης σταθερή στα  $35.3 \pm 0.5$  psu. Η μέση τιμή του pH ήταν  $7.06 \pm 0.11$ , του κορεσμού οξυγόνου  $100.6 \pm 0.6\%$ , των νιτρωδών ιόντων  $0.14 \pm 0.08$  ppm και της ολικής αμμωνίας (TAN)  $0.07 \pm 0.03$  ppm. Ένα μοτίβο αυξομειώσεως των συγκεντρώσεων νιτρωδών ιόντων και ολικής αμμωνίας παρατηρήθηκε να ακολουθεί το πρόγραμμα χορήγησης του σιτηρεσίου, με την αύξηση να παρατηρείται μετά από 24 ώρες (Διάγραμμα 3.11). Σημειώνεται ότι η χορήγηση τροφής πραγματοποιήθηκε τις ημέρες 0, 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19, 21, 23, 26, 28 και 30. Επίσης, να σημειωθεί ότι οι δειγματοληψίες του νερού πραγματοποιούνταν πριν τη χορήγηση της τροφής.



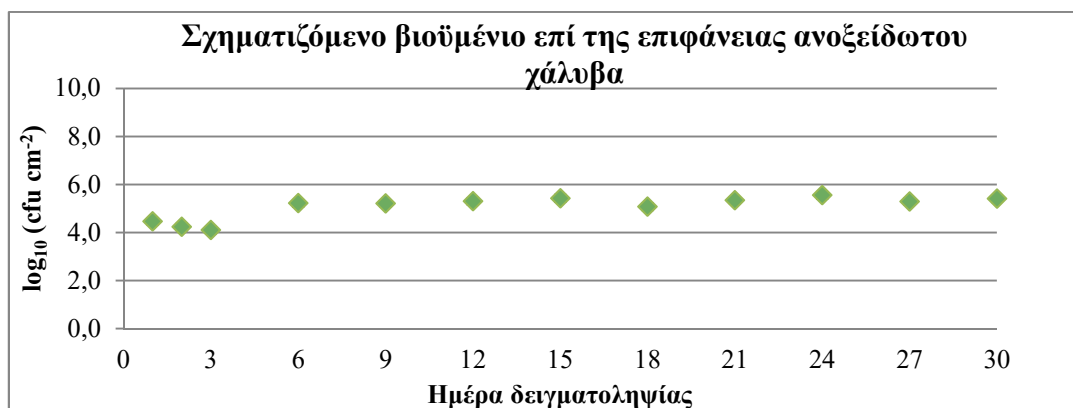
**Διάγραμμα 3.11 :** Συγκέντρωση των νιτρωδών ιόντων και της ολικής αμμωνίας (TAN) κατά της διάρκειας των 30 ημερών του πειράματος.

Σε ότι αφορά το μικροβιακό φορτίο των πλαγκτονικών ετερότροφων βακτηρίων του νερού, αυτό παρέμεινε σε γενικές γραμμές σταθερό με τη συγκέντρωση αυτών να κυμαίνεται από 3.8 έως  $5.4 \log\text{CFU ml}^{-1}$  (Διάγραμμα 3.12). Τάση για αυξημένες τιμές παρατηρήθηκε 24h μετά τη χορήγηση τροφής, δηλαδή τις ημέρες 1, 3, 6, 15, 24 και 27. Αντίθετα, τις ημέρες δειγματοληψίας που απείχαν 48-72 ώρες από την τελευταία χορήγηση τροφής, καταγράφηκε χαμηλότερο μικροβιακό φορτίο, ήτοι τις ημέρες 2, 9, 12, 18, 21 και 30.



**Διάγραμμα 3.12 :** Ο μικροβιακός πληθυσμός των θαλάσσιων ετερότροφων πλαγκτονικών βακτηρίων ανά χρονικό σημείο δειγματοληψίας. Οι τιμές αναφέρονται σε  $\log (\text{CFU mL}^{-1})$ .

Σε ότι αφορά το μικροβιακό φορτίο των σχηματιζόμενων βιοϋμενίων στις ανοξείδωτες επιφάνειες, ήδη μέσα σε 24 ώρες κατόπιν της τοποθέτησης των κουπονιών στο σύστημα η επιφάνεια είχε αποικηθεί από έναν πληθυσμό ετερότροφων βακτηρίων της τάξης των  $4.5 \pm 0.05 \log(\text{CFU cm}^{-2})$ . Μέσα σε έξι ημέρες, ο πληθυσμός έφτασε σε μία πυκνότητα  $5.2 \pm 0.03 \log(\text{CFU cm}^{-2})$  και παρέμεινε σχετικά σταθερός μέχρι το τέλος των δειγματοληψιών (Διάγραμμα 3.13).

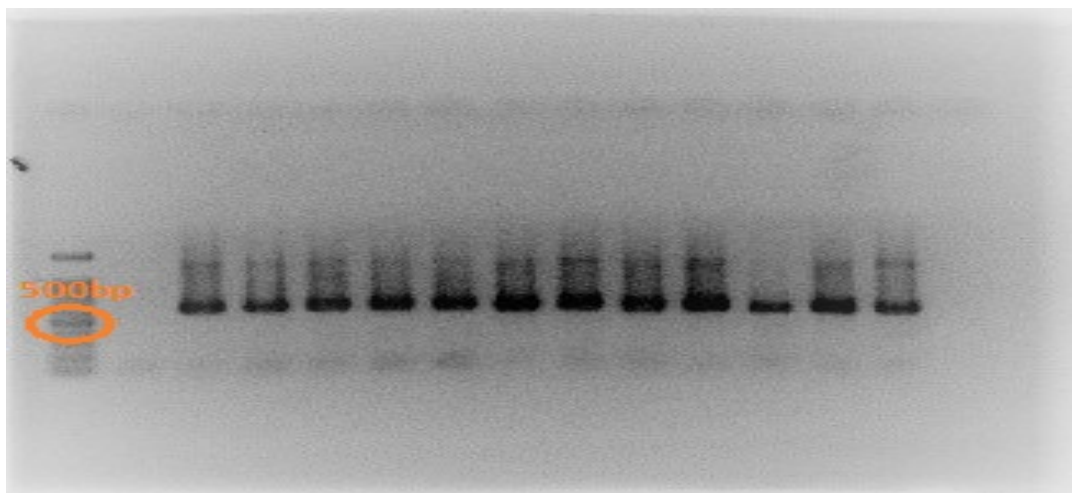


**Διάγραμμα 3.13 :** Η πορεία του σχηματιζόμενου βιοϋμενίου επί των επιφανειών ανοξείδωτου χάλυβα ανά ημέρα δειγματοληψίας. Απεικονίζεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση του  $\log (\text{cfu cm}^{-2})$ .

