



ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Διπλωματική Εργασία

**Μελέτη του επιπολασμού Gram αρνητικών παθογόνων σε  
μεσογειακά είδη ιχθύων υδατοκαλλιέργειας με μοριακές και  
βιοχημικές μεθόδους**

ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΓΑΜΠΙΕΡΑΚΗ

Επιβλέπων καθηγητής: Γεώργιος Λαγουμιντζής

Πάτρα, Φεβρουάριος 2025

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή/της φοιτήτριας («Στυλιανή Γαμπιεράκη») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο/η συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του/της συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του/της συγγραφέα/δημιουργού. Ο/Η συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

Μελέτη του επιπολασμού Gram αρνητικών παθογόνων σε  
μεσογειακά είδη ιχθύων υδατοκαλλιέργειας με μοριακές και  
βιοχημικές μεθόδους

Στυλιανή Γαμπιεράκη

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Γεώργιος Λαγουμιντζής

*Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα  
Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών*

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Ανδρέας Σκορίλας

*Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και  
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

Πάτρα, Φεβρουάριος 2025

*‘Μου έμαθαν πως ο δρόμος της προόδου  
δεν είναι ούτε γρήγορος ούτε εύκολος.’*

*Marie Curie*

## **Ευχαριστίες και αφιέρωση**

*Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή επιβλέπων της παρούσας  
Διπλωματικής Εργασίας κύριο Λαγουμιντζή Γιώργο.*

*~Στην οικογένεια μου & σε εσένα.~*

## Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζει τον επιπολασμό *Gram*-αρνητικών παθογόνων βακτηρίων (*Vibrio harveyi*, *Pasteurella spp.*, *Aeromonas spp.*, *Photobacterium damsela*) σε μεσογειακά είδη ιχθυοκαλλιέργειας, με τη χρήση μοριακών (RT-qPCR) και βιοχημικών τεχνικών Microgen™ GnA-GnB. Τα δείγματα της μελέτης προήλθαν από διάφορες γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας, ενώ οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν από Μάρτιο έως Ιούνιο 2024. Τα αποτελέσματα αναδεικνύουν τη διαφοροποίηση της παθογόνου παρουσίας μεταξύ περιοχών και ειδών, υποδεικνύοντας την υψηλή συχνότητα ανίχνευσης της *Pasteurella spp.* και *Aeromonas spp.*, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα παθογόνα που δεν ανιχνεύθηκαν.

Η μελέτη ανέδειξε την αξία της RT-qPCR ως μεθόδου υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας για την έγκαιρη ανίχνευση παθογόνων, ενώ η συμπληρωματική χρήση βιοχημικών τεχνικών ενίσχυσε τη διαγνωστική αξιοπιστία. Παράλληλα, καταγράφηκαν προκλήσεις όπως η γεωγραφική ετερογένεια στην παρουσία παθογόνων και η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών λόγω της υπερβολικής χρήσης αντιβιοτικών.

Τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν την ανάγκη για ολοκληρωμένες στρατηγικές διαχείρισης, που περιλαμβάνουν τη χρήση εμβολίων, την εφαρμογή βιώσιμων πρακτικών εκτροφής και τη μείωση της χρήσης αντιβιοτικών. Επίσης, προτείνεται η αξιοποίηση ψηφιακών συστημάτων παρακολούθησης και η ενίσχυση της έρευνας στη γενετική ανθεκτικότητα των ειδών.

Η εργασία συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση της δυναμικής των λοιμώξεων στις υδατοκαλλιέργειες και θέτει τη βάση για την ανάπτυξη καινοτόμων εργαλείων και πρακτικών, με στόχο τη βιώσιμη ανάπτυξη του κλάδου και την προστασία της υγείας των εκτρεφόμενων ειδών.

## Λέξεις – Κλειδιά

*Gram*-αρνητικά παθογόνα, Υδατοκαλλιέργεια, RT-qPCR, Βιώσιμη διαχείριση, *Pasteurella spp.*

# **Study of the prevalence of Gram-negative pathogens in Mediterranean aquaculture fish species using molecular and biochemical methods**

## **Abstract**

This thesis examines the prevalence of Gram-negative pathogenic bacteria (*Vibrio harveyi*, *Pasteurella* spp., *Aeromonas* spp., *Photobacterium damsela*) in Mediterranean aquaculture species, employing molecular (RT-qPCR) and biochemical methodologies. Samples were obtained from many parts of Greece from March to June 2024. Results indicated notable regional and species-specific disparities in pathogen abundance, with *Pasteurella* spp. and *Aeromonas* spp. being the most commonly identified, whilst other infections were absent. The research emphasized the significance of RT-qPCR as a highly sensitive and precise technology for early pathogen identification, augmented by biochemical methods that improved diagnostic dependability. Challenges encompassed geographical variability in disease distribution and the establishment of resistant strains because to excessive antibiotic utilization. The findings underscore the necessity for cohesive management measures, encompassing vaccine research, the adoption of sustainable farming methods, and diminished dependence on antibiotics. Furthermore, the implementation of digital monitoring systems and additional research into species' genetic resistance are advised. This study considerably enhances the comprehension of infection dynamics in aquaculture and establishes a basis for the creation of innovative instruments and techniques intended to advance the sector sustainably and safeguard the health of farmed species.

## **Keywords**

Gram-negative pathogens, Aquaculture, RT-qPCR, Sustainable management, *Pasteurella* spp.





## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	vi
Abstract .....	vii
Κατάλογος Εικόνων .....	xii
Κατάλογος Πινάκων .....	xiii
Συνοτομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xiv
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
1.1. Η Υδατοκαλλιέργεια .....	1
1.2 Η Μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια.....	2
1.1.2 Οικονομικές Επιπτώσεις της Υδατοκαλλιέργειας στη Μεσόγειο.....	3
1.2 Ελληνική υδατοκαλλιέργεια .....	5
1.2.1 Όγκος και αξία παραγωγής .....	6
1.2.2 Απασχόληση στην Ελληνική Υδατοκαλλιέργεια.....	8
1.2.3 Περιβαλλοντικές Επιπτώσεις της Υδατοκαλλιέργειας στη Μεσόγειο.....	9
1.3 Ευρωπαϊκό Λαβράκι - <i>Dicentrarchus labrax</i> .....	11
1.4 Τσιπούρα - <i>Sparus aurata</i> .....	13
2. Προκλήσεις και Δυναμική Παθογόνων .....	17
2.1 Διαχείριση, διάγνωση και βιώσιμες πρακτικές <i>Gram</i> -αρνητικών παθογόνων στη Μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια.....	18
2.2 Διαχείριση ασθενειών και υγείας στην Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια .....	21
2.3 <i>Gram</i> -Αρνητικά Παθογόνα στη Μεσογειακή Υδατοκαλλιέργεια .....	22
2.3.1 Λοιμώξεις από <i>Vibrio spp.</i> στην Υδατοκαλλιέργεια.....	23
2.3.2 Λοιμώξεις από <i>Pasteurella spp.</i> στην Υδατοκαλλιέργεια .....	27
2.3.3 Λοιμώξεις από <i>Aeromonas</i> στην Υδατοκαλλιέργεια .....	31
2.3.4 Λοιμώξεις από <i>Photobacterium damsela</i> στην Υδατοκαλλιέργεια .....	35

3.ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΜΩΝ .....	39
3.1. Μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση παθογόνων .....	39
3.1 Μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται.....	39
3.1.1 Τεχνικές eDNA/eRNA.....	40
3.1.2 Πλεονεκτήματα των Μοριακών Μεθόδων .....	41
3.2.1 Η Εφαρμογές της PCR .....	42
3.2.2 Εξέλιξη της PCR σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR) .....	45
3.2.3 Πλεονεκτήματα RT-qPCR και Εμπορικές Εφαρμογές.....	46
3.2.4 Χρήση της qPCR στην ανάλυση και μελέτη ιχθύων .....	47
3.3 Βιοχημικές Μέθοδοι Ανίχνευσης.....	48
3.3.1 Ταυτοποίηση Gram-Αρνητικών Βακτηρίων .....	48
3.3.2 Αυτοματοποιημένα Συστήματα Ταυτοποίησης Μικροοργανισμών .....	49
3.3.3 Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί των Βιοχημικών Μεθόδων .....	51
3.3.4 Βιοχημικές αναλύσεις με Microgen™ GN A+B ID .....	52
3.3.5 Μέθοδος Microgen™ GN A+B σε ιχθύες .....	53
4. Στόχος και αντικείμενο της μελέτης .....	55
5. Υλικά και Μέθοδοι .....	56
5.1 Περιοχή Α: Περιοχή Θαλάμου νηματικής ροής .....	56
5.2 Περιοχή Β: Πάγκος Εργασίας .....	57
5.3 Ανάλυση Αντιδραστηρίων Kit .....	58
5.4 Διαδικασία PCR .....	59
5.5 Μεθοδολογία Microgen™ GN A+B ID.....	61
5. Αποτελέσματα.....	62
6. Συζήτηση.....	67

6.1 Κατανόηση της Δυναμικής των Νοσημάτων .....	68
6.2 Αλληλεπίδραση Ξενιστή-Παθογόνου-Περιβάλλοντος .....	69
6.3 Μηχανισμοί Εξάρσεων Νοσημάτων .....	69
6.4 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες και Ασθένειες .....	70
6.5 Περιορισμοί της Μελέτης .....	71
7. Συμπεράσματα .....	73
Βιβλιογραφία.....	74
Παράρτημα Α : Φωτογραφικό Υλικό .....	90
Παράρτημα Β Πίνακες αναφοράς βιοχημικών .....	94

## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Παραγωγή προϊόντων αλιείας και υδατοκαλλιέργειας στην Ελλάδα .....	6
Εικόνα 2: Παραγωγή θαλάσσιων μεσογειακών ιχθύων στην Ελλάδα 2012-2024 .....	7
Εικόνα 3: Απασχολούμενοι στον τομέα των υδατοκαλλιέργειών στην Ελλάδα .....	8
Εικόνα 4: Γεωγραφική κατανομή των απασχολούμενων στην υδατοκαλλιέργεια στην Ελλάδα .....	9
Εικόνα 5 Ευρωπαϊκό Λαβράκι - <i>Dicentrarchus labrax</i> .....	12
Εικόνα 6 Τσιπούρα <i>Sparus Aurata</i> .....	15
Εικόνα 7: Αποικίες <i>Vibrio harveyi</i> σε προσομοίωση φυσικού περιβάλλοντος .....	25
Εικόνα 8 : Μορφολογία των στελεχών του <i>Vibrio harveyi</i> . ....	26
Εικόνα 9: Μακροσκοπική εικόνα από τσιπούρες και λαβράκια μολυσμένα με <i>Vibrio harveyi</i> .....	27
Εικόνα 10: Φωτομικρογραφία ενός δείγματος με κατά Gram χρώση, πολυάριθμων Gram-αρνητικών βακτηρίων <i>Pasteurella dagmatis</i> .....	29
Εικόνα 11 : Τυπική εμφάνιση αποικιών <i>Pasteurella multocida</i> σε άγαρ αίματος.....	30
Εικόνα 12 : Κλινικά σημεία και μεταθανάτια ευρήματα σε εκτρεφόμενα λαβράκια μολυσμένα με <i>Pasteurella anguilliseptica</i> .....	30
Εικόνα 13 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του <i>Aeromonas veronii</i> που απομονώθηκε από επιδημία νόσου σε εκτροφή Νείλου τιλάπιας στη Βραζιλία. ....	33
Εικόνα 14 : Α) Ίκτερος στην εμφάνιση των προσβεβλημένων ψαριών. Β) Κίτρινο χρώμα του ορού αίματος, υποδηλώνοντας ηπατική βλάβη. Γ) Ευρωπαϊκό λαβράκι με ελκωτικές αλλοιώσεις στην επιδερμίδα. Δ) Ελκωτική επιδερμική αλλοίωση με ορατή κοκκιωματώδη αντίδραση. Ε) Σπληνομεγαλία σε μολυσμένο ευρωπαϊκό λαβράκι. F) Πολλά λευκωπά οζίδια εμφανή μακροσκοπικά στον σπλήνα. Γ) Διόγκωση νεφρού με εστιακή νέκρωση. Η) Νεκρωτικές εστίες στο ήπαρ. ....	34
Εικόνα 15: (Α) Αποικίες του <i>Photobacterium damsela</i> με β-αιμόλυση σε άγαρ αίματος 5% μετά από επώαση για 24 ώρες στους 35°C. (Β) Μικρές, πράσινες αποικίες σε άγαρ θειοθειικού-κιτρικού-χολικών αλάτων-σακχαρώδους (TCBS) μετά από επώαση για 24 ώρες στους 35°C. ....	37
Εικόνα 16 Ανάπτυξη Διάφορες μορφολογίες και μαστίγια του <i>Photobacterium</i> που παρατηρήθηκαν με οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία. ....	37
Εικόνα 17: Κλινικά και μακροσκοπικά σημεία σε άρρωστα λαβράκια και τσιπούρες. ....	38
Εικόνα 18 Αποτελέσματα της qPCR.....	66
Εικόνα 19 Αφυδατωμένη ταινία GnA-GnB.....	90
Εικόνα 20 Αποστείρωση Pasteur Γυάλινη.....	90
Εικόνα 21 Αποστειρωμένη ποσότητα αλατούχου ορού & δειγματοληψία αποικίας.....	91
Εικόνα 22 Ομογενοποίηση αποικίας στον αλατούχο ορό.....	92
Εικόνα 23 Εκχύλιση ομογενοποιημένου ορού & προσθήκη ορυκτελαίου .....	93
Εικόνα 24 Εμφάνιση αποτελεσμάτων μετά από την προσθήκη των αντιδραστηρίων. ....	93

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Αποτελέσματα δειγματοληψιών μακροσκοπικής εικόνας.....	63
Πίνακας 2 Αποτελέσματα μοριακής εξέτασης RT-qPCR.....	64
Πίνακας 3 Αποτελέσματα βιοχημικών δειγμάτων Microgen <sup>TM</sup> GnA-GnB.....	65
Πίνακας 4 Πίνακας αναφοράς κωδικού προφίλ παθογόνου. ....	94

## Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

**A. *hydrophila*** - *Aeromonas hydrophila*

**AFLP** – Amplified Fragment Length Polymorphism (Ενισχυμένος Πολυμορφισμός  
Μήκος Θραυσμάτων)

**FAO** - Food and Agriculture Organization (Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας)

**IMTA** - Integrated Multi-Trophic Aquaculture (Ολοκληρωμένη Πολυτροφική  
Υδατοκαλλιέργεια)

**IoT** - Internet of Things (Διαδίκτυο των Πραγμάτων)

**P. *damselae*** - *Photobacterium damsela*

**P. *spp.*** - *Pasteurella spp.*

**PCR** - Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)

**RT-qPCR** - Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (Ποσοτική Αντίδραση  
Πολυμεράσης σε Πραγματικό Χρόνο)

**V. *harveyi*** - *Vibrio harveyi*

**MMx** – Master Mix

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Η Υδατοκαλλιέργεια

Η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο τομέα παραγωγής τροφίμων στον κόσμο, με συνεχή εξέλιξη, επέκταση και εντατικοποίηση σχεδόν σε όλες τις περιοχές της υφηγίου. Η συνεχώς αυξανόμενη παγκόσμια πληθυσμιακή ανάπτυξη συνοδεύεται από την αντίστοιχη αύξηση της ζήτησης για υδρόβια προϊόντα διατροφής. Ωστόσο, η παραγωγή από την αλιεία έχει φτάσει σε ένα σημείο κορεσμού, καθώς τα περισσότερα κύρια αλιευτικά πεδία έχουν ήδη εξαντλήσει τη μέγιστη δυναμική τους. Ως αποτέλεσμα, η ιχθυοκαλλιέργεια θεωρείται μία κρίσιμη ευκαιρία για να γεφυρωθεί το χάσμα ανάμεσα στην προσφορά και τη ζήτηση υδρόβιων τροφίμων στις περισσότερες περιοχές του κόσμου<sup>1</sup>.

Παρά τις προοπτικές που προσφέρει, ο τομέας αντιμετωπίζει σημαντικές προκλήσεις στο δρόμο για την αξιοποίηση του δυναμικού του. Η εντατικοποίηση και η διαφοροποίηση των μεθόδων παραγωγής συνεχίζονται, με την εισαγωγή νέων ειδών και την τροποποίηση των συστημάτων και πρακτικών παραγωγής. Οι αγορές, το εμπόριο και οι προτιμήσεις των καταναλωτών καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη του τομέα, με έντονες απαιτήσεις για ασφαλή και ποιοτικά προϊόντα. Αυτό έχει οδηγήσει στην ενίσχυση της εφαρμογής κανονισμών και της καλύτερης διακυβέρνησης του τομέα, με στόχο τη διασφάλιση της βιωσιμότητας<sup>1</sup>.

Παράλληλα, γίνεται ολοένα και πιο αντιληπτό ότι η βιώσιμη ανάπτυξη και η υπεύθυνη παραγωγή στην ιχθυοκαλλιέργεια δεν μπορούν να επιτευχθούν μακροπρόθεσμα χωρίς τη συμμετοχή των ίδιων των παραγωγών στη διαδικασία λήψης αποφάσεων και στη ρύθμιση του κλάδου. Αυτή η συνειδητοποίηση έχει οδηγήσει σε προσπάθειες ενδυνάμωσης των παραγωγών και των ενώσεών τους, καθώς και στην προώθηση της αυτορρύθμισης του τομέα. Η εξέλιξη αυτή συμβάλλει στη βελτίωση της διαχείρισης μέσω της υιοθέτησης "καλύτερων πρακτικών διαχείρισης" από τους παραγωγούς, με έμφαση στη βιώσιμη και υπεύθυνη παραγωγή<sup>2</sup>.

Η ιχθυοκαλλιέργεια, που σε μεγάλο βαθμό στηρίζεται σε μικρής κλίμακας παραγωγούς, διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην προσπάθεια για βιώσιμη ανάπτυξη, μείωση της φτώχειας και βελτίωση της επισιτιστικής ασφάλειας σε παγκόσμιο επίπεδο. Η ενσωμάτωση σύγχρονων τεχνολογιών, όπως η χρήση βιώσιμων πρακτικών και οι

εφαρμογές ψηφιακής παρακολούθησης της παραγωγής, καθώς και η ενίσχυση της περιβαλλοντικής ευαισθητοποίησης, είναι απαραίτητες για την αντιμετώπιση των προκλήσεων του κλάδου<sup>2</sup>. Μέσα από αυτές τις εξελίξεις, η ιχθυοκαλλιέργεια έχει τη δυνατότητα να διαδραματίσει πρωταγωνιστικό ρόλο στη διασφάλιση της επισιτιστικής επάρκειας και στη βιώσιμη ανάπτυξη των τοπικών και παγκόσμιων κοινοτήτων.

## 1.2 Η Μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια

Η Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί έναν από τους πλέον σημαντικούς τομείς παραγωγής υδρόβιων τροφίμων, με ιδιαίτερη οικονομική, κοινωνική και περιβαλλοντική σημασία για τις χώρες της περιοχής. Στηρίζεται κυρίως στην εκτροφή ειδών όπως η τσιπούρα (*Sparus aurata*), το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), και το μύδι (*Mytilus galloprovincialis*), τα οποία είναι υψηλής ζήτησης στις τοπικές και διεθνείς αγορές<sup>3</sup>. Ο τομέας αυτός αναπτύσσεται ραγδαία τις τελευταίες δεκαετίες, καλύπτοντας ένα σημαντικό ποσοστό της ζήτησης για ψάρια και μαλάκια, σε μια εποχή που τα αποθέματα της φυσικής αλιείας μειώνονται λόγω υπεραλίευσης και περιβαλλοντικών πιέσεων<sup>4</sup>.

Η γεωγραφική θέση της Μεσογείου, με το ήπιο κλίμα και τα εκτεταμένα παράκτια οικοσυστήματα, προσφέρει ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη της ιχθυοκαλλιέργειας. Η περιοχή χαρακτηρίζεται από μεγάλη βιοποικιλότητα, γεγονός που επιτρέπει τη δοκιμή καινοτόμων συστημάτων εκτροφής και την εισαγωγή νέων ειδών στην παραγωγή. Επιπλέον, η μακρά παράδοση στη θαλάσσια εκμετάλλευση έχει ενισχύσει τις δεξιότητες και την εμπειρία των τοπικών κοινωνιών στον τομέα<sup>5</sup>.

Ωστόσο, η Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια αντιμετωπίζει προκλήσεις που συνδέονται με τη βιωσιμότητα και την προστασία του περιβάλλοντος. Η εντατική εκτροφή, η υπερβολική χρήση φυσικών πόρων και η επιβάρυνση των υδάτινων οικοσυστημάτων από τα απόβλητα της παραγωγής έχουν εγείρει ανησυχίες για τις επιπτώσεις στο θαλάσσιο περιβάλλον. Επιπλέον, η εξάπλωση παθογόνων μικροοργανισμών και παρασίτων, όπως τα Gram-αρνητικά βακτήρια (*Vibrio*, *Aeromonas*, *Photobacterium damsela*) και το πρωτόζωο *Cryptocaryon irritans*, αποτελεί σοβαρή απειλή για την υγεία των εκτρεφόμενων ειδών<sup>6</sup>.

Η ανάγκη για βιώσιμη ανάπτυξη έχει οδηγήσει στην υιοθέτηση νέων τεχνολογιών και πρακτικών διαχείρισης, όπως τα ολοκληρωμένα πολυτροφικά συστήματα εκτροφής (IMTA), η χρήση προβιοτικών και εμβολίων για την πρόληψη ασθενειών, καθώς και η



εφαρμογή συστημάτων παρακολούθησης και ελέγχου των περιβαλλοντικών παραμέτρων<sup>7</sup>. Παράλληλα, προωθείται η ενίσχυση της συνεργασίας μεταξύ επιστημονικών φορέων, κυβερνήσεων και ιδιωτών παραγωγών, ώστε να διασφαλιστεί η συμμόρφωση με διεθνείς κανονισμούς και πρότυπα<sup>8</sup>.

Η Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια, παρά τις προκλήσεις, διαθέτει τεράστιες προοπτικές για περαιτέρω ανάπτυξη, υποστηρίζοντας την τοπική οικονομία, προσφέροντας θέσεις εργασίας και συμβάλλοντας στη διατροφική ασφάλεια. Η επένδυση σε έρευνα, καινοτομία και βιώσιμες πρακτικές μπορεί να ενισχύσει τη θέση της περιοχής ως παγκόσμιος κόμβος για την παραγωγή υδρόβιων προϊόντων υψηλής ποιότητας, προστατεύοντας παράλληλα τα πολύτιμα θαλάσσια οικοσυστήματά της.

### 1.1.2 Οικονομικές Επιπτώσεις της Υδατοκαλλιέργειας στη Μεσόγειο

Η υδατοκαλλιέργεια στη Μεσόγειο αποτελεί έναν σημαντικό τομέα για την ασφάλεια τροφίμων, ενώ ταυτόχρονα υποστηρίζει τις τοπικές οικονομίες των χωρών της περιοχής. Η παραγωγή ιχθυηρών και άλλων υδρόβιων οργανισμών μέσω της υδατοκαλλιέργειας όχι μόνο ενισχύει την παροχή θαλασσινών προϊόντων για την κατανάλωση, αλλά δημιουργεί και θέσεις εργασίας, υποστηρίζοντας έτσι την οικονομική ανάπτυξη των παράκτιων κοινοτήτων. Η εμπορική αξία του τομέα της υδατοκαλλιέργειας παγκοσμίως ανήλθε σε περίπου 250 δισεκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ, με τις χώρες της Μεσογείου να διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο σε αυτό το οικονομικό τοπίο. Οι κυριότεροι παραγωγοί, όπως η Ιταλία, η Ελλάδα, η Ισπανία και η Τουρκία, συνεισφέρουν σημαντικά στη συνολική παραγωγή της βιομηχανίας, ενισχύοντας την εξαγωγή προϊόντων, αλλά και την εγχώρια κατανάλωση<sup>9</sup>.

Η ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας προσφέρει μια σειρά από οικονομικά οφέλη, καθώς εξασφαλίζει τη συνεχιζόμενη προσφορά πρωτεϊνών υψηλής ποιότητας σε περιοχές που εξαρτώνται από τα θαλάσσια προϊόντα για την κάλυψη των διατροφικών τους αναγκών. Η αυξανόμενη ζήτηση για θαλασσινά προϊόντα, λόγω της συνεχώς αυξανόμενης παγκόσμιας κατανάλωσης, καθιστά τον τομέα της υδατοκαλλιέργειας θεμελιώδη για την ικανοποίηση αυτής της ανάγκης<sup>10</sup>. Ωστόσο, η ανάπτυξη αυτή απαιτεί παράλληλα την υιοθέτηση βιώσιμων και υπεύθυνων πρακτικών προκειμένου να διασφαλιστεί η μακροχρόνια βιωσιμότητα του τομέα.

Η συνδυασμένη εφαρμογή αποτελεσματικών στρατηγικών διαχείρισης, βιώσιμων πρακτικών και προόδων στη βιοτεχνολογία είναι κρίσιμη για το μέλλον της μεσογειακής υδατοκαλλιέργειας. Ο τομέας της υδατοκαλλιέργειας αντιμετωπίζει διάφορες προκλήσεις, όπως η υπεραλίευση, η ρύπανση των υδάτων και οι επιπτώσεις από την κλιματική αλλαγή. Ωστόσο, οι εξελίξεις στη βιοτεχνολογία προσφέρουν νέες δυνατότητες για τη βελτίωση των παραγωγικών διαδικασιών και την αντιμετώπιση αυτών των προκλήσεων. Τεχνολογίες όπως η γενετική βελτίωση των ιχθύων, η ανάπτυξη πιο ανθεκτικών ειδών και η εφαρμογή προηγμένων συστημάτων παρακολούθησης για την ανίχνευση και πρόληψη ασθενειών μπορούν να συνεισφέρουν στη βελτίωση της αποδοτικότητας και της βιωσιμότητας των υδατοκαλλιεργειών<sup>11</sup>.

Η εφαρμογή βιώσιμων πρακτικών, όπως η χρήση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας για τη λειτουργία των υδατοκαλλιεργειών, η μείωση των εκπομπών ρύπων και η ενσωμάτωση οικολογικών συστημάτων στις καλλιέργειες, θα βοηθήσει στην ελαχιστοποίηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων της βιομηχανίας. Επιπλέον, η εφαρμογή προληπτικών στρατηγικών για την υγεία των ψαριών, όπως η χρήση εμβολίων, προβιοτικών και ανοσοδιεγερτικών, μπορεί να μειώσει τη χρήση αντιβιοτικών, ενισχύοντας την ποιότητα των προϊόντων και διασφαλίζοντας την ασφάλεια των τροφίμων.

Οι μελλοντικές προκλήσεις για την υδατοκαλλιέργεια της Μεσογείου περιλαμβάνουν την ανάγκη για αυξημένη παραγωγικότητα για να καλυφθεί η αυξανόμενη ζήτηση, την προστασία των θαλάσσιων οικοσυστημάτων και την προσαρμογή στον αντίκτυπο της κλιματικής αλλαγής. Παράλληλα, οι οικονομικές ευκαιρίες που προσφέρονται από τη βιομηχανία της υδατοκαλλιέργειας είναι τεράστιες, καθώς οι τοπικές οικονομίες θα συνεχίσουν να επωφελούνται από τις θέσεις εργασίας και την ανάπτυξη του εμπορίου<sup>12</sup>.

Η επιτυχία του τομέα της υδατοκαλλιέργειας στη Μεσόγειο εξαρτάται από τη διαρκή καινοτομία, τη συνεργασία μεταξύ των κρατών, της επιστημονικής κοινότητας και των επιχειρήσεων, καθώς και από την εφαρμογή πολιτικών που ενθαρρύνουν τη βιώσιμη ανάπτυξη και την προστασία των θαλάσσιων πόρων<sup>12</sup>. Η υδατοκαλλιέργεια μπορεί να συνεχίσει να αποτελεί έναν κρίσιμο πυλώνα για την ασφάλεια τροφίμων και την οικονομική ευημερία στην περιοχή, εφόσον καταφέρει να συνδυάσει την παραγωγικότητα με την περιβαλλοντική και κοινωνική ευθύνη.

## 1.2 Ελληνική υδατοκαλλιέργεια

Μέχρι το 1980, η υδατοκαλλιέργεια στην Ελλάδα περιοριζόταν κυρίως στις εκτατικές ιχθυοκαλλιέργειες των λιμνοθαλασσών, στις εντατικές ιχθυοκαλλιέργειες γλυκών υδάτων, όπως η εκτροφή πέστροφας, καθώς και στη μυδοκαλλιέργεια. Στη συνέχεια, τα τελευταία 40 χρόνια, σημειώθηκε σημαντική ανάπτυξη των εντατικών ιχθυοκαλλιεργειών θαλάσσιων μεσογειακών ειδών, με κυρίαρχα την τσιπούρα και το λαβράκι, καθιστώντας την υδατοκαλλιέργεια έναν από τους πιο δυναμικούς τομείς της πρωτογενούς παραγωγής της χώρας<sup>13</sup>.

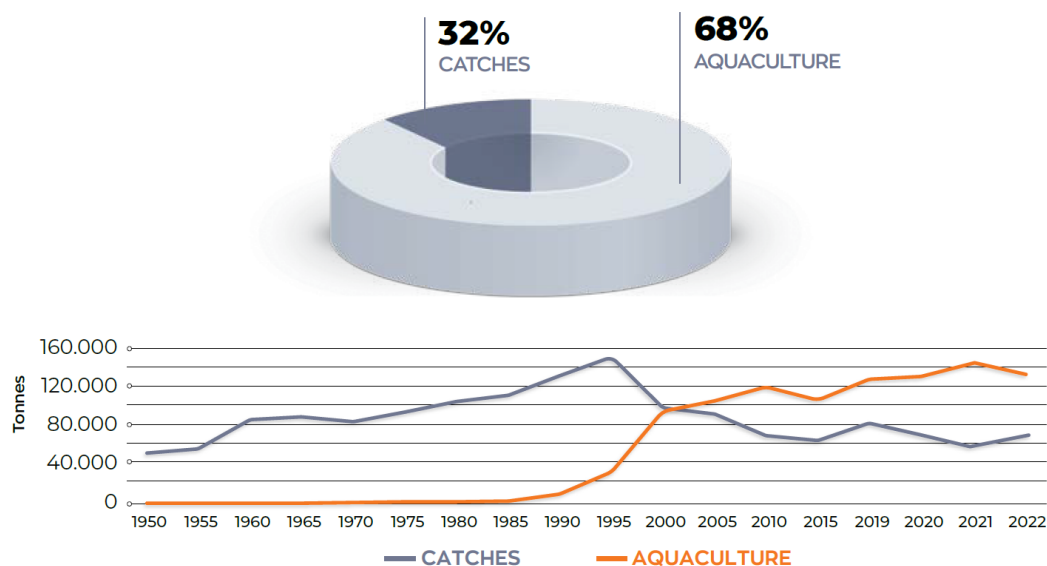
Στην αρχή, μόλις το 2% της εγχώριας παραγωγής αλιευτικών προϊόντων προερχόταν από την υδατοκαλλιέργεια, με συνολική παραγωγή περίπου 2.000 τόνους, ενώ το υπόλοιπο 98% προερχόταν από τη συλλεκτική αλιεία, που παρήγαγε 105.651 τόνους. Ωστόσο, αυτή η αναλογία άρχισε σταδιακά να αλλάζει. Από το 2003 και μετά, η παραγωγή προϊόντων υδατοκαλλιέργειας ξεπέρασε αυτήν της αλιείας, γεγονός που αντικατοπτρίζει τη ραγδαία εξέλιξη του τομέα<sup>13</sup>. Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία του Food and Agriculture Organization, το 68% της συνολικής παραγωγής αλιευμάτων στην Ελλάδα προέρχεται πλέον από την υδατοκαλλιέργεια, με το υπόλοιπο 32% να καλύπτεται από την αλιεία (Εικόνα 1)<sup>14</sup>.

Η θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια, που επικεντρώνεται κυρίως στην εκτροφή ευρύαλων μεσογειακών ψαριών και μυδιών, αποτελεί το 98% της συνολικής παραγωγής υδατοκαλλιέργειας στη χώρα. Η μέθοδος εκτροφής βασίζεται σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς, μια τεχνική που πρωτοχρησιμοποιήθηκε εκτενώς στη Νορβηγία για την εκτροφή σολομού<sup>13</sup>. Το 1985, λειτουργούσαν μόλις 12 μονάδες παραγωγής, με συνολική παραγωγή 100 τόνους, ενώ σήμερα, ο αριθμός τους έχει φτάσει στις 287 μονάδες, με παραγωγή που ξεπερνά τους 120.000 τόνους ετησίως<sup>13</sup>.

Τα κυριότερα εκτρεφόμενα είδη περιλαμβάνουν την τσιπούρα και το λαβράκι, ενώ σε μικρότερη κλίμακα εκτρέφονται και άλλα μεσογειακά είδη, όπως ο κρανιός και το ιαπωνικό φαγκρί. Η διαδικασία εκτροφής μιμείται τους φυσικούς μηχανισμούς και διαρκεί περίπου 16-18 μήνες, μέχρι τα ψάρια να φτάσουν το εμπορικό μέγεθος των 400 γραμμαρίων<sup>14</sup>. Η επιτυχής ολοκλήρωση αυτής της διαδικασίας απαιτεί εξειδικευμένη επιστημονική γνώση και τεχνογνωσία.

Η δεύτερη σημαντικότερη κατηγορία υδατοκαλλιέργειας στην Ελλάδα είναι η οστρακοκαλλιέργεια, με κυρίαρχο προϊόν το μεσογειακό μύδι<sup>14</sup>. Η οργανωμένη εκτροφή

μυδιών ξεκίνησε το 1970 σε περιοχές των ποταμών Λουδία και Αξιού και σταδιακά επεκτάθηκε σε άλλες περιοχές, όπως η Πιερία, η Ημαθία και η Καβάλα<sup>13</sup>.