### 3.3 Ανάλυση της σύνθεσης της μικροβιακής κοινότητας

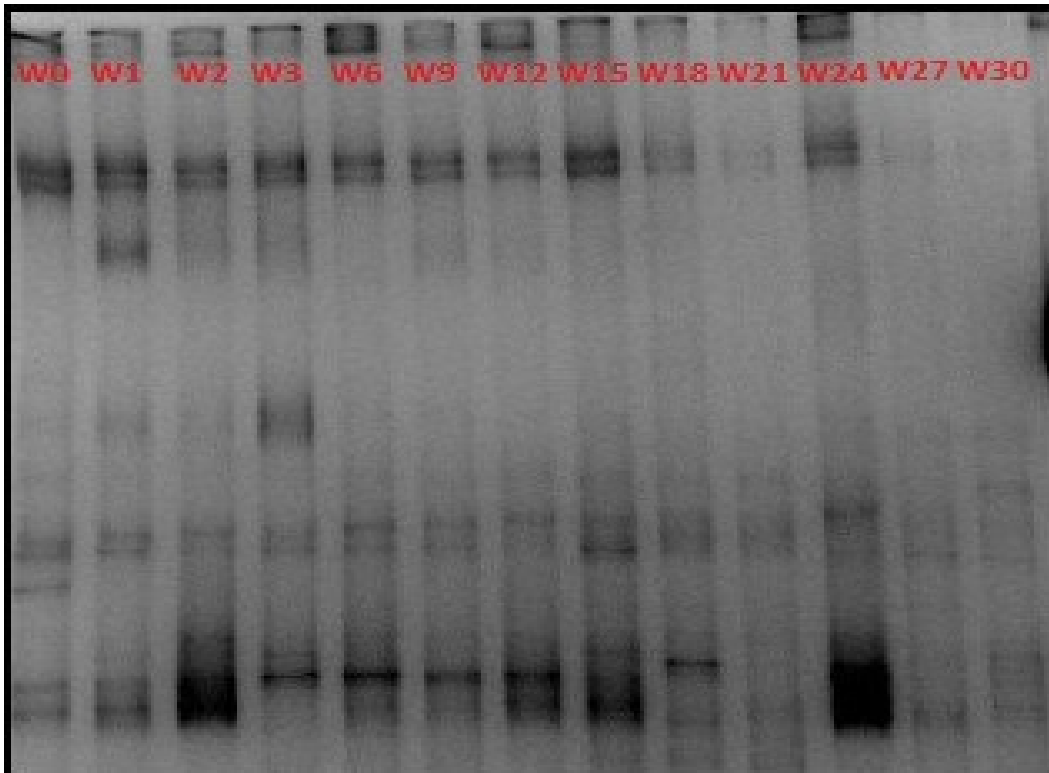
#### 3.3.1 Εξέλιξη της σύνθεσης της μικροβιακής κοινότητας του νερού

Η εξαγωγή του DNA από τα δείγματα νερού (100 mL) καθώς και από τα αντίστοιχα τρυβλία κατέστη σε όλες τις περιπτώσεις επιτυχής. Ακολούθησε αντίδραση PCR, το αποτέλεσμα της οποίας ελέγχθηκε κατόπιν ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.1, το προϊόν της αντίδρασης βρίσκεται κοντά στο αναμενόμενο μέγεθος των 580bp.

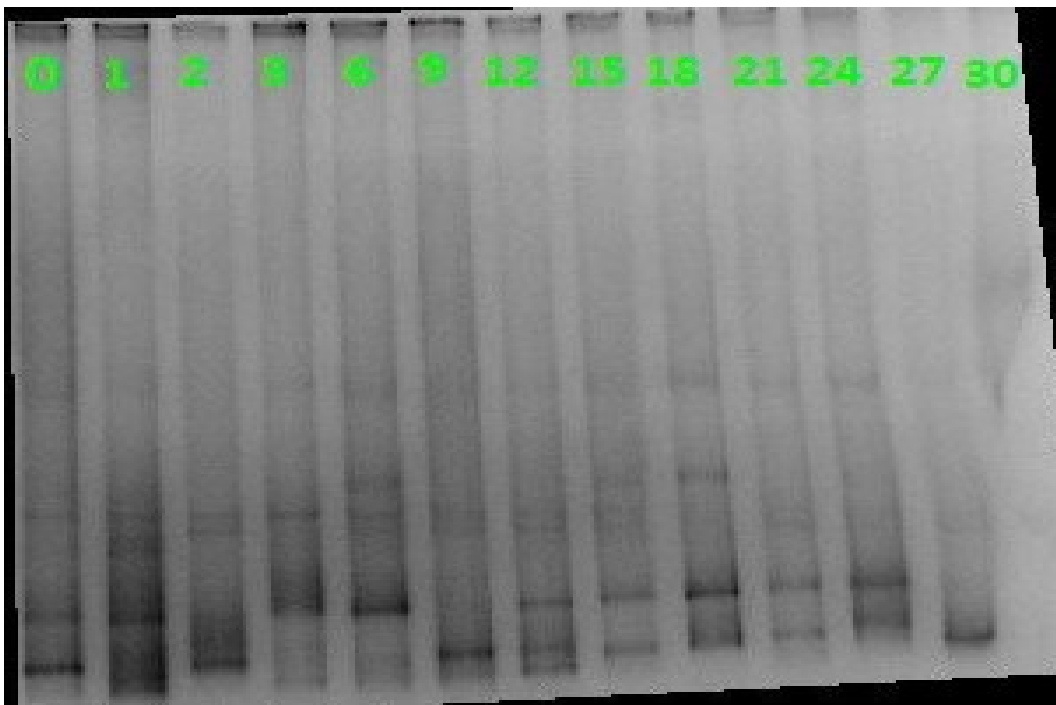


**Εικόνα 3.1 :** Φωτογραφία από το πήκτωμα αγαρόζης του προϊόντος της αντίδρασης PCR με τους primers 341(GC)F/907R. Οι ζώνες είναι ευκρινείς ανάμεσα στα 500 και 600 bp, επιβεβαιώνοντας το αναμενόμενο προϊόν μεγέθους 580 bp. Απεικονίζονται στην πρώτη στήλη η κλιμακα τάξεως 100bp, στη δεύτερη στήλη ο αρνητικός μάρτυρας και έπονται τα δείγματα του νερού (W0-W30).

Τα αποτελέσματα της DGGE για τη σύνθεση της πλαγκτονικής βακτηριακής κοινότητας φανερώνουν ότι τα OTUs παρέμειναν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια των 30 ημερών του πειράματος. Αποκαλύφθηκε η ύπαρξη 14-24 διαφορετικών OTUs όταν εξετάστηκαν τα δείγματα του νερού (Εικόνα 3.2). Από την άλλη πλευρά, τα αποτελέσματα της DGGE από τα τρυβλία του νερού αποκάλυψαν έναν μικρότερο βαθμό βιοποικιλότητας που κυμάνθηκε από 1 έως 9 OTUs, όπως φαίνονται στην εικόνα 3.3. Είναι εμφανής η απουσία, στα ηλεκτροφορητικά προφίλ των δειγμάτων που προέρχονται από τα τρυβλία, των OTUs που εμφανίζονται στην αρχή της ηλεκτροφόρησης, σε σχέση με τα δείγματα που προέρχονται απ' ευθείας από το νερό.



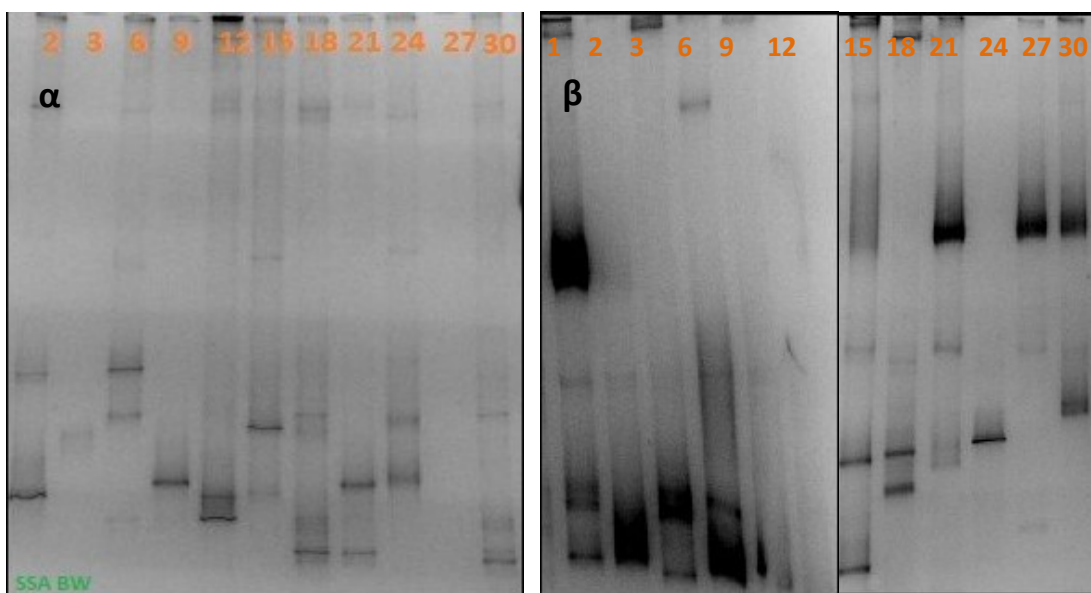
Εικόνα 3.2 :Ηλεκτροφορητικό προφίλ DGGE της μικροβιακή κοινότητας από τα δείγματα του νερού τα χρονικά σημεία 0 έως 30.



Εικόνα 3.3 : Ηλεκτροφορητικό προφίλ DGGE μικροβιακής κοινότητας από τα τρυβλία του νερού τα χρονικά σημεία 0 έως 30.

### 3.3.2 Εξέλιξη της μικροβιακής κοινότητας του σχηματισθέντος βιοϋμενίου

Η εξαγωγή του DNA από τα δείγματα τα αποκολλημένα βιοϋμενία (4 mL) καθώς και από τα αντίστοιχα τρυβλία ήταν σε όλες τις περιπτώσεις επιτυχής. Ακολούθησε αντίδραση PCR, το αποτέλεσμα της οποίας επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Πραγματοποιήθηκε DGGE μόνο στα αποκολλημένα βιοϋμενία του κουπονιού A για τις ημέρες δειγματοληψίας 2 έως 30, καθώς και στα δείγματα από τα αντίστοιχα τρυβλία για τις ημέρες δειγματοληψίας 1 έως 30. Στα ηλεκτροφορητικά προφίλ της DGGE, εμφανίζονται από 2 έως 10 διαφορετικά OTUs, όταν πρόκειται για τα δείγματα απ' ευθείας από τα βακτηριακά εναιωρήματα (Εικόνα 3.4 α), ενώ στα αντίστοιχα δείγματα από τα τρυβλία εμφανίζονται από 1 έως 12 OTUs (Εικόνα 3.4 β).



**Εικόνα 3.4 :** Ηλεκτροφορητικά προφίλ DGGE της μικροβιακής σύνθεσης των σχηματιζόμενων βιοϋμενίων. Στο (α) απεικονίζονται τα δείγματα από τα αποκολληθέντα βακτήρια του κουπονιού A τα χρονικά σημεία 2 έως 30 ενώ στο (β) τα δείγματα που προέρχονται από τα τρυβλία των αντίστοιχων βακτηριακών εναιωρημάτων, τα χρονικά σημεία 1 έως 30.

Σε κάθε περίπτωση, είτε εξετάζονται τα αποκολλημένα κύτταρα απ' ευθείας, ή τα τρυβλία τους, είναι εμφανής η αλλαγή της μικροβιακής σύνθεσης του βιοϋμενίου κατά το πέρασ του χρόνου. Παρατηρώντας τις ζώνες που εμφανίζονται στην ηλεκτροφόρηση, κανένα χρονικό σημείο δειγματοληψίας δεν εμφανίζει όμοιο μοτίβο ζωνώσεων με το προηγούμενο ή επόμενο χρονικό σημείο.

Τέλος, με χρήση του λογισμικού Bionumerics καταμετρήθηκαν οι διαφορετικές ζώνες (OTUs) για κάθε χρονικό σημείο και οι οποίες καταγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.1 . Ο αριθμός των διαφορετικών OTUs του βακτηριοπλαγκτόν φαίνεται να είναι μεγαλύτερος από αυτόν των προσκολλημένων OTUs, όταν εξετάζονται τα αρχικά δείγματα νερού και αποκολλημένων βιοϋμενικών κυττάρων.

**Πίνακας 3.1 :** Ο αριθμός των OTUs κάθε δείγματος όπως προκύπτει από την ανάλυση των gel με χρήση του Bionumerics.

<b>Ημέρα δειγματοληψίας</b>	<b>Νερό (100mL)</b>	<b>Τρυβλία νερού</b>	<b>Αποκολλημένο βιοϋμένιο (4mL)</b>	<b>Τρυβλίο βιοϋμενίου</b>
<b>0</b>	17	4	N/A	N/A
<b>1</b>	19	7	N/A	12
<b>2</b>	16	5	5	10
<b>3</b>	14	5	2	9
<b>6</b>	21	9	6	10
<b>9</b>	14	3	4	6
<b>12</b>	13	6	5	N/A
<b>15</b>	15	6	5	3
<b>18</b>	18	6	9	5
<b>21</b>	24	6	7	4
<b>24</b>	18	6	4	1
<b>27</b>	20	3	N/A	3
<b>30</b>	15	1	10	6

## 4. Συζήτηση

### 4.1. Η πορεία του μικροβιακού πληθυσμού κατόπιν αλλαγής νερού υπό την παρουσία ή απουσία υπερϊώδους ακτινοβολίας

Η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο κλάδο παραγωγής τροφίμων τα τελευταία χρόνια, προσφέροντας πλέον περίπου το 50% των ιχθύων που καταναλώνονται παγκοσμίως ([www.fao.org/fishery/](http://www.fao.org/fishery/)). Η ανάπτυξη και εφαρμογή νέων τεχνολογιών στην παραγωγή αποτελεί μονόδρομο στη σύγχρονη εποχή. Το ενδιαφέρον του καταναλωτή και του παραγωγού στρέφεται σε οικονομικά βιώσιμες παραγωγικές διαδικασίες, ποιοτικά και ασφαλή ιχθυοπροϊόντα καθώς και μειωμένο περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Η νέα τεχνολογία που συνδυάζει όλα τα παραπάνω ονομάζεται κλειστό σύστημα υδατοκαλλιέργειας και προσφέρει άμεση εξοικονόμηση υδάτινων πόρων και έλεγχο των παραμέτρων εκτροφής με επακόλουθες προβλεπόμενες σταθερές παραγωγές (Bregnballe, 2015). Ήδη, από στοιχεία της προηγούμενης δεκαετίας διαφαίνονταν ότι οι ιχθυογεννητικοί σταθμοί στρέφονταν προς αυτήν την τεχνολογία (Martins et al., 2010).

Τα κλειστά συστήματα υδατοκαλλιέργειας αποτελούν ελεγχόμενα οικοσυστήματα και προσφέρουν ένα περιβάλλον με αφθονία θρεπτικών συστατικών, παρέχοντας ιδανικές συνθήκες για τη μικροβιακή αύξηση. Η μικροβιακή χλωρίδα που ανευρίσκεται στα κλειστά συστήματα μπορεί να χωριστεί σε δύο ομάδες βακτηρίων, τα αυτότροφα νιτροποιητικά βακτήρια και τα ετερότροφα, τα οποία καταναλώνουν και αποικοδομούν την οργανική ύλη (Martins et al., 2010). Ειδικότερα, τα νιτροποιητικά βακτήρια, τα οποία μετατρέπουν την αμμωνία σε νιτρώδη ιόντα, παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στη λειτουργία των κλειστών συστημάτων (Blancheton et al., 2013).

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η επίδραση που έχει μία μεγάλη αλλαγή νερού της τάξεως του 40% στον πληθυσμό των πλαγκτονικών ετερότροφων βακτηρίων, υπό δύο περιπτώσεις, α) όταν λειτουργούσε σύστημα αποστείρωσης νερού υπερϊώδων ακτινών και β) όταν δε λειτουργούσε. Καταγράφηκε το μικροβιακό φορτίο σε πολλαπλά σημεία δειγματοληψίας στο σύστημα για περίοδο 7 ημερών κατόπιν της αλλαγής νερού, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιούνταν καταγραφή των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού.

Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε «έτρεχε» αρκετούς μήνες νωρίτερα, με αποτέλεσμα να έχει επέλθει ισορροπία στη ρύθμιση των βιογεωχημικών κύκλων και δη αυτού του αζώτου ο οποίος εξετάστηκε μερικώς με την καταγραφή των νιτρωδών και αμμωνιακών ιόντων. Αυξημένα επίπεδα αμμωνίας ή/και νιτρωδών ιόντων μπορούν να προκαλέσουν το θάνατο των ιχθύων. Υψηλά επίπεδα αμμωνίας στο νερό μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Randall and Tsui, 2002), ενώ η τοξική δράση των νιτρωδών ιόντων οφείλεται στον ανταγωνισμό που επιδεικνύουν στη δέσμευσή τους από την αιμογλοβίνη έναντι του οξυγόνου. Τα ιόντα δεσμεύονται από την αιμογλοβίνη, σχηματίζοντας τη μεθαιμογλοβίνη (Hargreaves, 1998), προκαλώντας τελικά ασφυξία στους ιχθύες. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της αμμωνίας (ολικής και μη ιονίζουσας) και των νιτρωδών ιόντων ήταν, σε κάθε περίπτωση, χαμηλότερα από τα όρια ασφαλείας, διασφαλίζοντας ασφαλείς συνθήκες εκτροφής.