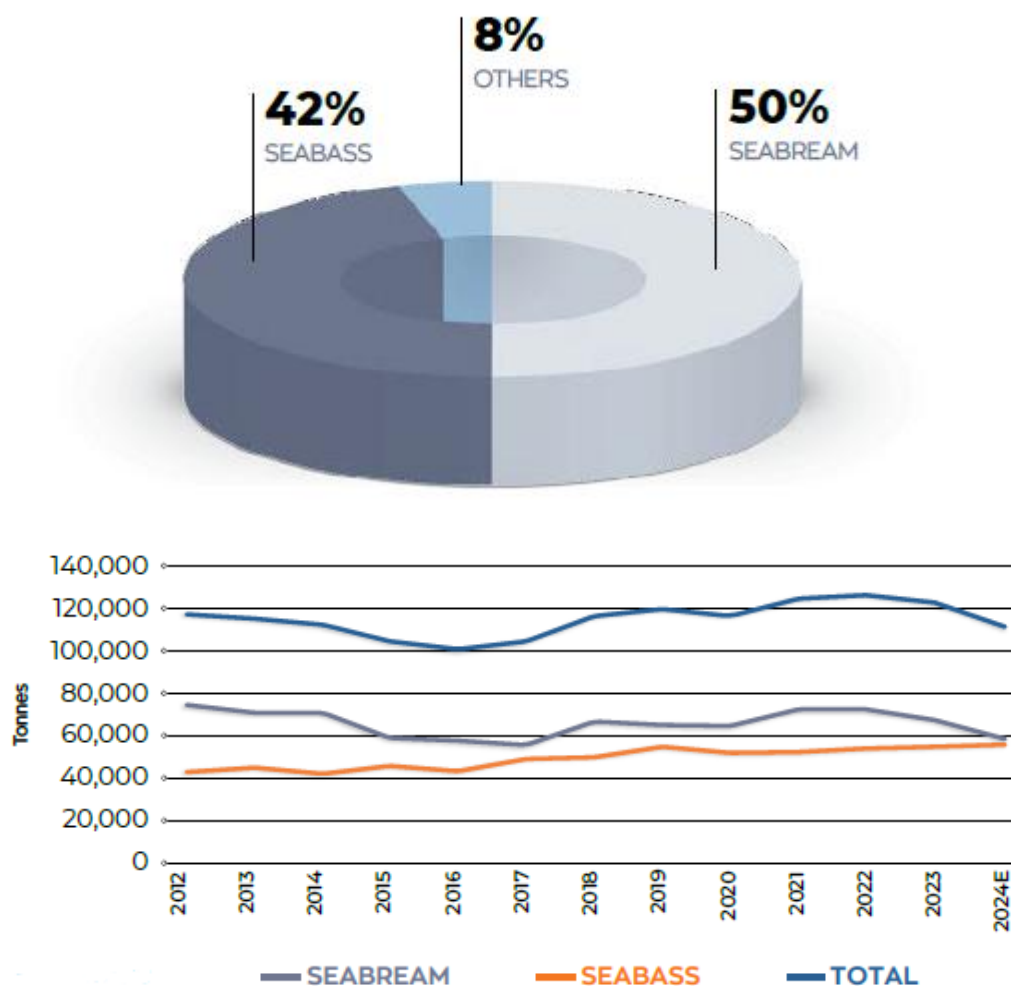
Εικόνα 1: Παραγωγή προϊόντων αλιείας και υδατοκαλλιέργειας στην Ελλάδα<sup>13</sup>

### 1.2.1 Όγκος και αξία παραγωγής

Το 2023, η παραγωγή ψαριών στη μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια έφτασε τους 131.300 τόνους, με συνολική αξία 752,5 εκατομμύρια ευρώ<sup>13</sup>. Η επίδοση αυτή κατέγραψε μείωση κατά 4,2% τόσο στον όγκο όσο και στην αξία πωλήσεων σε σύγκριση με το προηγούμενο έτος, όπου η παραγωγή ανήλθε στους 137.000 τόνους και η αξία στα 787 εκατομμύρια ευρώ<sup>13</sup>. Η τσιπούρα και το λαβράκι εξακολουθούν να αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής, καλύπτοντας το 92%, ενώ το υπόλοιπο 8% αφορά άλλα μεσογειακά είδη, όπως ο κρانيός και το βραχύπτερο φαγκρί (Εικόνα 2<sup>13</sup>).

Συγκεκριμένα, η συνολική παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού έφτασε τους 121.300 τόνους, εκ των οποίων οι 66.000 τόνοι αφορούσαν την τσιπούρα και οι 55.300 το λαβράκι, με την αξία να ανέρχεται στα 697 εκατομμύρια ευρώ. Συγκριτικά με το 2022, παρατηρήθηκε μείωση 4,2% στον όγκο παραγωγής και 4,5% στην αξία πωλήσεων. Η τσιπούρα παρουσίασε σημαντική πτώση, με τον όγκο παραγωγής να μειώνεται κατά 9% και την αξία πωλήσεων κατά 8%. Αντίθετα, το λαβράκι κατέγραψε αύξηση 2,5% στον όγκο παραγωγής, ενώ η αξία πωλήσεών του παρέμεινε σχεδόν σταθερή, σημειώνοντας οριακή μείωση 0,2%<sup>13</sup>.

Για το 2024, εκτιμάται ότι η παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού θα μειωθεί κατά 5%, φτάνοντας περίπου τους 115.000 τόνους<sup>13</sup>. Η μείωση αυτή αποδίδεται κυρίως στη μειωμένη παραγωγή γόνου τσιπούρας. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την περίοδο 2013-2023, η συνολική παραγωγή των δύο αυτών ειδών κατέγραψε αύξηση της τάξης του 5%<sup>13</sup>.

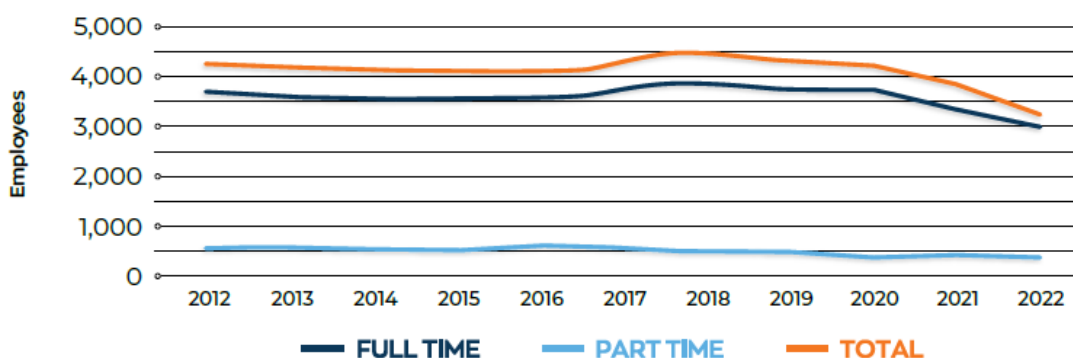


Εικόνα 2: Παραγωγή θαλάσσιων μεσογειακών ιχθύων στην Ελλάδα 2012-2024<sup>13</sup>

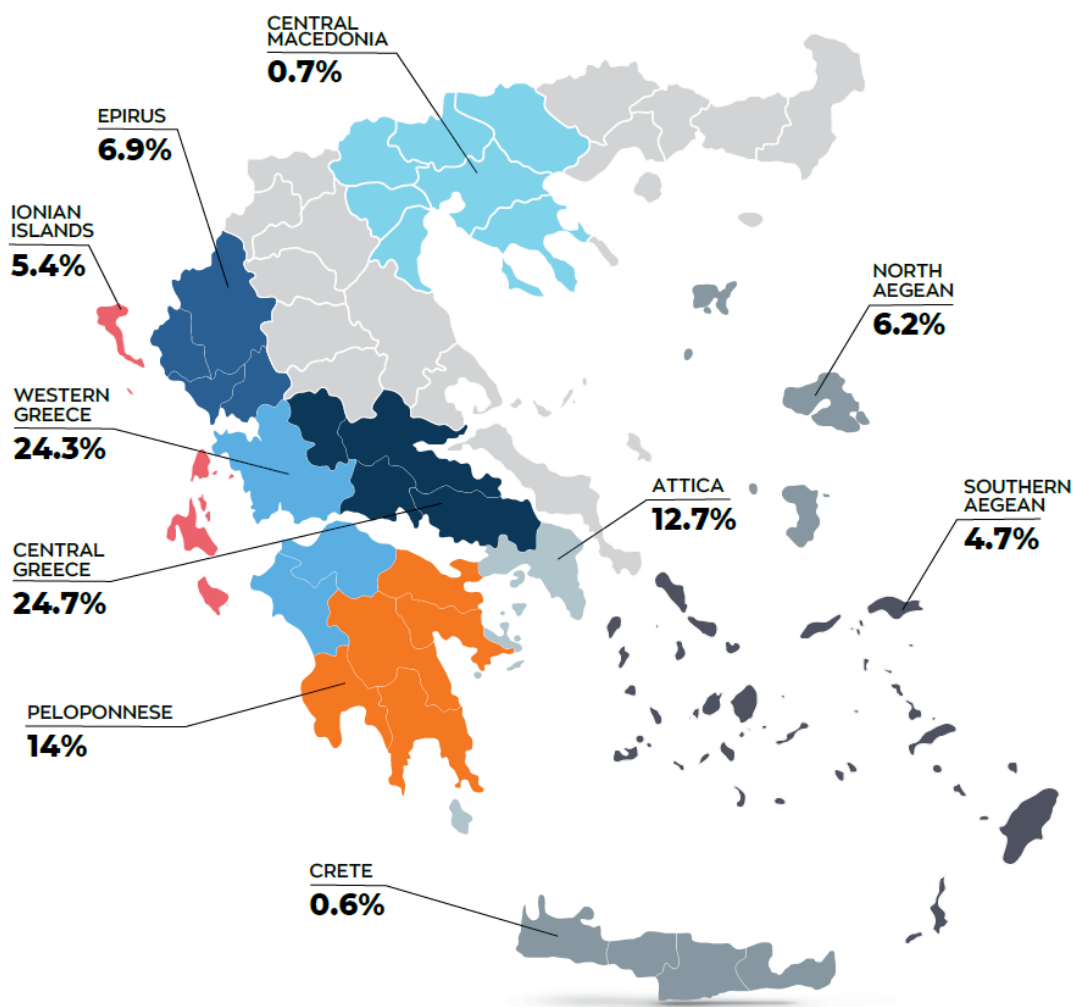
### 1.2.2 Απασχόληση στην Ελληνική Υδατοκαλλιέργεια

Η ανάπτυξη του τομέα της υδατοκαλλιέργειας έχει καταστήσει την Ελλάδα μία από τις χώρες με τα υψηλότερα ποσοστά απασχόλησης στον κλάδο αυτόν σε επίπεδο ΕΕ. Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα διαθέσιμα δεδομένα, ο συνολικός αριθμός εργαζομένων, μόνιμων και εποχιακών, ανέρχεται σε 3.489 άτομα<sup>13</sup> (**Εικόνα 3**). Αν συμπεριληφθούν και οι έμμεσες θέσεις εργασίας που δημιουργούνται από υποστηρικτικές δραστηριότητες, όπως τα παρασκευαστήρια ιχθυοτροφών, η κατασκευή εξοπλισμού, τα ιχθυοκιβώτια και οι μεταφορές, τότε εκτιμάται ότι ο συνολικός αριθμός των απασχολούμενων στον κλάδο φτάνει περίπου τους 12.000 εργαζομένους, που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα ειδικοτήτων (επιστημονικές, τεχνικές και εργατικές)<sup>13</sup>.

Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά της απασχόλησης στον τομέα αυτόν είναι ότι μεγάλο μέρος των θέσεων εργασίας εντοπίζεται σε απομακρυσμένες περιοχές της χώρας, κυρίως στα νησιά, συμβάλλοντας καθοριστικά στην οικονομική ανάπτυξη των τοπικών κοινωνιών (**Εικόνα 4**). Στον τομέα της ιχθυοκαλλιέργειας, οι θέσεις εργασίας κατανέμονται σε 10 από τις 13 περιφέρειες της Ελλάδας, με τις περισσότερες να βρίσκονται στη Δυτική Ελλάδα, τη Στερεά Ελλάδα, την Πελοπόννησο και την Αττική<sup>13</sup>. Παρακάτω απεικονίζονται οι αριθμοί των απασχολούμενων στον κλάδο καθώς και τα ποσοστά απασχόλησης κατανεμημένα στο ελλαδικό χώρο.



**Εικόνα 3:** Απασχολούμενοι στον τομέα των υδατοκαλλιέργειών στην Ελλάδα<sup>13</sup>



Εικόνα 4: Γεωγραφική κατανομή των απασχολούμενων στην υδατοκαλλιέργεια στην Ελλάδα<sup>13</sup>

### 1.2.3 Περιβαλλοντικές Επιπτώσεις της Υδατοκαλλιέργειας στη Μεσόγειο

Η ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας στη Μεσόγειο έχει δημιουργήσει ποικίλες περιβαλλοντικές ανησυχίες, καθώς οι παραδοσιακές πρακτικές έχουν οδηγήσει σε προβλήματα όπως η υπεραλίευση και η υποβάθμιση των θαλάσσιων οικοσυστημάτων. Η εντατική εκμετάλλευση των υδατικών πόρων και η αυξημένη συγκέντρωση ιχθυοκαλλιεργειών σε συγκεκριμένες περιοχές έχουν ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση οργανικών αποβλήτων, την αλλαγή στη χημική σύσταση των υδάτων και την υποβάθμιση των φυσικών οικοτόπων. Επιπλέον, η εξάπλωση παθογόνων μικροοργανισμών και η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών έχουν οδηγήσει σε σοβαρές επιπτώσεις τόσο στη θαλάσσια βιοποικιλότητα όσο και στη δημόσια υγεία, καθιστώντας αναγκαία την αναζήτηση πιο βιώσιμων και φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων<sup>4</sup>.



Η σύγχρονη έρευνα επικεντρώνεται στη διερεύνηση του ρόλου των ωφέλιμων μικροοργανισμών στα συστήματα υδατοκαλλιέργειας, καθώς αυτοί μπορούν να συμβάλουν στη διαχείριση ασθενειών, στη βελτίωση της ποιότητας του νερού και στη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων. Η χρήση μικροβιακών κοινοτήτων που ανταγωνίζονται παθογόνους μικροοργανισμούς ή ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων μπορεί να μειώσει την ανάγκη για χημικές παρεμβάσεις, προάγοντας έτσι μια πιο οικολογική προσέγγιση στην ιχθυοκαλλιέργεια<sup>15</sup>.

Μια από τις βασικές στρατηγικές που προτείνονται για τη βελτίωση της περιβαλλοντικής βιωσιμότητας είναι η εφαρμογή προληπτικών μέτρων, όπως η χρήση εμβολίων, προβιοτικών και ανοσοδιεγερτικών ουσιών. Τα εμβόλια συμβάλλουν στη μείωση της ανάγκης για αντιβιοτικά, ενισχύοντας την ανθεκτικότητα των ψαριών απέναντι σε συγκεκριμένες ασθένειες. Τα προβιοτικά, από την άλλη, αποτελούν ευεργετικούς μικροοργανισμούς που βοηθούν στη διατήρηση μιας υγιούς μικροβιακής ισορροπίας στο πεπτικό σύστημα των ψαριών, μειώνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης παθογόνων. Τα ανοσοδιεγερτικά ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων, βελτιώνοντας την αντίστασή τους σε λοιμώξεις και μειώνοντας την ανάγκη για φαρμακευτικές θεραπείες<sup>6</sup>.

Η εφαρμογή αυτών των στρατηγικών όχι μόνο συμβάλλει στη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων της υδατοκαλλιέργειας αλλά και αντιμετωπίζει ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα του κλάδου, την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τόσο την υγεία των ιχθύων όσο και την ανθρώπινη υγεία μέσω της τροφικής αλυσίδας. Για τον λόγο αυτό, η προώθηση εναλλακτικών, φιλικών προς το περιβάλλον λύσεων είναι επιτακτική<sup>15</sup>.

Συνολικά, η βιώσιμη ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας στη Μεσόγειο απαιτεί την υιοθέτηση καινοτόμων μεθόδων που μειώνουν τις αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον, ενώ παράλληλα διασφαλίζουν την υγεία και την ευημερία των υδρόβιων οργανισμών. Η ενσωμάτωση της μικροβιακής οικολογίας στη διαχείριση των ιχθυοκαλλιεργειών, σε συνδυασμό με την εφαρμογή προληπτικών στρατηγικών, μπορεί να αποτελέσει το κλειδί για μια πιο αειφόρο και υπεύθυνη προσέγγιση στον κλάδο της υδατοκαλλιέργειας.



### 1.3 Ευρωπαϊκό Λαβράκι - *Dicentrarchus labrax*

Το ευρωπαϊκό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax* L.) (Εικόνα 5) ανήκει στην οικογένεια *Moronidae* και την τάξη *Perciformes*. Εντοπίζεται σε παράκτια ύδατα του Ατλαντικού Ωκεανού, από τη νότια Νορβηγία (60°B) έως τη Δυτική Σαχάρα (30°B), καθώς και σε ολόκληρη τη Μεσόγειο Θάλασσα και τη Μαύρη Θάλασσα. Το είδος αυτό έχει εισαχθεί για σκοπούς υδατοκαλλιέργειας στο Ισραήλ, καθώς και στο Ομάν και στα Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα<sup>16</sup>.

Το ευρωπαϊκό λαβράκι είναι γονοχωριστικό είδος (gonochoristic), δηλαδή τα άτομα αναπτύσσουν ξεχωριστά φύλα. Τα θηλυκά αναπαράγονται κατά τη διάρκεια του χειμώνα στη Μεσόγειο Θάλασσα (Δεκέμβριος έως Μάρτιος) και μέχρι τον Ιούνιο στον Ατλαντικό Ωκεανό. Παρουσιάζουν υψηλή γονιμότητα, παράγοντας κατά μέσο όρο 200.000 αυγά ανά κιλό θηλυκού. Η αναπαραγωγή ξεκινά σε θηλυκά βάρους πάνω από 2 κιλά, ενώ το προσδόκιμο ζωής τους στη φύση φτάνει τα 6-7 χρόνια<sup>17</sup>.

Τα αυγά και οι προνύμφες του λαβρακιού διασπείρονται εκτεταμένα κατά τους πρώτους τρεις μήνες της ζωής τους, ενώ οι ενήλικες είναι γνωστό ότι μεταναστεύουν για εκατοντάδες χιλιόμετρα<sup>16</sup>.

Η γενετική διαφοροποίηση του ευρωπαϊκού λαβρακιού είναι από τις καλύτερα μελετημένες μεταξύ των θαλάσσιων ψαριών της Ευρώπης. Γενετικές μελέτες που χρησιμοποιούν μεθόδους όπως τα αλλοένζυμα, το μιτοχονδριακό DNA, τα RAPDs και οι μικροδορυφόροι, έχουν οδηγήσει στον εντοπισμό τριών γενετικά διακριτών ζωνών:

- Βορειοανατολικός Ατλαντικός Ωκεανός
- Δυτική Μεσόγειος
- Ανατολική Μεσόγειος

Οι μεταβατικές ζώνες έχουν εντοπιστεί στο μέτωπο του Ατλαντικού και της Δυτικής Μεσογείου, και, μεταξύ της Δυτικής και Ανατολικής Μεσογείου<sup>18</sup>.

Παρά τη μεταναστευτική συμπεριφορά των ενηλίκων, η οποία καλύπτει μεγάλες αποστάσεις, η γενετική δομή δείχνει ότι οι πληθυσμοί της Ανατολικής Μεσογείου παρουσιάζουν σημαντική διαφοροποίηση, π.χ. σε λεκάνες όπως η Αδριατική, το Ιόνιο και το Αιγαίο Πέλαγος, ο Λιβυκό-Τυνησιακός κόλπος και η Λεβαντίνη<sup>18</sup>.

Η ανθρώπινη παρέμβαση μέσω της μεταφοράς γόνου από τη Δυτική Μεσόγειο προς διάφορα ιχθυοτροφεία έχει επίσης επηρεάσει τη γενετική ποικιλομορφία του είδους.

Ορισμένα αλλοένζυμα στο ευρωπαϊκό λαβράκι φαίνεται να παρουσιάζουν μοτίβα συχνότητας αλληλόμορφων που καθορίζονται από την προσαρμογή σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Συγκριτικές μελέτες μεταξύ πληθυσμών σε λιμνοθάλασσες και θαλάσσια περιβάλλοντα έδειξαν ότι ορισμένα αλλοένζυμα επηρεάζονται από επιλογή, ενώ μόνο λίγα από αυτά φαίνεται να συμβάλλουν στη διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών<sup>18</sup>.

Το ευρωπαϊκό λαβράκι είναι επιρρεπές σε αρκετές βακτηριακές, ιογενείς και παρασιτικές ασθένειες, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τόσο την υγεία των ψαριών όσο και την οικονομική βιωσιμότητα της υδατοκαλλιέργειας.



Εικόνα 5 Ευρωπαϊκό Λαβράκι - *Dicentrarchus labrax*<sup>19</sup>

Τα κύρια παθογόνα που επηρεάζουν το ευρωπαϊκό λαβράκι είναι:

- ***Vibrio anguillarum***: Προκαλεί τη νόσο της δονακίωσης. Εξωτερικά παρατηρούνται ερυθρότητα της βάσεως των πτερυγίων όπως και της έδρας όπως και ο εξόφθαλμος. Εσωτερικά η κλινική εικόνα χαρακτηρίζεται από αιμορραγίες στα περισσότερα όργανα, ο σπλήνας είναι διογκωμένος και το έντερο παρουσιάζει έντονη υπεραιμία. Ακόμη σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρούνται ελκωτικές αλλοιώσεις σε διάφορα σημεία του σώματος. Η θνησιμότητα είναι υψηλή στους ιχθυοπληθυσμούς<sup>20</sup>.
- ***Photobacterium damsela subsp. piscicida***: Προκαλεί την παστεριδίαση. Η εκδήλωση της νόσου έχει δύο μορφές, την χρόνια και την οξεία. Συγκεκριμένα, για την οξεία μορφή παρατηρείται η εστιακή νέκρωση των βραγχίων, η διόγκωση και το σκούρο χρώμα του σπλήνα καθώς και η υπεραιμία του ήπατος. Η χρόνια μορφή χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία λευκωπών οζιδίων(κοκκιώματα) στον σπλήνα και τους νεφρούς<sup>20</sup>.

- ***Aeromonas hydrophila***: Προκαλεί μεγάλη δερματική αλλοίωση ενώ εσωτερικά η εικόνα είναι σηψαιμική με παρουσία ασκίτη, διάχυτων αιμορραγιών στα περισσότερα ενδοκοιλιακά όργανα.<sup>20</sup>.
- ***Myxobolus spp.* και *Sparicotyle chrysophrii***: Παρασιτικά παθογόνα που επηρεάζουν τα βράγχια και το δέρμα, προκαλώντας αναπνευστικά προβλήματα και επιβράδυνση της ανάπτυξης<sup>20</sup>.

Η αντιμετώπιση και διαχείριση των ασθενειών από τα προαναφερόμενα παθογόνα περιέχει διάφορες μεθόδους όπως:

- **Εμβολιασμός**: Τα εμβόλια κατά της δονακίωσης και της παστεριδίασης έχουν μειώσει σημαντικά τη θνησιμότητα<sup>21</sup>.
- **Χρήση Προβιοτικών**: Ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών<sup>22</sup>.
- **Βιοασφάλεια**: Ο έλεγχος της ποιότητας του νερού, η αποφυγή υπερπληθυσμού και η χρήση πιστοποιημένου γόνου είναι κρίσιμες πρακτικές<sup>21</sup>.
- **Περιορισμός Αντιβιοτικών**: Η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων, γεγονός που καθιστά αναγκαία τη στρόφη προς βιώσιμες πρακτικές διαχείρισης<sup>21</sup>.

Η έγκαιρη διάγνωση μέσω μοριακών μεθόδων, όπως η qPCR, παρέχει κρίσιμα δεδομένα για την αντιμετώπιση των ασθενειών, ενώ η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων παθογόνων-ξενιστών-περιβάλλοντος είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα του κλάδου. Το ευρωπαϊκό λαβράκι αποτελεί σημαντικό είδος για την υδατοκαλλιέργεια στη Μεσόγειο, αλλά η υγεία και η παραγωγικότητά του απειλούνται από διάφορα παθογόνα. Η υιοθέτηση ολοκληρωμένων στρατηγικών διαχείρισης και βιώσιμων πρακτικών μπορεί να διασφαλίσει τη βιωσιμότητα του κλάδου και την ασφάλεια των τροφίμων.

#### 1.4 Τσιπούρα - *Sparus aurata*

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) (**Εικόνα 6**) είναι ένα υποτροπικό ψάρι της οικογένειας *Sparidae*. Κατανέμεται γεωγραφικά από 62°B έως 15°N και από 17°Δ έως 43°Α. Εμφανίζεται φυσικά στη Μεσόγειο και στη Μαύρη Θάλασσα (σπάνια), καθώς και στον ανατολικό Ατλαντικό, από τα Βρετανικά Νησιά και τα στενά του Γιβραλτάρ έως το Πράσινο Ακρωτήριο και γύρω από τα Κανάρια Νησιά<sup>23</sup>.

Η αλίευση της γίνεται με παραδοσιακό εξοπλισμό, καθώς και με ημιαπαγγελματικά μέσα σε περιοχές όπως η Ισπανία, η Σικελία, η Αίγυπτος και η Κύπρος. Συνήθως χρησιμοποιούνται τράτες, παραγάδια και πετονιές. Το είδος αυτό αποτελεί βασικό προϊόν στις αγορές της Αδριατικής, της Ελλάδας, της Τουρκίας και του Μαγκρέμπ, ενώ διατίθεται νωπό, ψυγμένο ή κατεψυγμένο<sup>18,24</sup>.

Είναι ιχθύς που ζει σε λιβάδια θαλάσσιου χόρτου και αμμώδεις βυθούς, καθώς και στη ζώνη του κυματισμού, συνήθως σε βάθη έως 30 μέτρα, αν και οι ενήλικες μπορεί να φτάσουν σε βάθη έως 150 μέτρα. Αν και αναφέρεται ως καθιστικό ψάρι, είναι πιθανές μεταναστεύσεις στον ανατολικό Ατλαντικό, από την Ισπανία έως τα Βρετανικά Νησιά. Εμφανίζεται είτε μοναχικά είτε σε μικρές συγκεντρώσεις<sup>23</sup>.

Η τσιπούρα είναι ευρύαλη, με ικανότητα προσαρμογής σε ευρύ φάσμα αλατότητας. Την άνοιξη μετακινείται σε προστατευμένα παράκτια ύδατα αναζητώντας άφθονη τροφή και ηπιότερες θερμοκρασίες (τροφικές μεταναστεύσεις). Το φθινόπωρο επιστρέφει στα ανοιχτά για αναπαραγωγή, καθώς είναι πολύ ευαίσθητη στις χαμηλές θερμοκρασίες (ο κατώτερος θανατηφόρος θερμοκρασιακός περιορισμός είναι οι 2°C)<sup>23</sup>.

Ακόμη, είναι πρωτανδρικός ερμαφρόδιτος οργανισμός: λειτουργεί ως αρσενικό κατά τα πρώτα δύο χρόνια της ζωής της, ενώ, όταν ξεπεράσει τα 30 εκατοστά σε μήκος, γίνεται θηλυκό. Κατά τη διάρκεια της αρσενικής φάσης, ο διφυλικός γοναδικός αδένας περιέχει λειτουργικούς όρχεις με ασύγχρονη σπερματογένεση και μη λειτουργικές ωοθήκες<sup>23</sup>.

Οι ωοθήκες αναπτύσσονται επίσης ασύγχρονα, και τα θηλυκά είναι παρτίδες γεννήτορες (batch spawners), παράγοντας 20.000-80.000 αυγά την ημέρα για μια περίοδο έως και 3 μηνών. Στη Μεσόγειο, η αναπαραγωγή πραγματοποιείται από τον Οκτώβριο έως τον Δεκέμβριο. Τα αυγά είναι σφαιρικά και πελαγικά, με διάμετρο ελαφρώς μικρότερη από 1 mm και περιέχουν ένα μεγάλο λιπαρό σταγονίδιο. Το πλαγκτονικό στάδιο των προνυμφών διαρκεί περίπου 50 ημέρες σε θερμοκρασίες 17-18°C<sup>18</sup>.

Η γενετική δομή της τσιπούρας έχει μελετηθεί εκτενώς μέσω συστημάτων γονιδίων-ενζύμων, AFLP και μιτοχονδριακού DNA. Πρόσφατα έχουν εντοπιστεί περίπου 25 μικροδορυφορικοί δείκτες, ενώ έχουν αναπτυχθεί επιπλέον 200 μικροδορυφορικοί δείκτες και πάνω από 3.000 ESTs (Expressed Sequence Tags) στο πλαίσιο του ευρωπαϊκού προγράμματος Bridgemap<sup>18</sup>.

Αν και οι πρώτες μελέτες έδειξαν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με την ύπαρξη πανμικτικών ή υποδιαιρεμένων πληθυσμών, νεότερες έρευνες έχουν αποκαλύψει κάποια γεωγραφική διαφοροποίηση. Για παράδειγμα, εντοπίστηκε έντονη διαφοροποίηση μεταξύ πληθυσμών στις ακτές της Τυνησίας, ενώ η γενετική διαφοροποίηση σε ευρύτερη κλίμακα, μεταξύ πληθυσμών του Ατλαντικού και της Μεσογείου, παραμένει χαμηλή αλλά σημαντική<sup>18,23,24</sup>.



Εικόνα 6 Τσιπούρα *Sparus Aurata*<sup>25</sup>

Τέλος, το είδος αυτό είναι ευάλωτο σε διάφορες ασθένειες που επηρεάζουν την υγεία και την οικονομική απόδοση στην υδατοκαλλιέργεια<sup>26</sup>.

#### Βακτηριακές Ασθένειες

- ***Vibrio anguillarum***: Είναι το βακτήριο που ευθύνεται για τη δονακίωση. Τα εξωτερικά συμπτώματα περιλαμβάνουν ερυθρότητα στη βάση των πτερυγίων, στην περιοχή της έδρας, καθώς και εξόφθαλμο. Στο εσωτερικό των ψαριών παρατηρούνται εκτεταμένες αιμορραγίες σε διάφορα όργανα, διογκωμένος σφήνας και υπεραιμία στο έντερο. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρουσιάζονται έλκη σε διάφορα σημεία του σώματος. Η ασθένεια προκαλεί υψηλή θνησιμότητα στους ιχθυοπληθυσμούς<sup>27</sup>.
- ***Photobacterium damsela* subsp. *piscicida***: Είναι το παθογόνο που προκαλεί την παστεριδίαση, η οποία μπορεί να εκδηλωθεί είτε σε οξεία είτε σε χρόνια μορφή. Στην οξεία μορφή της ασθένειας, εμφανίζεται εστιακή νέκρωση στα βράγχια, διόγκωση και σκουρόχρωμος σφήνας, καθώς και υπεραιμία στο ήπαρ. Στη

συνέχεια, σχηματίζονται λευκωπά οζίδια (κοκκιώματα) στα σπλήνα και τους νεφρούς.<sup>28</sup>.

- *Aeromonas hydrophila*: Προκαλεί εκτεταμένες αλλοιώσεις στο δέρμα των ψαριών, ενώ εσωτερικά η νόσος εκδηλώνεται με σηψαιμία, ασκίτη και διάχυτες αιμορραγίες στα περισσότερα ενδοκοιλιακά όργανα.<sup>29</sup>.

#### Παρασιτικές Ασθένειες

- *Sparicotyle chrysophrii*: Επιδρά στα βράγχια, προκαλώντας αναπνευστική δυσφορία<sup>30</sup>.
- *Myxobolus spp.*: Παθογόνα που επηρεάζουν το δέρμα και τα βράγχια<sup>31</sup>.

#### Ιογενείς Ασθένειες

- *Lymphocystis*: Η νόσος οφείλεται σε συγγενική ομάδα των ιριδοϊών από τους οποίους είναι παθογόνος σε ψάρια που ανήκουν στην ίδια οικογένεια ή στο γένος. Η ομάδα των ιών αυτών ονομάζεται ιός λεμφοκύστης. Η κλινική εικόνα υποδηλώνεται με υπόλευκα οζίδια μεμονωμένα είτε σε ομάδες στην επιφάνεια του σώματος ή/και στα εσωτερικά όργανα. Μπορεί να προκαλέσει σοβαρές απώλειες, ειδικά σε νέες ηλικίες ψαριών<sup>32</sup>.

Η πρόληψη και αντιμετώπιση των ασθενειών περιλαμβάνει:

- Εμβολιασμός: Για βασικές βακτηριακές ασθένειες όπως η δονακίωση<sup>28</sup>.
- Βιοασφάλεια: Έλεγχος ποιότητας νερού και περιορισμός της υπερπληθυσμιακής πίεσης<sup>33</sup>.
- Διατροφή: Η χρήση λειτουργικών τροφών με προβιοτικά και αντιοξειδωτικά ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα<sup>18,34</sup>.
- Χρήση μοριακών εργαλείων: Για την έγκαιρη διάγνωση και παρακολούθηση των παθογόνων<sup>18</sup>.

Η κατανόηση της βιολογίας, της γενετικής και της παθολογίας της τσιπούρας είναι κρίσιμη για τη βιωσιμότητα της καλλιέργειας του είδους, καθώς και για την προστασία των φυσικών πληθυσμών.



## 2. Προκλήσεις και Δυναμική Παθογόνων

Οι βακτηριακοί παθογόνοι οργανισμοί αποτελούν σημαντική απειλή για την υγεία των ιχθύων και την παραγωγικότητα της υδατοκαλλιέργειας στη Μεσόγειο. Ιδιαίτερα τα Gram-αρνητικά βακτήρια, τα οποία είναι γνωστά για τη δυνατότητά τους να μεταδίδονται από τα ζώα στον άνθρωπο (ζωονόσα), έχουν αναγνωριστεί ως βασικοί παθογόνοι παράγοντες στους ιχθύες<sup>35</sup>. Οι ασθένειες που προκαλούνται από αυτά τα βακτήρια μπορεί να οδηγήσουν σε σημαντικές απώλειες τόσο για την υγεία των ψαριών όσο και για την οικονομική βιωσιμότητα της βιομηχανίας υδατοκαλλιέργειας<sup>6,36</sup>. Μελέτες έχουν δείξει ότι αυτά τα βακτήρια εντοπίζονται συχνά σε διάφορους τύπους υδατοκαλλιέργειών, γεγονός που αναδεικνύει την ανάγκη για ενισχυμένα μέτρα παρακολούθησης και διαχείρισης των παθήσεων, προκειμένου να διασφαλιστεί η υγεία των ιχθύων και η ασφάλεια των τροφίμων<sup>33</sup>.

Οι βακτηριακές λοιμώξεις μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές επιπτώσεις στη βιωσιμότητα των υδατοκαλλιέργειών<sup>37</sup>. Οι ιχθυοκαλλιέργειες είναι συχνά περιβαλλοντικά πιεσμένες, με περιορισμένους χώρους και αυξημένη πυκνότητα ιχθύων, δημιουργώντας ιδανικές συνθήκες για την εξάπλωση των παθογόνων. Η εντατική παραγωγή και η συνεχής συσσώρευση οργανικών αποβλήτων, σε συνδυασμό με την επαναλαμβανόμενη χρήση αντιβιοτικών, μπορούν να οδηγήσουν σε αντοχή στα αντιβιοτικά και στην αύξηση της ανθεκτικότητας των παθογόνων, γεγονός που καθιστά ακόμα πιο δύσκολη τη διαχείριση των ασθενειών<sup>38</sup>. Η ανάγκη για αποτελεσματικά συστήματα παρακολούθησης και προληπτικά μέτρα είναι πιο επιτακτική από ποτέ για την πρόληψη των βακτηριακών λοιμώξεων.