Μία ώρα μετά την αλλαγή του νερού η συγκέντρωση των ετερότροφων βακτηρίων ήταν  $4.2 \pm 0.15 \log (\text{CFU mL}^{-1})$ ,  $4.89 \pm 0.23 \log (\text{CFU mL}^{-1})$  για τις δύο επαναλήψεις όταν λειτουργούσε η αποστείρωση μέσω UV, ενώ όταν δε λειτουργούσε ήταν  $5.1 \pm 0.12 \log (\text{CFU mL}^{-1})$ . Εικοσιτέσσερις ώρες αργότερα, ο πληθυσμός είχε αυξηθεί αντίστοιχα κατά 16% σε  $4.9 \pm 0.07 \log (\text{CFU mL}^{-1})$ , κατά 26% σε  $6.14 \pm 0.14 \log (\text{CFU mL}^{-1})$  και κατά 25% σε  $6.4 \pm 0.03 \log (\text{CFU mL}^{-1})$ .

Η σύσταση της τροφής και η ποσότητα του σιτηρεσίου επιδρούν σημαντικά στα οργανικά και ανόργανα στοιχεία που είναι διαθέσιμα στους μικροοργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, η τροφή σε μορφή συμπύκτων αποτελεί την κύρια πηγή εισερχόμενου αζώτου στο σύστημα (Hargreaves, 1998). Τα αποτελέσματά της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι οι φυσικοχημικές παράμετροι του νερού αλλά και το μικροβιακό φορτίου επηρεάζονταν και ακολουθούσαν το εβδομαδιαίο σιτηρέσιο του συστήματος.

Αναφορικά με το μικροβιακό φορτίο πρέπει να σημειωθεί ότι παρόλο που η αυξομείωση του πληθυσμού των ετερότροφων βακτηρίων δε βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική, εντούτοις υπάρχει μία εμφανής τάση, η οποία ακολουθούσε το σιτηρέσιο. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν καταγραφεί από τους Rojas-Tirado et al. (2018), οι οποίοι παρατήρησαν άμεσες αλλαγές των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού με επακόλουθες βραδείες αλλαγές στο μικροβιακό φορτίο, οι οποίες ήταν σε άμεση συσχέτιση με το πρόγραμμα του σιτηρεσίου σε κλειστό σύστημα εκτροφής ιριδιζουσας πέστροφας.

Ενώ αναμένονταν μεγαλύτερη αύξηση του μικροβιακού φορτίου κατά την απουσία υπερϊώδους φωτός, αντιθέτως, παρατηρήθηκε ότι υπάρχει σταθερότητα στο σύστημα σε ότι αφορά τον πληθυσμό των ετερότροφων θαλάσσιων βακτηρίων. Βέβαια, η συνεχής μείωση του pH υποδηλώνει μία γενική υποβάθμιση της ποιότητας του νερού εκτροφής. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε μία φορά και όχι εις διπλούν, καθώς η υποβάθμιση του νερού έγινε αντιληπτή μέσω της αλλαγής στη συμπεριφορά των ιχθύων. Πιο συγκεκριμένα, κατά τις τελευταίες μέρες, παρόλο τον καταγεγραμμένο κορεσμό σε οξυγόνο, οι ιχθύες παρουσίασαν αυξημένο ρυθμό βραγχιακών κινήσεων και μείωσαν την κατανάλωση τροφής. Αυτές οι συμπεριφορές αποτελούν ενδείξεις πρόκλησης στρες στους τους ιχθύες. Καθώς βασικό μέλημα του πειράματος ήταν να μη διαταραχθεί η εκτροφή των ιχθύων, αποφασίστηκε να μη διεξαχθεί δεύτερη επανάληψη.

Και στα τρία εβδομαδιαία πειράματα τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μικροβιακό φορτίο κινείται σε παρόμοια επίπεδα σε όλα τα σημεία δειγματοληψίας. Επιπλέον, οι αποικίες στα τρυβλία από όλα τα σημεία δειγματοληψίας περιείχαν πανομοιότυπες αποικίες σε σχέση με τη μορφολογία τους και την ποσόστωσή τους. Λόγω αυτών, στην επόμενη φάση του πειράματος επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί μία δεξαμενή μέρος του συστήματος, η οποία δε θα περιείχε ιχθύες.

#### **4.2. Δημιουργία βιοϋμενίων σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα**

Κατά τη διάρκεια της δεύτερης φάσης του πειράματος, εξετάστηκε η *in situ* δημιουργία βιοϋμενίων πάνω σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα. Σε μία δεξαμενή απαλλαγμένη από ιχθύες, η οποία αποτελεί μέρος του κλειστού συστήματος,



τοποθετήθηκαν οι μεταλλικές επιφάνειες (κουπόνια), ώστε με τακτές δειγματοληψίες να μελετηθεί η πορεία του σχηματιζόμενου βιοϋμενίου σε διάστημα 30 ημερών. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες νερού από την επιλεγμένη δεξαμενή, ώστε να προσδιοριστεί το φορτίο των πλαγκτονικών θαλάσσιων ετερότροφων βακτηρίων. Γενικά, κατά στις μελέτες των βιοϋμενίων αποτελεί κοινή πρακτική η δειγματοληψία νερού από σημεία χρήσης αυτού και προσδιορισμός του αριθμού των πλαγκτονικών κυττάρων των βακτηρίων. Όμως, ο αριθμός αυτός μπορεί να προκαλέσει παρανόηση σε ότι αφορά το μέγεθος του βιοϋμενίου ή το πού εδράζεται αυτό σε ένα σύστημα (Flemming, 2011).

Αποτελεί συνήθης πρακτική η λήψη δειγμάτων από προεπιλεγμένες επιφάνειες ώστε να αναλυθούν στο εργαστήριο (Schaule et al. 2000). Η απαρίθμηση των μικροοργανισμών πραγματοποιείται συνήθως με τον προσδιορισμό του συνολικού αριθμού μικροοργανισμών ικανών να σχηματίσουν αποικίες. Όμως, αυτή η προσέγγιση αποκαλύπτει μονάχα την κορυφή του παγόβουνου καθώς λιγότερο από 1% των μικροοργανισμών δύναται να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο (Rompres et al. 2002). Τα περισσότερα κύτταρα, ιδιαίτερα αυτά που εδράζονται στη βάση του βιοϋμενίου, δε μπορούν να καλλιεργηθούν στα πλούσια θρεπτικά υποστρώματα και δεν ανιχνεύονται. Εάν το ποσοστό των καλλιεργήσιμων βακτηρίων είναι υψηλό (10-100%), αυτό υποδεικνύει την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης θρεπτικών στο περιβάλλον και μεγάλη πιθανότητα ανάπτυξης του φαινομένου της βιο-επίστρωσης (Wingender and Flemming, 2004).

Οι συμβατικές μέθοδοι παρατήρησης και εξέτασης των βιοϋμενίων, υιοθετούν, όπως προαναφέρθηκε, δειγματοληψίες προκαθορισμένων επιφανειών ή εκθέτουν επιφάνειες υπό εξέταση (κουπόνια) τα οποία μεταφέρονται κατόπιν στο εργαστήριο για ανάλυση. Αντίστοιχα, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένες επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα, οι οποίες τοποθετήθηκαν στην άδεια δεξαμενή του κλειστού συστήματος και εκτέθηκαν στο νερό του συστήματος, όπου και παρέμειναν μέχρι τη δειγματοληψία τους. Η αποκόλληση των βιοϋμενικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε μέσω απόξεσης με τη χρήση γυάλινων σφαιριδίων. Η χρήση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης αποκαλύπτει ότι η μέθοδος με την απόξεση μέσω γυάλινων σφαιριδίων αφαιρεί από την επιφάνεια και τα κύτταρα καθώς και τις πολυμερείς εξωκυττάρια ουσίες. Αυτό καθιστά τη μέθοδο αυτή αρκετά ικανοποιητική και κατάλληλη για την αφαίρεση από επιφάνεια ανοξειδωτού χάλυβα βιοϋμενίων (Lindsay and von Holy, 1997).