Μια άλλη πρόκληση που σχετίζεται με τη δυναμική των παθογόνων στη Μεσόγειο είναι η κλιματική αλλαγή. Οι αυξανόμενες θερμοκρασίες του νερού επηρεάζουν τη φυσιολογία των παθογόνων, καθώς και τη συχνότητα και την ένταση των επιδημιών. Τα περισσότερα παθογόνα βακτήρια είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στις θερμοκρασίες, και οι αυξήσεις της θερμοκρασίας του θαλασσινού νερού, που σχετίζονται με την κλιματική αλλαγή, μπορούν να επιταχύνουν την ανάπτυξή τους, καθώς και τη μετάδοσή τους μεταξύ των ιχθύων. Οι αυξημένες θερμοκρασίες δημιουργούν επίσης ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη νέων ασθενειών, με τις ήδη υπάρχουσες να γίνονται πιο ανθεκτικές στις περιβαλλοντικές αλλαγές. Αυτό το φαινόμενο ενδέχεται να οδηγήσει σε υψηλότερη συχνότητα ξεσπάσματος ασθενειών, οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν τόσο την ποσότητα όσο

και την ποιότητα των ψαριών, επηρεάζοντας τη συνολική παραγωγή της υδατοκαλλιέργειας<sup>5</sup>.

Η δυναμική των παθογόνων είναι πολύπλοκη και επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η ποιότητα του νερού, η πυκνότητα των ιχθύων και η υγιεινή των εγκαταστάσεων. Συνεπώς, η παρακολούθηση της υγείας των ψαριών και η εκτίμηση της δυναμικής των παθογόνων είναι κρίσιμη για την πρόληψη και τη διαχείριση των επιδημιών στις υδατοκαλλιέργειες. Οι νέες τεχνολογίες, όπως η γενετική ανάλυση και η μοριακή διάγνωση, προσφέρουν δυνατότητες για ταχύτερη και πιο ακριβή ανίχνευση των παθογόνων, επιτρέποντας τη λήψη άμεσων μέτρων πριν την εκδήλωση της ασθένειας<sup>33</sup>.

Αν και οι προκλήσεις που συνδέονται με τις βακτηριακές λοιμώξεις και τις κλιματικές αλλαγές είναι μεγάλες, η ανάπτυξη βιωσιμότερων μεθόδων διαχείρισης και η εφαρμογή προληπτικών στρατηγικών, όπως η χρήση εμβολίων, προβιοτικών και ανοσοδιεγερτικών, μπορεί να συμβάλει στη μείωση των επιπτώσεων αυτών των παραμέτρων στην υδατοκαλλιέργεια. Η αντιμετώπιση αυτών των προκλήσεων απαιτεί συνεχιζόμενη έρευνα και συνεργασία μεταξύ επιστημόνων, ιχθυοκαλλιεργητών και πολιτικών φορέων, προκειμένου να διασφαλιστεί η μακροπρόθεσμη βιωσιμότητα του κλάδου και η προστασία της δημόσιας υγείας.

## **2.1 Διαχείριση, διάγνωση και βιώσιμες πρακτικές *Gram*-αρνητικών παθογόνων στη Μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια**

Η επικράτηση των παθογόνων *Gram*-αρνητικών βακτηρίων στα είδη ψαριών της Μεσογειακής υδατοκαλλιέργειας αποτελεί σημαντική πρόκληση τόσο για την υγεία των ψαριών όσο και για τη σταθερότητα της οικονομίας της βιομηχανίας υδατοκαλλιέργειας. Σημαντικά παθογόνα, όπως η *Aeromonas hydrophila* / *salmonicida*, η *Pasteurella*, το *Photobacterium damsela* και το *Vibrio anguillarum* είναι υπεύθυνα για σοβαρές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης της οξείας αιμορραγικής σηψαιμίας<sup>39</sup>. Αυτοί οι παθογόνοι οργανισμοί ευδοκιμούν σε διάφορα υδάτινα περιβάλλοντα και διακρίνονται σε κινητές μεσόφιλες και ακίνητες ψυχρόφιλες μορφές, γεγονός που δυσχεραίνει τις προσπάθειες διαχείρισης στο πλαίσιο των υδατοκαλλιεργειών<sup>35,40,41</sup>. Η παρουσία των *Gram*-αρνητικών παθογόνων, σε συνδυασμό με την αυξανόμενη εξάρτηση από την υδατοκαλλιέργεια ως πηγή τροφής, αναδεικνύει τη ζωτική σημασία της παρακολούθησης



και διαχείρισης αυτών των βακτηριακών απειλών για τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων και της βιωσιμότητας.

Οι μοριακές και βιοχημικές μέθοδοι έχουν αναδειχθεί ως κρίσιμα εργαλεία για την ανίχνευση αυτών των παθογόνων, συμβάλλοντας στην κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας και της δυναμικής μετάδοσής τους. Τεχνικές όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η πραγματικού χρόνου PCR (real-time PCR) και διάφορες βιοχημικές δοκιμές προσφέρουν τη δυνατότητα ταχείας ταυτοποίησης των λοιμώξεων, γεγονός που είναι ουσιώδες για την έγκαιρη παρέμβαση και θεραπεία<sup>37</sup>. Ωστόσο, παρά τα πλεονεκτήματα αυτών των μεθόδων, εξακολουθούν να υπάρχουν προκλήσεις, όπως τα ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, που υπογραμμίζουν την ανάγκη για συνεχή βελτίωση και επικύρωση των πρωτοκόλλων ανίχνευσης<sup>42</sup>. Αυτές οι προκλήσεις είναι ιδιαίτερα σημαντικές στο περιβάλλον της υδατοκαλλιέργειας, όπου η έγκαιρη και ακριβής διάγνωση αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την πρόληψη της εξάπλωσης των ασθενειών<sup>43</sup>. Επιπλέον, η εμφάνιση ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά μεταξύ των Gram-αρνητικών βακτηρίων προκαλεί έντονη ανησυχία για τις επιπτώσεις στη δημόσια υγεία και την αποτελεσματικότητα των παραδοσιακών θεραπευτικών στρατηγικών. Η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες, συχνά ως προληπτικό μέτρο, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών, τα οποία μπορούν να μεταφερθούν στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας<sup>6</sup>. Αυτό το φαινόμενο υπογραμμίζει την ανάγκη για στροφή προς βιώσιμες πρακτικές διαχείρισης, όπως η χρήση εμβολίων και προβιοτικών, που μπορούν να μειώσουν την εξάρτηση από τα αντιβιοτικά<sup>44</sup>.

Τα εμβόλια παρέχουν μια αποτελεσματική προσέγγιση πρόληψης, μειώνοντας τη θνησιμότητα και τη νοσηρότητα των ψαριών, ενώ τα προβιοτικά προάγουν την υγεία τους, ενισχύοντας τη φυσική τους άμυνα απέναντι στα παθογόνα<sup>6,44</sup>. Παράλληλα, η ανάπτυξη νέων εργαλείων βιοτεχνολογίας, όπως η ανάλυση του μικροβιώματος των υδάτινων οργανισμών, ανοίγει νέους ορίζοντες στην κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ψαριών και των μικροοργανισμών που τα περιβάλλουν. Η ολοκληρωμένη διαχείριση των βακτηριακών απειλών στις υδατοκαλλιέργειες απαιτεί διεπιστημονική προσέγγιση, συνδυάζοντας την προηγμένη τεχνολογία ανίχνευσης με τη βιοασφάλεια και την εφαρμογή βιώσιμων πρακτικών. Μέσω της επένδυσης στην έρευνα και της εφαρμογής καινοτόμων λύσεων, η βιομηχανία της υδατοκαλλιέργειας μπορεί να ενισχύσει τη βιωσιμότητά της, προστατεύοντας τόσο την ανθρώπινη υγεία όσο και το φυσικό περιβάλλον.

Έρευνες δείχνουν ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η ποιότητα του νερού και οι ανθρωπογενείς επιδράσεις, επηρεάζουν σημαντικά την επικράτηση και τη δυναμική των Gram-αρνητικών παθογόνων στις υδατοκαλλιέργειες<sup>35</sup>. Η εντατικοποίηση των πρακτικών υδατοκαλλιέργειας έχει δημιουργήσει περιβάλλοντα υψηλής πυκνότητας, τα οποία ευνοούν την εμφάνιση και την εξάπλωση ασθενειών<sup>6</sup>. Αυτή η εξέλιξη οδηγεί σε σοβαρές οικονομικές απώλειες και επηρεάζει την επισιτιστική ασφάλεια, καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη για τη διαμόρφωση αποτελεσματικών στρατηγικών διαχείρισης<sup>44</sup>.

Η ενίσχυση των συστημάτων παρακολούθησης και η υιοθέτηση ολοκληρωμένων προσεγγίσεων διαχείρισης, που λαμβάνουν υπόψη τις οικολογικές και μικροβιολογικές ιδιαιτερότητες των υδατοκαλλιεργειών, αναδεικνύονται ως ζωτικής σημασίας μέτρα. Η πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παθογόνων, των ξενιστών και του περιβάλλοντος απαιτεί διεπιστημονική έρευνα και καινοτόμες λύσεις που θα διασφαλίσουν τη μακροπρόθεσμη βιωσιμότητα του τομέα.

Καθώς ο τομέας της Μεσογειακής υδατοκαλλιέργειας συνεχίζει να αναπτύσσεται, η αντιμετώπιση της επικράτησης των Gram-αρνητικών παθογόνων αποτελεί κεντρικό ζήτημα για τη διασφάλιση της υγείας των ψαριών, την προστασία της ασφάλειας των τροφίμων και την υποστήριξη των τοπικών οικονομιών. Οι πρόσφατες πρόοδοι στη μοριακή διάγνωση παρέχουν ταχύτητα και ακρίβεια στην ανίχνευση παθογόνων, επιτρέποντας την έγκαιρη παρέμβαση<sup>6</sup>. Παράλληλα, η βαθύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων παθογόνων-ξενιστών-περιβάλλοντος θα αποτελέσει θεμέλιο για την ανάπτυξη στρατηγικών πρόληψης και ελέγχου.

Η διατήρηση της μακροπρόθεσμης βιωσιμότητας των υδατοκαλλιεργειών στη Μεσόγειο εξαρτάται από την ικανότητά μας να αντιμετωπίσουμε αυτές τις προκλήσεις με συνδυασμένες προσπάθειες από την επιστημονική κοινότητα, τις τοπικές αρχές και τη βιομηχανία. Η επένδυση σε τεχνολογίες αιχμής, όπως οι γενετικές αναλύσεις, η μικροβιολογική χαρτογράφηση και τα προηγμένα συστήματα παρακολούθησης, αποτελεί βασικό μοχλό για την ενίσχυση της παραγωγής, την προστασία των φυσικών πόρων και τη βελτίωση της ανθεκτικότητας του κλάδου<sup>35</sup>.

## 2.2 Διαχείριση ασθενειών και υγείας στην Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια

Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι παθογόνα μπορούν να μεταδοθούν μεταξύ άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών σε συστήματα ιχθυοκαλλιέργειας, ιδιαίτερα σε καλλιέργειες με κλωβούς<sup>3</sup>. Αυτή η αμφίδρομη μετάδοση αποτελεί σημαντική πρόκληση, καθώς ορισμένα παθογόνα, όπως μονογενείς παράσιτα, έχουν την ικανότητα να αλλάζουν εύκολα ξενιστή, μεταπηδώντας από άγρια σε εκτρεφόμενα ψάρια και ενισχύοντας έτσι τη μολυσματική τους δράση<sup>3</sup>.

Για να μειωθεί ο κίνδυνος μετάδοσης παθογόνων σε άγριους πληθυσμούς, είναι απαραίτητη η χρήση υψηλής ποιότητας και πιστοποιημένων γόνων<sup>36</sup>. Τα μεγάλα εμπορικά ιχθυογεννητικά κέντρα, τα οποία σχεδόν εξαλείφουν τους παθογόνους παράγοντες, παράγουν γόνους που ελέγχονται αυστηρά για την παρουσία γνωστών παθογόνων, ενώ κάθε παρτίδα συνοδεύεται από κτηνιατρικά πιστοποιητικά<sup>33</sup>. Ωστόσο, οι μικρότερες μονάδες συχνά δεν πληρούν τα απαραίτητα πρότυπα, αυξάνοντας τον κίνδυνο διάδοσης ασθενειών<sup>33</sup>.

Η μετάδοση παθογόνων μεταξύ άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών είναι ακόμα πιο δύσκολο να ελεγχθεί. Η εμφάνιση ασθενειών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως οι συνθήκες εκτροφής, η ευζωία των ψαριών και το στρες που προκαλείται από την πυκνότητα αποθήκευσης, την ποιότητα του νερού, τη διατροφή, τη διαθεσιμότητα οξυγόνου και τους χειρισμούς<sup>36</sup>. Στις μονάδες με κλωβούς, η χρήση αντιβιοτικών θα πρέπει να περιορίζεται, κάτι που μπορεί να επιτευχθεί με τον εμβολιασμό των γόνων ενάντια στους πιο συχνούς παθογόνους παράγοντες<sup>33</sup>.

Στη θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια, οι δύο κύριοι παθογόνοι παράγοντες για το λαβράκι είναι το *Vibrio anguillarum* (που προκαλεί δονακίωση) και το *Photobacterium damsela* (που προκαλεί παστεριδίαση). Και για τις δύο ασθένειες υπάρχουν διαθέσιμα εμβόλια<sup>33</sup>. Ο εμβολιασμός κατά της δονακίωσης εφαρμόζεται συχνά στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των γόνων, ενώ η αντιμετώπιση της παστερέλωσης γίνεται συνήθως κατόπιν ειδικού αιτήματος<sup>3</sup>.

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η νομοθεσία που αφορά τη διαχείριση υγείας στις ιχθυοκαλλιέργειες δεν είναι ομοιογενής στις χώρες της Μεσογείου. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για την αδειοδότηση χημικών ουσιών και προϊόντων υγείας, γεγονός που περιπλέκει περαιτέρω την αποτελεσματική εφαρμογή στρατηγικών διαχείρισης ασθενειών<sup>34</sup>.

Πέρα από τα παραπάνω, είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν καινοτόμες τεχνολογίες και να υιοθετηθούν καλύτερες πρακτικές διαχείρισης. Η βελτίωση των συστημάτων παρακολούθησης και η ενίσχυση της συνεργασίας μεταξύ των χωρών θα συμβάλουν στη μείωση των κινδύνων και θα διασφαλίσουν τη βιωσιμότητα του κλάδου της ιχθυοκαλλιέργειας.

### 2.3 Gram-Αρνητικά Παθογόνα στη Μεσογειακή Υδατοκαλλιέργεια

Η Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους κλάδους της παγκόσμιας αλιείας, παρέχοντας πολύτιμους υδάτινους πόρους και συνεισφέροντας στην οικονομική ανάπτυξη και την επισιτιστική ασφάλεια. Ωστόσο, ο τομέας αυτός αντιμετωπίζει σοβαρές προκλήσεις λόγω της αυξανόμενης εμφάνισης λοιμωδών νοσημάτων, με τα Gram-αρνητικά παθογόνα να αποτελούν κύριους παράγοντες που απειλούν την υγεία των εκτρεφόμενων ειδών <sup>45</sup>. Βακτήρια όπως τα *Vibrio*, *Pasteurella*, *Aeromonas*, και *Photobacterium damsela*, έχουν συνδεθεί με σοβαρές ασθένειες που προκαλούν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας και σημαντικές οικονομικές απώλειες <sup>44</sup>.

Τα συγκεκριμένα παθογόνα χαρακτηρίζονται από εξελιγμένους μηχανισμούς παθογένειας, οι οποίοι περιλαμβάνουν την παραγωγή τοξινών, την ενεργοποίηση συστημάτων έκκρισης και την ικανότητα αποφυγής των ανοσολογικών αντιδράσεων του ξενιστή. Τα *Vibrio* είναι υπεύθυνα για σοβαρές μορφές σηψαιμίας, ενώ το *Photobacterium damsela* προκαλεί νεκρωτικές αλλοιώσεις στους ιστούς. Τα είδη *Aeromonas* είναι γνωστά για τη σηψαιμία, ενώ η *Pasteurella* σχετίζεται με λοιμώξεις του αίματος και βλάβες στα ζωτικά όργανα <sup>6</sup>.

Η εντατικοποίηση της παραγωγής στις ιχθυοκαλλιέργειες δημιουργεί περιβάλλοντα υψηλής πυκνότητας, τα οποία ευνοούν τη μετάδοση αυτών των παθογόνων και την εμφάνιση επιδημιών. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία του νερού, η ποιότητα του περιβάλλοντος και οι ανθρωπογενείς παρεμβάσεις, συμβάλλουν στην εξάπλωση και την παθογένεια αυτών των οργανισμών.

Η αντιμετώπιση των Gram-αρνητικών παθογόνων στη Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια απαιτεί πολυδιάστατες προσεγγίσεις, συνδυάζοντας τη χρήση μοριακών διαγνωστικών εργαλείων, τη χορήγηση εμβολίων και προβιοτικών, και την εφαρμογή βιώσιμων πρακτικών διαχείρισης. Καθώς η βιομηχανία συνεχίζει να επεκτείνεται, η ανάπτυξη και εφαρμογή ολοκληρωμένων στρατηγικών για την πρόληψη και έλεγχο αυτών των λοιμώξεων είναι ζωτικής σημασίας για τη διασφάλιση της βιωσιμότητας του κλάδου, την προστασία των οικοσυστημάτων και την παροχή ασφαλών και ποιοτικών τροφίμων.

### 2.3.1 Λοιμώξεις από *Vibrio spp.* στην Υδατοκαλλιέργεια

Τα βακτήρια του γένους *Vibrio* είναι αρνητικά κατά Gram και συναντώνται ευρέως σε θαλάσσια και παράκτια οικοσυστήματα καθώς και σε περιβάλλοντα υδατοκαλλιέργειας. Στην **Εικόνα 7** απεικονίζονται εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) ελήφθησαν για τα κύτταρα που υπήρχαν στο αρχικό εμβόλιο (μάρτυρας), καθώς και για εκείνα που επώαστηκαν στους 30°C για 3, 6 και 21 ημέρες, αντίστοιχα αποικία του *Vibrio harveyi* που επώαστηκαν σε θαλασσινό νερό στους 30°C<sup>46</sup>. Αποτελούν σημαντικό μέρος της μικροχλωρίδας αυτών των οικοσυστημάτων, αλλά περιλαμβάνουν και σοβαρούς παθογόνους παράγοντες για τα ζώα που εκτρέφονται στην υδατοκαλλιέργεια. Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από *Vibrio spp.* (γνωστές ως δονακίωση) είναι από τις πιο διαδεδομένες ασθένειες που πλήττουν ψάρια και άλλους οργανισμούς υδατοκαλλιέργειας παγκοσμίως, οδηγώντας σε σημαντική θνησιμότητα<sup>47</sup>.

Τα σημαντικότερα είδη του γένους *Vibrio* που σχετίζονται με ασθένειες είναι τα *V. harveyi* (**Εικόνα 8**), *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* και *V. splendidus*. Τα συγκεκριμένα είδη είναι συχνά υπεύθυνα για λοιμώξεις σε γαρίδες και ψάρια: *V. harveyi*: Συνδέεται με τη λαμπυρίζουσα βιβρίωση στις γαρίδες *Litopenaeus vannamei* και *Penaeus monodon*. Είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας μαζικής θνησιμότητας στις *P. monodon*. *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, και *V. vulnificus*: Εντοπίζονται ως σημαντικοί παθογόνοι παράγοντες σε διάφορα είδη ψαριών, συμπεριλαμβανομένης της τσιπούρας (*Sparus aurata*)<sup>48</sup>. Στην **Εικόνα 9** παρουσιάζεται η κλινική εικόνα από τσιπούρα (*Sparus aurata*) και από λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*). Συγκεκριμένα στο (Α) απεικονίζονται γόνιμοι τσιπούρας που μολύνθηκαν φυσικά, στο (Β) νεαρά λαβράκια με φυσική μόλυνση, εμφανίζοντας διάταση της κοιλιακής χώρας, στο (C) λαβράκι με φυσική μόλυνση, εμφανίζοντας αιμορραγίες στη βάση του θωρακικού περυγίου, γύρω από το στόμα και την καλυπτήρια χώρα (operculum), στο (D) λαβράκι με φυσική μόλυνση, εμφανίζοντας κοιλιακή διάταση, στο (Ε) τσιπούρα με φυσική μόλυνση, εμφανίζοντας σοβαρή εξέλκωση του δέρματος και του μυϊκού ιστού, στο (F) λαβράκι με φυσική μόλυνση, εμφανίζοντας φλεγμονή της κολυμβητικής κύστης και πάχυνση του τοιχώματός της, (G) νεαρό λαβράκι με φυσική μόλυνση, εμφανίζοντας ωχρότητα στα βράγχια και υπερβολική έκκριση βλέννας, (H) νεαρή τσιπούρα με φυσική μόλυνση,

εμφανίζοντας βράγχια με υπερβολική έκκριση βλέννας και (Ι) λαβράκι με φυσική μόλυνση, εμφανίζοντας συμφορημένο σπλήνα και νεφρό<sup>49</sup>.

Η μόλυνση από *Vibrio spp.* στα ψάρια αρχίζει συνήθως με τη διείσδυση του βακτηρίου στους ιστούς του ξενιστή, κυρίως μέσω χημειοτακτικής δραστηριότητας. Στη συνέχεια, τα βακτήρια αναπτύσσουν ένα σύστημα δέσμευσης σιδήρου που τους επιτρέπει να πολλαπλασιαστούν και να προκαλέσουν βλάβη στους ιστούς του ξενιστή μέσω εξωκυτταρικών προϊόντων, όπως αιμολυσίνες και πρωτεάσες<sup>50</sup> (Εικόνα 7).

Στην περίπτωση της τσιπούρας, μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε υπερέκκριση βλέννας και θρόμβους αίματος σε ψάρια που είχαν μολυνθεί από *V. harveyi*<sup>50</sup>. Η έρευνα κατέληξε ότι τα συμπτώματα αυτά οφείλονταν στη δραστηριότητα της αιμολυσίνης<sup>50</sup>. Άλλα κοινά συμπτώματα της δονακίωσης περιλαμβάνουν:

- Εντερική νέκρωση
- Αναιμία
- Συσσώρευση ασκητικού υγρού
- Πετέχειες στους μυϊκούς ιστούς
- Υγρό στην ουροδόχο κύστη

Η κατανόηση του παθογόνου δυναμικού των θαλάσσιων *Vibrio spp.* και των μηχανισμών που προκαλούν ασθένεια παραμένει σημαντική πρόκληση. Πρόσφατες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει το ναυπλιό της *Artemia* ως απλό μοντέλο μελέτης λόγω της δυνατότητας καλλιέργειάς του υπό γνοτοβιοτικές συνθήκες<sup>48,50</sup>.

Οι τεχνικές για τη μελέτη του αποικιστικού δυναμικού των *Vibrio spp.* περιλαμβάνουν:

- Χρήση κυτταρικών σειρών.
- Άμεση παρατήρηση μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης.
- Χρήση παθογόνων στελεχών *Vibrio* σημασμένων με φθορίζουσα χρωστική για παρατήρηση *in vivo*.

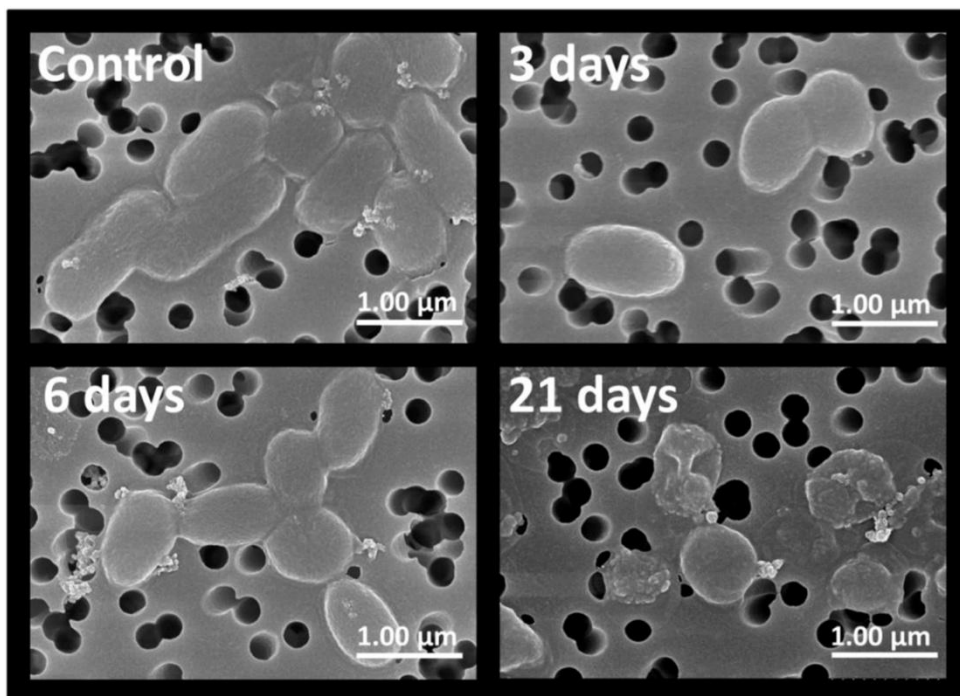
Η διαχείριση των λοιμώξεων από *Vibrio spp.* βασίζεται σε ολοκληρωμένες στρατηγικές, όπως:

- Βιοασφάλεια: Βελτίωση των συνθηκών του νερού και της διατροφής.
- Εμβολιασμοί: Ανάπτυξη εμβολίων για την προστασία από συγκεκριμένα στελέχη.
- Χρήση προβιοτικών: Για την ενίσχυση του μικροβιώματος και την αναστολή της ανάπτυξης παθογόνων.

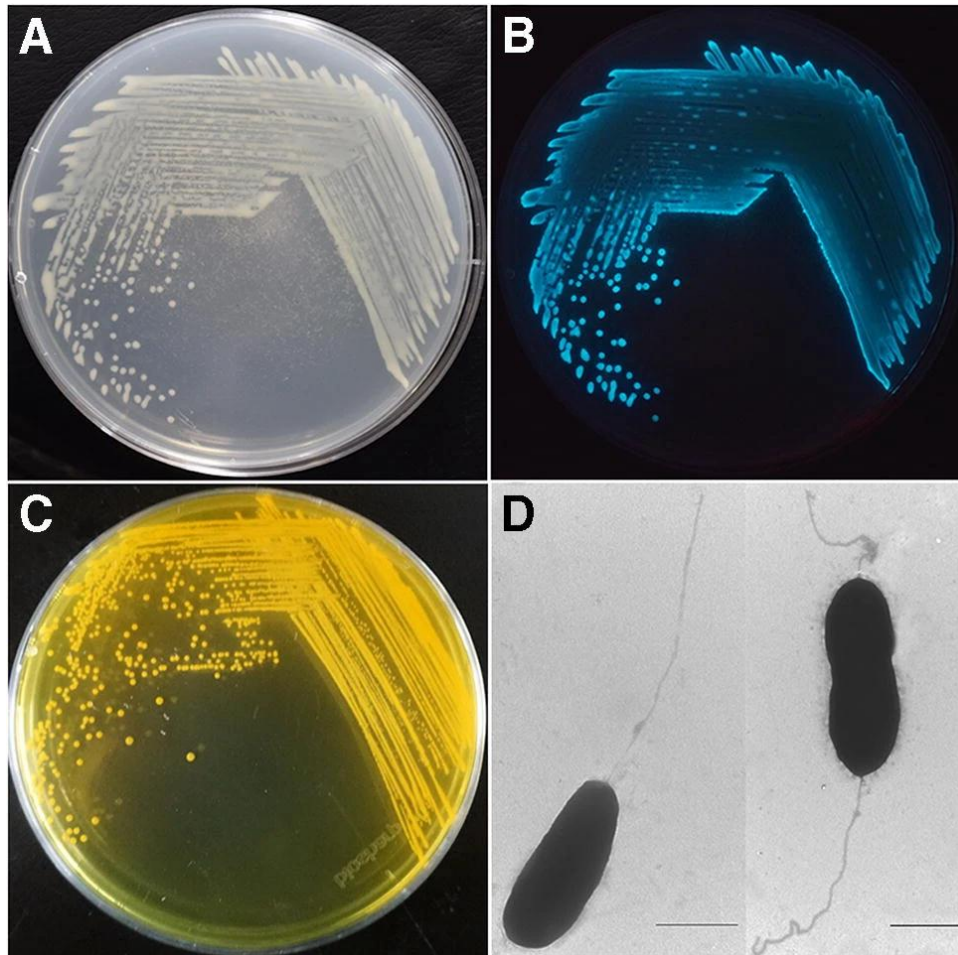


- Γενετική ανθεκτικότητα: Μελέτες για την επιλογή γενετικά ανθεκτικών πληθυσμών ψαριών και γαρίδων.

Η συνεχής έρευνα για τον εντοπισμό νέων παθογόνων και η ανάπτυξη τεχνολογιών ανίχνευσης είναι απαραίτητες για τη μείωση της θνησιμότητας και τη βελτίωση της παραγωγικότητας στην υδατοκαλλιέργεια.

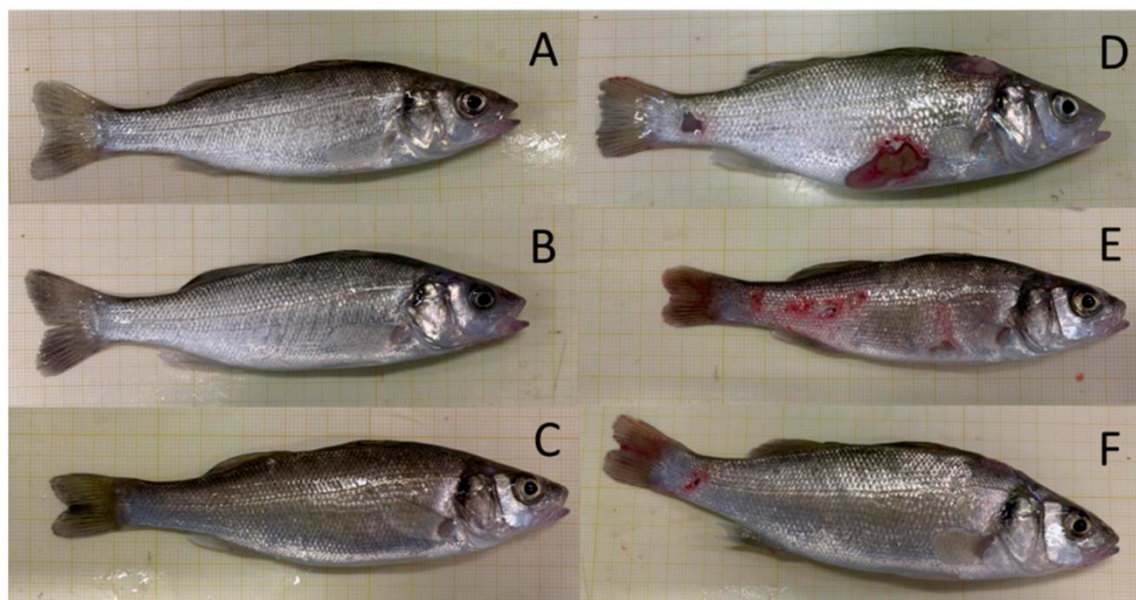


**Εικόνα 7:** Αποικίες *Vibrio harveyi* σε προσομοίωση φυσικού περιβάλλοντος<sup>46</sup>



**Εικόνα 8 :** Μορφολογία των στελεχών του *Vibrio harveyi*. **a** Ανάπτυξη του *V. harveyi* VIB 391 σε θαλάσσιο άγαρ 2216E. **b** Βιοφωταύγεια του *V. harveyi* VIB 391. **c** Ανάπτυξη του *V. harveyi* VIB 645 σε άγαρ TCBS. **d** Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετάδοσης (TEM) των κυττάρων του VIB 645 που προήλθαν από καλλιέργεια σε θαλάσσιο νερό. Κλίμακα = 1  $\mu\text{m}$ .<sup>51</sup>





Εικόνα 9: Μακροσκοπική εικόνα από τσιπούρες και λαβράκια μολυσμένα με *Vibrio harveyi*<sup>49</sup>

### 2.3.2 Λοιμώξεις από *Pasteurella* spp. στην Υδατοκαλλιέργεια

Τα βακτήρια του γένους *Pasteurella* είναι αρνητικά κατά Gram, μικρά, αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια (Εικόνα 10). Πρόκειται για παθογόνους μικροοργανισμούς που σχετίζονται με λοιμώξεις τόσο σε χερσαίους όσο και σε υδρόβιους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών. Στην υδατοκαλλιέργεια, τα είδη *Pasteurella* έχουν συνδεθεί με σοβαρές ασθένειες που προκαλούν σημαντικές οικονομικές απώλειες<sup>52</sup>.

Τα κύρια είδη του γένους που σχετίζεται με την υδατοκαλλιέργεια είναι το *Pasteurella skyensis* και *multocida* (Εικόνα 11). Το βακτήριο αυτό έχει εντοπιστεί ως αιτιολογικός παράγοντας της παστερέλλωσης, μιας βακτηριακής ασθένειας που επηρεάζει διάφορα είδη ψαριών, όπως η τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*)<sup>53</sup>.

Η παστερέλλωση είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας στη Μεσόγειο, ενώ περιστατικά έχουν αναφερθεί και σε περιοχές με έντονη καλλιέργεια ψαριών, όπως η Ελλάδα, η Ισπανία και η Ιταλία<sup>53</sup>.

Τα συμπτώματα και η κλινική εικόνα των ψαριών που προσβάλλονται από *Pasteurella* spp. παρουσιάζουν (Εικόνα 12):

- Έλκη στο δέρμα και αιμορραγικές αλλοιώσεις.
- Διόγκωση κοιλότητας (ασκίτης).
- Αιμορραγίες στα βράγχια, στο ήπαρ και στους μυϊκούς ιστούς.

- Εξέλκωση ή αποχρωματισμό των ιστών.
- Νευρολογικές διαταραχές, όπως ασυντόνιστες κινήσεις ή απώλεια προσανατολισμού.

Η θνησιμότητα μπορεί να φτάσει σε πολύ υψηλά ποσοστά, ειδικά σε περιόδους αυξημένου στρες για τα ψάρια (π.χ. λόγω μεταβολών θερμοκρασίας ή κακής ποιότητας νερού)<sup>54</sup>.

Η *Pasteurella spp.* μεταδίδεται κυρίως μέσω της επαφής με μολυσμένο νερό, εξοπλισμό ή άλλα ψάρια. Παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο μόλυνσης περιλαμβάνουν<sup>52,53</sup>:

- Υψηλή πυκνότητα ψαριών σε κλωβούς.
- Κακή ποιότητα νερού και υψηλά επίπεδα αμμωνίας ή οργανικών υλικών.
- Μεταβολές θερμοκρασίας που αποδυναμώνουν το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών.

Η διάγνωση της ασθένειας βασίζεται<sup>54</sup>:

- Στην απομόνωση και καλλιέργεια του βακτηρίου από προσβεβλημένους ιστούς.
- Στη χρήση μοριακών τεχνικών, όπως PCR, για την ταυτοποίηση του *Pasteurella spp.*.
- Σε μικροσκοπική εξέταση βιοψιών ή ιστοπαθολογικών δειγμάτων.

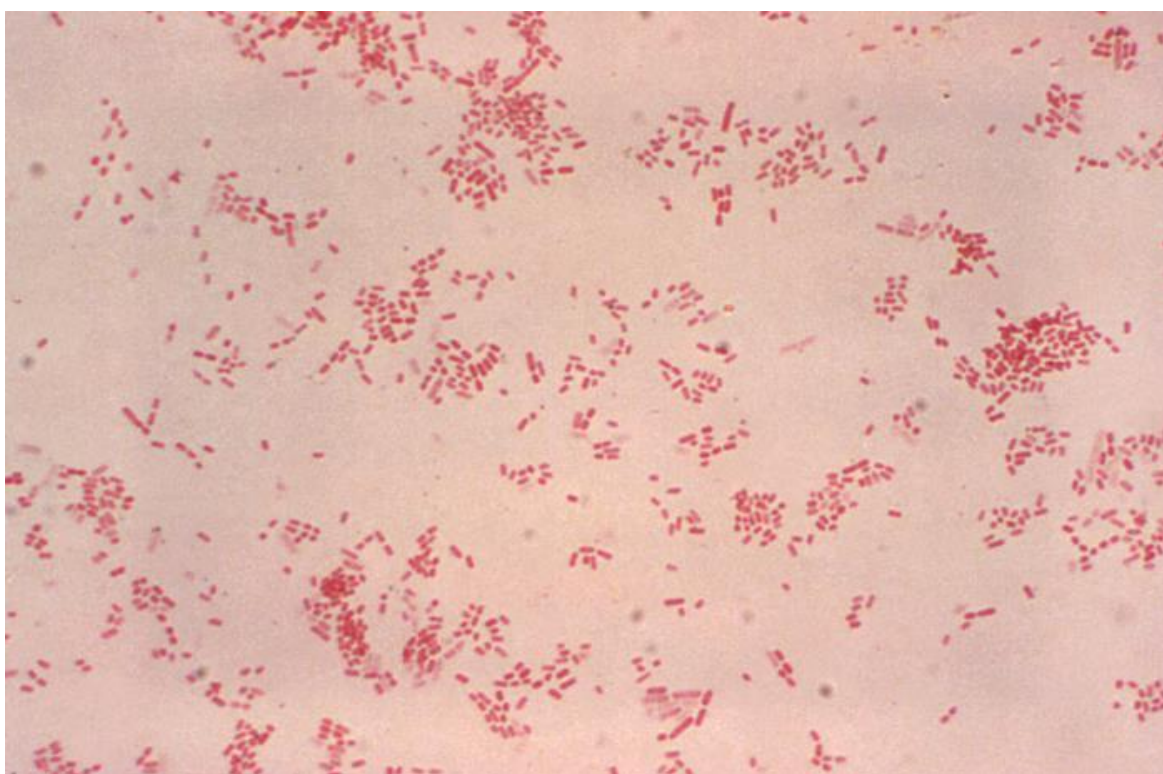
Η πρόληψη και αντιμετώπιση των λοιμώξεων από *Pasteurella spp.* απαιτεί την εφαρμογή μέτρων βιοασφάλειας και διατήρηση υγιεινών συνθηκών καλλιέργειας<sup>6</sup>.

Ενδεικτικά:

- Διαχείριση Περιβάλλοντος:
- Διατήρηση καλής ποιότητας νερού με τακτική αλλαγή ή καθαρισμό.
- Μείωση της οργανικής ύλης στις δεξαμενές.
- Εμβολιασμοί: Η ανάπτυξη εμβολίων για την *Pasteurella skyensis* είναι σε εξέλιξη και αναμένεται να συμβάλει στην πρόληψη.
- Αντιβιοτική Θεραπεία: Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία, αλλά η αλόγιστη χρήση τους πρέπει να αποφεύγεται για την πρόληψη της ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών.
- Χρήση Προβιοτικών: Ενίσχυση της ανοσολογικής άμυνας των ψαριών μέσω διατροφικών συμπληρωμάτων.

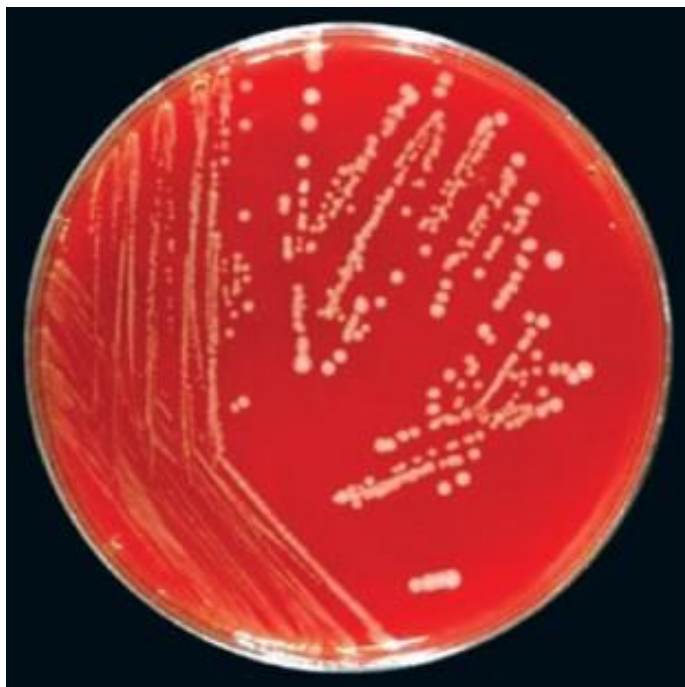
- Μείωση Στρες: Αποφυγή υπερπληθυσμού και απότομων αλλαγών στις συνθήκες του νερού.

Η παστερέλλωση που προκαλείται από *Pasteurella spp.* αποτελεί σημαντική απειλή για την υδατοκαλλιέργεια ειδικά την Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια, με σημαντικές επιπτώσεις στην παραγωγικότητα και την οικονομία του κλάδου. Η συνεχής έρευνα για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων διάγνωσης, πρόληψης και θεραπείας είναι ζωτικής σημασίας για τη βιώσιμη ανάπτυξη του κλάδου.

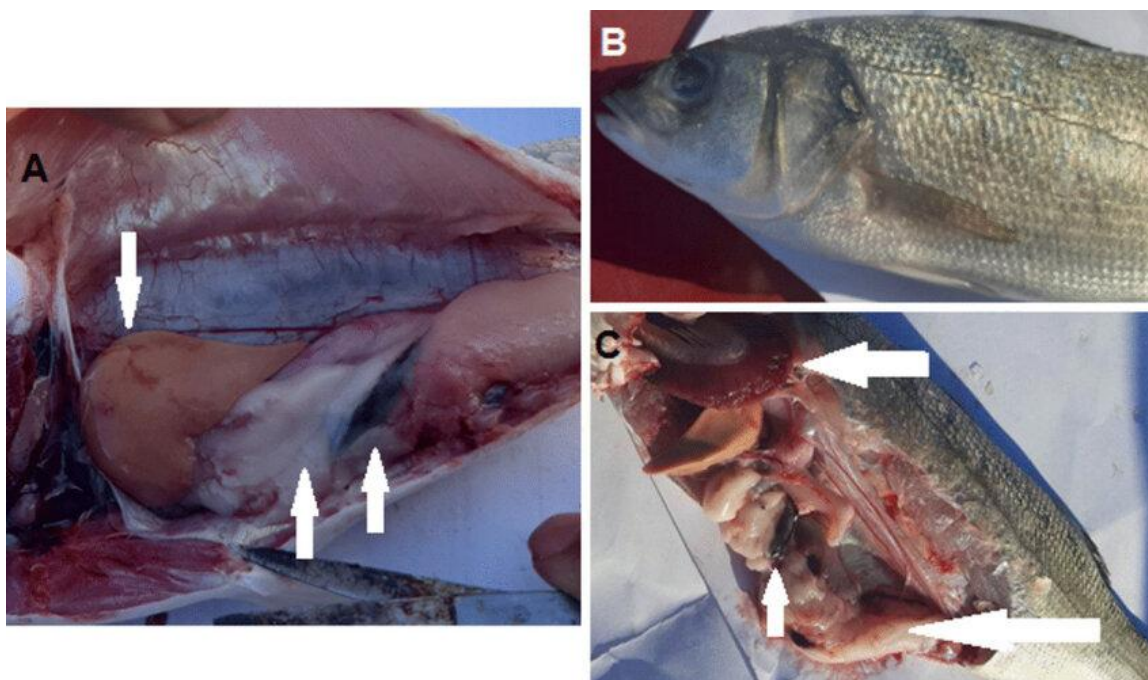


**Εικόνα 10:** Φωτομικρογραφία ενός δείγματος με κατά Gram χρώση, πολυάριθμων Gram-αρνητικών βακτηρίων *Pasteurella dagmatis*<sup>55</sup>





Εικόνα 11 : Τυπική εμφάνιση αποικιών *Pasteurella multocida* σε άγαρ αίματος<sup>56</sup>



Εικόνα 12 : Κλινικά σημεία και μεταθανάτια ευρήματα σε εκτρεφόμενα λαβράκια μολυσμένα με *Pasteurella anguilliseptica*. (Α) Τα βέλη υποδεικνύουν αιμορραγίες στο ήπαρ, στις εσωτερικές επιφάνειες του κοιλιακού λίπους και σπληνομεγαλία. (Β) Απώλεια οφθαλμού. (C) Βράγχια με ωχρή ερυθρή απόχρωση και σπληνομεγαλία<sup>57</sup>.

### 2.3.3 Λοιμώξεις από *Aeromonas* στην Υδατοκαλλιέργεια

Τα βακτήρια του γένους *Aeromonas* είναι Gram-αρνητικά, ευκαιριακά παθογόνα που απαντώνται ευρέως σε υδάτινα περιβάλλοντα (**Εικόνα 13**). Τα κυριότερα παθογόνα είδη που επηρεάζουν την υδατοκαλλιέργεια είναι το *Aeromonas hydrophila* και το *Aeromonas salmonicida*. Αυτά τα είδη προκαλούν σοβαρές ασθένειες στα ψάρια, οδηγώντας σε υψηλή θνησιμότητα και σημαντικές οικονομικές απώλειες στον κλάδο της υδατοκαλλιέργειας<sup>39,41</sup>.

Τα παθογόνα αυτά είναι διαδεδομένα σε υδάτινα περιβάλλοντα και ταξινομούνται σε δύο κύριες ομάδες. Η πρώτη αποτελείται από κινητά, μεσόφιλα αερομονάδες, οι οποίες ευδοκιμούν σε θερμοκρασίες γύρω στους 37°C. Η δεύτερη περιλαμβάνει ακίνητες, ψυχρόφιλες μορφές, που προτιμούν χαμηλότερες θερμοκρασίες, κυρίως μεταξύ 22–28°C. Η διαφοροποίηση αυτή επιτρέπει στα παθογόνα να προσαρμόζονται σε ποικίλα περιβαλλοντικά πλαίσια, αυξάνοντας τη δυσκολία αντιμετώπισής τους<sup>35,40</sup>.

Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά οι παθογόνοι μηχανισμοί και η κλινική εικόνα από παθογόνα στελέχη *Aeromonas*. Το *A. hydrophila* προκαλεί την οξεία αιμορραγική σηψαιμία, μια σοβαρή συστηματική λοίμωξη που επηρεάζει τα ψάρια<sup>58</sup>. Τα κλινικά συμπτώματα είναι (**Εικόνα 14**):

- Αιμορραγίες στο δέρμα και στα βράγχια.
- Έλκη και φλεγμονές στους μυϊκούς ιστούς.
- Διόγκωση των κοιλιακών κοιλοτήτων (ασκίτης).
- Σημάδια σήψης και αποσύνθεσης.

Το *A. salmonicida* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της φουρουγκουλόσης, μιας ασθένειας που επηρεάζει κυρίως ψυχρόφιλα είδη ψαριών, όπως ο σολομός και η πέστροφα.

Τα κλινικά συμπτώματα είναι :

- Υποδόρια οζίδια και φλεγμονώδεις αλλοιώσεις.
- Νέκρωση στα εσωτερικά όργανα.
- Υψηλή θνησιμότητα σε συνθήκες στρες.
- Περιβαλλοντική Ανθεκτικότητα και Μετάδοση

Η μετάδοση γίνεται μέσω μολυσμένου νερού, τροφής, ή επαφής με μολυσμένα ψάρια. Ο υπερπληθυσμός και η κακή ποιότητα νερού αυξάνουν τον κίνδυνο εξάπλωσης<sup>59</sup>.

Η διάγνωση των Λοιμώξεων από *Aeromonas* βασίζεται σε:

- Καλλιέργεια και ταυτοποίηση: Απομόνωση του παθογόνου από μολυσμένα δείγματα (π.χ. δέρμα, βράγχια, εσωτερικά όργανα).
- Μοριακές τεχνικές: Χρήση PCR για την ανίχνευση συγκεκριμένων γονιδίων του *Aeromonas spp.*
- Ιστοπαθολογική ανάλυση: Παρατήρηση νεκρωτικών βλαβών σε ιστούς.

Συνοπτικά τα μέτρα πρόληψης και αντιμετώπισης είναι<sup>60</sup>:

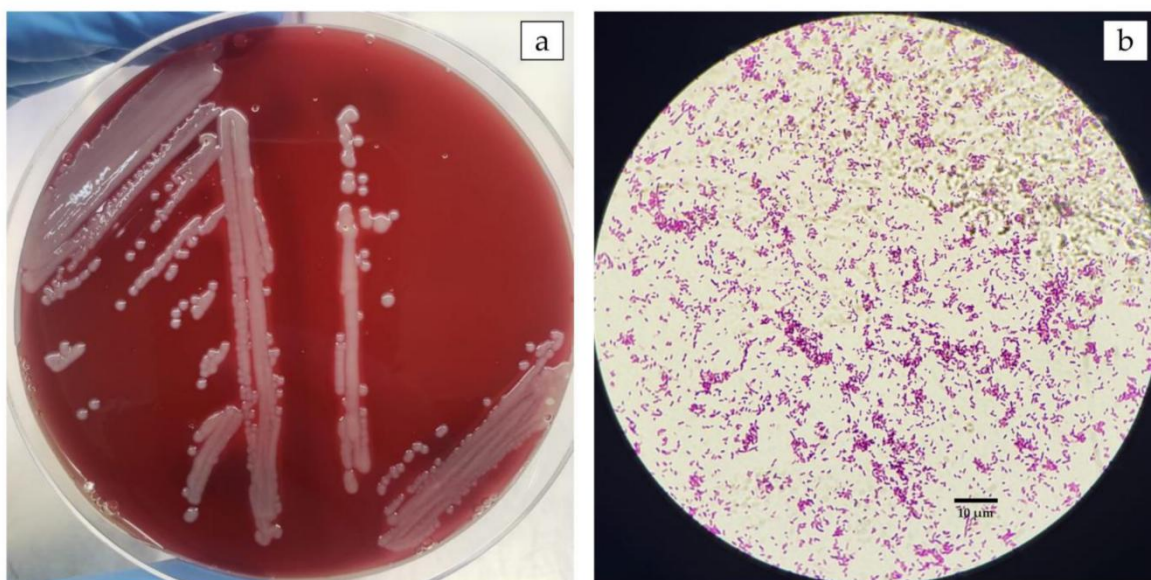
Βιοασφάλεια: Μείωση του υπερπληθυσμού και διατήρηση καλής ποιότητας νερού, καθαρισμός και απολύμανση των δεξαμενών και εξοπλισμού και τακτικός έλεγχος των ψαριών για ενδείξεις μόλυνσης.

Εμβολιασμός: Αναπτύσσονται εμβόλια για την πρόληψη της φουρουγκουλόσης και άλλων λοιμώξεων που προκαλούνται από *Aeromonas spp.*

Χρήση Αντιβιοτικών: Τα αντιβιοτικά μπορούν να είναι αποτελεσματικά για τη θεραπεία, αλλά η υπερβολική χρήση τους μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών.

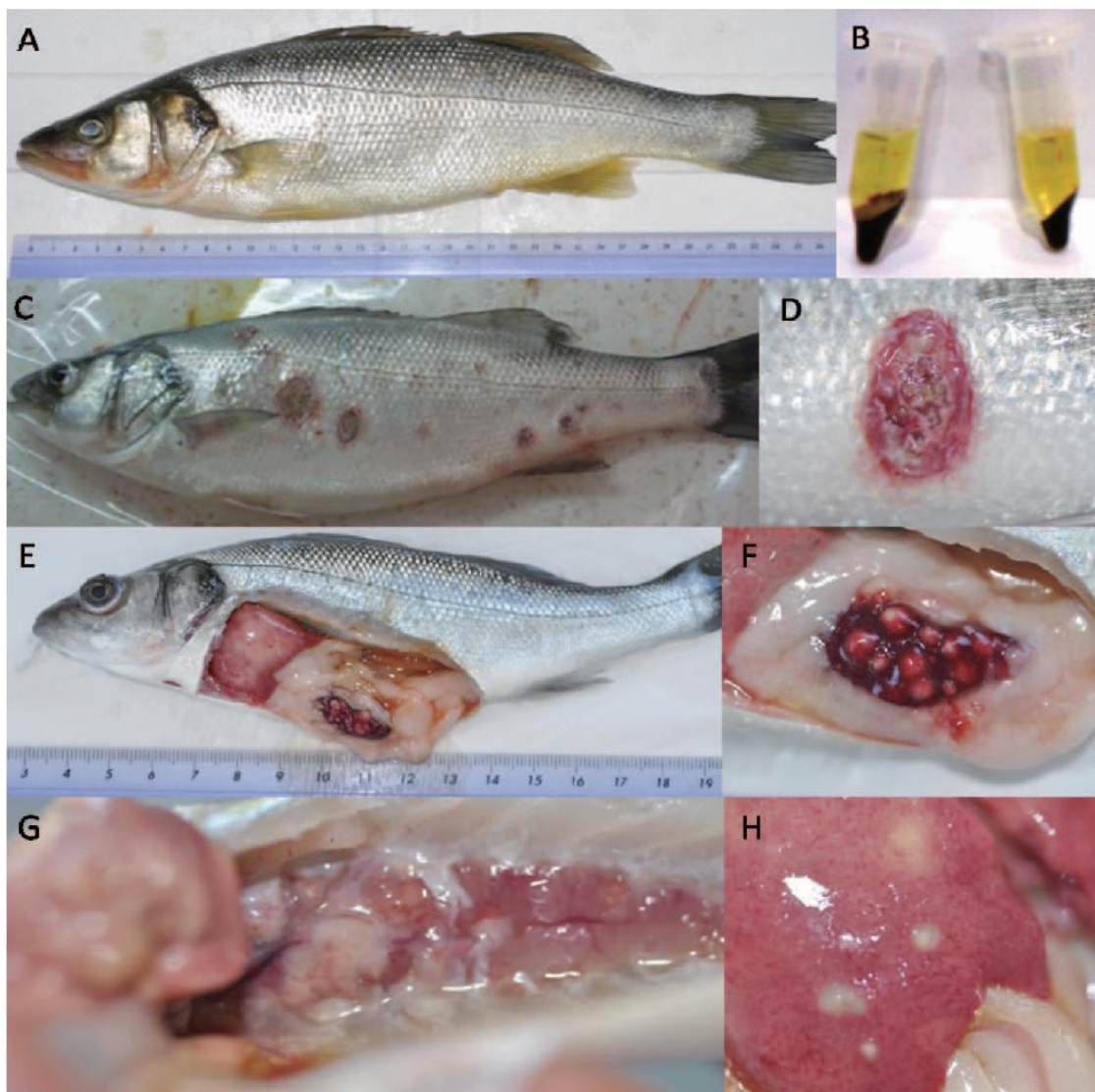
Προβιοτικά και Ενισχυτές Ανοσίας: Η χορήγηση προβατικών ενισχύει την ανοσολογική αντίσταση των ψαριών και μειώνει τον κίνδυνο λοιμώξεων.

Οι λοιμώξεις από *Aeromonas spp.* αποτελούν σημαντική απειλή για την υδατοκαλλιέργεια, ιδιαίτερα στη Μεσόγειο. Η ανάπτυξη ολοκληρωμένων στρατηγικών πρόληψης και θεραπείας, που συνδυάζουν τη βιοασφάλεια, τη χρήση εμβολίων, και τη σωστή διαχείριση των συνθηκών καλλιέργειας, είναι κρίσιμη για τη βιώσιμη ανάπτυξη της βιομηχανίας. Η παρουσία αυτών των παθογόνων στις υδατοκαλλιέργειες έχει σοβαρές συνέπειες, τόσο για την παραγωγή όσο και για τη βιωσιμότητα του τομέα. Η κατανόηση της συμπεριφοράς και της οικολογικής τους προσαρμοστικότητας αποτελεί κρίσιμο βήμα για την ανάπτυξη στρατηγικών διαχείρισης που θα διασφαλίσουν την υγεία των ψαριών και την προστασία της οικονομικής απόδοσης της βιομηχανίας. Η περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών παθογένειας και της ανθεκτικότητας αυτών των μικροοργανισμών στις υδάτινες συνθήκες είναι απαραίτητη για την πρόληψη της εξάπλωσής τους και τη βελτίωση της συνολικής υγειονομικής κατάστασης των ιχθυοκαλλιεργειών<sup>61</sup>.



**Εικόνα 13** Μορφολογικά χαρακτηριστικά του *Aeromonas veronii* που απομονώθηκε από επιδημία νόσου σε εκτροφή Νείλου τιλάπιας στη Βραζιλία. **(α)** Καλλιέργεια βακτηρίων σε άγαρ ΒΗΙ από ιστούς μολυσμένων ψαριών που συλλέχθηκαν στο πεδίο. Παρουσία αποικιών με μέγεθος κεφαλής καρφίτσας, ημιδιαφανών, κιτρινωπών και πεπλατυσμένων. **(β)** Gram-αρνητικοί βάκκοι υπό οπτικό μικροσκόπιο (κλίμακα 10 μm)<sup>62</sup>.





**Εικόνα 14 :** Μορφολογικά χαρακτηριστικά *Aeromonas spp* που απομονώθηκε από επιδημία νόσου σε εκτροφή λαβρακιού. **A)** Ίκτερος στην εμφάνιση των προσβεβλημένων ψαριών. **B)** Κίτρινο χρώμα του ορού αίματος, υποδηλώνοντας ηπατική βλάβη. **C)** Ευρωπαϊκό λαβράκι με ελκωτικές αλλοιώσεις στην επιδερμίδα. **D)** Ελκωτική επιδερμική αλλοίωση με ορατή κοκκιωματώδη αντίδραση. **E)** Σπληνομεγαλία σε μολυσμένο ευρωπαϊκό λαβράκι. **F)** Πολλά λευκωπά οζίδια εμφανή μακροσκοπικά στον σπλήνα. **G)** Διόγκωση νεφρού με εστιακή νέκρωση. **H)** Νεκρωτικές εστίες στο ήπαρ. Όλες οι εικόνες προέρχονται από φυσικά μολυσμένα ψάρια<sup>63</sup>.



#### 2.3.4 Λοιμώξεις από *Photobacterium damsela* στην Υδατοκαλλιέργεια

Το *Photobacterium damsela* είναι ένα Gram-αρνητικό, ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο, που ανήκει στην οικογένεια *Vibrionaceae* (Εικόνα 15 & 16). Είναι ευρέως διαδεδομένο σε θαλάσσια και υφάλμυρα οικοσυστήματα και αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους αιτιολογικούς παράγοντες ασθενειών στην υδατοκαλλιέργεια, επηρεάζοντας ιδιαίτερα τα μεσογειακά είδη ψαριών, όπως το και την τσιπούρα. Το βακτήριο διακρίνεται σε δύο υποείδη: το *P. damsela subsp. piscicida* και το *P. damsela subsp. damsela*, τα οποία ευθύνονται για διαφορετικές ασθένειες<sup>64,65</sup>.

Το στέλεχος *Photobacterium damsela subsp. piscicida* είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας της ψιδοκυττάρωσης (Photobacteriosis), μια συστηματική βακτηριακή λοίμωξη που προκαλεί υψηλή θνησιμότητα σε ψάρια<sup>66</sup>.

Τα κλινικά συμπτώματα της ψιδοκυττάρωσης είναι (Εικόνα 17):

- Σκοτεινό χρωματισμό του σώματος.
- Λήθαργο και ανορεξία.
- Εμφάνιση λευκών οζιδίων στα εσωτερικά όργανα (π.χ. σπλήνα, νεφρά, ήπαρ).
- Ασκίτη (διόγκωση της κοιλιάς λόγω συσσώρευσης υγρού).

Το στέλεχος *Photobacterium damsela subsp. damsela* προκαλεί νεκρωτική σήψη και δερματικά έλκη, ενώ σε ανθρώπους μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές δερματικές λοιμώξεις μέσω επαφής με μολυσμένο νερό ή ψάρια<sup>67</sup>.

Τα κλινικά συμπτώματα της λοίμωξης είναι:

- Δερματικά έλκη και αιμορραγίες.
- Σήψη και νεκρωτικές αλλοιώσεις στους μυϊκούς ιστούς.
- Θνησιμότητα σε σοβαρές περιπτώσεις.

Η λοιμογόνος δράση του *P. damsela* οφείλεται σε πολλούς παράγοντες παθογένειας, όπως:

- Εξωκυτταρικές τοξίνες: Ηπατοτοξίνες και αιμολυσίνες που καταστρέφουν τους ιστούς του ξενιστή.
- Σύστημα πρόσληψης σιδήρου: Το βακτήριο χρησιμοποιεί συστήματα σιδηροφόρων για την εξασφάλιση σιδήρου από τον ξενιστή, κρίσιμου για την επιβίωσή του.

- Κάψα πολυσακχαριτών: Ενισχύει την αντοχή του βακτηρίου στην φαγοκυττάρωση από το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών<sup>64</sup>.

Η διάγνωση της λοίμωξης μπορεί να πραγματοποιηθεί με καλλιέργεια και ταυτοποίηση. Το βακτήριο καλλιεργείται σε θρεπτικά υλικά, όπως το θαλασσινό άγαρ, και ταυτοποιείται με βιοχημικές δοκιμές ή μοριακές τεχνικές (PCR). Η μικροσκοπική ανάλυση είναι επίσης ένα εργαλείο διάγνωσης όπου παρατηρούνται χαρακτηριστικές βλάβες στα εσωτερικά όργανα, καθώς και η παρουσία οζιδίων με βακτήρια εντός τους<sup>64</sup>.

Η χρήση της PCR για την ανίχνευση ειδικών γονιδίων του *P. damsela* παρέχει ακριβή και ταχεία διάγνωση<sup>65</sup>.

Το *P. damsela* μεταδίδεται κυρίως μέσω<sup>66,67</sup>:

- Μολυσμένου νερού: Το βακτήριο ευδοκimeί σε θερμοκρασίες 20–25°C, που είναι συνηθισμένες στις μεσογειακές θάλασσες.
- Επαφής με μολυσμένα ψάρια: Ο υπερπληθυσμός στις ιχθυοκαλλιέργειες αυξάνει τον κίνδυνο μετάδοσης.
- Κακής ποιότητας τροφής: Η χρήση μολυσμένων ή χαμηλής ποιότητας τροφών μπορεί να εισάγει το παθογόνο στον οργανισμό των ψαριών.

Τα μέτρα πρόληψης και αντιμετώπισης είναι<sup>65</sup>:

- Βιοασφάλεια
- Βελτίωση των συνθηκών καλλιέργειας και μείωση του υπερπληθυσμού.
- Καθαρισμός και απολύμανση δεξαμενών και εξοπλισμού.
- Έλεγχος της ποιότητας του νερού.
- Εμβολιασμός
- Εμβόλια κατά του *P. damsela subsp. piscicida* έχουν αναπτυχθεί και έχουν δείξει αποτελεσματικότητα στη μείωση της θνησιμότητας.

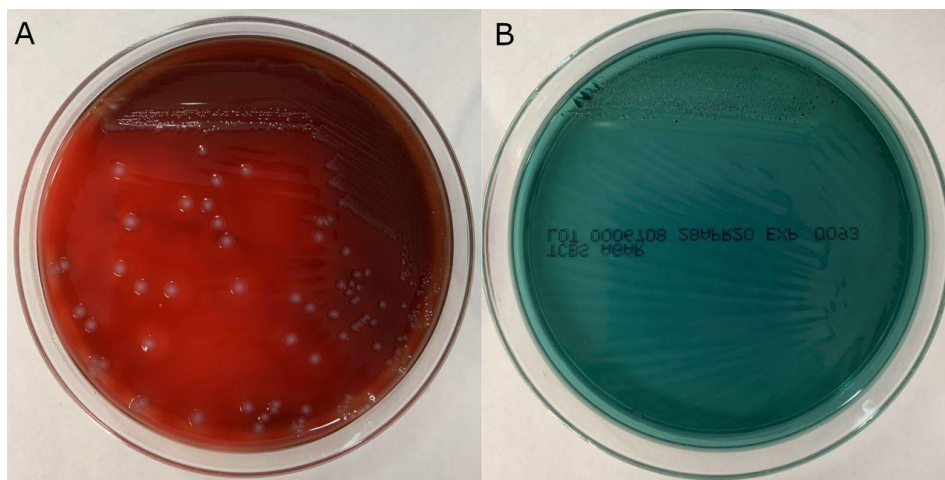
Αντιβιοτικά όπως οι φθοριοκινολόνες και οι τετρακυκλίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν, αν και η υπερβολική χρήση τους μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών<sup>66</sup>.

Εναλλακτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της ασθένειας είναι:

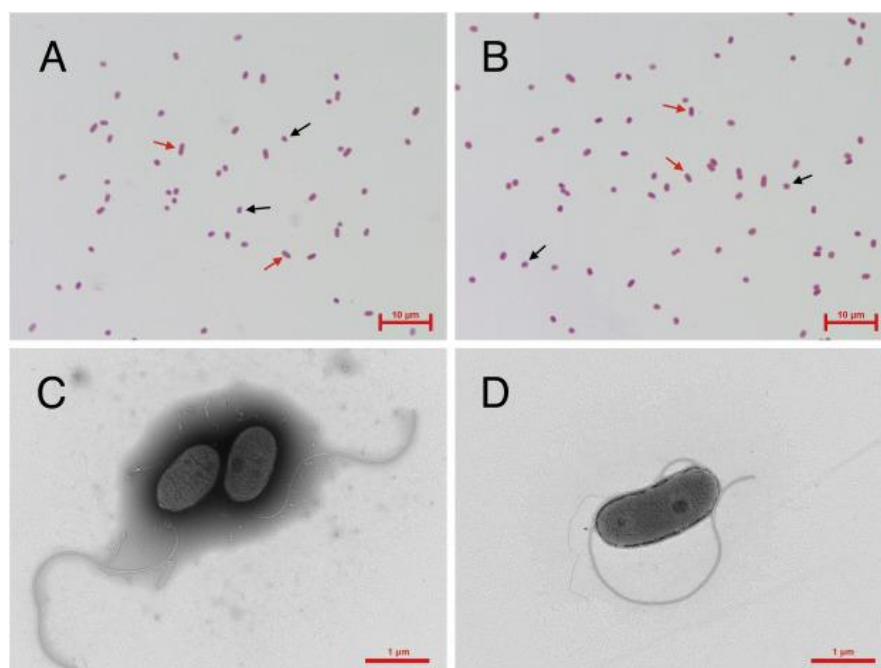
Προβιοτικά: Χρήση μικροοργανισμών που ενισχύουν την άμυνα των ψαριών<sup>22,34</sup>.

Ανοσοδιεγερτικά: Φυσικά προϊόντα που ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών<sup>65</sup>.

Το *Photobacterium damsela* αποτελεί μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις για τη βιωσιμότητα της μεσογειακής υδατοκαλλιέργειας. Η πρόληψη και η αποτελεσματική διαχείριση των λοιμώξεων απαιτούν συνδυασμό στρατηγικών, όπως η ενίσχυση της βιοασφάλειας, η ανάπτυξη νέων εμβολίων, και η υπεύθυνη χρήση αντιβιοτικών. Η συνεχιζόμενη έρευνα για τους μηχανισμούς παθογένειας και τις μεθόδους πρόληψης είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση της υγείας των ιχθυοκαλλιεργειών και τη βιώσιμη ανάπτυξη του κλάδου.

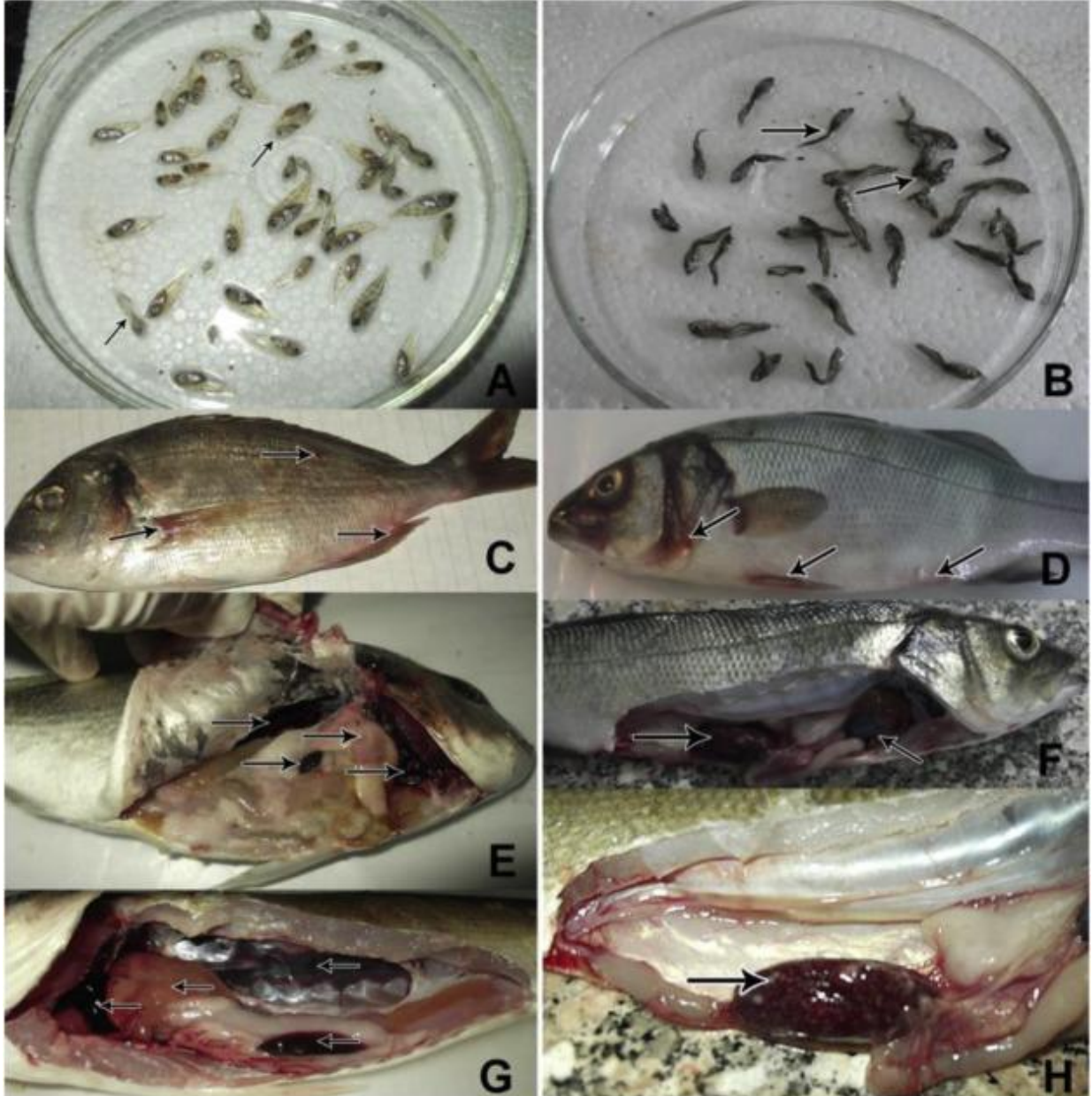


**Εικόνα 15:** Αποικόνιση καλλιέργειας *Photobacterium damsela* σε τρυβλία Petri (A) Αποικίες του *Photobacterium damsela* με β-αιμόλυση σε άγαρ αίματος 5% μετά από επώαση για 24 ώρες στους 35°C. (B) Μικρές, πράσινες αποικίες σε άγαρ θειοθειικού-κιτρικού-χολικών αλάτων-σακχαρόζης (TCBS) μετά από επώαση για 24 ώρες στους 35°C<sup>68</sup>.