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι μέσα σε 24 ώρες, η επιφάνεια των κουπονιών είχε αποικηθεί από έναν πληθυσμό ετερότροφων βακτηρίων της τάξης των  $4.5 \pm 0.05 \log(\text{CFU cm}^{-2})$ . Ο πληθυσμός αυτός φάνηκε να παραμένει σταθερός για την περίοδο των 30 ημερών οπότε και διήρκεσαν οι δειγματοληψίες. Ταυτόχρονα, οι εικόνες των τρυβλίων δε φάνηκαν να αλλάζουν σημαντικά ανά κουπόνι και ανά χρονικό σημείο, υποδηλώνοντας ότι το βιοϋμένιο ήταν σταθερό και από άποψης βακτηριακής σύνθεσης. Επίσης, κατά την απαρίθμηση των τρυβλίων, παρατηρήθηκε σταθερότητα στη μορφολογία των αποικιών που εμφανίζονταν στα δείγματα των πλαγκτονικών κυττάρων του νερού.

### 4.3. Η σύνθεση του βιοϋμενίου

Η μικροβιακή σύνθεση των βιοϋμενίων είναι μεγάλης σημαντικότητας. Η δημιουργία των βιοϋμενίων μπορεί να παρέχει μία υψηλότερη σταθερότητα στη βακτηριακή κοινότητα των δεξαμενών και ταυτόχρονα να εμποδίζει παθογόνα βακτήρια να εγκατασταθούν στο σύστημα (van der Meeren et al., 2011). Επιπλέον, τα βιοϋμενία έχουν δειχθεί ότι αλληλεπιδρούν με τους υπόλοιπους οργανισμούς που συμμετέχουν στη βιο-επίστρωση. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα βιοϋμενία υποστηρίζουν την τροφική αλυσίδα, οδηγώντας στην ύπαρξη και ανάπτυξη πρωτοζώων και κατόπιν άλλων ασπόνδυλων ζώων (Wingender and Flemming, 2011). Για παράδειγμα, μία μελέτη πάνω στις αλληλεπιδράσεις των βιοϋμενίων και των φυκών που συμμετέχουν στη βιο-επίστρωση αποκάλυψε ότι υπάρχει ένα μεγάλο εύρος αλληλεπιδράσεων, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την εδραίωση, τη μορφολογία και το ρυθμό ανάπτυξης των φυκών, ενώ αποκαλύφθηκαν στρατηγικές που υιοθετούν τα φύκη για να επηρεάσουν αρνητικά τη δημιουργία του βακτηριακών βιοϋμενίων (Mieszkin et al., 2013). Επίσης, η μελέτη των J. Yang et al. (2014) αποκαλύπτει ότι το πάχος του βιοϋμενίου μπορεί να επιδράσει στην εδραίωση της προνύμφης του μυδιού *Mytilus coruscus*. Εάν είναι γνωστή η σύνθεση του βιοϋμενίου είναι εφικτό να επιδράσουμε στην εδραίωση των προνυμφών των ασπόνδυλων ζώων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω παραγωγής και εξωκυτταρικής μεταφοράς χημικών ουσιών από ειδικά τροποποιημένα βακτήρια, έτσι ώστε να απομακρύνονται επιβλαβή είδη και να προωθείται η εδραίωση των ειδών που θέλουμε (Krishnaveni et al., 2017).

Η μελέτη της σύνθεσης των βιοϋμενίων με τη χρήση μοριακών τεχνικών μπορεί να προσφέρει δυνατότητες ανεύρεσης καινούργιων στρατηγικών αναστολής του φαινομένου της βιο-επίστρωσης. Οι μοριακές τεχνικές αναδεικνύουν την ανεπάρκεια των κλασικών μεθόδων καλλιέργειας στην προσπάθειά μας να αναγνωρίσουμε και να ταυτοποιήσουμε τα είδη εκείνα των βακτηρίων που δημιουργούν βιοϋμενία. Αυτά τα νέα μοριακά εργαλεία δίνουν τη δυνατότητα να βελτιστοποιηθεί η αναγνώριση και η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στους οργανισμούς που συμμετέχουν στη βιο-επίστρωση και αυτούς που δημιουργούν βιοϋμενία, οδηγώντας πλέον την έρευνα σε καινούργιες στρατηγικές ελέγχου της βιο-επίστρωσης (Thakur et al., 2008).

Αρκετά μοριακά εργαλεία χρησιμοποιούνται στη μελέτη των θαλάσσιων μικροοργανισμών, με την εφαρμογή της PCR-DGGE να είναι ένα από αυτά (Thakur et al., 2008). Η τεχνική της PCR-DGGE αποτελεί μία μοριακή προσέγγιση η οποία μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικές με τη γενετική μικροβιακή ποικιλότητα από δείγμα κάθε προέλευσης (Muyzer et al., 1993). Επιπλέον, είναι ιδιαίτερα χρήσιμη ως μία αρχική μοριακή προσέγγιση για την έρευνα, τη διάκριση βιοκοινωνιών και την ανεύρεση των ποσοτικά κυρίαρχων μελών αυτών. Η PCR-DGGE δίνει τη δυνατότητα σάρωσης πολλαπλών δειγμάτων και τη λήψη πληροφοριών σχετικά με τις αλλαγές στη βιοκοινότητα και τις διαφορές μεταξύ βιοκοινοτήτων (Sandaa et al., 2003).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πορεία της σύνθεσης του βιοϋμενίου μέσω της PCR-DGGE, με γονίδιο στόχο το 16S rRNA και ειδικότερα τις υπερμετάβλητες περιοχές V3-V5. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε και η σύνθεση του πληθυσμού των πλαγκτονικών βακτηρίων και η πορεία της στο χρόνο. Επίσης, εξετάστηκαν και

δείγματα από το σύνολο των αποικιών από τρυβλία προερχόμενα είτε από τα αντίστοιχα δείγματα νερού ή τα αποκολλημένα βιοϋμένια, ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται απ' ευθείας από τα δείγματα έναντι των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από την κλασική μικροβιολογική μέθοδο επίστρωσης τρυβλίων.

Τα ηλεκτροφορητικά μοτίβα που προέκυψαν από τα δείγματα που λήφθηκαν απ' ευθείας από το νερό, αποκάλυψαν ότι υπάρχουν περισσότερες ζώνες (OTUs) οι οποίες δεν απεικονίζονται μέσα από τα τρυβλία, υποδηλώνοντας ότι υπάρχουν είδη βακτηρίων που δεν κατάφεραν να αναπτυχθούν στο θρεπτικό υλικό. Επίσης, OTUs που έχουν μεγάλη παρουσία στα τρυβλία, στα δείγματα του νερού είτε δεν αντιπροσωπεύονται ή δεν εμφανίζουν αντίστοιχα έντονη ζώνωση. Σε ό,τι αφορά τη σύνθεση του βιοϋμενίου, αυτή φάνηκε ότι αλλάζει μέσα στο χρόνο όταν εξετάστηκαν τα δείγματα απ' ευθείας από τα αποκολλημένα βιοϋμένια. Αντίθετα, από τις εικόνες που λαμβάνονται από τα τρυβλία δε φαίνεται το επίπεδο της αλλαγής της σύνθεσης της βιοκοινωνίας.

#### **4.4. Περιορισμοί της PCR-DGGE**

Οι πληροφορίες που δύναται να αποκομίσουμε από τα ηλεκτροφορητικά προφίλ της DGGE είναι περιορισμένα, εκτός και αν πρόκειται για συγκριτικούς σκοπούς (De Schryver et al., 2008). Για παράδειγμα, μόνο τα βακτήρια που βρίσκονται σε αριθμό άνω του 1% σε σχέση με τη συνολική βιοκοινότητα μπορούν να ανιχνευθούν με αυτή την τεχνική. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως ως ένα εργαλείο με το οποίο οπτικοποιούνται οι διαφοροποιήσεις στη σύνθεση ενός βακτηριακού πληθυσμού στο πέρασ του χρόνου (De Schryver et al., 2008). Τα ηλεκτροφορητικά προφίλ της DGGE από δείγματα που λαμβάνονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα μπορούν να συγκριθούν και να αποκαλύψουν το ρυθμό με τον οποίο η μικροβιακή κοινότητα αλλάζει.

Η απομόνωση του γενετικού υλικού από μία σύνθετη κοινότητα αποτελεί πρόκληση. Οι συνθήκες λύσης των κυττάρων πρέπει να είναι τέτοιες ώστε όλων των ειδών τα κύτταρα να μπορούν να σπάσουν, χωρίς όμως να προκαλείται ζημιά στο γενετικό υλικό (Kuhn et al., 2017). Εάν χάνεται γενετικό υλικό κατά τη διάρκεια της λύσης των κυττάρων τότε οι τιμές αφθονίας των γονιδιωμάτων θα υποτιμάται (Van Aggelen et al., 2018). Σε ό,τι αφορά τα δείγματα του νερού, η ποσότητα των 100 mL που χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση γενετικού υλικού με λύση των κυττάρων με το παρόν πρωτόκολλο. Άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν χρησιμοποιήσει μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος νερού, της τάξης των 250 mL από κλειστό σύστημα ιχθυοκαλλιέργειας (Martins et al., 2015) ή και μικρότερη ποσότητα, στα 50 mL, από κλειστό σύστημα ιχθυοκαλλιέργειας (Attramadal et al., 2012b) ή από καλλιέργεια τροχοζώων (Rombaut et al., 2001). Η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν επαρκής για τη λήψη DNA συγκέντρωσης από 6.5 έως 12.5 ng/μL σε μία συνολική ποσότητα 26 μL. Επιπλέον, ο λόγος των απορροφήσεων  $A_{260}/A_{280}$  κυμάνθηκε από 1.0 έως 1.5 και ο λόγος  $A_{260}/A_{230}$  από 0.072 έως 0.181, καθιστώντας το γενετικό υλικό χαμηλής ποιότητας. Παρόλη τη χαμηλή ποιότητα του εξαχθέντος DNA, η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε επιτυχώς.

Το βήμα της ενίσχυσης μέσω PCR των γονιδίων στόχων μπορεί να αποτελεί πηγή προδιάθεσης μέσω πολλών παραμέτρων, όπως το ποσό του γενετικού υλικού που θα χρησιμοποιηθεί, η επιλογή των εκκινητών, η επιλογή της πολυμεράσης, και το πρωτόκολλο που θα χρησιμοποιηθεί (κύκλοι, και θερμοκρασία υβριδισμού) (Van Aggelen et al., 2018). Ακόμα, το υψηλό ποσοστό σε GC στο γονίδιο ενός taxon μπορεί να παρεμποδίσει την αποδιάταξη και να μη φανεί ποτέ σαν ενισχυμένο κομμάτι και να χαθεί (Van Aggelen et al., 2018). Επιπλέον, η ενίσχυση τμημάτων του γονιδιώματος μέσω PCR εισάγει συστηματικά λάθη ασχέτως του γονιδίου στόχου (Dahlhöf, 2002).

Το ζεύγος των εκκινητών που θα χρησιμοποιηθεί και η περιοχή στόχος, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά το αποτέλεσμα της ποικιλότητας που θα ανακλύσει σε μία μελέτη που βασίζεται στα ενισχυμένα τμήματα του γονιδίου 16S rRNA (Zhang et al., 2018). Πιο συγκεκριμένα οι Zhang et al. (2018) σε μία *in silico* μελέτη, αποκάλυψαν ότι οι εκκινητές που στοχεύουν τις υπερμετάβλητες περιοχές V3-V6 δίνουν καλύτερα αποτελέσματα σε ότι αφορά την αποκάλυψη της σύνθεσης της μικροβιακής κοινότητας. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που στοχεύουν τις περιοχές V3-V5, κατά αντιστοιχία με έναν αριθμό μελετών που σχετίζονται με την ανάλυση της μικροβιακής βιοκοινότητας του θαλάσσιου περιβάλλοντος ή της υδατοκαλλιέργειας (McIntosh et al., 2008; Steinum et al., 2009; van der Meeren et al., 2011; Attramadal et al., 2014; Wold et al., 2014; Attramadal et al., 2016).

Ένα ακόμα μειονέκτημα είναι η δημιουργία χιμαιρικών αλληλουχιών, οι οποίες δύνανται να προκύψουν εάν κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης δεν ολοκληρωθεί η επιμήκυνση και το κομμάτι αυτό να αποτελέσει εκκινητή για τον επόμενο κύκλο. Αυτές οι χιμαιρικές αλληλουχίες μπορούν να παρερμηνευτούν ως διαφορετικά taxa. Αυτές οι δημιουργίες δε μπορούν να ποσοτικοποιηθούν όταν μελετάμε σύνθετες βιοκοινότητες και το λάθος δε μπορεί να διορθωθεί. Άλλος τύπος από PCR artifacts που εμφανίζονται είναι τα ετεροδιμερή, τα οποία προκύπτουν από την υβριδοποίηση ετερόλογων αλληλουχιών, αν και η παρουσία τους είναι λιγότερη συχνή από αυτή των χιμαιρικών μορίων. Πάλι, αυτό μπορεί να μειωθεί μειώνοντας τον αριθμό των κύκλων της PCR (Van Aggelen et al., 2018).

Ο κύριος όμως περιορισμός που έχει αυτή η μέθοδος έγκειται στο ότι εάν δύο οργανισμοί έχουν την ίδια αλληλουχία στο γονίδιο 16S rRNA, τότε δύναται να ομαδοποιηθούν στο ίδιο είδος σε μία ανάλυση 16S, ακόμα και αν αυτοί ανήκουν σε διαφορετικά είδη. Καθώς η 16S ανάλυση βασίζεται ακριβώς στο γονίδιο του 16S rRNA, με τα OTUs να χαρακτηρίζονται ως taxa, δεν είναι γενικά εφικτό να ξεχωρίσουν στελέχη ή ακόμα και συγγενικά είδη σε ορισμένες περιπτώσεις. Τα OTUs αναλύονται σε κάθε ταξινομικό επίπεδο αλλά ο διαχωρισμός είναι λιγότερο ακριβής στο επίπεδο του είδους (Ranjan et al., 2016). Βέβαια, στοχεύοντας πολλαπλές περιοχές στο γονίδιο του 16S rRNA, αντί για μία “universal” περιοχή, μπορεί να αυξήσει και να βελτιστοποιήσει την ανακατασκευή της μικροβιακής κοινότητας (Wang et al., 2016).

#### 4.5. Μελλοντικές εργασίες

Το επόμενο βήμα αυτής της εργασίας, έρχεται με την αλληλούχηση του 16S γονιδίου και αποτελεί μία ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική που βασίζεται στις υπερμεταβλητές περιοχές (V1-V9) του βακτηριακού γονιδίου 16S rRNA ώστε να πραγματοποιηθούν ταξινομικοί διαχωρισμοί στο εύρος της βιοκοινωνίας (Chakravorty et al., 2007). Η τεχνική χρησιμοποιείται επίσης για την ανάλυση της μικροβιακής ποικιλότητας σε διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα, όπως χώμα (Chong et al., 2012) ακόμα και από δείγμα ανθρώπινου εντέρου (Dethlefsen et al., 2008). Με βάση αυτό, τα στάδια μελλοντικής μελέτης περιλαμβάνουν την απομόνωση των κύριων ζωνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, εξαγωγή του DNA, PCR με τους ίδιους εκκινητές, ηλεκτροφόρηση DGGE για την εξακρίβωση ότι πρόκειται για μία ζώνη, καθαρισμός του ενισχυμένου τμήματος και αλληλούχηση, ώστε να ταυτοποιηθούν οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στο βιοϋμένιο.