**Εικόνα 16** Ανάπτυξη Διάφορες μορφολογίες και μαστίγια του *Photobacterium* που παρατηρήθηκαν με οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία. (A) Σφαιρικές (μαύρο βέλος) και ραβδόμορφες (κόκκινο βέλος)

παρατηρήθηκαν με οπτική μικροσκοπία. (B) Ίδιες μορφολογίες μετά από απόξεση μιας μεμονωμένης αποικίας σε καθαρή καλλιέργεια. (C) Σχεδόν σφαιρικά βακτήρια και μαστίγια που παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία. (D) Ραβδόμορφα βακτήρια και μαστίγια που παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία<sup>69</sup>.



**Εικόνα 17: Κλινικά και μακροσκοπικά σημεία σε άρρωστα λαβράκια και τσιπούρες.**

(A) Τσιπούρα και (B) γόνος λαβρακίου εμφανίζουν υψηλή θνησιμότητα με δερματικά έλκη και σκελετικές δυσμορφίες. (C, D) Τυπικά συμπτώματα σε άρρωστες τσιπούρες (C) και λαβράκια (D) περιλαμβάνουν μειωμένη όρεξη, λήθαργο, αδιαφάνεια του κερατοειδούς, αποκόλληση λεπιών, σκουρόχρωμη χρώση του δέρματος, ωχρότητα στα βράγχια, αιμορραγίες στη βάση των πτερυγίων και διαβρώσεις στο κεφάλι και στις πλευρές του σώματος. (E-H) Μακροσκοπικές αλλοιώσεις σε μολυσμένες τσιπούρες (E, G) και λαβράκια (F, H) περιλαμβάνουν διογκωμένο και ωχρο ήπαρ, υπερπλήρη χοληδόχο κύστη, διόγκωση του σπλήνα και των νεφρών με χαρακτηριστικές γκριζόλευκες κοκκιωματώδεις εναποθέσεις, αιμορραγίες γύρω από την καρδιά, λιπώδεις εναποθέσεις και, σε ορισμένες περιπτώσεις, παρουσία πυώδους υλικού στις κοιλιακές κοιλότητες<sup>70</sup>.



### 3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΜΩΝ

#### 3.1. Μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση παθογόνων

Οι μοριακές τεχνικές έχουν αναδειχθεί ως βασικά εργαλεία για την ταχεία και ακριβή ανίχνευση των gram-αρνητικών παθογόνων σε είδη ιχθύων που καλλιεργούνται στη Μεσόγειο<sup>71</sup>. Με την ανάπτυξη αυτών των τεχνικών, οι επιστήμονες έχουν τη δυνατότητα να εντοπίζουν παθογόνους οργανισμούς με μεγαλύτερη ακρίβεια και σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα, κάτι που είναι εξαιρετικά σημαντικό για τη διαχείριση της υγείας των ιχθύων και την πρόληψη εξάρσεων ασθενειών στις υδατοκαλλιέργειες. Ένα από τα πιο σημαντικά μοριακά εργαλεία είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η οποία έχει καταστεί ακρογωνιαίος λίθος στα εργαστήρια μικροβιολογίας τροφίμων, λόγω της ικανότητάς της να ανιχνεύει παθογόνους οργανισμούς σε πραγματικό χρόνο, παρέχοντας τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές πληροφορίες<sup>72-74</sup>. Η PCR είναι εξαιρετικά χρήσιμη για την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων βακτηρίων ή άλλων παθογόνων στο περιβάλλον των υδατοκαλλιεργειών και προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές μικροβιολογικές μεθόδους.

#### 3.1 Μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται

Πολλές μοριακές τεχνικές χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των παθογόνων στους ιχθύες, προσφέροντας ισχυρά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές βιοχημικές μεθόδους. Οι κυριότερες από αυτές περιλαμβάνουν την κλασική PCR, την nested PCR, την real-time PCR, την multiplex PCR, την loop-mediated isothermal amplification (LAMP) και τα DNA microarrays. Κάθε μία από αυτές τις τεχνικές έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που την καθιστούν κατάλληλη για διαφορετικούς τύπους ανίχνευσης.

- Nested PCR: Είναι μια παραλλαγή της παραδοσιακής PCR που χρησιμοποιεί δύο σετ primers για την αύξηση του στόχου, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της ανίχνευσης, ιδιαίτερα για την ανίχνευση βακτηρίων σε χαμηλές συγκεντρώσεις<sup>75</sup>.
- Real-time PCR: Η real-time PCR ή quantitative PCR (qPCR) επιτρέπει την παρακολούθηση της διαδικασίας ανίχνευσης σε πραγματικό χρόνο, δίνοντας τη δυνατότητα για ποσοτική ανάλυση των παθογόνων οργανισμών. Η μέθοδος αυτή είναι εξαιρετικά χρήσιμη για την ακριβή μέτρηση της ποσότητας του παθογόνου

DNA στο δείγμα, επιτρέποντας τη λεπτομερή παρακολούθηση της εξέλιξης μιας λοίμωξης<sup>76</sup>.

- Multiplex PCR: Αυτή η μέθοδος επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών παθογόνων σε ένα μόνο δείγμα, κάτι που καθιστά τη διαδικασία πιο αποδοτική και ταχύτερη. Με τη χρήση πολλαπλών primers, μπορεί να αναγνωριστεί μια σειρά από διαφορετικά παθογόνα στον ίδιο χρόνο<sup>77</sup>.
- LAMP: Η μέθοδος Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιεί ισόθερμες συνθήκες αντίδρασης, χωρίς την ανάγκη για θερμικούς κύκλους, όπως στην PCR. Αυτή η μέθοδος είναι ιδιαίτερα αποδοτική και γρήγορη, καθώς μπορεί να ανιχνεύσει παθογόνους οργανισμούς με εξαιρετική ευαισθησία, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις DNA<sup>78</sup>.
- DNA Microarrays: Τα μικροσυστήματα DNA (DNA microarrays) είναι μια πιο σύνθετη μέθοδος που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση μεγάλου αριθμού παθογόνων οργανισμών χρησιμοποιώντας μικροσκοπικές πλάκες καλυμμένες με στίγματα DNA. Αυτή η τεχνική είναι ιδανική για την ανίχνευση πολλαπλών παθογόνων σε μία μόνο ανάλυση και είναι χρήσιμη όταν απαιτείται η παρακολούθηση πολλών βακτηρίων ή άλλων μικροοργανισμών ταυτόχρονα<sup>79</sup>.

### 3.1.1 Τεχνικές eDNA/eRNA

Οι μέθοδοι Περιβαλλοντικού DNA (eDNA) και Περιβαλλοντικού RNA (eRNA) έχουν αναδειχθεί ως καινοτόμα εργαλεία για την ανίχνευση οργανισμών σε διάφορα περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων των υδατοκαλλιεργειών. Η χρήση αυτών των τεχνικών επιτρέπει την ανίχνευση ειδών ψαριών και παθογόνων οργανισμών σε δείγματα νερού χωρίς την ανάγκη για άμεση αλληλεπίδραση με τα ίδια τα οργανισμούς, καθιστώντας τις πολύ χρήσιμες σε περιβαλλοντικές και οικολογικές μελέτες. Η εφαρμογή των τεχνικών eDNA/eRNA στην υδατοκαλλιέργεια προσφέρει τη δυνατότητα για μη επεμβατική και γρήγορη παρακολούθηση της βιοποικιλότητας, καθώς και για την ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων ή ιών που μπορεί να επηρεάζουν την υγεία των ιχθύων<sup>80</sup>.

Το eDNA αναφέρεται στο γενετικό υλικό που απελευθερώνεται από τους οργανισμούς στο περιβάλλον μέσω αποβολών, σάλιου ή κυτταρικών θραυσμάτων, το οποίο στη συνέχεια εντοπίζεται και αναλύεται σε δείγματα νερού. Η ανίχνευση του eDNA προσφέρει μια σειρά από πλεονεκτήματα σε σχέση με παραδοσιακές μεθόδους, όπως η

καλλιέργεια μικροοργανισμών ή η παρατήρηση οργανισμών, καθώς επιτρέπει την ανίχνευση οργανισμών χωρίς την ανάγκη για φυσική παρουσία ή συλλογή του ίδιου του οργανισμού. Η δυνατότητα ανίχνευσης eDNA σε νερό, για παράδειγμα, μπορεί να βοηθήσει στον εντοπισμό ιχθύων, ακόμα και όταν αυτά είναι δύσκολο να παρατηρηθούν ή να συλληφθούν, όπως σε μεγάλες εκτάσεις ή σε δύσκολα προσβάσιμες περιοχές των υδατοκαλλιεργειών<sup>81</sup>.

Αντίστοιχα, το eRNA αναφέρεται στο RNA που απελευθερώνεται στο περιβάλλον από οργανισμούς, και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ενεργών οργανισμών ή παθογόνων με μεγαλύτερη ακρίβεια σε σχέση με το DNA, καθώς το RNA είναι πιο προσωρινό και ενδείκνυται για την ανίχνευση του οργανισμού σε κατάσταση ενεργού μόλυνσης ή παρουσίας. Η ανίχνευση eRNA μπορεί να προσφέρει πληροφορίες για την ενεργό μόλυνση ή την παρουσία ενός παθογόνου οργανισμού, κάτι που είναι χρήσιμο για την άμεση αντίδραση σε περιπτώσεις μόλυνσης σε υδατοκαλλιέργειες<sup>80</sup>. Επιπλέον, δεδομένου ότι το RNA καταστρέφεται γρήγορα μετά την αποδέσμευσή του από το οργανισμό, η ανίχνευση του προσφέρει την ικανότητα να προσδιορίσουμε την παρουσία ενός οργανισμού σε πιο πρόσφατο χρόνο και σε ενεργή φάση.

### **3.1.2 Πλεονεκτήματα των Μοριακών Μεθόδων**

Η χρήση μοριακών τεχνικών για την ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων στην υδατοκαλλιέργεια προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές βιοχημικές μεθόδους. Αυτές οι τεχνικές έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν και να ταυτοποιούν πολλαπλούς βακτηριακούς παθογόνους οργανισμούς ταυτόχρονα, μειώνοντας τον χρόνο ανάλυσης και ενισχύοντας την ευαισθησία και ειδικότητα στην ταυτοποίηση των παθογόνων<sup>82</sup>. Ειδικότερα, οι μοριακές μέθοδοι μπορούν να ανιχνεύσουν χαμηλά επίπεδα γενετικού υλικού (DNA ή RNA) στο δείγμα, κάτι που είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την ανίχνευση βακτηρίων ή ιών σε πρώιμο στάδιο της μόλυνσης, προτού εκδηλωθούν τα κλινικά συμπτώματα.

Επιπλέον, η χρήση αυτών των τεχνικών εξαλείφει την ανάγκη για μακροχρόνια καλλιέργεια των παθογόνων, μειώνοντας το κόστος και το χρόνο που απαιτείται για την ανίχνευση. Οι τεχνικές αυτές είναι επίσης πιο ευέλικτες και μπορούν να εφαρμοστούν σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλόντων, όπως το θαλασσινό νερό, τα δείγματα οργανικών αποβλήτων ή τα δείγματα ιστών των ιχθύων. Αυτό επιτρέπει την άμεση διάγνωση και τη

λήψη αποφάσεων για την πρόληψη και τη θεραπεία ασθενειών, προστατεύοντας έτσι την υγεία των ιχθύων και την ασφάλεια των θαλασσινών προϊόντων<sup>83</sup>.

Οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης είναι επομένως κρίσιμες για την ανάπτυξη και εφαρμογή στρατηγικών διαχείρισης στην υδατοκαλλιέργεια, καθώς επιτρέπουν την ταχύτερη και πιο αξιόπιστη διάγνωση, συμβάλλοντας στην προληπτική υγειονομική παρακολούθηση και στην ενίσχυση της ασφάλειας τροφίμων<sup>84</sup>.

### 3.2.1 Η Εφαρμογές της PCR

Στον τομέα των βιολογικών επιστημών έχουν σημειωθεί αξιοσημείωτες τεχνολογικές εξελίξεις. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εφεύρεση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), η οποία επαναπροσδιόρισε τη μοριακή βιολογία, καθώς βρήκε εφαρμογές σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους. Σημαντική πρόοδος στην τεχνική σημειώθηκε με την εισαγωγή της Taq DNA πολυμεράσης, ενός ενζύμου με θερμική σταθερότητα, το οποίο προέρχεται από το βακτήριο *Thermus aquaticus*.

Η PCR αποτελεί μια εργαστηριακή τεχνική ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων που χρησιμοποιείται για τη μετουσίωση και ανάλυση μικρών αλληλουχιών DNA ή RNA με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση. Η διαδικασία επικεντρώνεται σε συγκεκριμένα τμήματα DNA μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα. Η Taq πολυμεράση, χάρη στη θερμική της σταθερότητα, μπορεί να αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται κατά τη διαδικασία, διατηρώντας τη δραστηριότητά της και επιτρέποντας την αποτελεσματική σύνθεση του DNA.

Η PCR περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια, τα οποία είναι: η αποδιάταξη, η υβριδοποίηση και η επιμήκυνση. Κατά την αποδιάταξη, το DNA θερμαίνεται στους 95°C, προκαλώντας τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στις βάσεις του δίκλωνου DNA. Στο στάδιο της υβριδοποίησης, το δείγμα ψύχεται σε θερμοκρασίες από 37°C έως 72°C, επιτρέποντας την αναδιαμόρφωση των δεσμών υδρογόνου. Οι εκκινητές, με μήκος 20-25 νουκλεοτιδίων, προσδένονται στο μονόκλωνο DNA στις συμπληρωματικές θέσεις τους, ξεκινώντας από το 3' άκρο του πρότυπου DNA, οδηγώντας στη δημιουργία δίκλωνων μορίων DNA.

Στο τελικό στάδιο, η επιμήκυνση πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες από 75°C έως 80°C, που είναι ιδανικές για την ενζυμική δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης, επιτρέποντας την αντιγραφή του DNA με ακρίβεια και αποτελεσματικότητα<sup>85</sup>.



Μετά από 30-40 κύκλους, οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι της PCR τείνουν να μειώνονται, κυρίως λόγω της εξασθένησης της απόδοσης των αντιδραστηρίων και της επίδρασης διαφόρων παραγόντων, όπως η συγκέντρωση πυροφωσφορικών μορίων, η υπερβολική ανόπτηση και η παρουσία ανασταλτικών παραγόντων στο δείγμα. Μεταξύ των συνηθέστερων αναστολέων της PCR περιλαμβάνονται η πρωτεΐνωση K, η φαινόλη και το EDTA.

Η πρωτεΐνωση K έχει την ιδιότητα να καταστρέφει την πολυμεράση Taq. Επίσης, διάφορες ουσίες όπως η ηπαρίνη, τα ιοντικά απορρυπαντικά, η αιμοσφαιρίνη, καθώς και χρωστικές όπως η ξυλένια κυανόλη και η βρωμοφαινόλη, μπορεί να επηρεάσουν δυσμενώς τη διαδικασία της PCR. Για την αποφυγή τέτοιων προβλημάτων, το DNA από τα αρχικά δείγματα συνήθως καθαρίζεται μέσω διαλυτοποίησης και καθίζησης με αιθανόλη.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της PCR, ακολουθεί το στάδιο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης, με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου. Κατά την εξέταση του πηκτώματος υπό υπεριώδες φως, εξακριβώνεται η εξειδίκευση των προϊόντων. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη μεταφορά των προϊόντων σε φίλτρο και τη χρήση ανιχνευτών, όπως το Southern blot, για τον υβριδισμό. Τέλος, εξαλείφεται η πιθανότητα ενίσχυσης των διμερών εκκινητών.

Η PCR έχει τη δυνατότητα να παράγει ενισχυμένα προϊόντα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για έκφραση και κλωνοποίηση, λόγω της ύπαρξης σημείων περιορισμού στα άκρα τους. Κάθε γονίδιο απαιτεί τον σχεδιασμό ειδικών εκκινητών. Τα αποτελέσματα της PCR συνήθως αναλύονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης, ακολουθούμενης από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο<sup>86</sup>.

Από την ανάπτυξη της PCR έχουν δημιουργηθεί πολλές τροποποιημένες εκδοχές της, οι οποίες ονομάστηκαν βάσει των διαφοροποιήσεων στο αρχικό πρωτόκολλο. Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα της PCR είναι η ταχύτητα και η ευαισθησία της, επιτρέποντας την εξαγωγή αποτελεσμάτων μέσα σε μόλις 30 λεπτά. Η μέθοδος επιτρέπει επίσης την εύκολη διαφοροποίηση μεταξύ στελεχών, χάρη στη χρήση πολλαπλών ζευγών εκκινητών.

Η ανάλυση των προϊόντων της PCR βασίζεται σε δύο κύριες μεθόδους απεικόνισης: α) τη χρώση του ενισχυμένου προϊόντος με χημικές χρωστικές, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο, και β) τη σήμανση των εκκινητών ή των νουκλεοτιδίων με φθορίζουσες χρωστικές πριν από την ενίσχυση<sup>87</sup>.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί την πιο διαδεδομένη και εύχρηστη μέθοδο, καθώς διαχωρίζει τα προϊόντα DNA με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ένα σύνολο γνωστών προϊόντων DNA, τα οποία λειτουργούν ως μοριακοί δείκτες, διευκολύνοντας την ακριβή εκτίμηση του μεγέθους κάθε προϊόντος.

Η PCR μπορεί να εφαρμοστεί χρησιμοποιώντας μητρικό DNA από διάφορους ιστούς και οργανισμούς, όπως δέρμα, τρίχες, περιφερικό αίμα, μικρόβια και σάλιο. Κάθε διαδικασία PCR απαιτεί την παρουσία μητρικού DNA, εκκινητών, νουκλεοτιδίων και DNA πολυμεράσης.

Η DNA πολυμεράση αποτελεί το κύριο ένζυμο της διαδικασίας, το οποίο συνδέει τα νουκλεοτίδια για τη δημιουργία του προϊόντος PCR. Τα νουκλεοτίδια, που αποτελούνται από τις τέσσερις βάσεις αδερίνη (A), θυμίνη (T), γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C), λειτουργούν ως δομικά συστατικά και χρησιμοποιούνται από την DNA πολυμεράση για τη σύνθεση του ενισχυμένου DNA. Οι εκκινητές διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο, καθορίζοντας με ακρίβεια το τμήμα DNA που θα ενισχυθεί.

Όλα τα απαραίτητα συστατικά αναμειγνύονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και στη συνέχεια τοποθετούνται σε ειδική συσκευή, γνωστή ως θερμικός κυκλοποιητής. Αυτή η συσκευή περιλαμβάνει θερμικό μπλοκ με υποδοχές για τα δοκιμαστικά σωληνάρια ή τις πλάκες που περιέχουν το μείγμα αντίδρασης. Ο θερμικός κυκλοποιητής ρυθμίζει με ακρίβεια και προγραμματισμό τη θερμοκρασία, επιτρέποντας την επαναλαμβανόμενη ενίσχυση του DNA μέσω τριών βασικών θερμοκρασιακών σταδίων. Με κάθε επανάληψη αυτών των σταδίων, ο αριθμός των μορίων DNA διπλασιάζεται<sup>88</sup>.

Η PCR έχει καθιερωθεί ως μία ισχυρή και αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση γονιδίων παθογόνων μικροοργανισμών. Ωστόσο, η μέθοδος παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα, που καθιστούν απαραίτητη την ανάπτυξη νέων τεχνικών. Τέτοιες δυσκολίες περιλαμβάνουν την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων, τη λύση των κυττάρων, τη διασταυρούμενη μόλυνση, καθώς και ανεπιτυχείς αντιδράσεις λόγω της παρουσίας ανασταλτικών παραγόντων.

Επιπλέον, οι τεχνικές PCR δεν μπορούν να διακρίνουν μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων, ενώ ένας από τους μεγαλύτερους περιορισμούς τους είναι η πιθανότητα εμφάνισης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, λόγω της μη ειδικής σύνδεσης με δίκλωνες ακολουθίες DNA. Για τον λόγο αυτό, είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός εκκινητών υψηλής ακρίβειας, ώστε να αποφεύγεται η ενίσχυση μη στοχευμένων αλληλουχιών DNA<sup>87</sup>.

### 3.2.2 Εξέλιξη της PCR σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR)

Η ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR) αποτελεί μια τεχνολογικά προηγμένη μέθοδο μοριακής βιολογίας που βασίζεται στην κλασική PCR, ενισχύοντας και ποσοτικοποιώντας συγκεκριμένα τμήματα DNA σε πραγματικό χρόνο<sup>89</sup>. Η μέθοδος αυτή αξιοποιεί φθορίζουσες χρωστικές και ανιχνευτές DNA για την ακριβή μέτρηση των ενισχυμένων προϊόντων DNA, επιτρέποντας την ταχεία και αξιόπιστη ανίχνευση παθογόνων παραγόντων. Σε αντίθεση με την κλασική PCR, η RT-qPCR δεν απαιτεί την ανάλυση των προϊόντων μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης, μειώνοντας έτσι τον χρόνο και τον κόπο που απαιτείται για τη διαδικασία<sup>90</sup>.

Η βασική διαφοροποίηση της RT-qPCR συγκριτικά με την κλασική PCR έγκειται στην ικανότητα παρακολούθησης της ενίσχυσης του DNA σε πραγματικό χρόνο μέσω φθορίζουσας σήμανσης. Το φθορίζον σήμα παράγεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης μέσω εξειδικευμένων ανιχνευτών ή χρωστικών που δεσμεύονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των προϊόντων PCR, επιτρέποντας τη συνεχή παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης<sup>91</sup>.

Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του DNA, η RT-qPCR χρησιμοποιεί διάφορα συστήματα φθορισμού, όπως το SYBR Green I, τους ανιχνευτές TaqMan και τους μοριακούς φάρους (molecular beacons)<sup>92</sup>:

- SYBR Green I: Πρόκειται για μία απλή και οικονομική χρωστική που δεσμεύεται σε δίκλινα μόρια DNA. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται σημαντικά όταν το SYBR Green I συνδέεται στη μικρή αύλακα της διπλής έλικας. Παρά το χαμηλό κόστος και την ευκολία χρήσης, η μη εξειδίκευση της χρωστικής οδηγεί σε σύνδεση και με μη-ειδικά προϊόντα, όπως διμερή εκκινητών, γεγονός που απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή.
- Ανιχνευτές TaqMan: Οι ανιχνευτές αυτοί είναι ολιγονουκλεοτίδια διπλής επισήμανσης, με ένα φθοροφόρο στο 5' άκρο και έναν αποσβεστήρα στο 3' άκρο. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, το ένζυμο Taq πολυμεράση διασπά τον ανιχνευτή, επιτρέποντας την εκπομπή φθορισμού. Οι TaqMan ανιχνευτές διακρίνονται για την υψηλή τους εξειδίκευση και ευαισθησία.
- Μοριακοί Φάροι: Αυτοί οι ανιχνευτές αποτελούνται από στελέχη/φουρκέτες με βρόγχο, όπου περιέχεται η συμπληρωματική αλληλουχία-στόχος. Όταν ο φάρος υβριδίζεται με το DNA-στόχο, το σήμα φθορισμού αυξάνεται.

### 3.2.3 Πλεονεκτήματα RT-qPCR και Εμπορικές Εφαρμογές

Η ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR) εφαρμόστηκε ως εργαστηριακή μέθοδος για την ενίσχυση και ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση μορίων DNA. Η τεχνική αυτή αξιοποιήθηκε ως αναλυτικό εργαλείο για την ποσοτική αξιολόγηση του ιϊκού φορτίου, υπολογίζοντας την αρχική συγκέντρωση του προτύπου δείγματος με υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια<sup>93</sup>.

Η qRT-PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη, καθώς μετρά τη συγκέντρωση των προϊόντων PCR κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της αντίδρασης, βασιζόμενη στην ανίχνευση φθορισμού που παράγεται από τη χημική αντίδραση<sup>94</sup>. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σφραγισμένη πλάκα PCR, η οποία επέτρεψε την ανίχνευση των στόχων σε πραγματικό χρόνο, εξαλείφοντας την ανάγκη για περαιτέρω επεξεργασία μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Αυτή η διαδικασία μείωσε τον κίνδυνο εμφάνισης ψευδών θετικών αποτελεσμάτων, ο οποίος συχνά προκύπτει από μεταφορά αμπλικονίου στις παραδοσιακές PCR<sup>95</sup>.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση καμπύλης τήξης για τη διάκριση των αμπλικονίων από μη ειδικά προϊόντα και διμερή εκκινητών. Οι φθορίζοντες ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν περιλάμβαναν το σύστημα TaqMan και το SYBR Green, το οποίο δεσμεύει το δίκλωνο DNA (dsDNA). Οι ανιχνευτές αυτοί υβριδοποιήθηκαν στις αλληλουχίες στόχου, παράγοντας σήμα φθορισμού ανάλογο με τη συγκέντρωση των προϊόντων ενίσχυσης. Η ανίχνευση του φθορισμού πραγματοποιήθηκε είτε στο τέλος της διαδικασίας PCR (φθορισμός τελικού σημείου) είτε κατά τη φάση ενίσχυσης, με τη μέγιστη ποσοτικοποίηση να εμφανίζεται κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης<sup>96</sup>.

Η RT-qPCR είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και επιτρέπει την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων DNA, ενώ η απουσία μετέπειτα επεξεργασίας μειώνει τον κίνδυνο διασταυρούμενης μόλυνσης. Σε αντίθεση με τη συμβατική PCR, η οποία απαιτεί ηλεκτροφόρηση για την ανάλυση των προϊόντων, η RT-qPCR είναι ιδανική για αυτοματοποιημένες και υψηλής απόδοσης αναλύσεις<sup>97</sup>.

Αυτή η τεχνική έχει εφαρμοστεί ευρέως για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών, όπως<sup>97</sup>:

- *Staphylococcus aureus* σε νωπό γάλα,
- *Salmonella spp.* σε φρέσκα φρούτα και λαχανικά,

- *E. coli* O157:H7 και άλλα στελέχη που παράγουν Shiga τοξίνες,
- *Listeria monocytogenes* και *Campylobacter jejuni*.

Στην εμπορική αγορά, υπάρχουν διάφορα κιτ RT-qPCR που ενσωματώνουν την τεχνολογία αυτή, όπως<sup>97</sup>:

- Salmonella BAX™ PCR Kit (DuPont Qualicon),
- TaqMan® *Listeria monocytogenes* Detection Kit (Applied Biosystems),
- *E. coli* O157 BAX® PCR Kit (DuPont Qualicon),
- ADIAFOOD *Campylobacter* JCL qPCR Kit (AES Chemunex).

Ενώ το SYBR Green I προσφέρει χαμηλό κόστος και δυνατότητα χρήσης καμπύλης τήξης για την επαλήθευση της εξειδίκευσης των προϊόντων, τα συστήματα TaqMan και οι μοριακοί φάροι προσφέρουν ανώτερη ευαισθησία και ακρίβεια<sup>97</sup>. Οι συνεχείς βελτιώσεις στη RT-qPCR έχουν καταστήσει τη μέθοδο αναπόσπαστο εργαλείο στη μοριακή διάγνωση και την ανίχνευση παθογόνων με υψηλή αξιοπιστία και ταχύτητα.

### 3.2.4 Χρήση της qPCR στην ανάλυση και μελέτη ιχθύων

Η ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές στη μοριακή βιολογία για την ανάλυση γενετικού υλικού. Στον τομέα της ιχθυολογίας και της υδατοκαλλιέργειας, η qPCR χρησιμοποιείται εκτενώς για διάφορες εφαρμογές που περιλαμβάνουν τη διάγνωση ασθενειών, τη γενετική ταυτοποίηση ειδών, τη μελέτη πληθυσμιακής γενετικής και την ανίχνευση παθογόνων<sup>98</sup>.

Η qPCR έχει καθιερωθεί ως μία αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στα ψάρια. Εφαρμόζεται για την ανίχνευση ιών, βακτηρίων, μυκήτων και παρασίτων που προσβάλλουν είδη ψαριών τόσο σε φυσικούς πληθυσμούς όσο και σε συστήματα υδατοκαλλιέργειας. Ειδικά πρωτόκολλα qPCR έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση παθογόνων όπως<sup>98</sup>:

- *Vibrio spp.* και *Aeromonas spp.* (βακτήρια που προκαλούν ασθένειες σε θαλάσσια και γλυκά νερά).
- *Viral Hemorrhagic Septicemia Virus* (VHSV) και *Infectious Salmon Anemia Virus* (ISAV) (ιοί που επηρεάζουν σολομούς).

- *Mycobolus cerebralis*, το παράσιτο που προκαλεί την ασθένεια "whirling disease" στις πέστροφες.

Η qPCR που εφαρμόζεται σε ψάρια βασίζεται στη χρήση εκκινητών (primers) που στοχεύουν ειδικές αλληλουχίες γονιδίων, όπως τα 16S rRNA και COI για βακτηριακή και γενετική ταυτοποίηση αντίστοιχα, προσφέροντας μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία στην ποσοτικοποίηση παθογόνων.

### 3.3 Βιοχημικές Μέθοδοι Ανίχνευσης

Οι βιοχημικές μέθοδοι διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανίχνευση και ταυτοποίηση των Gram-αρνητικών παθογόνων σε συστήματα υδατοκαλλιέργειας. Αυτές οι μέθοδοι συχνά συμπληρώνουν τις μοριακές τεχνικές, παρέχοντας μια σειρά αναλυτικών προσεγγίσεων που διευκολύνουν την αναγνώριση διαφόρων μικροβιακών ειδών και των προτύπων αντίστασής τους<sup>99</sup>. Παρόλο που οι μοριακές τεχνικές προσφέρουν υψηλή ακρίβεια και ταχύτητα, οι βιοχημικές μέθοδοι συνεχίζουν να αποτελούν έναν χρήσιμο και ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο, ιδιαίτερα για τη διαγνωστική της βακτηριακής χλωρίδας σε δείγματα νερού και ιχθύων.

#### 3.3.1 Ταυτοποίηση Gram-Αρνητικών Βακτηρίων

Η ταυτοποίηση των Gram-αρνητικών βακτηρίων συνήθως περιλαμβάνει έναν συνδυασμό βιοχημικών δοκιμασιών. Κύριες δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν:

- Δοκιμή οξειδάσης: Η δοκιμή αυτή ελέγχει την παρουσία του ενζύμου κυτοχρωμικής οξειδάσης, το οποίο είναι χαρακτηριστικό για πολλά Gram-αρνητικά βακτήρια. Η αντίδραση αυτής της δοκιμής μπορεί να αποκαλύψει την ικανότητα του βακτηρίου να οξειδώσει διάφορες χημικές ενώσεις<sup>100</sup>.
- Αξιολόγηση ζυμώσεως σακχάρων: Αυτή η δοκιμή ελέγχει την ικανότητα των βακτηρίων να ζυμώνουν διάφορους τύπους σακχάρων (π.χ. γλυκόζη, λακτόζη, σακχαρόζη). Αυτή η μέθοδος είναι χρήσιμη για τη διαφοροποίηση των βακτηρίων που έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά άλλων δοκιμών<sup>101</sup>.
- Δοκιμές IMVC: Οι δοκιμές Indole, Methyl Red, Voges-Proskauer και Citrate (IMVC) χρησιμοποιούνται για να εκτιμηθεί η ικανότητα των βακτηρίων να παράγουν ένζυμα που διασπούν τις οργανικές ενώσεις και να παράγουν διάφορα



μεταβολικά προϊόντα. Αυτές οι δοκιμές είναι πολύ χρήσιμες για την κατηγοριοποίηση και διαφοροποίηση των Gram-αρνητικών βακτηρίων<sup>102</sup>.

- Δοκιμή του pH: Σε κάποιες περιπτώσεις, η αλλαγή του pH σε διάφορα καλλιεργητικά μέσα χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η ικανότητα των βακτηρίων να παράγουν οξέα από τη ζύμωση των σακχάρων<sup>103</sup>.

Αυτές οι βιοχημικές δοκιμές αναλύουν τις μεταβολικές ικανότητες των βακτηρίων, επιτρέποντας τη διαφοροποίησή τους με βάση τις λειτουργίες που εκτελούν στο περιβάλλον τους. Η ταυτοποίηση των βακτηρίων με τη χρήση αυτών των δοκιμών είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την κατηγοριοποίηση και την καταγραφή παθογόνων που ενδέχεται να επηρεάζουν τα ιχθύδια σε συστήματα υδατοκαλλιέργειας.

### 3.3.2 Αυτοματοποιημένα Συστήματα Ταυτοποίησης Μικροοργανισμών

Η ταυτοποίηση των βακτηρίων έχει γίνει ακόμη πιο ακριβής και ταχεία με την χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων μικροβιακής ταυτοποίησης, όπως το σύστημα Vitek-2. Αυτό το σύστημα χρησιμοποιεί ειδικά καλλιεργητικά μέσα και αισθητήρες για να ανιχνεύσει τις βιοχημικές αντιδράσεις που προκαλούνται από τα βακτήρια. Χρησιμοποιώντας βάση δεδομένων με αναγνωρισμένα χαρακτηριστικά, το Vitek-2 μπορεί να παρέχει ακριβείς και ταχείες ταυτοποιήσεις μικροοργανισμών, περιορίζοντας το χρόνο που απαιτείται για τη διάγνωση των ασθενειών στις υδατοκαλλιέργειες<sup>104</sup>. Η χρήση αυτών των συστημάτων επιτρέπει στους επιστήμονες και τους διαχειριστές των υδατοκαλλιέργειών να εντοπίζουν πιο αποτελεσματικά τις αιτίες των λοιμώξεων και να λάβουν τα κατάλληλα μέτρα για την αποτροπή της εξάπλωσης των παθογόνων.

Η δοκιμή ευαισθησίας σε αντιβιοτικά είναι κρίσιμη για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των θεραπευτικών επιλογών έναντι των παθογόνων βακτηρίων. Αυτή η διαδικασία παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την επιλογή των καταλληλότερων αντιβιοτικών, προκειμένου να ελεγχθεί η εξάπλωση της λοίμωξης και να περιοριστεί η ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής ευαισθησίας είναι η μέθοδος διάχυσης δίσκου Kirby-Bauer, η οποία χρησιμοποιεί έναν πίνακα αντιβιοτικών για να προσδιορίσει την ευαισθησία των παθογόνων<sup>105</sup>.

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την τοποθέτηση δίσκων που περιέχουν συγκεκριμένα αντιβιοτικά πάνω σε πλάκες άγαρ και την παρατήρηση της ζώνης αναστολής ανάπτυξης



γύρω από κάθε δίσκο. Όσο μεγαλύτερη είναι η ζώνη, τόσο πιο ευαίσθητο είναι το βακτήριο στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας παθογόνων, όπως οι καρβαπενέμες ανθεκτικά Gram-αρνητικά ράβδους, που αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα στην υγειονομική περίθαλψη λόγω της αυξανόμενης αντίστασης τους στα αντιβιοτικά<sup>105</sup>.

Ένα από τα κύρια σημεία εστίασης στη μελέτη των Gram-αρνητικών βακτηρίων είναι η ανίχνευση της παραγωγής καρβαπενέμασης, η οποία συμβάλλει στην αντίσταση στα αντιβιοτικά. Η καρβαπενέμαση είναι ένα ένζυμο που εκκρίνεται από κάποια βακτήρια και μπορούν να διασπάσουν τα καρβαπενέμες αντιβιοτικά, καθιστώντας τα αναποτελεσματικά στην καταπολέμηση της λοίμωξης. Η παρουσία καρβαπενέμης καθιστά τα βακτήρια εξαιρετικά επικίνδυνα, καθώς δημιουργούν προβλήματα στη θεραπεία λοιμώξεων, ειδικά σε ασθενείς με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα<sup>106</sup>.

Η ανίχνευση της παραγωγής καρβαπενεμάσης γίνεται μέσω φαινοτυπικών προσεγγίσεων, οι οποίες περιλαμβάνουν διάφορες διαγνωστικές μεθόδους που χρησιμοποιούν καλλιέργειες βακτηρίων για να προσδιορίσουν την ικανότητά τους να παράγουν αυτά τα ένζυμα. Κάποιες από τις πιο γνωστές δοκιμές είναι οι εξής:

- Δοκιμή τροποποιημένου Hodge: Αυτή η δοκιμή χρησιμοποιείται για να εντοπίσει την ικανότητα των βακτηρίων να παράγουν καρβαπενέμαση, εξετάζοντας την επίδραση των καρβαπενεμικών αντιβιοτικών σε μια καλλιέργεια βακτηρίων. Η παρουσία μιας χαρακτηριστικής ζώνης ανάπτυξης γύρω από το βακτήριο υποδεικνύει παραγωγή καρπαπενεμάσης<sup>107</sup>.
- Τροποποιημένη μέθοδος αδρανοποίησης καρβαπενεμάσης: Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει την προσθήκη συγκεκριμένων ουσιών που αδρανοποιούν την καρβαπενεμάση και την παρατήρηση για αλλαγές στην ανάπτυξη των βακτηρίων, οι οποίες υποδεικνύουν την παρουσία αυτής της αντίστασης<sup>108</sup>.
- Συνδυασμένες δοκιμές δίσκου: Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί την τοποθέτηση δίσκων με διαφορετικά αντιβιοτικά, σε συνδυασμό με το βακτήριο, για να προσδιορίσει την ύπαρξη καρβαπενεμάσης, ελέγχοντας αν η παρουσία ενός συγκεκριμένου αντιβιοτικού μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του βακτηρίου<sup>109</sup>.

Επιπλέον, χρωματομετρικές μέθοδοι, όπως οι δοκιμές Carba-NP και blue-carba, έχουν προταθεί για την ταχεία ανίχνευση της δραστηριότητας καρβαπενεμάσης απευθείας από κλινικά δείγματα<sup>110,111</sup>. Οι δοκιμές αυτές χρησιμοποιούν χρωματικές αλλαγές για να

επισημάνουν την παρουσία καρβαπενεμάσης, επιτρέποντας την ταχεία διάγνωση και παρέχοντας πολύτιμο χρόνο για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας.

Η δοκιμή ευαισθησίας σε αντιβιοτικά και η ανίχνευση παραγωγής καρβαπενεμάσης αποτελούν σημαντικά εργαλεία για τη διαχείριση και την καταπολέμηση των ανθεκτικών βακτηρίων στις υδατοκαλλιέργειες και τη κλινική ιατρική. Η ακριβής και έγκαιρη διάγνωση της ανθεκτικότητας αυτών των βακτηρίων είναι καθοριστική για την επιτυχή αντιμετώπιση λοιμώξεων και τη μείωση της εξάπλωσης της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Οι συνδυασμένες φαινοτυπικές και χρωματομετρικές μέθοδοι παρέχουν αξιόπιστα εργαλεία για τη διάγνωση και τη διαχείριση αυτών των επικίνδυνων παθογόνων, συμβάλλοντας στην καλύτερη υγειονομική φροντίδα και τη βιώσιμη ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας.

### **3.3.3 Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί των Βιοχημικών Μεθόδων**

Οι βιοχημικές μέθοδοι για την ανίχνευση των Gram-αρνητικών βακτηρίων προσφέρουν διάφορα πλεονεκτήματα. Η κυριότερη τους χρησιμότητα έγκειται στην ευκολία εφαρμογής και στην υπολογιστικά απλή διαδικασία. Οι μέθοδοι αυτές είναι ευρέως διαδεδομένες και διαθέτουν χαμηλότερο κόστος σε σχέση με τις μοριακές τεχνικές. Η εφαρμογή τους δεν απαιτεί ιδιαίτερα εξελιγμένο εξοπλισμό, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση βακτηριακών λοιμώξεων ακόμη και σε περιβάλλοντα όπου η τεχνολογία PCR ή άλλες προηγμένες μοριακές τεχνικές δεν είναι διαθέσιμες<sup>112</sup>.

Ωστόσο, οι βιοχημικές μέθοδοι παρουσιάζουν και περιορισμούς. Η ευαισθησία τους είναι περιορισμένη σε σχέση με τις μοριακές τεχνικές, καθώς ενδέχεται να μην ανιχνεύσουν όλα τα βακτήρια ή να μη διακρίνουν με ακρίβεια στελέχη με παρόμοια χαρακτηριστικά. Επιπλέον, ορισμένα βακτήρια μπορεί να παρουσιάζουν ανακριβή αποτελέσματα λόγω της μεταβλητότητας στις βιοχημικές τους αντιδράσεις υπό διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας<sup>113</sup>.

Οι βιοχημικές μέθοδοι ανίχνευσης Gram-αρνητικών βακτηρίων συνεχίζουν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση και διάγνωση ασθενειών στις υδατοκαλλιέργειες, παρέχοντας ένα χρήσιμο εργαλείο για την αναγνώριση των παθογόνων και την αξιολόγηση των προτύπων αντίστασης. Η συνδυασμένη χρήση αυτών των μεθόδων με μοριακές τεχνικές μπορεί να οδηγήσει σε πιο ολοκληρωμένες και

ακριβείς διαγνωστικές προσεγγίσεις, συμβάλλοντας στην υγιή διαχείριση των υδατοκαλλιεργειών και στην πρόληψη των εξάρσεων ασθενειών.

### 3.3.4 Βιοχημικές αναλύσεις με Microgen™ GN A+B ID

Το Microgen™ GN A+B είναι ένα σύστημα ταχείας διάγνωσης που χρησιμοποιείται για την αναγνώριση και κατηγοριοποίηση των οικογενειών Εντεροβακτηριοειδών (Enterobacteriaceae) και άλλων Gram-αρνητικών βακίλων, τόσο σε οξειδάσης-αρνητικών όσο και σε οξειδάσης-θετικών στελεχών. Είναι ιδανικό για εργαστηριακή χρήση, καθώς επιτρέπει την αναγνώριση ενός μεγάλου φάσματος Gram-αρνητικών βακτηρίων με την εφαρμογή μιας σειράς βιοχημικών δοκιμών σε δύο ταινίες μικροπηγαδίων (GN A και GN B)<sup>114</sup>.

Το σύστημα Microgen™ GN A+B χρησιμοποιεί συνολικά 24 τυποποιημένα βιοχημικά υποστρώματα, που είναι κατανομημένα σε δύο ταινίες με 12 υποστρώματα η κάθε μία. Κάθε υπόστρωμα αντιπροσωπεύει μια διαφορετική βιοχημική αντίδραση που σχετίζεται με την ικανότητα του βακτηρίου να μεταβολίζει συγκεκριμένες ουσίες<sup>115</sup>.

Κάθε ταινία περιέχει υποστρώματα που ελέγχουν διαφορετικές βιοχημικές αντιδράσεις, όπως η ικανότητα του βακτηρίου να αφομοιώνει σάκχαρα, να παράγει αέρια, ή να εκλύει ορισμένα ένζυμα. Η διαφορετική σύνθεση αυτών των υποστρωμάτων επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ των βακτηρίων που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες ή οικογένειες<sup>115</sup>.

Το σύστημα λειτουργεί μέσω μικροφρεατίων που περιέχουν τα βιοχημικά υποστρώματα. Με την τοποθέτηση του βακτηριακού ιστού στα αντίστοιχα μικροφρεατίων και την παρακολούθηση της αντίδρασης στα υποστρώματα, οι αντιδράσεις που συμβαίνουν (όπως η αλλαγή του χρώματος ή η αέρια εκτόνωση) καταγράφονται. Αυτές οι αντιδράσεις δίνουν ενδείξεις για την ταυτοποίηση του βακτηρίου<sup>116</sup>.

Αφού ολοκληρωθούν οι βιοχημικές αντιδράσεις, τα αποτελέσματα καταγράφονται και συγκρίνονται με τη βάση δεδομένων του συστήματος, η οποία περιέχει προφίλ για διάφορους τύπους Gram-αρνητικών βακτηρίων. Από τα αποτελέσματα, μπορεί να γίνει η αναγνώριση της οικογένειας και του είδους του βακτηρίου<sup>116</sup>.

Τα πλεονεκτήματα της βιοχημικής μεθόδου Microgen™ GN A+B ID είναι<sup>117</sup>:

- Ταχύτητα και ακρίβεια: Το σύστημα επιτρέπει την γρήγορη αναγνώριση βακτηρίων, σε σύγκριση με άλλες παραδοσιακές μεθόδους καλλιέργειας και ταυτοποίησης.

- Ευκολία χρήσης: Η διαδικασία είναι απλή και απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία από τους εργαστηριακούς τεχνικούς.
- Πολυδιάστατη αναγνώριση: Μπορεί να αναγνωρίσει ένα ευρύ φάσμα *Gram*-αρνητικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των οξειδάσης-θετικών και οξειδάσης-αρνητικών βακτηρίων.

Οι περιορισμοί της βιοχημικής μεθόδου Microgen™ GN A+B ID είναι<sup>117</sup>:

- Αναγνώριση μόνο *Gram*-αρνητικών βακτηρίων: Το σύστημα εστιάζει μόνο στην κατηγοριοποίηση *Gram*-αρνητικών βακτηρίων και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για *Gram*-θετικά βακτήρια ή μικροοργανισμούς άλλων τύπων.
- Πιθανές διακυμάνσεις σε λιγότερο κοινά είδη: Σε ορισμένες περιπτώσεις, η αναγνώριση μπορεί να είναι πιο δύσκολη ή λιγότερο ακριβής για λιγότερο συνηθισμένα ή νέα στελέχη βακτηρίων.

Το Microgen™ GN A+B αποτελεί ένα εξαιρετικό εργαλείο για εργαστήρια μικροβιολογίας, παρέχοντας γρήγορη και ακριβή αναγνώριση *Gram*-αρνητικών βακτηρίων, κάτι που είναι σημαντικό για τη διάγνωση.

### 3.3.5 Μέθοδος Microgen™ GN A+B σε ιχθύες

Οι βιοχημικές αναλύσεις με τη χρήση του συστήματος Microgen™ GN A+B χρησιμοποιούνται κυρίως για την ταυτοποίηση και ανάλυση μικροοργανισμών που απαντώνται σε ψάρια και άλλα υδρόβια οργανισμούς. Πρόκειται για ένα σύστημα εργαστηριακής διάγνωσης που επιτρέπει την ταυτοποίηση βακτηρίων με βάση τα χαρακτηριστικά τους, τα οποία ανιχνεύονται μέσω της αντίδρασης σε μια σειρά χημικών αντιδράσεων και διαδικασιών<sup>118</sup>.

Οι βιοχημικές αναλύσεις στις οποίες χρησιμοποιείται το Microgen™ GN A+B για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών στα ψάρια περιλαμβάνουν τη διάγνωση παθογόνων βακτηρίων όπως οι *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Salmonella* και άλλοι μικροοργανισμοί που μπορεί να είναι επικίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία. Με τη χρήση αυτών των συστημάτων, μπορεί να γίνει ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροβίων που προκαλούν αλλοιώσεις στα ψάρια και που ενδέχεται να έχουν σοβαρές συνέπειες για τη δημόσια υγεία, καθώς και για τη βιομηχανία της αλιείας<sup>38</sup>.

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης του Microgen™ GN A+B στην μελέτη των ιχθύων είναι<sup>116</sup>:

- Ακρίβεια και ταχύτητα: Το σύστημα προσφέρει ταχεία και ακριβή ανάλυση μικροοργανισμών, μειώνοντας τον χρόνο διάγνωσης σε σύγκριση με άλλες παραδοσιακές μεθόδους.
- Ευκολία στη χρήση: Οι πλάκες του Microgen™ GN A+B είναι εύχρηστες και δεν απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.
- Αξιοπιστία: Παρέχουν αξιόπιστα αποτελέσματα, τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν για περαιτέρω επιστημονική έρευνα ή για εφαρμογές στον έλεγχο ποιότητας των ψαριών.

#### 4. Στόχος και αντικείμενο της μελέτης

Η ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια κατέχει ηγετική θέση στην Ευρώπη, αποτελώντας έναν από τους πιο δυναμικούς τομείς της πρωτογενούς παραγωγής της χώρας και συνεισφέροντας σημαντικά στην τοπική και εθνική οικονομία. Με κύρια είδη την τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), η παραγωγή επικεντρώνεται κυρίως στη χρήση πλωτών ιχθυοκλωβών και εκτείνεται σε θαλάσσιες περιοχές με υψηλή βιοποικιλότητα. Ωστόσο, η εντατικοποίηση της παραγωγής έχει επιφέρει αυξημένους κινδύνους εμφάνισης παθογόνων, τα οποία απειλούν την υγεία των εκτρεφόμενων ειδών και την βιωσιμότητα του κλάδου.

Η παρουσία Gram-αρνητικών παθογόνων, όπως τα είδη *Vibrio*, *Photobacterium damsela*, *Aeromonas*, και *Pasteurella*, συνδέεται άμεσα με την εμφάνιση σοβαρών νοσημάτων που προκαλούν υψηλή θνησιμότητα, μειωμένη ανάπτυξη και οικονομικές απώλειες. Παράλληλα, η αλληλεπίδραση μεταξύ των καλλιεργούμενων και άγριων πληθυσμών ψαριών αυξάνει τον κίνδυνο διασποράς παθογόνων στο φυσικό περιβάλλον, καθιστώντας την αποτελεσματική διαχείριση της υγείας των ιχθύων απαραίτητη.

Ο στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του επιπολασμού Gram-αρνητικών παθογόνων σε μεσογειακά είδη ψαριών υδατοκαλλιέργειας μέσω συνδυαστικής χρήσης μοριακών και βιοχημικών μεθόδων και βιβλιογραφικής ανασκόπησης.

Ειδικότερα, η μελέτη επιδιώκει:

- Την ανίχνευση και ταυτοποίηση των κύριων παθογόνων παραγόντων με τη χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας, όπως η PCR, και τη συσχέτισή τους με επιδημιολογικά δεδομένα.
- Την αξιολόγηση της παθογένειας μέσω βιοχημικών αναλύσεων και την κατανόηση των μηχανισμών που συμβάλλουν στην πρόκληση ασθενειών.

Η μελέτη αυτή επιδιώκει να προσφέρει πολύτιμα δεδομένα για την ανάπτυξη και εφαρμογή πιο στοχευμένων στρατηγικών πρόληψης και διαχείρισης νοσημάτων, ενισχύοντας τη βιωσιμότητα της ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας και τη συμμόρφωση με τις αρχές της βιώσιμης ανάπτυξης.

## 5. Υλικά και Μέθοδοι

Παρακάτω αναλύονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για στο εργαστηριακό κομμάτι της παρούσας έρευνας σχετικά με την ανίχνευση και ταυτοποίηση των κύριων παθογόνων μικροοργανισμών με τη χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας, όπως η PCR.

Το αντικείμενο της πειραματικής μεθοδολογίας έλαβε χώρα σε ιδιωτικό εργαστήριο της Δυτικής Αττικής με σκοπό την ανάλυση και ταυτοποίηση δειγμάτων από ιχθύδια προερχόμενα από ιχθυοκλωβούς εκτροφής που υπάρχουν στις θαλάσσιες περιοχές ανά την Ελλάδα. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε τυχαίους κλωβούς ή κλωβούς με ύπαρξη μικρής υποψίας εκδήλωση συμπτωμάτων παθολογίας ιχθύων. Ο στόχος κατά την διαδικασία τόσο των δειγματοληψιών όσο και των καταγραφών των αποτελεσμάτων στόχευε στην διαπίστωση της ύπαρξης ή μη παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και στην συγκριτική ανάλυση από τα δείγματα των ψαριών.

Τα δείγματα συλλεγόντουσαν από τους υπευθύνους της εκάστοτε μονάδας και από ιχθυοπαθολόγους γινόταν η διαδικασία απομόνωσης και αποθήκευσης του ιστού σε υγρό διάλυμα RNA later για περαιτέρω επεξεργασία. Κατά την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας πειραματικής διαδικασίας, στο πλαίσιο εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας, το εργαστήριο -εκτός των απομονωμένων ιστών ιχθύων- έλαβε και δείγματα ολόκληρων ψαριών με τη διαδικασία απομόνωσης του στόχου-ιστού να πραγματοποιείται από την υπεύθυνη ιχθυοπαθολόγο του εργαστηρίου. Στην περίπτωση αυτή, τα δείγματα και η επεξεργασία τους γινόταν άμεσα για την αποφυγή αλλοιώσεων. Ο ιστός και για τις δύο περιπτώσεις ήταν η σπλήνα και ο εγκεφάλους. Τα δείγματα που παραλάμβανε το εργαστήριο είτε ολόκληρα ψάρια είτε έτοιμος απομονωμένος ιστός της κάθε παρτίδας-κλωβού ήταν ομαδοποιημένα (pool).

### 5.1 Περιοχή Α: Περιοχή Θαλάμου νηματικής ροής

Στην καθαρή περιοχή (θάλαμος νηματικής ροής) πραγματοποιούνταν όλες οι διαδικασίες που απαιτούσαν αυστηρές συνθήκες απολύμανσης. Τα αντιδραστήρια, εκτός του θετικού μάρτυρα, αναδιαλύονταν σε αυτήν την περιοχή. Επιπλέον, διανεμόταν το μίγμα αντίδρασης (MMx) και προετοιμαζόταν ο αρνητικός μάρτυρας. Τα απαιτούμενα υλικά περιλάμβαναν πιπέτες διαφόρων μεγεθών (500  $\mu$ L, 10  $\mu$ L), tip μιας χρήσης αποστειρωμένα με φίλτρο, γάντια, και καθαρά σωληνάρια PCR. Όλες οι επιφάνειες



απολυμαίνονταν πριν και μετά από κάθε χρήση με διάλυμα αιθανόλης. Τα απαραίτητα υλικά και αναλώσιμα περιλαμβάνουν:

- Πιπέτες: 500  $\mu$ L, 10  $\mu$ L
- Tip μιας χρήσης αποστειρωμένα με φίλτρο
- Γάντια μίας χρήσης
- Καθαρά tubes PCR 0,2  $\mu$ L

Για την προετοιμασία του μάρτυρα ακολουθήθηκε:

1. Διανομή 10  $\mu$ L Master Mix (MMx) σε σωληνάρια PCR.
2. Προσθήκη 10  $\mu$ L νερού (Αρνητικός Μάρτυρας).
3. Προετοιμασία Θετικού Μάρτυρα (10  $\mu$ L MMx + 10  $\mu$ L DNA).

## 5.2 Περιοχή Β: Πάγκος Εργασίας

Στην περιοχή αυτή (πάγκος εργασίας), πραγματοποιούνταν η ανασύσταση του θετικού μάρτυρα, η εκχύλιση των δειγμάτων, το πιπετάρισμα των δειγμάτων και του θετικού μάρτυρα. Τα χρησιμοποιούμενα υλικά περιλάμβαναν πιπέτες διαφόρων μεγεθών (10, 20, 200, 500  $\mu$ L), tips με φίλτρο, γάντια, βάση μαγνήτη, βάση δειγμάτων, σωληνάρια Eppendorf (0,5 mL), δοχείο απόρριψης αναλωσίμων με σακουλάκι μιας χρήσης, και συσκευή ανάγνωσης. Ιδιαίτερη προσοχή δινόταν στην αποφυγή δημιουργίας σταγονιδίων και εγκλείστου αέρα (φυσαλίδες) κατά το πιπετάρισμα, ενώ οι πιπέτες και οι επιφάνειες απολυμαίνονταν τακτικά. Τα απαραίτητα υλικά περιλαμβάνουν:

- Πιπέτες: 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 500  $\mu$ L
- Tips με φίλτρο μίας χρήσης αποστειρωμένα
- Γάντια μίας χρήσης
- Στατώ με μαγνήτη
- Στατώ δειγμάτων
- Σωληνάρια Eppendorf 0.5 mL για την εκχύλιση
- Δοχείο απορριμμάτων με σακουλάκι μίας χρήσης
- Συσκευή ανάλυσης (PCR Machine)

Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στην αποφυγή δημιουργίας αερολυμάτων και σταγονιδίων κατά το πιπετάρισμα. Όλα τα υλικά απολυμαίνονται με αιθυλική αλκοόλη απολύμανσης και στη συνέχεια με δις-απιονισμένο νερό.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων πριν την τοποθέτηση στο μηχάνημα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Προστίθενται 10  $\mu\text{L}$  DNA από κάθε δείγμα στα σωληνάρια PCR.
2. Τα καπάκια κλείνουν καλά και τα tips απορρίπτονται προσεκτικά.
3. Ελέγχεται η απουσία φυσαλίδων και η θέση του υγρού στον πάτο των σωληναρίων.

### 5.3 Ανάλυση Αντιδραστηρίων Kit

Προετοιμασία αντιδραστηρίων και κιτ εκχύλισης

1. Ανασύσταση Proteinase K: Προστίθενται 500  $\mu\text{L}$  στο φιαλίδιο Proteinase K. Ανακινείται κυκλικά και φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
2. Ανασύσταση Μαγνητικών Σφαιριδίων: Το περιεχόμενο του φιαλιδίου ανακινείται καλά και αναμιγνύεται με το Binding Buffer.

Για το κιτ εκχύλισης, η ανασύσταση της Proteinase K γινόταν με την προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  στο φιαλίδιο και ανακίνηση για 5 λεπτά. Το διάλυμα αποθηκευόταν στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Οι μαγνητικές σφαίρες (N3a) αναμιγνύονταν καλά πριν από κάθε χρήση με το Binding Buffer (No.3). Στο κιτ εργασίας, ανασυστήνονταν τα αντιδραστήρια, συμπεριλαμβανομένου του εσωτερικού μάρτυρα DNA, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Κιτ Εργασίας:

- Εσωτερικός Μάρτυρας DNA (Internal Control)
- Template Prep Buffer (1000  $\mu\text{L}$ )
- Εκκινητές (αντίστοιχα για κάθε παθογόνο)

Θετικός Μάρτυρας:

- Ανασύσταση με Template Prep Buffer (1000  $\mu\text{L}$ )
- Φύλαξη στην κατάψυξη, σε ξεχωριστό κουτί.

Διαδικασία Εκχύλισης (Extraction):

1. Σε σωληνάριο Eppendorf, αναμιγνύονται:
  - 200  $\mu$ L Sample Prep
  - 200  $\mu$ L Lysis Buffer
  - 10-25 mg ιστού (τεμαχισμένος και ομογενοποιημένος)

Το μίγμα ανακινείται καλά.

Προστίθενται 20  $\mu$ L Proteinase K και 10  $\mu$ L Internal Control. Ανακινείται με vortex και επώάζεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο, αφήνοντας το ίζημα. Στη συνέχεια, προστίθενται 500  $\mu$ L μαγνητικά σφαιρίδια (μετά από ανάδευση). Ακολουθεί μαγνητισμός και αφαίρεση του διαυγούς υγρού.

Ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις με:

- Wash Buffer 1: 500  $\mu$ L, vortex, μαγνητισμός.
- Wash Buffer 2: 500  $\mu$ L, vortex, μαγνητισμός.
- Ethanol: 500  $\mu$ L, vortex, μαγνητισμός και πλήρης απομάκρυνση.

Στη συνέχεια στεγνώνεται το pellet για 10 λεπτά.

Προστίθενται 50-200  $\mu$ L Elution Buffer. Το μίγμα αναδεύεται, μαγνητίζεται, και το υπερκείμενο (DNA) συλλέγεται.

Η εκχύλιση των δειγμάτων πραγματοποιούνταν σε καθαρά σωληνάρια Eppendorf, όπου προστίθεντο 200  $\mu$ L Sample Prep, 200  $\mu$ L Lysis Buffer, και 10-25 mg ιστού, καλά τεμαχισμένου. Το μείγμα ανακινούνταν με vortex και ακολουθούσε η προσθήκη 20  $\mu$ L Proteinase K και 10  $\mu$ L Internal Control. Μετά από επώαση για 15-30 λεπτά, το υπερκείμενο διάλυμα μεταφερόταν σε νέο σωληνάριο, αφήνοντας το ίζημα (pellet). Ακολουθούσε η προσθήκη μαγνητικών σφαιριδίων, πλύσεις με κατάλληλα διαλύματα (Wash Buffer 1, Wash Buffer 2, Ethanol) και η τελική ανάκτηση του DNA με Elution Buffer. Το DNA φυλασσόταν σε καθαρά σωληνάρια Eppendorf στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Για την RT-qPCR χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά Master Mix της εταιρείας Primer design, που διαθέτει για κάθε παθογόνο.

## 5.4 Διαδικασία PCR

Στο θάλαμο νηματικής ροής, γινόταν η διανομή του μίγματος PCR σε σωληνάρια PCR, όπου προστίθεντο 10  $\mu$ L MMx και νερό για τον αρνητικό μάρτυρα. Στην ίδια περιοχή,

προετοιμαζόταν ο θετικός μάρτυρας και τα δείγματα. Στον εργαστηριακό πάγκο, προστίθετο το DNA των δειγμάτων στα σωληνάρια PCR. Ακολουθούσε η τοποθέτηση των σωληναρίων στο PCR μηχάνημα. Μετά την ολοκλήρωση των κύκλων, τα αποτελέσματα αναλύονταν αυτόματα από το λογισμικό.

#### Λειτουργία PCR Μηχανήματος:

1. Τοποθέτηση σωληναρίων στη συσκευή Genesisg\_q32 με τη σειρά:
2. 1-A: Αρνητικός μάρτυρας
3. 2-A: Θετικός μάρτυρας
4. 3-A: Δείγμα 1 κ.λπ.
5. Επιλογή προγράμματος και έναρξη.
6. Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα αναλύονται αυτόματα από το λογισμικό της συσκευής και καταγράφονται σύμφωνα με το εγχειρίδιο χρήσης.

#### Σημειώσεις:

Η διαδικασία του Πραγματικού Χρόνου Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Real-Time PCR), που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων γενετικών αλληλουχιών σε πραγματικό χρόνο έγινε σύμφωνα με τα πρότυπα από Khehra et. al.<sup>119</sup>

Τα βασικά βήματα της διαδικασίας PCR σε πραγματικό χρόνο ήταν:

1. Απομόνωση DNA/RNA: Συλλογή και απομόνωση του γενετικού υλικού από το δείγμα (εγκεφάλου ή σπλήνα)
2. Σχεδιασμός εκκινητών (primers): Χρήση ειδικών εκκινητών που στοχεύουν την επιθυμητή γενετική αλληλουχία.
3. Προετοιμασία αντιδράσεων: Ανάμιξη του απομονωμένου DNA με εκκινητές, νουκλεοτίδια, πολυμεράση και φθορίζουσες ανιχνευτές.
4. Θερμική κυκλική αντίδραση: Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι θέρμανσης και ψύξης για την αποδιάταξη του DNA, πρόσδεση των εκκινητών και επιμέλεια της νέας αλυσίδας DNA. Αποδιάταξη (~94°C) - υβριδισμός ευκίνητων DNA και επιμήκυνση (~72°C)
5. Ανίχνευση φθορισμού: Κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης, οι φθορίζουσες ανιχνευτές εκπέμπουν φως, το οποίο ανιχνεύεται και μετράται σε πραγματικό χρόνο, επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση του αρχικού γενετικού υλικού.

## 5.5 Μεθοδολογία Microgen™ GN A+B ID

Κάθε λυοφιλοποιημένο μικροφρεάτιο, αναδιαλύθηκε με εναιώρημα φυσιολογικού ορού, στο οποίο προστέθηκε η απομονωθείσα αποικία. Τα δείγματα επώασθηκαν σε θερμοκρασία 35-37°C, με αλλαγές στο χρώμα να υποδεικνύουν θετικά αποτελέσματα. Μετά την επώαση, προστέθηκαν ειδικά αντιδραστήρια για την επιβεβαίωση των μεταβολισμών, ενώ τα αποτελέσματα καταγράφηκαν και αναλύθηκαν μέσω κατάλληλου λογισμικού.

Διαδικασία:

- 1 Παρασκευή εναιωρήματος: Καθαρή αποικία (18-24 ωρών) αναμείχθηκε σε 3 mL αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού.
- 2 Προσθήκη δείγματος: Τέσσερις σταγόνες του εναιωρήματος τοποθετήθηκαν σε κάθε μικροφρεάτιο.
- 3 Επικάλυψη και επώαση: Φρεάτια 1, 2, 3, 9 (GN A) και 20, 24 (GN B) καλύφθηκαν με ορυκτέλαιο. Οι ταινίες επώασθηκαν για 24 ώρες (Εντεροβακτηριοειδή) ή 48 ώρες (οξειδάση-θετικά Gram-αρνητικά).

### Προσθήκη Αντιδραστηρίων:

Μετά την επώαση, στα μικροφρεάτια προστέθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- Φρεάτιο 8: 2 σταγόνες Kovac. Κόκκινο χρώμα → θετικό.
- Φρεάτιο 10: 1 σταγόνα VP I + 1 σταγόνα VP II. Ροζ/κόκκινο χρώμα → θετικό.
- Φρεάτιο 12: 1 σταγόνα TDA. Κερασί χρώμα → θετικό.

Η διαδικασία στοχεύει στον εντοπισμό και την αναγνώριση Gram-αρνητικών παθογόνων, προσφέροντας αξιόπιστη αξιολόγηση με βάση το προφίλ των βιοχημικών αντιδράσεων. Τα δεδομένα καταγράφηκαν και αξιολογήθηκαν με βάση προκαθορισμένους πίνακες και λογισμικό ερμηνείας.

## 5. Αποτελέσματα

Η παρουσία μικροοργανισμών εντοπίστηκε κυρίως για το *Pasteurella* και *Aeromonas* ενώ τα υπόλοιπα παθογόνα δεν ανιχνεύθηκαν (*Vibrio harveyi* και *Photobacterium damsela*). Παρακάτω παρουσιάζονται τα δεδομένα από δειγματοληψίες ιχθυοκαλλιέργειας που πραγματοποιήθηκαν από τις 30 Μαρτίου 2024 έως τις 11 Ιουνίου 2024, σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Αναλύθηκαν συνολικά δείγματα από ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας και συγκεκριμένα λαβράκι - *Dicentrarchus labrax* (Bass) και τσιπούρα - *Sparus aurata* (Bream). Οι δειγματοληψίες κάλυψαν περιοχές όπως Αργολίδα, Αστακό, Αστυπάλεια, Θεσπρωτία, Νότιου Ευβοϊκό, Σαλαμίνα και Σερίφο. Ο αριθμός δειγμάτων κυμαινόταν από 10 έως 70 ψάρια ανά περιοχή. Συνολικά είκοσι τέσσερα (24) δείγματα εξετάστηκαν εκ των οποίων τα έντεκα (11) δείγματα ήταν τσιπούρα και τα δεκατρία (13) δείγματα από λαβράκι. Το μέσο βάρος ψαριών διακυμάνθηκε από 3,37gr έως 398gr ανάλογα με το είδος και την περιοχή.

Για κάθε δείγμα έγινε περιγραφική εξέταση κλινικής, παρασιτολογικής και εσωτερικής εικόνας όπου καταγράφηκαν παθολογικές ενδείξεις όπως σπληνομεγαλία, διογκωμένος νεφρός, νέκρωση βραγχίων, και μονογενή παράσιτα στα βράγχια. Τα δεδομένα των δειγμάτων καθώς και τα αποτελέσματα από τις μακροσκοπικές εξετάσεις παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**.

Οι μικροβιολογικές και μοριακές αναλύσεις διερεύνησαν την παρουσία των παθογόνων μέσω μικροβιολογικών και μοριακών μεθόδων (real time qPCR). Οι **Πίνακες 2** και **3** παρουσιάζουν τα αποτελέσματα των μοριακών εξετάσεων και των βιοχημικών εξετάσεων αντίστοιχα. Όπως φαίνεται και από τους πίνακες τα αποτελέσματα των μοριακών και βιοχημικών μεθόδων συμπίπτουν. Στην **Εικόνα 18** απεικονίζονται τα αποτελέσματα της real time qPCR για τον έλεγχο της *Pasteurella* όπου φαίνεται στην πρώτη γραμμή (A1) ο θετικός μάρτυρας, στη δεύτερη γραμμή (A2) ο αρνητικός μάρτυρας στην τρίτη γραμμή (A3) το πρώτο δείγμα το οποίο είναι αρνητικό ενώ στην τέταρτη γραμμή (A4) εμφανίζεται θετικό δείγμα στους 25 θερμοκύκλους. Στην **Εικόνα 19** απεικονίζονται θετικά δείγματα από τα αποτελέσματα της RT- qPCR εξέτασης.

Σε όλο τον δειγματοληπτικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν, μέθοδοι ταυτοποίησης και καλλιέργειας των παθογόνων. Σε αρκετές περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες σε ειδικά θρεπτικά υποστρώματα όπως Blood Agar, καθώς και μοριακές μέθοδοι real time qPCR.



Συνολικά βρέθηκαν τρία (3) δείγματα θετικά σε *Pasteurella* στο λαβράκι όπου δύο από αυτά προήλθαν από την περιοχή της Σαλαμίνας και ένα από την Αργολίδα, αντίστοιχα το βακτήριο της *Aeromonas* έδειξε θετικό αποτέλεσμα σε τρία (3) δείγματα προερχόμενα δύο από την Θεσπρωτία και ένα από την Σέριφο. Το παθογόνο Gram-αρνητικό βακτήριο *Aeromonas* δε εντοπίστηκε σε δείγματα τσιπούρας, εν αντίθεση, πέντε (5) δείγματα βρέθηκαν θετικά για *Pasteurella*, όπου τρία δείγματα ήταν από την περιοχή της Σαλαμίνας και από ένα δείγμα τσιπούρας προήλθε από την Θεσπρωτία και τον Ν. Ευβοϊκό. Σε όλες τις αναλύσεις υπήρχε συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων των μικροβιολογικών, βιοχημικών και μοριακών μεθόδων.

Τα αποτελέσματα δείχνουν την ανάγκη για συνεχή παρακολούθηση των ιχθυοκαλλιεργειών μέσω συνδυασμένων κλινικών, μικροβιολογικών και μοριακών αναλύσεων για την έγκαιρη ανίχνευση παθογόνων παραγόντων καθώς και για την μελέτη της εποχικής τους διακύμανσης αλλά και της χωρικής τους διασποράς στον Ελλαδικό χώρο.

**Πίνακας 1: Αποτελέσματα δειγματοληψιών μακροσκοπικής εικόνας**

Δειγματοληψίες	Περιοχή	Είδος	Fish τμχ	M.B gr	Μακροσκοπική Εικόνα
30.03.24	Ν. Ευβοϊκός	Bream	50	3,7	Σπληνομεγαλία, διογκωμένος νεφρός
02.04.24	Σαλαμίνα	Bream	50	3,37	Νέκρωση βραγχίων, έλκος κατά μήκος
04.04.24	Αργολίδα	Bass	30	80	Μονογενή παράσιτα, νέκρωση σώμα
12.04.24	Σέριφος	Bass	50	123	Αδύνατα ψάρια, ελαφρά αιμορραγικά
18.04.24	Αστυπάλαια	Bass	30	80	Εξωτερικά αιμορραγίες
29.04.24	Σαλαμίνα	Bass	30	6	Καθαρή Εικόνα
08.05.24	Σαλαμίνα	Bream	30	10	Ψάρια με οζίδια, ελαφρά σπληνομεγαλία
13.05.24	Αστυπάλαια	Bass	20	370	Αποχρωματισμένο ήπαρ, παράσιτο στην στοματική κοιλότητα (Caligus)
15.05.24	Θεσπρωτία	Bass	20	359	Οζίδια, ίκτερος, πετέχιες
16.05.24	Αργολίδα	Bream	50	118	Σπλήνα& νεφρός λίγο λίπος
17.05.24	Αστυπάλαια	Bass	20	110	Γεμάτο στομάχι, αποχρωματισμένο ήπαρ

21.05.24	N. Ευβοϊκός	Bass	30	12	Φυσιολογική
23.05.24	N. Ευβοϊκός	Bream	20	40	Φυσιολογική
28.05.24	Αστακός	Bream	20	40	Καθαρή Εικόνα
30.05.24	Αστυπάλαια	Bass	20	8,5	Μονογενή παράσιτα, Σπληνομεγαλία
31.05.24	Σέριφος	Bass	50	115	Καθαρή Εικόνα
03.06.24	Σαλαμίνα	Bass	30	8	Καθαρή Εικόνα
04.06.24	Σαλαμίνα	Bream	30	12	Ψάρια με οζίδια, ελαφρά σπληνομεγαλία
05.06.24	N. Ευβοϊκός	Bream	50	4,2	Σπλήνα & νεφρός λίγο λίπος
06.06.24	Αργολίδα	Bream	70	6,8	Καθαρή Εικόνα
06.06.24	Θεσπρωτία	Bass	40	30	Οζίδια, πετέχιες
07.06.24	Θεσπρωτία	Bream	40	10,5	Σπληνομεγαλία
10.06.24	Αστακός	Bream	60	140	Γεμάτο στομάχι, λίπος σπλήνα
11.06.24	Σέριφος	Bass	30	33,4	Νεκρώσεις στα βράγχια, 4/8 με οζίδια, καχεκτικά

**Πίνακας 2: Αποτελέσματα μοριακής εξέτασης RT-qPCR**

Δειγματοληψίες	Περιοχή	Είδος	<i>V.harveyi</i>	<i>Pasteurella</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>P.damselea</i>
30.03.24	N. Ευβοϊκός	Bream	-	+	-	-
02.04.24	Σαλαμίνα	Bream	-	+	-	-
04.04.24	Αργολίδα	Bass	-	+	-	-
12.04.24	Σέριφος	Bass	-	-	-	-
18.04.24	Αστυπάλαια	Bass	-	-	-	-
29.04.24	Σαλαμίνα	Bass	-	+	-	-
08.05.24	Σαλαμίνα	Bream	-	+	-	-
13.05.24	Αστυπάλαια	Bass	-	-	-	-
15.05.24	Θεσπρωτία	Bass	-	-	+	-
16.05.24	Αργολίδα	Bream	-	-	-	-

17.05.24	Αστυπάλαια	Bass	-	-	-	-
21.05.24	N. Ευβοϊκός	Bass	-	-	-	-
23.05.24	N. Ευβοϊκός	Bream	-	-	-	-
28.05.24	Αστακός	Bream	-	-	-	-
30.05.24	Αστυπάλαια	Bass	-	-	-	-
31.05.24	Σέριφος	Bass	-	-	-	-
03.06.24	Σαλαμίνα	Bass	-	+	-	-
04.06.24	Σαλαμίνα	Bream	-	+	-	-
05.06.24	N. Ευβοϊκός	Bream	-	-	-	-
06.06.24	Αργολίδα	Bream	-	-	-	-
06.06.24	Θεσπρωτία	Bass	-	-	+	-
07.06.24	Θεσπρωτία	Bream	-	-	-	-
10.06.24	Αστακός	Bream	-	-	-	-
11.06.24	Σέριφος	Bass	-	-	+	-

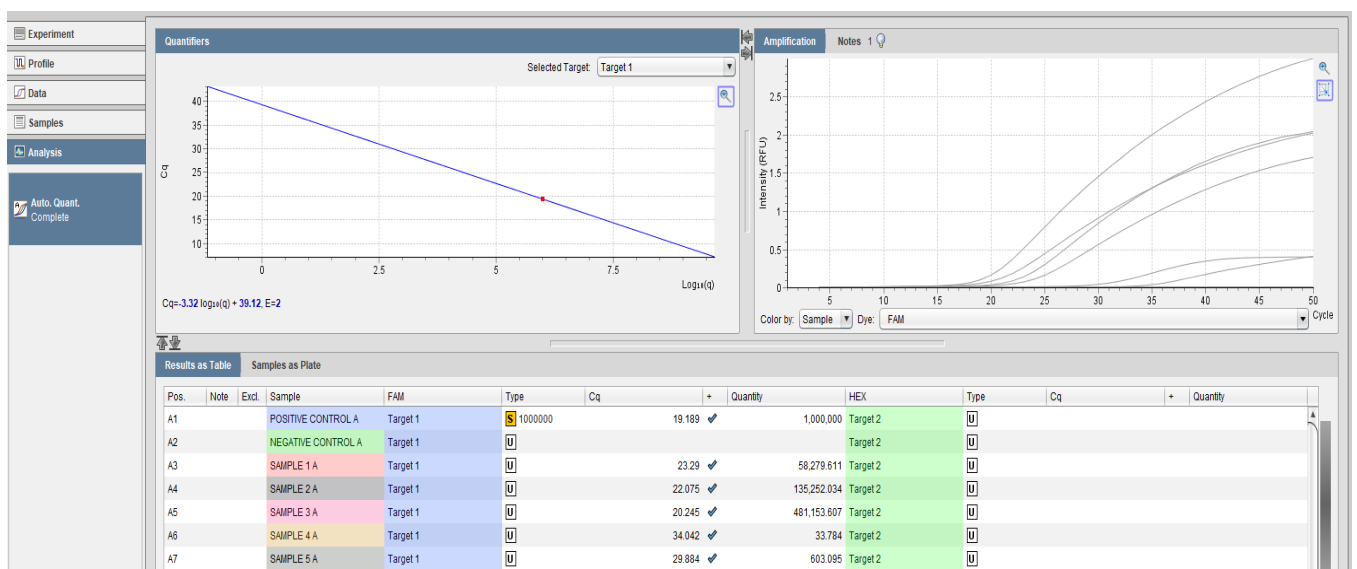
Πίνακας 3: Αποτελέσματα βιοχημικών δειγμάτων Microgen™ GnA-GnB

Δειγματοληψίες	Περιοχή	Είδος	<i>V.harveyi</i>	<i>Pasteurella</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>P.damselea</i>
30.03.24	N. Ευβοϊκός	Bream	-	✓	-	-
02.04.24	Σαλαμίνα	Bream	-	✓	-	-
04.04.24	Αργολίδα	Bass	-	✓	-	-
12.04.24	Σέριφος	Bass	-	-	-	-
18.04.24	Αστυπάλαια	Bass	-	-	-	-
29.04.24	Σαλαμίνα	Bass	-	✓	-	-
08.05.24	Σαλαμίνα	Bream	-	✓	-	-
13.05.24	Αστυπάλαια	Bass	-	-	-	-
15.05.24	Θεσπρωτία	Bass	-	-	✓	-
16.05.24	Αργολίδα	Bream	-	-	-	-
17.05.24	Αστυπάλαια	Bass	-	-	-	-
21.05.24	N. Ευβοϊκός	Bass	-	-	-	-

23.05.24	N. Ευβοϊκός	Bream	-	-	-	-
28.05.24	Αστακός	Bream	-	-	-	-
30.05.24	Αστυπάλαια	Bass	-	-	-	-
31.05.24	Σέριφος	Bass	-	-	-	-
03.06.24	Σαλαμίνα	Bass	-	✓	-	-
04.06.24	Σαλαμίνα	Bream	-	✓	-	-
05.06.24	N. Ευβοϊκός	Bream	-	-	-	-
06.06.24	Αργολίδα	Bream	-	-	-	-
06.06.24	Θεσπρωτία	Bass	-	-	✓	-
07.06.24	Θεσπρωτία	Bream	-	-	-	-
10.06.24	Αστακός	Bream	-	-	-	-
11.06.24	Σέριφος	Bass	-	-	✓	-

Pos.	Note	Sample	FAM	Type	Cq	+	Quantity	HEX	Type	Cq	+	Quantity
A1		P.C.P	Target 1	1000000	20.22	✓	1000000	Target 2	U			
A2		N.C.P	Target 1	U				Target 2	U			
A3		Sample 1 P	Target 1	U				Target 2	U			
A4		Sample 2 P	Target 1	U				Target 2	U	25.15	✓	

Εικόνα 18 Αποτελέσματα της RT- qPCR με A1 θετικό μάρτυρα και A4 ικανοποιητικό μοριακό φορτίο επιβεβαίωσης



Εικόνα 19 Απεικόνιση θετικών δειγμάτων RT-qPCR  
Διπλωματική Εργασία

## 6. Συζήτηση

Η μελέτη του επιπολασμού *Gram*-αρνητικών παθογόνων σε μεσογειακά είδη ιχθυοκαλλιέργειας ανέδειξε σημαντικά ευρήματα σχετικά με την υγεία των εκτρεφόμενων ψαριών και τις επιπτώσεις τους στη βιωσιμότητα της υδατοκαλλιέργειας. Τα αποτελέσματα προσφέρουν ουσιαστικές πληροφορίες για την κατανόηση της δυναμικής των λοιμώξεων και της αλληλεπίδρασης παθογόνων-ξενιστών, αλλά και προτάσεις για τη βελτίωση της διαχείρισης του κλάδου.

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας επιβεβαιώνουν παρόμοια ευρήματα προηγούμενων μελετών που υπογραμμίζουν την κυρίαρχη παρουσία παθογόνων όπως τα *Pasteurella spp.* και τα *Aeromonas spp.*<sup>120</sup> στη Μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια. Οι παθογόνοι παράγοντες που εντοπίστηκαν στην παρούσα εργασία συνδέονται με σοβαρές επιδημιολογικές προκλήσεις, όπως επισημάνθηκε και σε διεθνείς μελέτες, με έμφαση στη συμβολή περιβαλλοντικών παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία του νερού και η ποιότητα του περιβάλλοντος<sup>6</sup>.

Παρόλο που η χρήση της RT-qPCR και των βιοχημικών τεχνικών προσφέρει υψηλή ακρίβεια, άλλες μελέτες τονίζουν την ανάγκη για συνδυασμό διαγνωστικών μεθόδων ώστε να μειωθούν τα ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, κάτι που αποτελεί επίσης πρόκληση και στην παρούσα εργασία<sup>121</sup>.

Η χρήση μοριακών μεθόδων, όπως η RT-qPCR, επέτρεψε την ταχεία και ακριβή ανίχνευση παθογόνων, προσφέροντας δυνατότητες για έγκαιρη παρέμβαση. Η ενσωμάτωση βιοχημικών αναλύσεων ενίσχυσε τη διαγνωστική ακρίβεια, επιτρέποντας την ταυτοποίηση μη ανιχνεύσιμων παθογόνων σε πρώιμα στάδια μόλυνσης<sup>122</sup>. Αυτή η προσέγγιση ενισχύει τη δυνατότητα εφαρμογής βιώσιμων πρακτικών διαχείρισης.

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε ορισμένους περιορισμούς όπως:

- Η γεωγραφική ετερογένεια διότι η παρουσία παθογόνων διέφερε σημαντικά μεταξύ περιοχών, γεγονός που καταδεικνύει την ανάγκη για τοπικές στρατηγικές διαχείρισης.
- Η περιβαλλοντική πίεση αφού οι ανθρωπογενείς επιδράσεις και οι εντατικές πρακτικές εκτροφής ευνοούν τη μετάδοση παθογόνων όπως αναδείχθηκε από την παθογένεια των ιχθύων από την περιοχή της Σαλαμίνας.
- Αντοχή στα αντιβιοτικά αφού η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών, καθιστώντας επιτακτική τη χρήση εμβολίων και προβιοτικών<sup>122</sup>. Η περίπτωση των δειγμάτων της

Θεσπρωτίας με παραμονή του παθογόνου έπειτα του πρώτου εντοπισμού και μετά το πέρας μηνών θεραπείας

Σύμφωνα με τα παραπάνω αλλά και μέσω της βιβλιογραφικής μελέτης προκύπτουν μελλοντικές προτάσεις για την βιοασφάλεια των εκτρεφόμενων ιχθύων όπως:

- **Η ανάπτυξη και χρήση εμβολίων:** Τα εμβόλια μπορούν να αποτελέσουν αποτελεσματική λύση για τη μείωση της θνησιμότητας από συγκεκριμένα παθογόνα, όπως η *Pasteurella spp.*<sup>121</sup>
- **Προώθηση Ολοκληρωμένων Συστημάτων Διαχείρισης (IMTA):** Η ενσωμάτωση πολυτροφικών συστημάτων μπορεί να συμβάλει στη μείωση της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης<sup>123</sup>.
- **Έρευνα στη Γενετική Ανθεκτικότητα:** Η επιλογή ανθεκτικών πληθυσμών ψαριών μπορεί να μειώσει την επίδραση των λοιμώξεων<sup>121</sup>.
- **Εφαρμογή Ψηφιακής Παρακολούθησης:** Τα συστήματα IoT και ανάλυσης δεδομένων μπορούν να προσφέρουν προληπτική παρακολούθηση της υγείας των ψαριών<sup>121</sup>.
- **Περιορισμός Αντιβιοτικών:** Η εκπαίδευση των παραγωγών στη βιώσιμη χρήση φαρμακευτικών αγωγών είναι κρίσιμη για τη μείωση της αντοχής στα αντιβιοτικά<sup>121</sup>.

Η παρούσα μελέτη συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση της δυναμικής των Gram-αρνητικών παθογόνων και παρέχει πρακτικές προτάσεις για την ενίσχυση της υγείας και της βιωσιμότητας στις Μεσογειακές υδατοκαλλιέργειες<sup>124</sup>. Η εφαρμογή καινοτόμων μεθόδων διάγνωσης και διαχείρισης είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της οικονομικής και περιβαλλοντικής βιωσιμότητας του κλάδου.

## 6.1 Κατανόηση της Δυναμικής των Νοσημάτων

Η κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του ξενιστή, του παθογόνου και του περιβάλλοντος είναι καθοριστική για την ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών πρόληψης και ελέγχου των λοιμωδών νοσημάτων στις υδατοκαλλιέργειες. Τα παθογόνα που πλήττουν τις υδατοκαλλιέργειες, όπως τα βακτήρια, οι ιοί και τα παράσιτα, αλληλεπιδρούν με τον ξενιστή (τους ιχθύες) και το περιβάλλον τους με τρόπους που επηρεάζουν την εξάπλωση των λοιμώξεων και την έκταση των επιπτώσεών τους<sup>125</sup>.



Η κατανόηση αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη στρατηγικών που να προλαμβάνουν ή να περιορίζουν την εξάπλωση των ασθενειών, ενώ παράλληλα μειώνουν τον αντίκτυπο στη βιωσιμότητα των υδατοκαλλιεργειών. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη δυναμική της ασθένειας περιλαμβάνουν τη φυσιολογία του ξενιστή, τη συμπεριφορά του παθογόνου, την αλληλεπίδραση του παθογόνου με το περιβάλλον, καθώς και τις συνθήκες διαχείρισης της υδατοκαλλιέργειας.

## 6.2 Αλληλεπίδραση Ξενιστή-Παθογόνου-Περιβάλλοντος

Το περιβάλλον της υδατοκαλλιέργειας, όπως η θερμοκρασία του νερού, τα επίπεδα του οξυγόνου, η ποιότητα του νερού και η παρουσία άλλων οργανισμών, επηρεάζει άμεσα την υγεία των ιχθύων και την εμφάνιση ασθενειών. Για παράδειγμα, οι υψηλές θερμοκρασίες νερού μπορούν να εντείνουν τη δραστηριότητα των παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ η ρύπανση του νερού μπορεί να καταστείλει τις φυσικές άμυνες των ιχθύων, καθιστώντας τους πιο ευάλωτους σε λοιμώξεις. Η ποιότητα του νερού επηρεάζει την ανάπτυξη και την αντοχή των παθογόνων, καθώς και την ικανότητα του οργανισμού να ανταποκριθεί σε αυτές τις επιθέσεις.

Η παρουσία άλλων ειδών, όπως είναι τα παράσιτα ή τα φυτοπλαγκτόν, μπορεί επίσης να επηρεάσει την ανάπτυξη και την εξάπλωση των ασθενειών. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των παθογόνων και των άλλων οργανισμών του περιβάλλοντος μπορεί να ενισχύσει τη δυναμική των λοιμώξεων ή, αντιθέτως, να περιορίσει την εξάπλωσή τους. Έτσι, η παρακολούθηση του περιβάλλοντος και των συνθηκών που επικρατούν στις υδατοκαλλιέργειες είναι θεμελιώδης για την κατανόηση της εξέλιξης των ασθενειών και την ανάπτυξη στρατηγικών παρέμβασης<sup>126</sup>.

## 6.3 Μηχανισμοί Εξάρσεων Νοσημάτων

Η έρευνα σχετικά με τους μηχανισμούς που οδηγούν στις εξάρσεις των ασθενειών είναι κρίσιμη για την κατανόηση των αιτίων και της πορείας τους. Οι εξάρσεις συνήθως προκαλούνται από έναν συνδυασμό παραγόντων που περιλαμβάνουν την αλλαγή στις συνθήκες του περιβάλλοντος, την παρουσία νέων στελεχών παθογόνων ή την εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος των ιχθύων<sup>127</sup>. Για παράδειγμα, οι εξάρσεις λοιμώξεων λόγω βακτηρίων, όπως οι *Vibrio* ή οι *Aeromonas*, συχνά συνδέονται με την αύξηση της

θερμοκρασίας του νερού, η οποία ευνοεί την ανάπτυξη αυτών των παθογόνων και ενισχύει τη μετάδοσή τους.

Επιπλέον, η συνύπαρξη των ιχθύων με άλλες ασθένειες ή λοιμώξεις, η ύπαρξη αυξημένων πιέσεων λόγω της πυκνότητας των ιχθύων στις υδατοκαλλιέργειες, καθώς και οι μη αποδεκτές συνθήκες διατροφής και υγιεινής μπορούν να συμβάλουν στην εκδήλωση επιδημιών.

Η κατανόηση των μηχανισμών εξάρσεων απαιτεί τη συνεχιζόμενη έρευνα στον τομέα της επιδημιολογίας των ασθενειών και τη μελέτη των συμπεριφορών των παθογόνων, προκειμένου να εντοπιστούν τα αίτια και οι παράγοντες κινδύνου που ευνοούν τις εξάρσεις.

## 6.4 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες και Ασθένειες

Η κατανόηση του ρόλου των περιβαλλοντικών παραμέτρων στη δυναμική των ασθενειών στις υδατοκαλλιέργειες είναι θεμελιώδης για την ανάπτυξη στρατηγικών διαχείρισης που να μειώνουν τον αντίκτυπο των ασθενειών. Ειδικότερα, οι παράγοντες που σχετίζονται με τη θερμοκρασία, την οξύτητα του νερού (pH), την περιεκτικότητα σε οξυγόνο, τη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών και την ποιότητα του νερού γενικότερα, επηρεάζουν τη δραστηριότητα των παθογόνων και την ευαισθησία των ιχθύων σε ασθένειες. Οι διακυμάνσεις σε αυτές τις παραμέτρους μπορούν να προκαλέσουν σημαντική επιδείνωση των συνθηκών διαβίωσης, ευνοώντας την ανάπτυξη μικροβιακών παθογόνων, παράσιτων και άλλων παραγόντων που επιβαρύνουν την υγεία των ιχθύων.

Η ενσωμάτωση της παρακολούθησης των περιβαλλοντικών συνθηκών σε συστήματα διαχείρισης των υδατοκαλλιεργειών και η ενσωμάτωσή της στην επιδημιολογία των ασθενειών είναι ένα κρίσιμο βήμα για την αναγνώριση των παραγόντων που επηρεάζουν την υγεία των ιχθύων και την ανάπτυξη στρατηγικών για την πρόληψη και τον έλεγχο των λοιμώξεων<sup>128</sup>.

Η κατανόηση της δυναμικής των ασθενειών στις υδατοκαλλιέργειες απαιτεί μια ολοκληρωμένη προσέγγιση που να περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του ξενιστή, του παθογόνου και του περιβάλλοντος. Η συνεχιζόμενη έρευνα στους μηχανισμούς εξάρσεων ασθενειών και την επιρροή των περιβαλλοντικών παραμέτρων είναι αναγκαία για την ανάπτυξη στρατηγικών πρόληψης και ελέγχου. Η εφαρμογή αυτών των στρατηγικών θα βοηθήσει στην προστασία των ιχθύων και στην ενίσχυση της βιωσιμότητας των

υδατοκαλλιιεργειών, με την ταυτόχρονη διασφάλιση της υγείας των καταναλωτών και της περιβαλλοντικής ισορροπίας<sup>128</sup>.

## 6.5 Περιορισμοί της Μελέτης

Η παρούσα μελέτη, παρότι προσφέρει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την παρουσία Gram-αρνητικών παθογόνων σε μεσογειακά είδη ιχθύων υδατοκαλλιέργειας, υπόκειται σε ορισμένους περιορισμούς που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

### Περιορισμένη γεωγραφική κάλυψη

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας, γεγονός που μπορεί να μην αντικατοπτρίζει πλήρως την επιδημιολογική εικόνα των παθογόνων σε όλη τη χώρα. Η παρουσία και η κατανομή των βακτηρίων επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες και συνθήκες εκτροφής, οι οποίες ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών περιοχών υδατοκαλλιέργειας και δεν καταγράφηκαν.

### Μέγεθος δείγματος

Ο αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν μπορεί να μην είναι επαρκής για την εξαγωγή ευρύτερων συμπερασμάτων αναφορικά με τον συνολικό επιπολασμό των παθογόνων. Η λήψη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων, καθώς και η επανάληψη της μελέτης σε διαφορετικές χρονικές περιόδους, θα μπορούσαν να βελτιώσουν την ακρίβεια των αποτελεσμάτων.

### Περιορισμοί των μοριακών και βιοχημικών μεθόδων

Η RT-qPCR και η μέθοδος Microgen™ GN A+B ID, που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των παθογόνων, αν και προσφέρουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, έχουν ορισμένους περιορισμούς. Η RT-qPCR μπορεί να εντοπίσει γενετικό υλικό από μη βιώσιμα βακτήρια, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση του επιπολασμού των παθογόνων. Από την άλλη, οι βιοχημικές μέθοδοι ταυτοποίησης μπορεί να παρουσιάζουν περιορισμούς στην ανίχνευση συγκεκριμένων βακτηριακών στελεχών ή παραλλαγών. Το γεγονός όμως ότι τα αποτελέσματα και των δύο μεθόδων συμπίπτουν μειώνει τις πιθανότητες αβεβαιότητας και αυξάνει το ποσοστό επαλήθευσης.

### Έλλειψη δεδομένων για την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

Η παρούσα μελέτη δεν εστίασε στην ανάλυση της ανθεκτικότητας των παθογόνων στα αντιβιοτικά. Η κατανόηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας είναι κρίσιμη για τη

διαχείριση των λοιμώξεων στις ιχθυοκαλλιέργειες, καθώς η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη πολυανθεκτικών στελεχών.

#### Περιβαλλοντικοί και διαχειριστικοί παράγοντες

Παρόλο που η μελέτη αναδεικνύει την παρουσία παθογόνων, δεν ελήφθησαν υπόψη παράγοντες όπως η ποιότητα του νερού, η διατροφή των ιχθύων και οι πρακτικές διαχείρισης των μονάδων υδατοκαλλιέργειας, οι οποίοι μπορεί να επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη διασπορά των βακτηρίων.

Συμπερασματικά, αν και η μελέτη παρέχει πολύτιμα δεδομένα, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες με μεγαλύτερη γεωγραφική κάλυψη, μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος και πρόσθετες αναλύσεις, όπως η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και η συσχέτιση με περιβαλλοντικές συνθήκες, ώστε να εξαχθούν πιο ολοκληρωμένα συμπεράσματα για τη διαχείριση των Gram-αρνητικών βακτηριακών λοιμώξεων στις υδατοκαλλιέργειες.

## 7. Συμπεράσματα

Η παρούσα πτυχιακή εργασία ανέδειξε τη σημαντικότητα της διερεύνησης των Gram αρνητικών παθογόνων που απαντώνται στη μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια, εστιάζοντας στις λοιμώξεις που πλήττουν είδη όπως η τσιπούρα και το λαβράκι. Τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν ότι η χρήση μοριακών τεχνικών, όπως η RT-qPCR, αποτελεί εξαιρετικά αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδο για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών. Οι μέθοδοι αυτές διευκολύνουν την έγκαιρη διάγνωση και τη στοχευμένη αντιμετώπιση των ασθενειών, ελαχιστοποιώντας τις οικονομικές απώλειες και τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις.

Παράλληλα, η συνδυαστική χρήση βιοχημικών μεθόδων, όπως η εφαρμογή του Microgen™ GN A+B ID, συνέβαλε στη διασταύρωση και επαλήθευση των αποτελεσμάτων, επιβεβαιώνοντας την παρουσία και την ταυτοποίηση συγκεκριμένων παθογόνων. Αυτή η πολυεπίπεδη προσέγγιση επέτρεψε τη βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας και της δυναμικής εξάπλωσης των λοιμώξεων στα συστήματα υδατοκαλλιέργειας.

Η σημαντικότητα των παραπάνω ευρημάτων έγκειται στην άμεση εφαρμογή τους στη βελτίωση της διαχείρισης των ασθενειών στις ιχθυοκαλλιέργειες όπως προτείνουν πρόσφατες μελέτες<sup>129</sup>. Η ενίσχυση της χρήσης των μοριακών και βιοχημικών εργαλείων, σε συνδυασμό με βιώσιμες πρακτικές διαχείρισης, μπορεί να συμβάλει αποφασιστικά στην προστασία της υγείας των εκτρεφόμενων ειδών, στη διασφάλιση της ποιότητας των προϊόντων και στη βιωσιμότητα του κλάδου.

## Βιβλιογραφία

1. Subasinghe, R., Soto, D., & Jia, J. (2009). Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 2–9. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01002.x>
2. Bostock, J., McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., Little, D., Ross, L., Handisyde, N., Gatward, I., & Corner, R. (2010). Aquaculture: Global status and trends. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 365, Issue 1554, pp. 2897–2912). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0170>
3. FAO. (2007). *Cage aquaculture Regional reviews and global overview*. <https://www.researchgate.net/publication/308523155>
4. Rosa, R., Marques, A., & Nunes, M. L. (2014). Mediterranean aquaculture in a changing climate. *The Mediterranean Sea: Its History and Present Challenges*, 605–616.
5. Rosa, R., Marques, A., & Nunes, M. L. (2012). Impact of climate change in Mediterranean aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 4(3), 163–177. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01071.x>
6. Cascarano, M. C., Stavrakidis-Zachou, O., MLadineo, I., Thompson, K. D., Papandroulakis, N., & Katharios, P. (2021). Mediterranean aquaculture in a changing climate: Temperature effects on pathogens and diseases of three farmed fish species. In *Pathogens* (Vol. 10, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091205>
7. Borghese, J., Giangrande, A., Arduini, D., Trani, R., Doria, L., Anglano, M., Rizzo, L., & Rossi, S. (2025). Influence of an innovative IMTA system (Mediterranean Sea, Italy) on environmental and biological parameters: Seasonal analysis. *Aquaculture*, 596, 741726.
8. Chatzivasileiou, D., Dimitriou, P. D., Theodorou, J., Kalantzi, I., Magiopoulos, I., Papageorgiou, N., Pitta, P., Tsapakis, M., & Karakassis, I. (2022). An IMTA in



Greece: Co-Culture of Fish, Bivalves, and Holothurians. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/jmse10060776>

9. Nielsen, R., Guillen, J., Llorente Garcia, I., Asche, F., Garlock, T., Kreiss, C. M., Novaković, S. V., Danatskos, C., Cozzolino, M., & Pokki, H. (2025). An analysis of the European *aquaculture* industry using the aquaculture performance indicators. *Aquaculture Economics & Management*, 1–22.
10. Massa, F., Onofri, L., & Fezzardi, D. (2017). Aquaculture in the Mediterranean and the Black Sea: a Blue Growth perspective. In *Handbook on the economics and management of sustainable oceans* (pp. 93–123). Edward Elgar Publishing.
11. Ibaibarriaga, L., Uriarte, A., Konrad, C., & Mantopoulou Palouka, D. (2025). *Scientific Technical and Economic Committee for Fisheries (STECF) Methodologies for Mediterranean stock assessments and the estimation of reference points*.
12. Masi, M., Marrocco, E. S., Fusco, G., Adinolfi, F., & Vecchio, Y. (2025). The economic sustainability of Italian aquaculture farms: Who has the potential to start the blue transition? *Marine Policy*, 171, 106478.
13. ΕΛΟΠΥ. (2024). *Ετήσια Έκθεση Υδατοκαλλιέργειας 2024 Aquaculture Annual Report 2024 Ελληνική Οργάνωση Παραγωγών Υδατοκαλλιέργειας Hellenic Aquaculture Producers Organisation*. [www.fishfromgreece.com](http://www.fishfromgreece.com)
14. FAO. (2024). The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. In *The State of World Fisheries and Aquaculture 2024*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cd0683en>
15. Mishra, A., Nam, G.-H., Gim, J.-A., Lee, H.-E., Jo, A., & Kim, H.-S. (2018). Current challenges of *Streptococcus* infection and effective molecular, cellular, and environmental control methods in aquaculture. *Molecules and Cells*, 41(6), 495–505.
16. Pérez-Ruzafa, A., & Marcos, C. (2014). Ecology and distribution of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus 1758). *Biology of European Sea Bass*, 1.

17. Kousoulaki, K., Sæther, B., Albrektsen, S., & Noble, C. (2015). Review on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758) nutrition and feed management: a practical guide for optimizing feed formulation and farming protocols. *Aquaculture Nutrition*, 21(2), 129–151.
18. Svåsand, T., Crosetti, D., García-Vázquez, E., & Verspoor, E. (2007). *GENIMPACT 6th Framework plan of the European Commission Genetic impact of aquaculture activities on native populations*.
19. *Dicentrarchus labrax*, *European seabass* - *FishBase*. (n.d.). Retrieved January 29, 2025, from <https://www.fishbase.org.au/v4/summary/63>
20. Rosado, D., Xavier, R., Severino, R., Tavares, F., Cable, J., & Pérez-Losada, M. (2019). Effects of disease, antibiotic treatment and recovery trajectory on the microbiome of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55314-4>
21. Rigos, G., Kogiannou, D., Padrós, F., Cristofol, C., Florio, D., Fioravanti, M., & Zarza, C. (2021). Best therapeutic practices for the use of antibacterial agents in finfish aquaculture: a particular view on European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Mediterranean aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13(3), 1285–1323.
22. Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A. H., & Austin, B. (2014). Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*, 431, 1–11.
23. Arabacı, M., Yilmaz, Y., Ceyhun, S., Erdoğan, O., Dorlay, H., Diler, I., Akhan, S., Kocabas, M., Özdemir, K., & Koyun, H. (2010). A review on population characteristics of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(6).
24. Mhalhel, K., Levanti, M., Abbate, F., Laurà, R., Guerrera, M. C., Aragona, M., Porcino, C., Briglia, M., Germanà, A., & Montalbano, G. (2023). Review on gilthead seabream (*Sparus aurata*) aquaculture: life cycle, growth, aquaculture practices and challenges. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(10), 2008.