## 5. Βιβλιογραφία

- Álvarez, A. García García, B. Garrido, M.D. Hernández, M.D., 2008. The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture* 284, 106-114.
- Attramadal, K.J.K., Minniti, G., Øie, G., Kjørsvik, E., Østensen, M.A., Bakke, I., Vadstein, O., 2016. Microbial maturation of intake water at different carrying capacities affects microbial control in rearing tanks for marine fish larvae. *Aquaculture* 457, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.015>
- Attramadal, K.J.K., Øie, G., Størseth, T.R., Alver, M.O., Vadstein, O., Olsen, Y., 2012a. The effects of moderate ozonation or high intensity UV-irradiation on the microbial environment in RAS for marine larvae. *Aquaculture* 330–333, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.042>
- Attramadal, K.J.K., Salvesen, I., Xue, R., Øie, G., Størseth, T.R., Vadstein, O., Olsen, Y., 2012b. Recirculation as a possible microbial control strategy in the production of marine larvae. *Aquac. Eng.* 46, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2011.10.003>
- Attramadal, K.J.K., Truong, T.M.H., Bakke, I., Skjermo, J., Olsen, Y., Vadstein, O., 2014. RAS and microbial maturation as tools for K-selection of microbial communities improve survival in cod larvae. *Aquaculture* 432, 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.052>
- Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A., 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55, 541–555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Bauvais, C., Zirah, S., Piette, L., Chaspoul, F., Domart-Coulon, I., Chapon, V., Gallice, P., Rebuffat, S., Pérez, T., Bourguet-Kondracki, M.L., 2015. Sponging up metals: Bacteria associated with the marine sponge *Spongia officinalis*. *Mar. Environ. Res.* 104, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.12.005>
- Blancheton, J.P., Attramadal, K.J.K., Michaud, L., d'Orbcastel, E.R., Vadstein, O., 2013. Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication. *Aquac. Eng.* 53, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.11.009>
- Bourne, D.G., Høj, L., Webster, N.S., Swan, J., Hall, M.R., 2006. Biofilm development within a larval rearing tank of the tropical rock lobster, *Panulirus ornatus*. *Aquaculture* 260, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.023>
- Bregnballe, J., 2015. A guide to Recirculation Aquaculture: An introduction to the new environmentally friendly and highly productive closed fish farming systems. *FAO Eurofish Rep.* 100. <https://doi.org/92-5-105177-1>
- Brunvold, L., Sandaa, R.A., Mikkelsen, H., Welde, E., Bleie, H., Bergh, Ø., 2007. Characterisation of bacterial communities associated with early stages of intensively

- reared cod (*Gadus morhua*) using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Aquaculture* 272, 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.053>
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., Alland, D., 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods* 69, 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>
- Characklis W.G., 1989. Biofilms and corrosion: A process analysis viewpoint. *Int. Biodeterior.* 25, 323–326.
- Chong, C.W., Pearce, D.A., Convey, P., Yew, W.C., Tan, I.K.P., 2012. Patterns in the distribution of soil bacterial 16S rRNA gene sequences from different regions of Antarctica. *Geoderma* 181–182, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.02.017>
- Chorianopoulos, N.G., Giaouris, E.D., Kourkoutas, Y., Nychas, G.J.E., 2010. Inhibition of the early stage of *Salmonella enterica* serovar enteritidis biofilm development on stainless steel by cell-free supernatant of a *Hafnia alvei* culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2018–2022. <https://doi.org/10.1128/AEM.02093-09>
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Debeer, D., Caldwell, D., Korber, D., 1994. Minireview: Biofilms, the Customized Microniche. *Microbiology* 176, 2137–2142.
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 270, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.006>
- Dahllöf, I., 2002. Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 213–217. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00314-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00314-2)
- Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J., 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 261–289. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.004>
- De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W., 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.019>
- Devarapalli, P., Kumavath, R.N., 2015. Metagenomics – A Technological Drift in Bioremediation. *Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil.* Intech.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L., Relman, D.A., 2008. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Biol.* 6, e280. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060280>
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Revies* 15, 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167>

- Doulgeraki, A.I., Paramithiotis, S., Nychas, G.J.E., 2011. Characterization of the Enterobacteriaceae community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.030>
- Eland, L.E., Davenport, R., Mota, C.R., 2012. Evaluation of DNA extraction methods for freshwater eukaryotic microalgae. *Water Res.* 46, 5355–5364. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.023>
- Flemming, H., 2011. Biofilm Highlights 5, 81–110. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-19940-0>
- Flemming, H.C., 2011. The perfect slime. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 86, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.04.025>
- Fletcher, M., 1994. Bacterial biofilms and biofouling. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 302–306. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(94\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0958-1669(94)90033-7)
- Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., Saito, M., 2016. Molecular approaches to studying microbial communities: Targeting the 16S ribosomal RNA gene. *J. UOEH* 38, 223–232. <https://doi.org/10.7888/juoeh.38.223>
- Ghosh, A., 2018. Metagenomic Analysis and its Applications. *Encycl. Bioinforma. Comput. Biol.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20178-7>
- Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Møretrø, T., Habimana, O., Desvaux, M., Renier, S., Nychas, G.J., 2014. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Sci.* 97, 289–309. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.023>
- Gines, R., Palicio, M., Zamorano, M.J., Arguello, A., Lopez, J.L., Afonso, J.M., 2002. Starvation before slaughtering as a tool to keep freshness attributes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquacult. Int.* 10: 379–389.
- Greenberg A.E., Clesceri L.S., Eaton A.D.,(Editors.), 1992a. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, p. 4-84, 4500-NH3 – H.
- Greenberg A.E., Clesceri L.S., Eaton A.D.,(Editors.), 1992b. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, p. 4-85, 4500-NO2-B.
- Handelsman, J., Handelsman, J., 2004. Metagenomics : Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 669–685. <https://doi.org/10.1128/MBR.68.4.669>
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., Goodman, R.M., 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new



frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5, 245–249.  
[https://doi.org/doi:10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/doi:10.1016/S1074-5521(98)90108-9)

- Hargreaves, J.A., 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds 181–212.
- 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.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.024>
- Kostaki, M., Chorianopoulos, N., Braxou, E., Nychas, G.J., Giaouris, E., 2012. Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2586–2595.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.07099-11>
- Krishnaveni, M., Asha, S., Vini, S.S., Mary Josephine Punitha, S., 2017. Metagenomics of Marine Invertebrate-Microbial Consortium, *Metagenomics: Perspectives, Methods, and Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102268-9.00013-6>
- Kuhn, R., Böllmann, J., Krahl, K., Bryant, I.M., Martienssen, M., 2017. Comparison of ten different DNA extraction procedures with respect to their suitability for environmental samples. *J. Microbiol. Methods* 143, 78–86.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.10.007>
- Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepile DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C, 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol* 31, 814–821.
- Lindsay, D., von Holy, A., 1997. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiol.* 14, 383–390.  
<https://doi.org/10.1006/FMIC.1997.0102>
- MacArthur, R. H., & Wilson, E. O., 1967. *The Theory of Island Biogeography*. Princeton, N.J.: Princeton University Press, 203 p.
- Madhavan, A., Sindhu, R., Parameswaran, B., Sukumaran, R.K., Pandey, A., 2017. Metagenome Analysis: A Powerful Tool for Enzyme Bioprospecting. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1–16.
- Martins, C.I.M., Eding, E.H., Verdegem, M.C.J., Heinsbroek, L.T.N., Schneider, O., Blancheton, J.P., d’Orbcastel, E.R., Verreth, J.A.J., 2010. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquac. Eng.* 43, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2010.09.002>
- Martins, P., Cleary, D.F.R., Pires, A.C.C., Rodrigues, A.M., Quintino, V., Calado, R., Gomes, N.C.M., 2013. Molecular Analysis of Bacterial Communities and Detection of Potential Pathogens in a Recirculating Aquaculture System for *Scophthalmus*

- maximus and *Solea senegalensis*. PLoS One 8, e80847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080847>
- Martins, P., Navarro, R.V. V, Coelho, F.J.R.C., Gomes, N.C.M., 2015. Development of a molecular methodology for fast detection of *Photobacterium damsela* subspecies in water samples. *Aquaculture* 435, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.028>
- McIntosh, D., Ji, B., Forward, B.S., Puvanendran, V., Boyce, D., Ritchie, R., 2008. Culture-independent characterization of the bacterial populations associated with cod (*Gadus morhua* L.) and live feed at an experimental hatchery facility using denaturing gradient gel electrophoresis. *Aquaculture* 275, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.021>
- Michaud L, Lo Giudice A, Interdonato F, Triplet S, Ying L, Blancheton JP, 2014. C/N ratio-induced structural shift of bacterial communities inside lab-scale aquaculture biofilters. *Aquac. Eng* 58, 77–87.
- Mieszkin, S., Callow, M.E., Callow, J.A., 2013. Interactions between microbial biofilms and marine fouling algae: A mini review. *Biofouling* 29, 1097–1113. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.828712>
- Mineta, K., Gojobori, T., 2016. Databases of the marine metagenomics. *Gene* 576, 724–728. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.035>
- Mizan, M.F.R., Jahid, I.K., Ha, S. Do, 2015. Microbial biofilms in seafood: A food-hygiene challenge. *Food Microbiol.* 49, 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.009>
- Morgan XC, Huttenhower C (2012) Chapter 12: Human Microbiome Analysis. *PLoS Comput Biol* 8(12): e1002808. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002808>
- Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Pulkkinen, J.T., Kiuru, T., Aalto, S.L., Koskela, J., Vielma, J., 2018. Startup and effects of relative water renewal rate on water quality and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in a unique RAS research platform. *Aquac. Eng.* 82, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.06.003>
- Randall, D.J., Tsui, T.K.N., 2002. Ammonia toxicity in fish. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 17–23.
- Ranjan R, Rani A, Metwally A, McGee HS, Perkins DL., 2016. Analysis of the microbiome: advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem Biophys Res Commun* 469(4), 967–77

- Rojas-Tirado, P., Pedersen, P.B., Vadstein, O., Pedersen, L.F., 2018. Changes in microbial water quality in RAS following altered feed loading. *Aquac. Eng.* 81, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.03.002>
- Rombaut, G., Suantika, G., Boon, N., Maertens, S., Dhert, P., Top, E., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2001. Monitoring of the evolving diversity of the microbial community present in rotifer cultures. *Aquaculture* 198, 237–252. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00594-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00594-4)
- Rompre, A., Servais, P., Baudart, J., De-Roubin, M.-R., Laurent, P., 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J. Microbiol. Methods* 49, 31–54.
- Sambrook, J., Russell, D., Irwin, N., Janssen, K., 2001. *Molecular Cloning- A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sandaa, R.A., Magnesen, T., Torkildsen, L., Bergh, Ø., 2003. Characterisation of the bacterial community associated with early stages of great scallop (*Pecten maximus*), using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 302–311. <https://doi.org/10.1078/072320203322346164>
- Satheesh, S., Ba-Akdah, M.A., Al-Sofyani, A.A., 2016. Natural antifouling compound production by microbes associated with marine macroorganisms — A review. *Electron. J. Biotechnol.* 21, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.002>
- Schaulé G, Griebé T, Flemming H-C., 2000. Steps of biofilm sampling and characterization in biofouling cases. In: Flemming H-C, Griebé T, Szewzyk U (eds) *Biofilms. Investigative methods and applications*. Technomic, Lancaster, Pa. pp 1–21.
- Schreier, H.J., Mirzoyan, N., Saito, K., 2010. Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.011>
- Simister, R.L., Schmitt, S., Taylor, M.W., 2011. Evaluating methods for the preservation and extraction of DNA and RNA for analysis of microbial communities in marine sponges. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 397, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.11.004>
- Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 573–583. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.008>
- Steinum, T., Sjøstad, K., Falk, K., Kvellestad, A., Colquhoun, D.J., 2009. An RT PCR-DGGE survey of gill-associated bacteria in Norwegian seawater-reared Atlantic salmon suffering proliferative gill inflammation. *Aquaculture* 293, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.05.006>
- Streit, W.R., Schmitz, R.A., 2004. Metagenomics - The key to the uncultured microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.08.002>

- Summerfelt, S.T., Sharrer, M.J., Tsukuda, S.M., Gearheart, M., 2009. Process requirements for achieving full-flow disinfection of recirculating water using ozonation and UV irradiation. *Aquac. Eng.* 40, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2008.10.002>
- Thakur, N.L., Jain, R., Natalio, F., Hamer, B., Thakur, A.N., Müller, W.E.G., 2008. Marine molecular biology: An emerging field of biological sciences. *Biotechnol. Adv.* 26, 233–245. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.01.001>
- Turan, N.B., Chormey, D.S., Büyükpınar, Ç., Engin, G.O., Bakirdere, S., 2017. Quorum sensing: Little talks for an effective bacterial coordination. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 91, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.03.007>
- Van Aggelen, H., Verstichel, B., Bultinck, P., Van Neck, D., Ayers, P.W., Cooper, D.L., 2018. Chemical verification of variational second-order density matrix based potential energy surfaces for the N2isoelectronic series. *J. Chem. Phys.* 132, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.015>
- van der Meeren, T., Brunvold, L., Sandaa, R.A., Bergh, Ø., Castberg, T., Thyraug, R., Mangor-Jensen, A., 2011. Water quality and microbial community structure in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) cultures. *Aquaculture* 316, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.016>
- Vieites, J.M., Guazzaroni, M.E., Beloqui, A., Golyshin, P.N., Ferrer, M., 2009. Metagenomics approaches in systems microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 236–255. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00152.x>
- Viuda-Martos, M., El Gendy, A.E.N.G.S., Sendra, E., Fernández-López, J., El Razik, K.A.A., Omer, E.A., Pérez-Alvarez, J.A., 2010. Chemical composition and antioxidant and anti-*Listeria* activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. *J. Agric. Food Chem.* 58, 9063–9070. <https://doi.org/10.1021/jf101620c>
- Wang, S., Sun, B., Tu, J., Lu, Z., 2016. Improving the microbial community reconstruction at the genus level by multiple 16S rRNA regions. *J. Theor. Biol.* 398, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.03.016>
- Watanabe, K., Baker, P.W., 2000. Environmentally relevant microorganisms. *J. Biosci. Bioeng.* 89, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)88043-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)88043-3)
- Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R., Inglis, CSHLP, 2008. *Molecular Biology of the Gene*. 6<sup>th</sup> Edition. Pearson.
- West, S.A., Winzer, K., Gardner, A., Diggle, S.P., 2012. Quorum sensing and the confusion about diffusion. *Trends Microbiol.* 20, 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.09.004>
- Wietz, M., Hall, M.R., Høj, L., 2009. Effects of seawater ozonation on biofilm development in aquaculture tanks. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.04.001>

- Wingender, J., Flemming, H.C., 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.009>
- Wingender, J., Flemming, H.C., 2004. Contamination potential of drinking water distribution network biofilms. *Water Sci. Technol.* 49, 277–286.
- Wold, P.A., Holan, A.B., Øie, G., Attramadal, K., Bakke, I., Vadstein, O., Leiknes, T.O., 2014. Effects of membrane filtration on bacterial number and microbial diversity in marine recirculating aquaculture system (RAS) for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) production. *Aquaculture* 422–423, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.019>
- Yang, J., Li, X., Liang, X., Bao, W.-Y., Shen, H.-D., Jia-Le, L., 2014. Effects of *Vibrio* biofilms of different sources on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*. *Aquaculture* 424–425, 228–233. <https://doi.org/10.11964/jfc.20170210708>
- Yang, W.J., Neoh, K.G., Kang, E.T., Teo, S.L.M., Rittschof, D., 2014. Polymer brush coatings for combating marine biofouling. *Prog. Polym. Sci.* 39, 1017–1042. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.02.002>
- Zhang, J., Ding, X., Guan, R., Zhu, C., Xu, C., Zhu, B., Zhang, H., Xiong, Z., Xue, Y., Tu, J., Lu, Z., 2018. Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. *Sci. Total Environ.* 618, 1254–1267. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.228>
- <http://www.fao.org/fishery/> Aquaculture topics and activities. *Aquaculture*. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 18 September 2018. [Cited 22 August 2019].
- ΣΕΘ, 2018. Ελληνική Ιχθυοκαλλιέργεια, ετήσια έκθεση.