25. *Sparus aurata*, Gilthead seabream - FishBase. (n.d.). Retrieved January 29, 2025, from <https://www.fishbase.org.au/v4/summary/1164>
26. Paperna, I. (1984). Review of diseases affecting cultured *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. In *l'Aquaculture du Bar et de Sparides* (pp. 465–482). INRA publication Paris.
27. Aly, S. M., Eissa, A. E., ElBanna, N. I., & Albutti, A. (2021). Efficiency of monovalent and polyvalent *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio Parahaemolyticus* vaccines on the immune response and protection in gilthead sea bream, *Sparus aurata* (L.) against vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 111, 145–151.
28. Magarinos, B., Romalde, J. L., Santos, Y., Casal, J. F., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1994). Vaccination trials on gilthead seabream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*. *Aquaculture*, 120(3–4), 201–208.
29. Reyes-Becerril, M., López-Medina, T., Ascencio-Valle, F., & Esteban, M. Á. (2011). Immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) following experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(4), 564–570.
30. Sitjà-Bobadilla, A., & Álvarez-Pellitero, M. (2009). *Experimental transmission of Sparicotyle chrysophrii (Monogenea: Polyopisthocotylea) to gilthead seabream (Sparus aurata) and histopathology of the infection.*
31. Sánchez-García, N., Raga, J. A., & Montero, F. E. (2014). Risk assessment for parasites in cultures of *Diplodus puntazzo* (Sparidae) in the Western Mediterranean: prospects of cross infection with *Sparus aurata*. *Veterinary Parasitology*, 204(3–4), 120–133.
32. Smirnov, M., Ofek, T., Hershko, H., & Ron, T. B. (2021). *First report of Iridovirus (ISKNV) infection in Israeli mariculture gilthead sea bream (Sparus aurata) at the Mediterranean Sea.*

33. Aly, S. M., & Fathi, M. (2024). Advancing aquaculture biosecurity: a scientometric analysis and future outlook for disease prevention and environmental sustainability. *Aquaculture International*, 1–27.
34. Hoseinifar, S. H., Sun, Y.-Z., Wang, A., & Zhou, Z. (2018). Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2429.
35. Dissasa, G., Lemma, B., & Mamo, H. (2022). Isolation and identification of major bacteria from three Ethiopian rift valley lakes live and processed fish, and water samples: implications in sanitary system of fish products. *BMC Veterinary Research*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03508-w>
36. Pérez-Sánchez, T., Mora-Sánchez, B., & Balcázar, J. L. (2018). Biological approaches for disease control in aquaculture: advantages, limitations and challenges. *Trends in Microbiology*, 26(11), 896–903.
37. Petty, B. D., & Francis-Floyd, R. (2022). *Bacterial Diseases of Fish*. <https://www.msdevetmanual.com/exotic-and-laboratory-animals/aquarium-fish/bacterial-diseases-of-fish>
38. Petrucci, S., Costa, C., Broyles, D., Dikici, E., Daunert, S., & Deo, S. (2021). On-site detection of food and waterborne bacteria—Current technologies, challenges, and future directions. *Trends in Food Science & Technology*, 115, 409–421.
39. Mekasha, S., & Linke, D. (2021). Secretion Systems in Gram-Negative Bacterial Fish Pathogens. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.782673>
40. Boulares, M., Mankai, M., Aouadhi, C., Olfa, B. M., & Hassouna, M. (2013). Characterisation and identification of spoilage psychotrophic Gram-negative bacteria originating from Tunisian fresh fish. *Annals of Microbiology*, 63(2), 733–744. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0527-3>

41. Pintea-Simon, I.-A., Bancu, L., Mare, A. D., Ciurea, C. N., Toma, F., & Man, A. (2024). Rapid Molecular Diagnostics of Pneumonia Caused by Gram-Negative Bacteria: A Clinician's Review. *Antibiotics*, 13(9), 805. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13090805>
42. Sanches-Fernandes, G. M. M., Sá-Correia, I., & Costa, R. (2022). Vibriosis Outbreaks in Aquaculture: Addressing Environmental and Public Health Concerns and Preventive Therapies Using Gilthead Seabream Farming as a Model System. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.904815>
43. Popović, N. T., Kepec, S., Kazazić, S. P., Strunjak-Perović, I., Bojanić, K., & Čož-Rakovac, R. (2022). Identification of environmental aquatic bacteria by mass spectrometry supported by biochemical differentiation. *PLoS ONE*, 17(6 June). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269423>
44. Pepi, M., & Focardi, S. (2021). Antibiotic-resistant bacteria in aquaculture and climate change: A challenge for health in the mediterranean area. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 18, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115723>
45. Vezzulli, L., Chelossi, E., Riccardi, G., & Fabiano, M. (2002). Bacterial community structure and activity in fish farm sediments of the Ligurian sea (Western Mediterranean). *Aquaculture International*, 10, 123–141.
46. Montánchez, I., Ogayar, E., Plágaro, A. H., Esteve-Codina, A., Gómez-Garrido, J., Orruño, M., Arana, I., & Kaberdin, V. R. (2019). Analysis of *Vibrio harveyi* adaptation in sea water microcosms at elevated temperature provides insights into the putative mechanisms of its persistence and spread in the time of global warming. *Scientific Reports*, 9(1), 289.
47. Novriadi, R. (2016). Vibriosis in aquaculture. *Omni-Akuatika*, 12(1).

48. Chatterjee, S., & Halder, S. (2012). *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *J. Mar. Sci. Res. Dev. S, 1*, 1–7.
49. Cámara-Ruiz, M., Cerezo, I. M., Guardiola, F. A., García-Beltrán, J. M., Balebona, M. C., Moriñigo, M. Á., & Esteban, M. Á. (2021). Alteration of the Immune Response and the Microbiota of the Skin during a Natural Infection by *Vibrio harveyi* in European Seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Microorganisms*, 9(5), 964.
50. Sheikh, H., John, A., Musa, N., Abdulrazzak, L. A., Alfatama, M., & Fadhlin, A. (2022). *Vibrio* spp. and their vibriocin as a vibriosis control measure in aquaculture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(10), 4477–4491.
51. Zhang, X.-H., He, X., & Austin, B. (2020). *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Marine Life Science & Technology*, 2, 231–245.
52. Daly, J. G., & Aoki, T. (2011). Pasteurellosis and other bacterial diseases. In *Fish diseases and disorders. Volume 3: viral, bacterial and fungal infections* (pp. 632–668). CABI Wallingford UK.
53. Toranzo, A. E., Casal, J. F., Figueras, A., Magarin, B., & Barja, J. L. (1991). Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture*, 99(1–2), 1–15.
54. Noya, M., Magariños, B., & Lamas, J. (1995). Interactions between peritoneal exudate cells (PECs) of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and *Pasteurella piscicida*. A morphological study. *Aquaculture*, 131(1–2), 11–21.
55. Centers for Disease Control and Prevention. (1977). *Details-Public Health Image Library (PHIL)*. <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=16102>
56. Lab Animal. (2008). Diagnosis | Pasteurellosis. *Lab Animal*, 37(1), 18–19. <https://doi.org/10.1038/labon0108-18>



57. Tawfeek, W. S., Kassab, A. S., Okasha, L. A., Abdelsalam, M., & Sherif, A. H. (2024). The phenotypic and genetic characteristics of *Pseudomonas anguilliseptica* strains associated with mortalities in farmed sea bream and sea bass. *Aquaculture International*, 32(4), 3973–3992.
58. Semwal, A., Kumar, A., & Kumar, N. (2023). A review on pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and their mitigation through medicinal herbs in aquaculture. *Heliyon*, 9(3).
59. Nielsen, M. E., Høi, L., Schmidt, A. S., Qian, D., Shimada, T., Shen, J. Y., & Larsen, J. L. (2001). Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China? *Diseases of Aquatic Organisms*, 46(1), 23–29.
60. Pereira, C., Duarte, J., Costa, P., Braz, M., & Almeida, A. (2022). Bacteriophages in the control of *Aeromonas* sp. in aquaculture systems: An integrative view. *Antibiotics*, 11(2), 163.
61. Pessoa, R. B. G., de Oliveira, W. F., Marques, D. S. C., dos Santos Correia, M. T., de Carvalho, E. V. M. M., & Coelho, L. C. B. B. (2019). The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microbial Pathogenesis*, 130, 81–94.
62. Bispo dos Santos, S., Fernandez Alarcon, M., Ballaben, A. S., Harakava, R., Galetti, R., Guimarães, M. C., Natori, M. M., Takahashi, L. S., Ildefonso, R., & Rozas-Serri, M. (2023). First report of *Aeromonas veronii* as an emerging bacterial pathogen of farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. *Pathogens*, 12(8), 1020.
63. Smyrli, M., Prapas, A., Rigos, G., Kokkari, C., Pavlidis, M., & Katharios, P. (2017). *Aeromonas veronii* infection associated with high morbidity and mortality in farmed European seabass *Dicentrarchus labrax* in the Aegean Sea, Greece. *Fish Pathology*, 52(2), 68–81.
64. Gouife, M., Chen, S., Huang, K., Nawaz, M., Jin, S., Ma, R., Wang, Y., Xue, L., & Xie, J. (2022). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in mariculture. *Aquaculture International*, 30(3), 1453–1480.

65. Romalde, J. L. (2002). Photobacterium damsela subsp. piscicida: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, 5, 3–9.
66. Laganà, P., Caruso, G., Minutoli, E., Zacccone, R., & Delia, S. (2011). Susceptibility to antibiotics of Vibrio spp. and Photobacterium damsela ssp. piscicida strains isolated from Italian aquaculture farms. *New Microbiologica*, 34(1), 53–63.
67. Labella, A., Berbel, C., Manchado, M., Castro, D., & Borrego, J. J. (2011). Photobacterium damsela subsp. damsela, an emerging pathogen affecting new cultured marine fish species in southern Spain. *Recent Advances in Fish Farms*, 9, 135–152.
68. Hayano, S., Masaki, T., Tadakuma, R., & Kashima, M. (2021). Photobacterium damsela subsp. damsela bacteraemia in a patient with liver cirrhosis. *BMJ Case Reports CP*, 14(6), e242580.
69. Shao, P., Yong, P., Zhou, W., Sun, J., Wang, Y., Tang, Q., Ren, S., Wu, Z., Zhao, C., & Xu, Y. (2019). First isolation of Photobacterium damsela subsp. damsela from half-smooth tongue sole suffering from skin-ulceration disease. *Aquaculture*, 511, 734208.
70. Essam, H. M., Abdellrazeq, G. S., Tayel, S. I., Torky, H. A., & Fadel, A. H. (2016). Pathogenesis of Photobacterium damsela subspecies infections in sea bass and sea bream. *Microbial Pathogenesis*, 99, 41–50.
71. Mata, A. I., Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M. M., Domínguez, L., & Fernández-Garayzábal, J. F. (2004). Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 3183–3187.
72. Balcazar, J. L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Girones, O., & Muzquiz, J. L. (2007). Quantitative detection of Aeromonas salmonicida in fish tissue by real-time PCR using self-quenched, fluorogenic primers. *Journal of Medical Microbiology*, 56(3), 323–328.

73. Balcazar, J. L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Girones, O., & Muzquiz, J. L. (2007). Quantitative detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue by real-time PCR using self-quenched, fluorogenic primers. *Journal of Medical Microbiology*, 56(3), 323–328.
74. Stoffregen, D. A., Backman, S. C., Perham, R. E., Bowser, P. R., & Babish, J. G. (1996). Initial disease report of *Streptococcus iniae* infection in hybrid striped (sunshine) bass and successful therapeutic intervention with the fluoroquinolone antibacterial enrofloxacin. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27(4), 420–434.
75. Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Nested polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2), pdb-prot095182.
76. Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29(3), 151–159.
77. Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), 47–51.
78. Wong, Y., Othman, S., Lau, Y., Radu, S., & Chee, H. (2018). Loop-mediated isothermal *amplification* (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 626–643.
79. Bier, F. F., von Nickisch-Rosenegk, M., Ehrentreich-Foerster, E., Reiss, E., Henkel, J., Strehlow, R., & Andresen, D. (2008). DNA microarrays. *Biosensing for the 21st Century*, 433–453.
80. Benedicenti, O., Måsøy Amundsen, M., Mohammad, S. N., Vrålstad, T., Strand, D. A., Weli, S. C., Patel, S., & Sindre, H. (2024). A refinement to eRNA and eDNA-based detection methods for reliable and cost-efficient screening of pathogens in Atlantic salmon aquaculture. *Plos One*, 19(10), e0312337.
81. Bohara, K., Yadav, A. K., & Joshi, P. (2022). Detection of fish pathogens in freshwater aquaculture using eDNA methods. *Diversity*, 14(12), 1015.

82. Askari, G. H., Shabani, A., & Miandare, H. K. (2013). *Application of molecular markers in fisheries and aquaculture*.
83. Overturf, K. (2009). *Molecular Research in Aquaculture*.
84. Tanya, C., & Kumar, R. (2010). Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2010.
85. Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 63, e3998.
86. Jernselius, S. (2024). Optimization of nucleic acid probes and transcriptional proteins for targeted data retrieval from DNA based data storage systems.
87. Priyanka, B., Patil, R. K., & Dwarakanath, S. (2016). A review on detection methods used for foodborne pathogens. *Indian Journal of Medical Research*, 144(3), 327–338.
88. Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), e6.
89. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–994.
90. Law, J. W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 5, 770.
91. Kabiraz, M. P., Majumdar, P. R., Mahmud, M. M. C., Bhowmik, S., & Ali, A. (2023). Conventional and advanced detection techniques of foodborne pathogens: A comprehensive review. *Heliyon*, 9(4).
92. Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., & Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50(4), S1–S5. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>

93. Dymond, J. S. (2013). Explanatory Chapter. In *Methods in Enzymology* (pp. 279–289). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-418687-3.00023-9>
94. Σκορίλας, Α. (2020). *Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική: Βασικές αρχές*. Πασχαλίδης.
95. Mackay, I. M. (2007). *Real-time PCR in microbiology*. Caister Academic Press Norfolk, UK.
96. Botes, M., de Kwaadsteniet, M., & Cloete, T. E. (2013). Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(1), 91–108. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6399-3>
97. Nina, N., Theoduloz, C., Giménez, A., & Schmeda-Hirschmann, G. (2020). Phenolics from the Bolivian highlands food plant *Ombrophytum subterraneum* (Aspl.) B. Hansen (Balanophoraceae): Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *Food Research International*, 137, 109382.
98. Austin, B., & Newaj-Fyzul, A. (2017). *Diagnosis and control of diseases of fish and shellfish*. Wiley Online Library.
99. Rungruangsak-Torrissen, K. (2018). *Biochemical techniques: development and implementation for making differences in aquaculture and fisheries research on environmental impact and climate change*.
100. Shields, P., & Cathcart, L. (2010). Oxidase test protocol. *American Society for Microbiology*, 1–9.
101. Hedberg, M., Hasslöf, P., Sjöström, I., Twetman, S., & Stecksén-Blicks, C. (2008). Sugar fermentation in probiotic bacteria—an in vitro study. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(6), 482–485.
102. Abdallah, M. S., Mustapha, T., Gambo, A., & Ishaq, S. (2016). Biochemical identification and cultural characterization of some Gram-negative bacteria obtained

- from fecal/Diarrhoeal samples. *Cibtech Journal of Microbiology An Online International Journal*, 5, 17–24.
103. Cotter, P. D., & Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 429–453.
104. Pincus, D. H. (2006). Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association, 2006, 1–32.
105. Biemer, J. J. (1973). Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 3(2), 135–140.
106. Kagambèga, A. B., Dembélé, R., Bientz, L., M'Zali, F., Mayonnove, L., Mohamed, A. H., Coulibaly, H., Barro, N., & Dubois, V. (2023). Detection and characterization of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Hospital effluents of Ouagadougou, Burkina Faso. *Antibiotics*, 12(10), 1494.
107. Amjad, A., Mirza, I. A., Abbasi, S. A., Farwa, U., Malik, N., & Zia, F. (2011). Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. *Iranian Journal of Microbiology*, 3(4), 189.
108. van der Zwaluw, K., de Haan, A., Pluister, G. N., Bootsma, H. J., de Neeling, A. J., & Schouls, L. M. (2015). The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PloS One*, 10(3), e0123690.
109. Pournaras, S., Zarkotou, O., Poulou, A., Kristo, I., Vrioni, G., Themeli-Digalaki, K., & Tsakris, A. (2013). A combined disk test for direct differentiation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(9), 2986–2990.
110. Cunningham, S. A., Limbago, B., Traczewski, M., Anderson, K., Hackel, M., Hindler, J., Sahm, D., Alyanak, E., Lawsin, A., & Gulvik, C. A. (2017). Multicenter



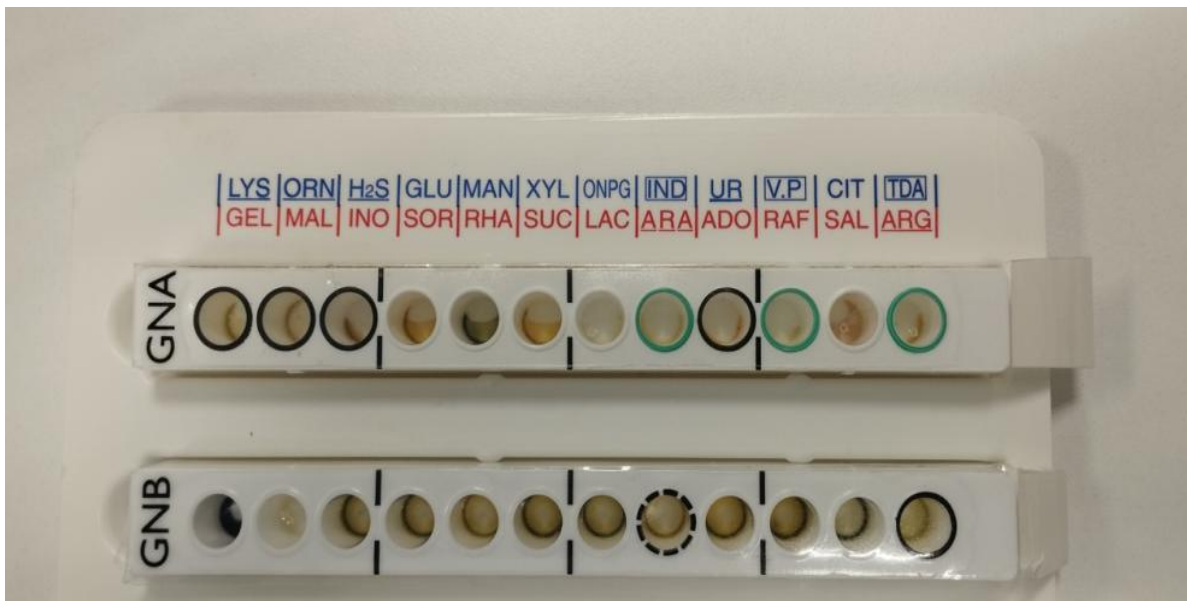
performance assessment of Carba NP test. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(6), 1954–1960.

111. Pires, J., Novais, A., & Peixe, L. (2013). Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12), 4281–4283.
112. Bridge, P. (2001). Biochemical and molecular techniques. In *Plant pathologist's pocketbook* (pp. 229–244). CABI Publishing Wallingford UK.
113. Lokman, P. M., & Symonds, J. E. (2014). Molecular and biochemical tricks of the research trade:-omics approaches in finfish aquaculture. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 48(3), 492–505.
114. Udoh, D. I., Eyo, A.-A. O., Asuquo, A. E., & Utsalo, S. J. (2023). 'Salmonella' serovars associated with bacteraemia infection in persons infected with human immunodeficiency virus with low CD4+ cell counts in Akwa Ibom State, Nigeria. *New Zealand Journal of Medical Laboratory Science*, 77(1), 28–32.
115. Versalovic, J. (2011). *Manual of clinical microbiology* (Vol. 1). American Society for Microbiology Press.
116. Benson, H. J. (2002). *Microbiological applications: a laboratory manual in general microbiology*. [McGraw-Hill].
117. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2020). *Medical microbiology*. Elsevier Health Sciences. <https://shop.elsevier.com/books/medical-microbiology/murray/978-0-323-67322-8>
118. Balcazar, J. L., & Borrego, J. J. (2020). Fish and Shellfish Pathogens. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 129, Issue 1, p. 2). Blackwell Science Ltd Oxford, UK.
119. Khehra, N., Padda, I., & Swift, C. (2023). Polymerase chain reaction (PCR). *StatPearls*.

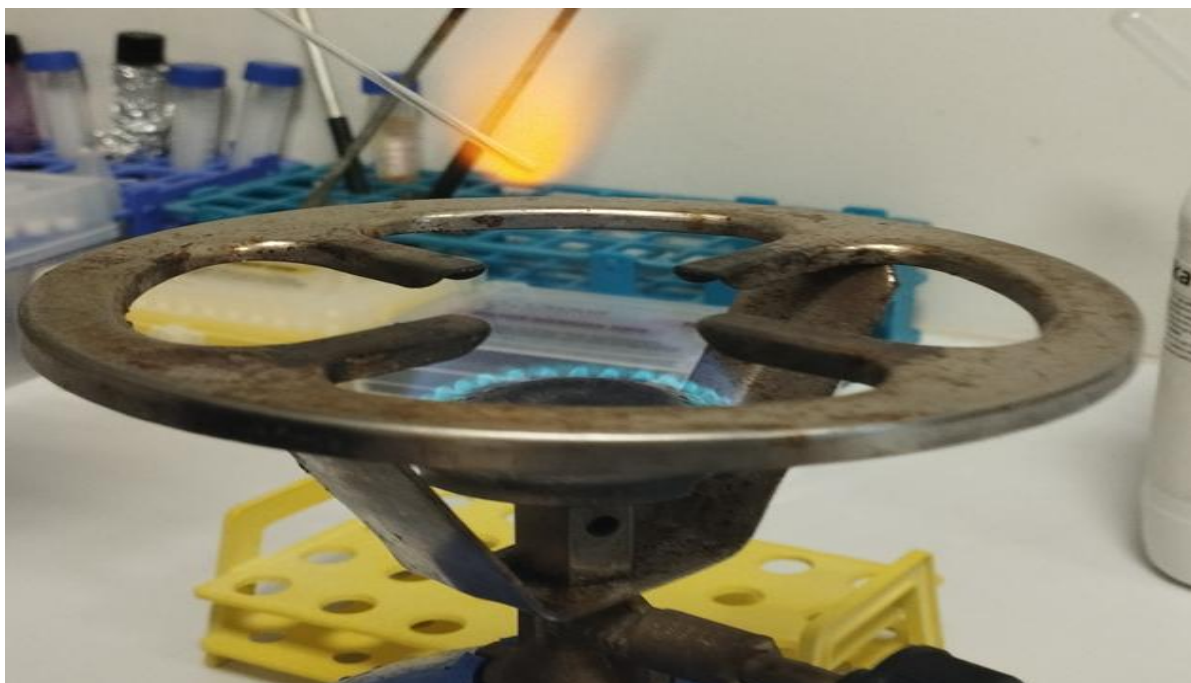
120. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 35–73.
121. Ziarati, M., Zorriehzahra, M. J., Hassantabar, F., Mehrabi, Z., Dhawan, M., Sharun, K., Emran, T. Bin, Dhama, K., Chaicumpa, W., & Shamsi, S. (2022). Zoonotic diseases of fish and their prevention and control. *Veterinary Quarterly*, 42(1), 95–118.
122. Moreira, M., Schrama, D., Farinha, A. P., Cerqueira, M., Raposo de Magalhaes, C., Carrilho, R., & Rodrigues, P. (2021). Fish pathology research and diagnosis in aquaculture of farmed fish; a proteomics perspective. *Animals*, 11(1), 125.
123. Filgueira, R., Guyondet, T., Reid, G. K., Grant, J., & Cranford, P. J. (2017). Vertical particle fluxes dominate integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) sites: implications for shellfish-fish synergy. *Aquaculture Environment Interactions*, 9, 127–143.
124. Timi, J. T., & Buchmann, K. (2023). A century of parasitology in fisheries and aquaculture. *Journal of Helminthology*, 97, e4.
125. Shariff, M. (1998). Impact of diseases on aquaculture in the Asia-Pacific region as exemplified by epizootic ulcerative syndrome (EUS). *Journal of Applied Ichthyology*, 14(3-4), 139–144.
126. Ferreira, J. G., Taylor, N. G. H., Cubillo, A., Lencart-Silva, J., Pastres, R., Bergh, Ø., & Guilder, J. (2021). An integrated model for aquaculture production, pathogen interaction, and environmental effects. *Aquaculture*, 536, 736438.
127. Sundh, H. (2009). *Chronic stress and intestinal barrier function: Implications for infection and inflammation in intensive salmon aquaculture*.
128. Lieke, T., Meinelt, T., Hoseinifar, S. H., Pan, B., Straus, D. L., & Steinberg, C. E. W. (2020). Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 943–965.

129. Jaies, I., Shah, F. A., Qadiri, S. S. N., Qayoom, I., Bhat, B. A., Dar, S. A., & Bhat, F. A. (2024). Immunological and molecular diagnostic techniques in fish health: present and future prospectus. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 551.

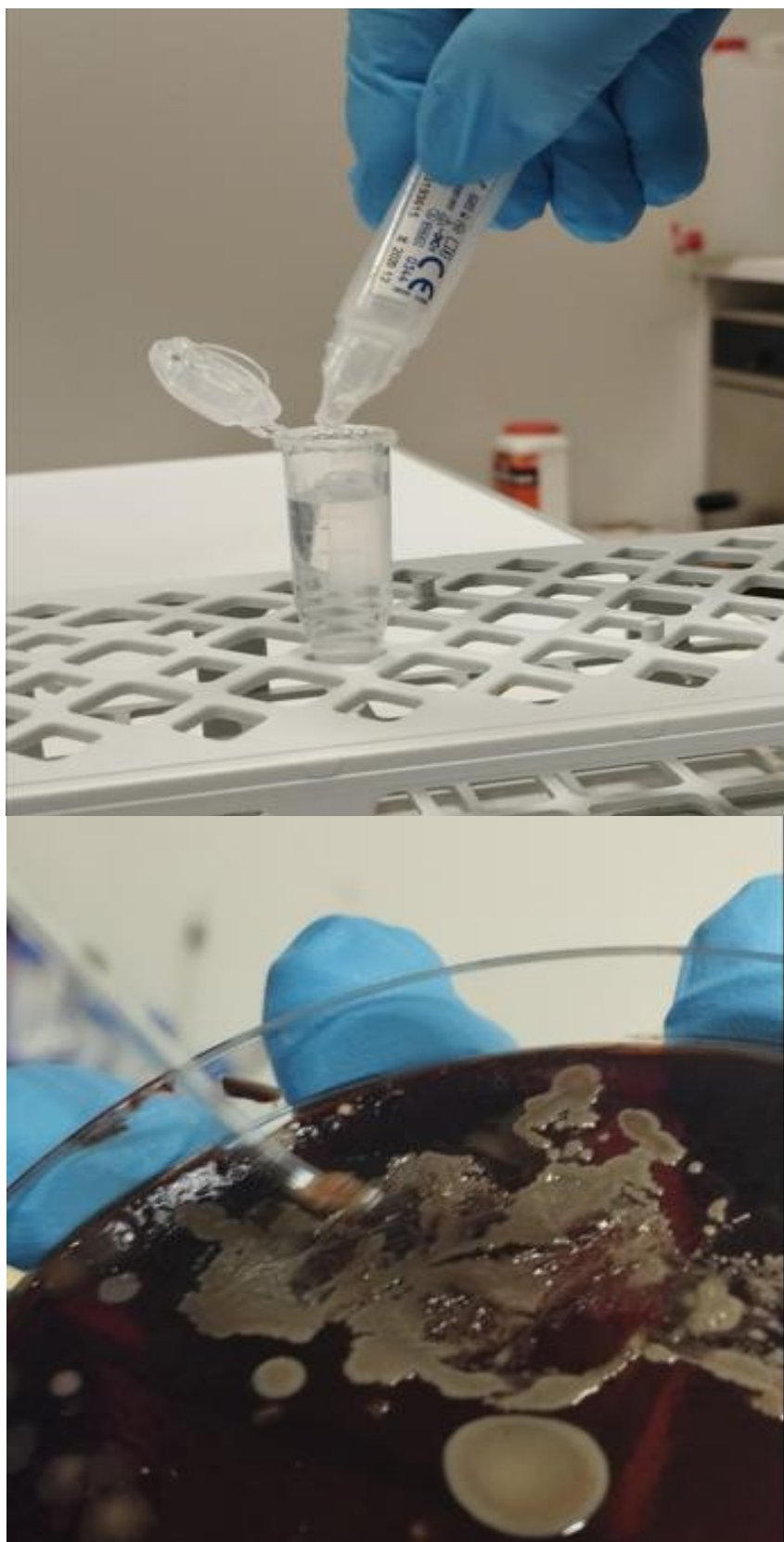
## Παράρτημα Α : Φωτογραφικό Υλικό



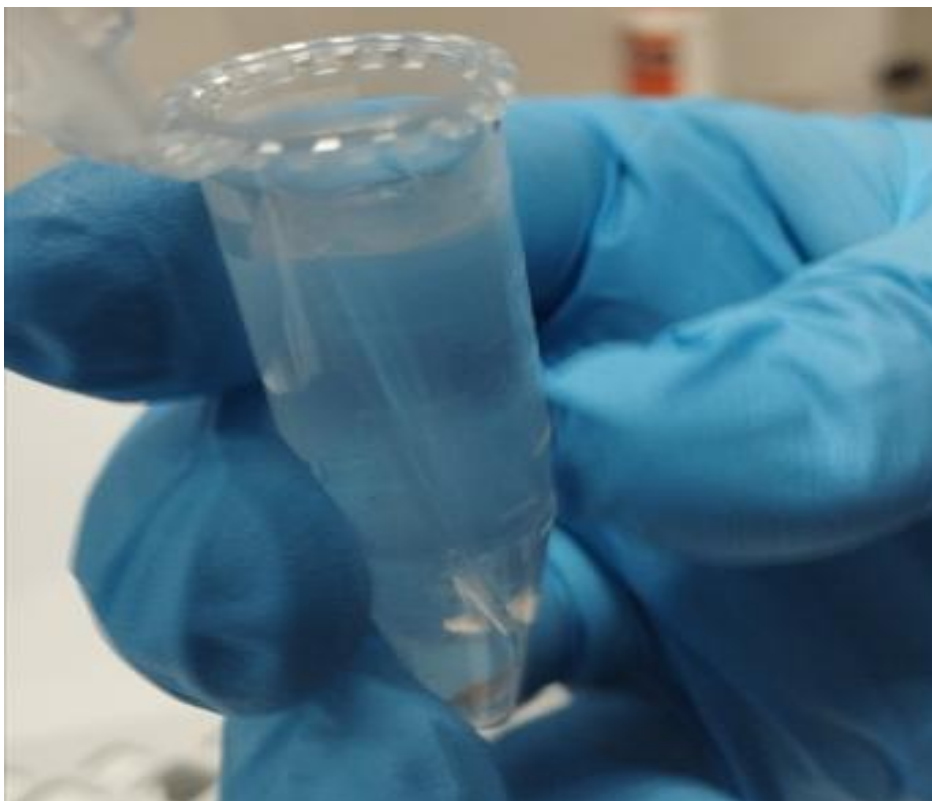
Εικόνα 20 Αφυδατωμένη ταινία GnA-GnB



Εικόνα 21 Αποστείρωση Pasteur Γυάλινη

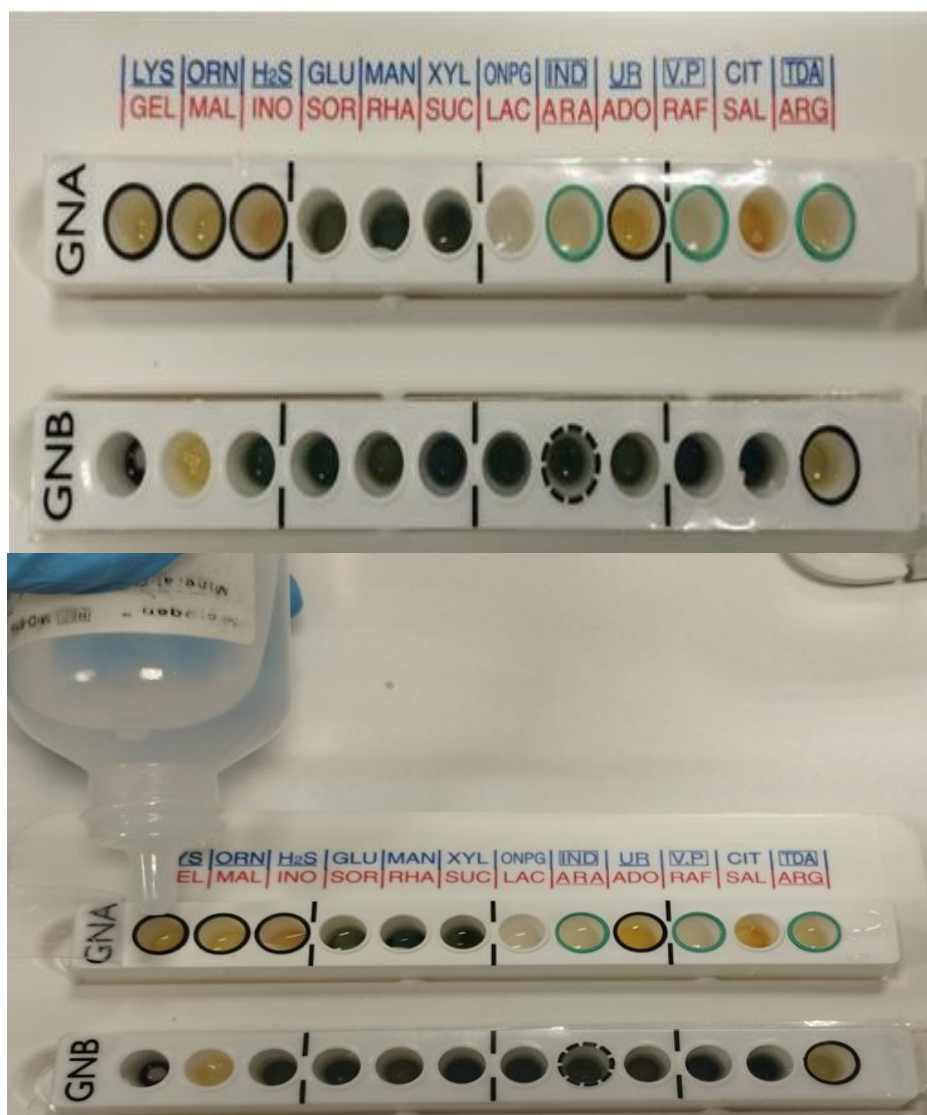


Εικόνα 22 Αποστειρωμένη ποσότητα αλατούχου ορού & δειγματοληψία αποικίας

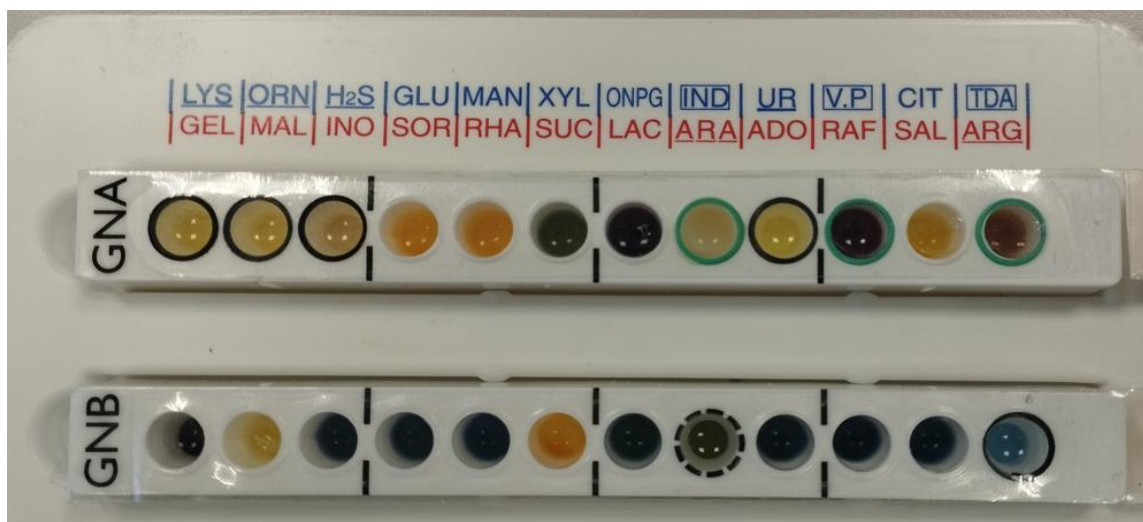


**Εικόνα 23** Ομογενοποίηση αποικίας στον αλατούχο ορό.





Εικόνα 24 Εκχύλιση ομογενοποιημένου ορού & προσθήκη ορυκτελαίου



Εικόνα 25 Εμφάνιση αποτελεσμάτων μετά από την προσθήκη των αντιδραστηρίων.

## Παράρτημα Β Πίνακες αναφοράς βιοχημικών

**Πίνακας 4: Πίνακας αναφοράς κωδικού προφίλ παθογόνου.**

Δείγματα Α																								
	GnA wells												GnB wells											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Αποτέλεσμα	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Δείκτης Αντίδρασης	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Αποτέλεσμα θετικών αντιδράσεων	6			7			4			5			4			1			0			1		
Κωδικός Παθογόνου	67454101 / Αερομονάδα																							

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης