



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ
ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**Απομόνωση και χαρακτηρισμός
βακτηριοφάγων για την καταπολέμηση της
δονακίωσης στην υδατοκαλλιέργεια**



Παναγιώτης Γ. Καλατζής

Ηράκλειο, 2014



UNIVERSITY OF CRETE

POST GRADUATE STUDIES PROGRAM

ENVIRONMENTAL BIOLOGY AND MANAGEMENT OF TERRESTRIAL
AND MARINE RESOURCES

Master of Science Thesis

Isolation and characterization of bacteriophages against vibriosis in aquaculture



Panos G. Kalatzis

Heraklion, 2014

Εξεταστική επιτροπή

Επιβλέπων καθηγητής

Μιχαήλ Παυλίδης (Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Μέλη εξεταστικής επιτροπής

Μαρουδιώ Κεντούρη (Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης)

Παντελής Καθάριος (Ερευνητής Γ Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας,
Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛΚΕΘΕ)

Ευχαριστίες	6
Χρηματοδότηση	8
Abstract	9
Περίληψη.....	10
Εισαγωγή	11
Πρόλογος	12
Δονακίωση	13
Ο αιτιολογικός παράγοντας - το γένος <i>Vibrio</i>	14
Μολυσματικότητα των <i>Vibrio</i>	16
Πύλες εισόδου των <i>Vibrio</i> στα ψάρια	17
Δονακίωση και περιβάλλον.....	18
Αντιμετώπιση δονακίωσης.....	19
Βακτηριοφάγοι.....	21
Ιστορική αναδρομή.....	22
Ταξινομική	23
Πολλαπλασιασμός των φάγων.....	26
Λυσιγονικό μονοπάτι.....	29
Αμυντικοί μηχανισμοί βακτηρίων	30
Εφαρμογές βακτηριοφάγων - Φαγοθεραπεία	31
Φαγοθεραπεία στην υδατοκαλλιέργεια	33
Η ιδιαίτερη περίπτωση του εκκολαπτηρίου - Φαγοθεραπεία	36
Στόχος της εργασίας.....	37
Υλικά και Μέθοδοι	38
Πειραματικός σχεδιασμός	39
Θρεπτικά υποστρώματα και μικροβιολογικές τεχνικές.....	39

Θρεπτικά υποστρώματα	39
Βακτηριακές καλλιέργειες	40
Τεχνική διπλής στιβάδας άγαρ	42
Καμπύλη ανάπτυξης του βακτηρίου	43
Βιοχημικός χαρακτηρισμός βακτηρίου	44
Μοριακός χαρακτηρισμός βακτηρίου	45
Εξαγωγή γενετικού υλικού	45
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	45
Αλληλούχιση και φυλογενετική ανάλυση	47
Απομόνωση και καθαρισμός βακτηριοφάγων	47
Δειγματοληψίες και καλλιέργειες εμπλουτισμού	47
Έλεγχος διηθημάτων εμπλουτισμού	48
Καθαρισμός και αύξηση του τίτλου των φάγων	49
Τιτλοδότηση και σταθερότητα βακτηριοφάγων	50
Χαρακτηρισμός βακτηριοφάγων	51
Εύρος ξενιστών φάγων	51
Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM)	52
Μορφολογία λυτικών πλακών	53
Γονιδίωμα και πέψη με ένζυμα περιορισμού	54
Λυτική δράση βακτηριοφάγων.....	55
Μονοφασική καμπύλη ανάπτυξης	55
<i>In vitro</i> πείραμα αποτελεσματικότητας βακτηριοφάγων.....	56
<i>In vivo</i> πείραμα αποτελεσματικότητας βακτηριοφάγων.....	57
Στατιστική και γραφική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	58
Υποβαθρο απομονωσησ βακτηριοφαγων	59
Αποτελέσματα	60
Βακτηριακός χαρακτηρισμός	61
Βιοχημικός χαρακτηρισμός	62
Μοριακός χαρακτηρισμός	67

Απομόνωση και χαρακτηρισμός βακτηριοφάγων	72
Εύρος ξενιστή	74
Μορφολογικός χαρακτηρισμός.....	75
Γενετικό υλικό και πέψη με περιοριστικά ένζυμα	77
Ήπιος / λυτικός	81
Χαρακτηριστικά κύκλου ζωής των βακτηριοφάγων.....	82
In vitro έλεγχος αποτελεσματικότητας βακτηριοφάγων.....	84
In vivo έλεγχος αποτελεσματικότητας βακτηριοφάγων.....	84
Συζήτηση	89
Εστιάζοντας στην φαγοθεραπεία	104
Βιβλιογραφία	107

Στην οικογένειά μου ...

Όποτε τους χρειάστηκα, σε όποια απόφαση και αν πήρα ήταν εκεί και με στήριξαν με
κάθε τρόπο.

Αφιερώνω τη μεταπτυχιακή μου διατριβή σε εσάς.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω του καθηγητές μου από το Πανεπιστήμιο Κρήτης κύριο Μιχάλη Παυλίδη που δέχθηκε να επιβλέψει την μεταπτυχιακή μου διατριβή καθώς επίσης και την κυρία Μαρουδιώ Κεντούρη που δέχθηκε να συμμετάσχει στην εξεταστική επιτροπή. Είναι οι άνθρωποι οι οποίοι μου έδωσαν την έμπνευση και μου έδωσαν την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθειά τους για να μάθω να σκέφτομαι και να προχωρήσω επιστημονικά στη ζωή μου.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Ντίνα Κοκκάρη η οποία με βοήθησε πάρα πολύ σε οτιδήποτε χρειάστηκα τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Έδειχνε πάντα κατανόηση σε οτιδήποτε συζητούσαμε και όταν το θέμα ήταν η μουσική, ευτυχώς με ανεχόταν. Ευχαριστώ Ντίνα!

Στα παιδιά του εργαστηρίου, στη Μαρία, τη Μαριάννα, το Roberto, τον JJ που συχνά περνούσαμε μαζί περισσότερες ώρες από όσες περνούσα με οποιονδήποτε άλλο και φροντίζαμε αυτές να περνούν ευχάριστα!

Στους ανθρώπους στο ινστιτούτο που έχουν δημιουργήσει ένα πολύ όμορφο κλίμα εργασίας δείχνοντας πάντα ευχάριστη διάθεση στην ατμόσφαιρα γεγονός που σε έκανε να περνάς καλά εκεί. Μαρία, Γιάννα, Νίκο, Νίκο, Νίκο, Κάσπερ, Ειρήνη, Στέλιο, Μανώλη σας ευχαριστώ πάρα πολύ.

Στους συνεργάτες εκτός ΕΛ. ΚΕ. Θ. Ε. που όμως με βοήθησαν να έρθω σε επαφή και να εκπαιδευτώ σε ένα άγνωστο σε μένα μέχρι τότε αντικείμενο όπως τα βακτήρια και οι βακτηριοφάγοι. Θέλω να ευχαριστήσω τον Mathias, το Roi και τη Sachia από το Πανεπιστήμιο της Κοπεγχάγης καθώς και τη Marina, τη Mzia, την Tiko, την Elene, την Tamuna, την Natia, την Ana, την Nino, την Eka και το Luka από το Ινστιτούτο Eliana της Τιφλίδας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω επίσης και στους φίλους και τις φίλες μου, στους δικούς μου ανθρώπους οι οποίοι άκουγαν σε πρώτη μετάδοση όλες τις ανησυχίες και τους προβληματισμούς που μοιραία προέκυψαν όλο αυτό το διάστημα του μεταπτυχιακού μου και βρήκαμε μαζί τις λύσεις.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα στον Αντώνη, διότι χωρίς τη στήριξη του η παρούσα διατριβή ίσως να μην ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στον άνθρωπο που πίστεψε σε εμένα περισσότερο από ότι πίστεψα εγώ στον ίδιο μου τον εαυτό και που έκανε οτιδήποτε περνάει από το χέρι του για να με βοηθήσει να πάω όσο ψηλότερα γίνεται. Παντελή ευχαριστώ για όλα.

Η εργασία αυτή χρηματοδοτήθηκε από τα έργα AQUAPHAGE (Marie Curie FP7-IRSES 2010) και FISHPHAGE (Αριστεία I, ΓΓΕΤ). Χρηματοδότηση έλαβα επίσης από το IKY.

Marie Curie – IRSES 2010, AQUAPHAGE Network for the development of Phage Therapy in Aquaculture, European Commission 7th Framework Programme



Το έργο FISHPHAGE «Βιολογικός έλεγχος βακτηρίων σε εκκολαπτήρια ψαριών με χρήση βακτηριοφάγων» χρηματοδοτείται από εθνικούς και κοινοτικούς πόρους (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος "Εκπαίδευση και δια Βίου Μάθηση", Δράση "ΑΡΙΣΤΕΙΑ", ΕΣΠΑ 2007-2013

Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών



ABSTRACT

The goal of this work was the isolation and characterization of lytic bacteriophages against fish pathogenic *Vibrios*.

A pathogenic *Vibrio* sp. common in the facilities of s of HCMR which was isolated during a vibriosis outbreak in *Sparus aurata* was used as a host. The bacterial strain was identified as *Vibrio alginolyticus*, following biochemical and molecular characterization.

Water from various sources and mussel from vibriosis-affected fish farms were sampled to isolate phages. Samples were enriched with nutrients as well as with the bacterial host and after filtration and purification procedures, 7 monoclonal bacteriophages were isolated. After increasing the titer of the 7 clonal phages, their morphology, host range and genome were studied. The 7 clonal phages following characterization were assigned into two different groups. One representative phage of each group, St2 and Grn1, were selected for further identification of their life cycle biological features (lytic activity, latency period, burst size and adsorption rate).

Efficacy of newly isolated bacteriophages was studied under both *in vitro* and *in vivo* experimental conditions.

In vitro: By infecting bacterial host's cultures, intense lytic activity was observed by diminishing the bacterial population to almost zero optical density for more than 6 hours.

In vivo: An effective **phage cocktail** was composed and added to live feeds cultures of *Brachionus plicatilis* resulting to the successful limitation of their bacterial load of *Vibrio*.

Current study's results conclude that bacteriophages can be used efficiently to control the populations of *Vibrio* that enter the marine hatcheries through live feeds.

Key-words

Bacteria, *Vibrio*, bacteriophages, isolation, characterization, phage therapy

Στόχος της εργασίας είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός λυτικών βακτηριοφάγων έναντι παθογόνων βακτηρίων του γένους *Vibrio*.

Παθογόνο βακτηριακό στέλεχος του γένους *Vibrio* το οποίο είναι κοινό στις εγκαταστάσεις του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. και απομονώθηκε από έξαρση δονακίωσης σε τσιπούρες *Sparus aurata* χρησιμοποιήθηκε σαν ξενιστής. Το βακτηριακό στέλεχος αυτό χαρακτηρίστηκε βιοχημικά και μοριακά και ταυτοποιήθηκε σαν στέλεχος του είδους *Vibrio alginolyticus*.

Έγιναν δειγματοληψίες νερού από διάφορες περιοχές και μυδιών από μονάδες υδατοκαλλιέργειας που είχαν προσβληθεί από δονακίωση. Τα δείγματα εμπλουτίστηκαν με την προσθήκη θρεπτικών συστατικών καθώς και με το βακτηριακό ξενιστή και έπειτα από επεξεργασία και διήθηση των εμπλουτισμένων δειγμάτων απομονώθηκαν. Μετά την αύξηση των τίτλων τους, οι βακτηριοφάγοι αυτοί χαρακτηρίστηκαν ως προς το εύρος ξενιστών τους, την μορφολογία τους και το γονιδίωμά τους. Οι 7 μονοκλωνικοί βακτηριοφάγοι κατατάχθηκαν σε 2 διακριτές ομάδες. Ένας αντιπροσωπευτικός φάγος από κάθε ομάδα, ο St2 και ο Gm1, επιλέχθηκαν για να προσδιοριστούν τα βιολογικά χαρακτηριστικά του κύκλου ζωής τους (λυτική δράση, λανθάνουσα περίοδος, μέγεθος έκρηξης και ρυθμός απορρόφησης).

Η αποτελεσματικότητα των βακτηριοφάγων ελέγχθηκε σε *in vitro* και *in vivo* συνθήκες.

In vitro: Η μόλυνση βακτηριακών καλλιέργειών του ξενιστή είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης σε σχεδόν μηδενικά επίπεδα οπτικής απορρόφησης για πάνω από 6 ώρες.

In vivo: Παρασκευάστηκε ένας συνδυασμός διαφορετικών βακτηριοφάγων και χορηγήθηκε σε καλλιέργειες ζωντανών τροφών των τροχοζώων *Brachionus plicatilis* με αποτέλεσμα τον επιτυχή περιορισμό του βακτηριακού φορτίου των *Vibrio* που υπήρχε στις καλλιέργειες αυτές.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης οδηγούν στο συμπέρασμα πως η χρήση βακτηριοφάγων μπορεί επιτυχώς να περιορίσει το βακτηριακό φορτίο των *Vibrio* που εισέρχονται στο περιβάλλον των εκκολαπτηρίων μέσω των ζωντανών τροφών.

Λέξεις κλειδιά

Βακτήρια, *Vibrio*, βακτηριοφάγοι, χαρακτηρισμός, φαγοθεραπεία

Η υδατοκαλλιέργεια είναι η ταχύτερα αναπτυσσόμενη βιομηχανία ζωικής παραγωγής στον κόσμο με έναν ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης που ξεπερνά το 8,8% (FAO 2007). Η Ελλάδα κατέχει ηγετική θέση στην Ευρώπη αντιπροσωπεύοντας σχεδόν το 50% της παραγωγής. Ένας από τους κύριους λόγους της επιτυχίας αυτής είναι η διαμόρφωση των εκκολαπτηρίων σε υψηλής τεχνολογίας και βιομηχανικής κλίμακας εγκαταστάσεις που μπορούν να παράγουν περισσότερο από 50 εκατομμύρια γόνο ετησίως. Βασική απειλή για την υδατοκαλλιέργεια είναι οι εξάρσεις ασθενειών οι οποίες οδηγούν σε μαζικές θνησιμότητες και συνεπώς σε οικονομική ζημιά για τους παραγωγούς. Η συνεχής εντατικοποίηση της παραγωγής έχει ως αποτέλεσμα υψηλή ιχθυοφόρτιση, αυξημένη καταπόνηση στα ψάρια καθώς επίσης και κακή ποιότητα νερού, παράγοντες που είναι άρρηκτα συνδεδεμένοι με την αυξημένη εκδήλωση ασθενειών στην υδατοκαλλιέργεια. Στο περιβάλλον των εκκολαπτηρίων, οι μεγαλύτερες θνησιμότητες σημειώνονται κατά την διάρκεια των αρχικών νυμφικών σταδίων, όταν οι ιχθυονύμφες ανοίξουν το στόμα και μπορέσουν ενεργητικά να προσλάβουν τροφή. Κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες της εκδήλωσης ασθενειών είναι τα ευκαιριακά βακτηριακά παθογόνα τα οποία εισέρχονται στο σύστημα μέσω των ζωντανών τροφών οι οποίες χορηγούνται στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια των ψαριών (Villamil et al. 2003). Σ' αυτά τα στάδια η δυνατότητα παρέμβασης του παραγωγού είναι περιορισμένη αφού η χορήγηση οποιουδήποτε αντιβιοτικού θα κατέστρεφε τη φυσική μικροχλωρίδα τόσο του περιβάλλοντος όσο και του εντέρου των ψαριών, με δραματικές συνέπειες στην επιβίωση αλλά και την ποιότητα του γόνου, κάτι που αναδεικνύει την αναγκαιότητα εξεύρεσης εναλλακτικών τρόπων αντιμετώπισης των βακτηρίων.

Η δονακίωση είναι μία από τις σημαντικότερες ασθένειες των ψαριών στις υδατοκαλλιέργειες. Η πρώτη περιγραφή της επιζωοτίας του νοσήματος χρονολογείται στα 1718 οπότε και περιγράφηκε σε χέλια, αναφερόμενη στα λατινικά ως *pestis rubra anguillarum* (Bonaveri 1761). Η δονακίωση προσβάλλει τα άγρια και καλλιεργούμενα ψάρια των αλμυρών και υφάλμυρων υδάτων κυρίως κατά την διάρκεια του φθινοπώρου (Rogers 1989). Η **κλινική εικόνα** της ασθένειας περιλαμβάνει αλλαγή συμπεριφοράς και συγκεκριμένα απώλεια όρεξης και ασυνήθιστη κολυμβητική συμπεριφορά με το κεφάλι να πλησιάζει συχνά την επιφάνεια του νερού. Εξωτερικά, μπορούν να παρατηρηθούν εξελκώσεις, αιμορραγία, διαβρωμένα πτερύγια και ουρά (Εικόνα 1). Στα σπλάχνα, το ψάρι εμφανίζει ωχρότητα και πετέχιες στο συκώτι καθώς και συμφόρηση (congestion) σε σπλήνα και νεφρό. Σε πολλές περιπτώσεις παρατηρείται συγκέντρωση ασκητικού υγρού στην περιτοναϊκή κοιλότητα (Diggles et al. 2000; Li et al. 1998; Li et al. 1999; Li 2002). Η συνεχής ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών είχε σαν αποτέλεσμα οι απώλειες στην παραγωγή λόγω της δονακίωσης να γίνουν αρκετά έντονες και η ασθένεια έγινε μείζονος σημασίας για την ιχθυοπαραγωγή (Schaperclaus 1991).



Εικόνα 1. Κλινικά περιστατικά δονακίωσης σε λαβράκια, *Dicentrarchus labrax*, με εμφανείς αιμορραγίες, τυπικές της ασθένειας (αρχείο Δρ. Παντελής Καθάριος).

Αιτιολογικός παράγοντας της νόσου είναι τα βακτήρια του γένους *Vibrio* και κυρίως το *Vibrio anguillarum* το οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Canestrini (1893) με την ονομασία *Bacillus anguillarum* λόγω του ξενιστή του *Anguilla anguilla*. Το σύγχρονο όνομα, *Vibrio anguillarum*, προέρχεται από την περιγραφή της βακτηριολογίας και της παθολογίας του νοσήματος από τον Bergman (Austin and Austin 1993). Εκτός από το *V. anguillarum* υπάρχουν επιπλέον αρκετά είδη του γένους *Vibrio* τα οποία απομονώθηκαν σαν αιτιολογικοί παράγοντες της δονακίωσης προκαλώντας τα κλινικά σημάδια της νόσου.

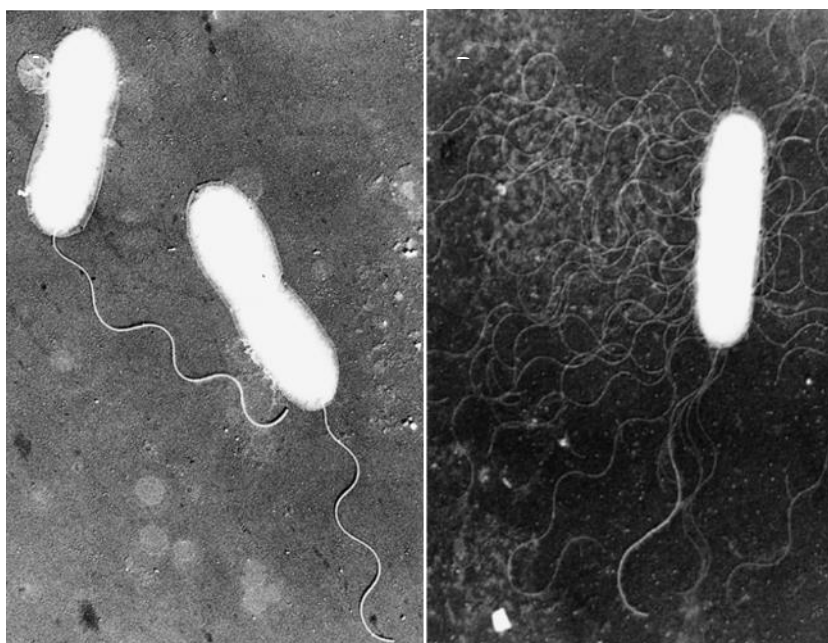
Αναφέρονται ενδεικτικά μερικά εξ αυτών: *V. ordalii* (Schiewe 1983), *V. salmonicida* (Egidius et al. 1986), *V. damsela* (Love et al. 1981), *V. alginolyticus* (Colorni et al. 1981), *V. harveyi* (Lunder et al. 1995). Η λίστα αυτή εμπλουτίζεται συνεχώς με νέα είδη *Vibrio*, για παράδειγμα το *V. rotiferianus* (Gomez-Gil et al. 2003) τα οποία δυνητικά μπορούν να προκαλέσουν το νόσημα (Austin et al. 2005).

Ο ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ - ΤΟ ΓΕΝΟΣ *VIBRIO*

Τα βακτήρια του γένους *Vibrio* είναι κατά κανόνα μικρά σε μέγεθος (0,5-0,8 x 1,4-2,6μm), ραβδόμορφα Gram-αρνητικά βακτήρια, με ικανότητα μεταβολισμού καταλάσης, οξειδάσης και ευαισθησία στον *Vibrio*-στατικό παράγοντα O/129 (Austin 2010). Όπως σε όλα τα Gram αρνητικά βακτήρια, η σύσταση του τοιχώματος των *Vibrio* αποτελείται από 3 λιποπολυσακχαρίτες (LPS): ένα κεντρικό πολυσακχαρίτη, ένα λιπίδιο A και μια πλευρική αλυσίδα O-πολυσακχαρίτη, η οποία διαφοροποιείται μεταξύ των ειδών και καθορίζει και τον ορότυπό τους.

Χαρακτηρίζονται από έντονη **κινητικότητα** (motility) η οποία οφείλεται στα πολικά μαστίγια που διαθέτουν. Τα μαστίγια αυτά μπορούν να βρίσκονται είτε μεμονωμένα στο άκρο του βακτηρίου (**μονότριχα**, monotrichous, Εικόνα 2A) είτε να καλύπτουν περιμετρικά όλη την επιφάνειά τους (**περίτριχα**, multitrichous, Εικόνα 2B). Ορισμένα είδη μπορούν να αναπτύσσουν επιπλέον πλήθος πλευρικών μαστιγίων, όταν βρεθούν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Εικόνα 2B). Ως προς τις απαιτήσεις τους σε οξυγόνο, είναι **δυσνητικά αναερόβια** και, επίσης, δεν έχουν την δυνατότητα απονιτροποίησης (Farmer et al. 2005). Πολύ λίγα είδη παρουσιάζουν βιοφωσφορισμό (bioluminescence).

Τα *Vibrio* αποτελούν βασικό τμήμα της φυσικής μικροβιακής χλωρίδας στα παράκτια και παραποτάμια συστήματα, καθώς επίσης και στην εντερική μικροχλωρίδα των θαλάσσιων ζώων. Πρόκειται κατά κύριο λόγο για βακτήρια του υδάτινου περιβάλλοντος των οποίων η κατανομή εξαρτάται από τα επίπεδα Na^+ , την διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων και την θερμοκρασία ($>18^\circ\text{C}$). Έχουν παγκόσμια εξάπλωση και κάποια είδη μπορούν να έχουν έντονα αρνητική επίδραση τόσο στον άνθρωπο όσο και στις ανθρώπινες χρήσεις των οικοσυστημάτων, όπως στην περίπτωση των υδατοκαλλιεργειών (Pruzzo et al. 2005). Πάνω από 80 είδη έχουν περιγραφεί και τουλάχιστον 12 από αυτά είναι ανθρώπινα παθογόνα, με σημαντικότερα εξ' αυτών τα *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* (Oliver et al. 2013). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα περιστατικά οργανικής σηψαιμίας που σημειώθηκαν στην Ν. Κορέα λόγω της κατανάλωσης ωμών στρειδιών που ήταν μολυσμένα από *Vibrio vulnificus* (Chu et al. 2011).



Εικόνα 2 Α: Ηλεκτρονική μικροσκοπία σε *Vibrio alginolyticus* που έχει αναπτυχθεί σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, x13000, Β: Ηλεκτρονική μικροσκοπία σε *Vibrio alginolyticus* που έχει αναπτυχθεί σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, x18000. Είναι εμφανή τα περιμετρικά μαστίγια που το βοηθούν να κινείται πάνω στο θρεπτικό (Farmer et al. 2005).

Τα περισσότερα *Vibrio* μπορούν να αναπτύσσονται καλά σε πολλά θρεπτικά υποστρώματα αρκεί να έχουν σαν βάση κάποια πηγή πρωτεΐνης, θαλασσινό νερό και επαρκή επίπεδα Na^+ . Το θρεπτικό υπόστρωμα **TCBS άγαρ** (thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar) είναι το πιο διαδεδομένο μέσο απομόνωσης βακτηρίων του γένους

Vibrio τόσο για ανθρώπινες όσο και για περιβαλλοντικές κλινικές περιπτώσεις (Farmer and Hickman-Brenner 1992).

ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ *VIBRIO*

Η πρώτη φάση της μόλυνσης του ψαριού από τα *Vibrio* είναι η προσκόλλησή του στην εξωτερική επιφάνεια του ξενιστή. Ο **υδρόφοβος χαρακτήρας** του βακτηριακού τοιχώματος φαίνεται να είναι καθοριστικός παράγοντας για την επίτευξη του σκοπού αυτού (Wang and Leung 2000). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του *V. anguillarum* για το οποίο έχει αναφερθεί πως η υδρόφοβη φύση του κυτταρικού τοιχώματος βοηθάει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση του στους ιστούς των άρρωστων ψαριών (Santos et al. 1991). Από την άλλη, μελέτες σε περιστατικά δονακίωσης που προκλήθηκαν από *V. alginolyticus* (Balebona et al. 1998) και *V.harveyi* (Lee et al. 1996) υποστηρίζουν πως δεν υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ μολυσματικότητας και ιδιοτήτων βακτηριακής επιφάνειας.

Οι **ενδοτοξίνες**, λιποπολυσακχαρίτες της κυτταρικής μεμβράνης των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, θεωρούνται παράγοντες μολυσματικότητας. Στη περίπτωση του *V. anguillarum* (Aoki et al. 1985) τη τοξικότητα των ενδοτοξινών διαφέρει αναλόγως του ξενιστή κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα πως οι ιδιότητες της βακτηριακής μεμβράνης δεν είναι αξιόπιστοι δείκτες για την μολυσματικότητα των *Vibrio* (Toranzo and Barja 1993).

Ο **σίδηρος**, είναι ένα απαραίτητο στοιχείο για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών. Η βιοδιαθεσιμότητα του σιδήρου είναι περιορισμένη στο περιβάλλον ενώ η συγκέντρωση του βιοδιαθέσιμου σιδήρου σε διάφορους ξενιστές είναι πολύ χαμηλή και το μεγαλύτερο ποσοστό βρίσκεται χηλικά συνδεδεμένο με σιδηροφόρες πρωτεΐνες (π.χ. τρανσφερίνες και λακτοφερρίνες) (Otto et al. 1992). Κατά συνέπεια, υπάρχουν υψηλής συνάφειας μηχανισμοί πρόσληψης σιδήρου στα *Vibrio* οι οποίοι αποδεσμεύουν τον σίδηρο από τις σιδηροφόρες πρωτεΐνες του ξενιστή και θεωρούνται πολύ σημαντικοί μολυσματικοί παράγοντες. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, τα *V. ordalii*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* είναι περιπτώσεις *Vibrio* των οποίων η μολυσματικότητα αποδεδειγμένα συνδέεται με την παρουσία μηχανισμών πρόσληψης σιδήρου (Biosca and Amaro 1996; Balebona et al. 1998). *In vivo* πειράματα έχουν αποδείξει πως μόνο τα στελέχη

τα οποία διαθέτουν τέτοια συστήματα μπορούν να πολλαπλασιαστούν στα ψάρια και να προκαλέσουν θνησιμότητα (Toranzo and Barja 1993).

Οι **εξωκυττάρειες ουσίες** (εξωτοξίνες ή **ECPs**), παίζουν σπουδαίο ρόλο στην παθογένεια των *Vibrio* στα ψάρια διότι η απομόνωση και χορήγησή τους σε ψάρια μπορεί να προκαλέσει κλινικά σημάδια όμοια με την χορήγηση ζωντανών βακτηρίων (Wang et al. 1998; Zhang and Austin 2000). Η δράση των ECPs είναι τόσο πρωτεολυτική όσο και υδρολυτική. Οι εξελκώσεις και η αποδόμηση των ιστών γύρω από αυτές, που προκαλεί η δονακίωση στα ψάρια οφείλονται στην υδρολυτική δράση των ECPs (Balebona et al. 1998). Υπάρχουν ήδη αναφορές για την απομόνωση τέτοιων ECPs από τα *V. anguillarum* (36kDa πρωτεάση) *V. alginolyticus* (34kDa πρωτεάση) *V. pelagius* (39kDa μεταλλο-πρωτεάση) (Inamura et al. 1985; Lee 1995; Farto et al. 2002). Η αιμολυτική και κυτταροτοξική δράση των ECPs συμβάλλουν στην παθογένεια του βακτηριακού στελέχους. Αποτελέσματα *in vivo* και *in vitro* πειραμάτων έδειξαν αιμολυτική δράση γεγονός το οποίο συνδέθηκε με την πρόκληση των αιμορραγικών συμπτωμάτων της δονακίωσης (Balebona et al. 1998; Zhang and Austin 2000; Li 2002). Η κυτταροτοξική δράση των εξωκυττάρειων ουσιών, δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη διότι εξαρτάται άμεσα από την επιλογή των κυτταρικών σειρών στις οποίες γίνονται οι πειραματισμοί (Toranzo and Barja 1993).

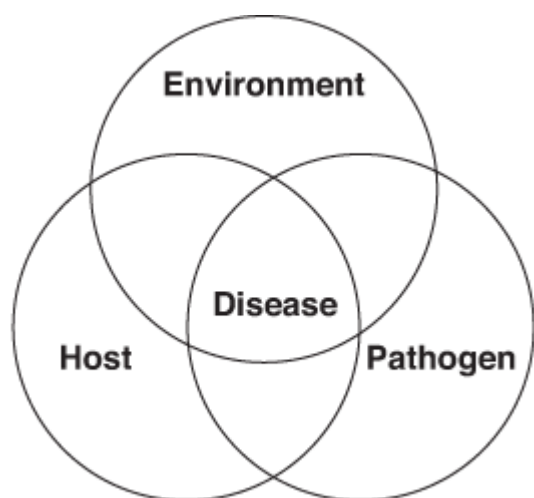
ΠΥΛΕΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΩΝ *VIBRIO* ΣΤΑ ΨΑΡΙΑ

Οι δύο κύριες πύλες εισόδου των *Vibrio* στα ψάρια είναι το **δέρμα** όταν έρχεται σε επαφή με ελεύθερα βακτήρια που υπάρχουν στο νερό και ο **πεπτικός σωλήνας**, μετά από κατάποση βακτηρίων που υπάρχουν στο νερό (Muroga and De La Cruz 1987; Kanno et al. 1989; Spanggaard et al. 2000). Οι Toranzo και Barja (1993) συμπλήρωσαν πως τα *Vibrio* έχουν την δυνατότητα να διεισδύσουν στον ξενιστή τους μέσω του **δέρματος**, των **πτερυγίων**, των **βραγχίων** και της έδρας. Κύριο εμπόδιο στη εισβολή των *Vibrio* είναι η βλέννα που καλύπτει το δέρμα, προστατεύοντας έτσι το ψάρι. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η περίπτωση του *Vibrio alginolyticus* το οποίο χορηγήθηκε σε ροφούς, *Epinephelus malabaricus* για να υπολογιστεί η μέση θανατηφόρος δόση (LD₅₀). Στα ψάρια από τα οποία είχε αφαιρεθεί η βλέννα, το LD₅₀ ήταν 3x10³ CFU/ml, ενώ στα ψάρια που είχαν φυσιολογική ποσότητα βλέννας, το LD₅₀ ήταν 2x10⁷ CFU/ml (Lee 1995). Αναφέρεται πως τα *Vibrio* μπορούν να εκμεταλλευτούν πληγές που έχουν προκληθεί στο δέρμα

από άλλα εκτοπαράσιτα και να εισέλθουν στον οργανισμό προκαλώντας δευτερογενείς λοιμώξεις (Rodgers and Burke 1988).

ΔΟΝΑΚΙΩΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Η παρουσία μολυσματικού στελέχους *Vibrio* σε ένα πληθυσμό ψαριών, δεν αρκεί για να εκδηλωθεί η ασθένεια. Πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν τα **θρεπτικά συστατικά** και οι **περιβαλλοντικές συνθήκες** οι οποίες επηρεάζουν την οξύτητα του περιστατικού της δονακίωσης (Hedrick 1998). Παράγοντες καταπόνησης (stress) **κακή ποιότητα νερού**, **ανεπάρκεια θρεπτικών στην διατροφή** (Diggles et al. 2000) και **ξαφνική μεταβολή θερμοκρασίας** (Angulo et al. 1994; Magariños et al. 2001) κάνουν τα ψάρια πολύ ευάλωτα στην ασθένεια (Εικόνα 3). Εκτός αυτού, η αύξηση τις θερμοκρασίας ευνοεί σημαντικά και τον πολλαπλασιασμό των *Vibrio*. Η **υψηλή ιχθυοφόρτιση** ευνοεί την εκδήλωση της ασθένειας καθότι συμβάλει στην περαιτέρω καταπόνηση των ψαριών και εξασθενώντας τις φυσικές άμυνες, δημιουργώντας πύλες εισόδου μέσω μικροτραυματισμών αλλά και αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα πιθανών ξενιστών σε περιορισμένο χώρο (Plumb 1999; Sobhana 2009).



Εικόνα 3 Επιδημιολογικό τρίγωνο που αποτυπώνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ περιβάλλοντος, βακτηριακού παθογόνου και ξενιστή οι οποίες οδηγούν στην εκδήλωση της ασθένειας (Snieszko, 1974)

Η θεραπεία της δονακίωσης γίνεται με τη χορήγηση κατάλληλων αντιβιοτικών ενώ η πρόληψη βασίζεται κυρίως στον εμβολιασμό (Εικόνα 4B). Τελευταία έχουν αναπτυχθεί νέοι τρόποι αντιμετώπισης οι οποίοι περιλαμβάνουν χορήγηση προβιοτικών, ανοσοδιεγερτικών και βιταμινών (Romero et al. 2012). Στην Ελλάδα υπάρχει εμπορικό σκεύασμα εμβολίου το οποίο περιέχει αδρανοποιημένα βακτήρια *V. anguillarum* O1 (ALPHA DIP™ *Vibrio*, PharmaQ) και χορηγείται μία ή δύο φορές ανά έτος, αποκλειστικά για την προστασία των λαβρακιών *Dicentrarchus labrax* έναντι της δονακίωσης. Η επιτυχία του εμβολίου οδήγησε ουσιαστικά στην εξάλειψη της νόσου το οποίο σε συνδυασμό με το κόστος του εμβολιασμού που είναι αρκετά υψηλό οδήγησε αρκετές μονάδες να μην εμβολιάζουν τα ψάρια. Επίσης, το σκεύασμα αυτό αφορά μόνο το *V. anguillarum* και κανένα άλλο στέλεχος *Vibrio* που δυνητικά αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα της ασθένειας. Επιπλέον σημαντικός περιορισμός στην χρήση εμβολίων είναι ότι μπορούν να χορηγηθούν σε ψάρια μεγέθους >1.5g αφήνοντας τα προηγούμενα μεγέθη ακάλυπτα. Η χορήγηση του εμβολίου γίνεται με εμβάπτιση στον ιχθυογεννητικό σταθμό ενώ εν συνεχεία πραγματοποιείται επαναληπτικός εμβολιασμός με ένεση όταν τα ψάρια είναι >50g στους ιχθυοκλωβούς. Η ενέσιμη χορήγηση απαιτεί πολλές εργατοώρες, εξαρτάται από τις καιρικές συνθήκες, καταπονεί τα ψάρια και αυξάνει το κόστος παραγωγής (Pereira et al. 2011). Όσον αφορά στις καλλιέργειες οστρακοειδών, το εμβόλιο δεν έχει νόημα καθότι οι οργανισμοί αυτοί δεν έχουν την δυνατότητα να ανάπτυξης αντισωμάτων (Roch 1999).

Μετά την εκδήλωση της ασθένειας, η μόνη μέθοδος θεραπείας είναι η χορήγηση **αντιβιοτικών** κυρίως λόγω του ευρέως φάσματος βακτηρίων που μπορούν να εξολοθρευθούν. Τα αντιβιοτικά χορηγούνται είτε ως πρόσθετα στην τροφή των ψαριών είτε εμβαπτίζοντάς τα σε μικρό όγκο νερού που περιέχει αντιβιοτικά.

Περιορισμένος αριθμός αντιβιοτικών είναι διαθέσιμα προς χρήση στην υδατοκαλλιέργεια και μάλιστα το υπάρχον νομικό πλαίσιο είναι πολύ αυστηρό σχετικά με τρόπο που αυτά πρέπει να χρησιμοποιούνται (Food and Drug Administration, FDA). Τα διαθέσιμα αντιβιοτικά περιλαμβάνουν ενισχυμένες σουλφοναμίδες, την οξυτετρακυκλίνη, τη φλορφενικόλη, την αμπικιλλίνη και τη φλουμεκίνη (Εικόνα 4A). Κατά συνέπεια, η συνεχής και εκτεταμένη χρήση των ίδιων

αντιβιοτικών, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών παθογόνων στελεχών. Η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας εν μέρει οφείλεται σε κάποια γονίδια που υπάρχουν στα πλασμίδια των βακτηρίων και έχουν την δυνατότητα να μεταφέρονται μεταξύ των βακτηρίων. Η συχνότητα μεταφοράς τους όμως, είναι τόσο που συνεπάγεται πως η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά είναι κυρίως χρωμοσωμικής προέλευσης (Li et al. 1999). Η αύξηση της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά πολλών ειδών *Vibrio* και *Pseudomonas* στην περιοχή της νοτιοδυτικής Ισπανίας είναι αποτέλεσμα της αλόγιστης χρήσης αντιβιοτικών στις μονάδες τσιπούρας που υπάρχουν στην περιοχή (Zorrilla et al. 2003). Επίσης, σε ιχθυοκαλλιέργειες λαυρακιού στην Τουρκία έχουν απομονωθεί βακτηριακά στελέχη των γενών *Vibrio* και *Pseudomonas* τα οποία εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά όπως τετρακυκλίνη, κεφαλοθίνη και στρεπτομυκίνη. Σε άλλη μελέτη αναφέρεται πως μετά από εξέταση των εσωτερικών οργάνων από τσιπούρες και λαβράκια καλλιέργειας που παρουσίασαν δονακίωση με αιτιολογικό παράγοντα το *V. alginolyticus*, το 91,17% των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν ήταν ανθεκτικά στο αντιβιοτικό νιτροφουραντοΐνη (Kahla-Nakbi et al. 2006). Συμπεραίνεται, λοιπόν, πως αυτές οι μονάδες εκτροφής λειτουργούν σαν δεξαμενή ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βακτηριακών στελεχών (Matyar 2007). Επιπλέον, υπάρχει η σοβαρή περίπτωση κατάλοιπα αντιβιοτικών να μείνουν στους ιστούς των ψαριών καλλιέργειας καθώς και στο θαλάσσιο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα λόγω του χαμηλού ρυθμού βιοδιάσπασής τους (Rigos et al. 2004). Η χρήση αντιβιοτικών, λοιπόν, ενέχει όχι μόνο τον κίνδυνο δημιουργίας και εξάπλωσης ανθεκτικών παθογόνων βακτηρίων, αλλά και μεταφοράς τους στον καταναλωτή στην περίπτωση που τα παθογόνα αυτά είναι και ανθρώπινα (π.χ. *Vibrio vulnificus*, *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.* κ.α.). Δημιουργείται, έτσι, μεγάλο πρόβλημα καθώς υπάρχει σοβαρή περίπτωση τα αντιβιοτικά για την αντιμετώπισή τους να μην έχουν αποτέλεσμα απέναντι σε ενδεχόμενη ασθένεια του καταναλωτή (Barton 2000; Angulo et al. 2004).



Εικόνα 4 Α: Τα αντιβιοτικά στην τροφή των ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας, Β: Εμπορικά σκευάσματα εμβολίων της εταιρείας PharmaQ που διατίθενται στις αγορές Ελλάδας και Κύπρου για την πρόληψη της δονακίωσης.

Επιπλέον σοβαρά μειονεκτήματα των αντιβιοτικών είναι το υψηλό κόστος για τους παραγωγούς και το ότι συχνά δεν απορροφώνται εξ' ολοκλήρου από τα ψάρια με αποτέλεσμα να εισέρχονται σε ενεργή μορφή στο περιβάλλον (wastes) καταστρέφοντας και την τοπική μικροχλωρίδα (Li et al. 1999). Η χρήση και η αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών είναι γενικά αποδεκτή, όμως εξαιτίας των αρνητικών συνεπειών που επιφέρει η χρήση τους η ανάγκη για εναλλακτικές επιλογές στην αντιμετώπιση της δονακίωσης έχει γίνει πλέον επιτακτική. Συνεπώς, ιδέες όπως η χρήση **βακτηριοφάγων** που μπορούν να μολύνουν με εξειδικευμένο τρόπο αλλά και να αυτό-πολλαπλασιάζονται μέσα στα ίδια τα βακτήρια έρχονται δυναμικά στο προσκήνιο (Joerger 2003).

ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΙ

Οι **βακτηριοφάγοι ή φάγοι** είναι ιοί οι οποίοι μολύνουν βακτήρια. Εκτιμάται πως το μέγεθος του πληθυσμού τους στο υδάτινο περιβάλλον είναι περίπου 10^{31} (Hendrix 2002) ενώ στα χερσαία οικοσυστήματα υπολογίζονται σε 10^7 φάγοι ανά γραμμάριο χώματος (Ashelford et al. 2003). Είναι αποδεδειγμένο πως οι βακτηριοφάγοι υπερέχουν αριθμητικά των βακτηρίων σε όλα τα οικοσυστήματα που έχουν μελετηθεί και συνεπώς αποτελούν την πλέον κυρίαρχη και άφθονη μορφή ζωής στη βιόσφαιρα (Furuse 1987). Έχουν την δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται μόνο όταν βρίσκεται στο περιβάλλον ο βακτηριακός ξενιστής (bacterial host) τους (Hendrix et al. 1999; La Scola et al. 2008), γεγονός που τα καθιστά υποχρεωτικά παρασιτικές μορφές ζωής. Τα ισωμάτια μπορούν να βρίσκονται εκτός τους ξενιστή τους, όμως όλοι οι φάγοι είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα και χρειάζονται

τον ξενιστή τους για να αναπαραχθούν (Jensen et al. 1998). Οι βακτηριοφάγοι εξολοθρεύουν από 4% έως 50% των βακτηρίων που παράγονται καθημερινά, συμμετέχουν στους γεωχημικούς κύκλους του πλανήτη και συνιστούν τη δεξαμενή της μεγαλύτερης γενετικής ποικιλότητας της γης (Suttle 2005).

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το 1896 για πρώτη φορά αναφέρθηκε από τον Ernst Hanbury Hankin ότι το νερό του Γάγγη ποταμού στην Ινδία μπορούσε να περιορίσει το *Vibrio cholera* και άλλα βακτήρια. Επίσημα, στην βιβλιογραφία οι πρώτες αναφορές για βακτηριοφάγους προέρχονται από δύο ανεξάρτητους επιστήμονες οι οποίοι τους ανακάλυψαν σχεδόν ταυτόχρονα. Το 1915 ο Άγγλος βακτηριολόγος Frederick Twort και το 1917 ο Γαλλο-Καναδός μικροβιολόγος Felix d'Herelle αναφέρθηκαν για πρώτη φορά σε ιούς οι οποίοι μπορούν να σκοτώνουν βακτήρια (Summers 1999). Ο Twort δεν ασχολήθηκε περαιτέρω με την έρευνα των ιών, όμως ο d'Herelle προχώρησε στην έρευνα των φάγων πραγματοποιώντας δοκιμές τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους, κατανοώντας σταδιακά την λειτουργία τους. Η αποτελεσματικότητα που παρουσίαζε η χρήση βακτηριοφάγων στην καταπολέμηση σοβαρότατων μικροβίων όπως της χολέρας, της πανώλης και του άνθρακα, οδήγησαν σε μια περίοδο (στα 1920) στην οποία προϊόντα βακτηριοφάγων παρασκευάζονταν σε μαζική κλίμακα από φαρμακευτικούς, τότε αλλά και σήμερα, κολοσσούς όπως η L'Oréal, Paris (Summers 1999) οι Eli Lilly & Co, Parke-Davies, Squibb & Sons and Swan-Myers κ.α. (Sulakvelidze et al. 2001).

Είκοσι χρόνια αργότερα (στα 1940), στη διάρκεια του 2^{ου} Παγκοσμίου Πολέμου, ανακαλύφθηκε το πρώτο αντιβιοτικό, η πενικιλίνη. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με κάποιες κλινικές αποτυχίες αλλά και ανησυχίες των επιστημόνων της εποχής σχετικά με τη συμπεριφορά των βακτηριοφάγων (Eaton and Bayne-Jones 1934) έθεσαν τη χρήση τους στο περιθώριο τόσο στις ΗΠΑ όσο και στην δυτική Ευρώπη. Παρόλα αυτά, στην ανατολική Ευρώπη, ιδίως στην Πρώην Σοβιετική Ένωση η έρευνα πάνω στους βακτηριοφάγους δεν σταμάτησε ποτέ και χρησιμοποιούνται από τότε μέχρι και σήμερα σαν θεραπευτικά μέσα ενάντια σε πάρα πολλές βακτηριακές ασθένειες (Chanishvili et al. 2002). Το μεγαλύτερο κέντρο παραγωγής και έρευνας βακτηριοφάγων ήταν και παραμένει το George Eliava Institute, με έδρα την Τιφλίδα της Γεωργίας το οποίο είχε φτάσει να απασχολεί

περισσότερους από 1000 επιστήμονες και κάποτε προμήθευε ολόκληρη τη Σοβιετική Ένωση με προϊόντα φαγοθεραπείας (Teddiashvili M. προσ. επικοινωνία).

Σήμερα, όπως θα αναφερθεί εκτενέστερα και στη συνέχεια, λόγω των σοβαρών προβλημάτων που έχει προκαλέσει η συνεχής και αλόγιστη χρήση των ίδιων αντιβιοτικών επί σειρά ετών, η επιστημονική και πολιτική κοινότητα τόσο της ΕΕ όσο και των ΗΠΑ έχει ήδη αρχίσει να επαναφέρει στο προσκήνιο την θεραπευτική χρήση των βακτηριοφάγων. Από το 2006, ο οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) και το τμήμα γεωργίας των ΗΠΑ (United States Department Of Agriculture, USDA), έχουν προχωρήσει στην έγκριση αρκετών προϊόντων φαγοθεραπείας, όπως τα ListShield™, EcoShield™, SalmoFresh™ (Intralytix Inc.), τα οποία χρησιμοποιούνται σαν συμπληρώματα διατροφής (Εικόνα 5)



Εικόνα 5. Τα εμπορικά σκευάσματα ListShield™, EcoShield™, SalmoFresh™ της εταιρείας Intralytix Inc., τα οποία διατίθενται στην αγορά των Η.Π.Α. και χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα διατροφής για την πρόληψη βακτηριακών ασθενειών από *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* και παθογόνους ορότυπους *Salmonella sp.*, αντίστοιχα.

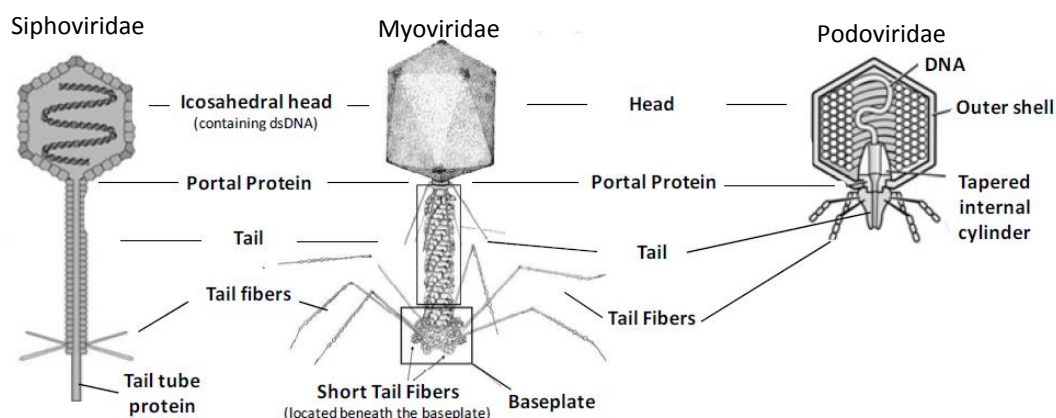
ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ

Η έρευνα στον τομέα των βακτηριοφάγων έχει δείξει πως πρόκειται για ομάδα ιών εξαιρετικά **μεγάλης ποικιλομορφίας**. Τα μεγέθη των γονιδιωμάτων τους κυμαίνονται από πολύ μικρά, μήκους μόλις λίγων χιλιάδων ζευγών βάσεων μέχρι 498 χιλιάδες ζεύγη βάσεων, στην περίπτωση του φάγου G που είναι ο μεγαλύτερος βακτηριοφάγος που έχει αλληλουχηθεί έως σήμερα (Burton et al. 2005). Παρά το γεγονός πως αυτό το μέγεθος αντιστοιχεί στο μέσο βακτηριακό γονιδίωμα, απουσιάζουν εντελώς γονίδια τα οποία κωδικοποιούν στοιχεία βασικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως τα ριβοσώματα, γεγονός που καταδεικνύει έντονα την παρασιτική φύση του βακτηριοφάγου.

Ένα ιοσωμάτιο βακτηριοφάγου αποτελείται από μονόκλωνο (ss) ή δίκλωνο (ds) DNA ή RNA το οποίο βρίσκεται μέσα σε ένα πρωτεϊνικό ή λιποπρωτεϊνικό έλυτρο. Η διεθνής επιτροπή ταξινόμικής των ιών (International Committee on the Taxonomy of Viruses, ICTV), βασίστηκε στην μορφολογία των φάγων καθώς επίσης και στην φύση του γενετικού τους υλικού και τους κατέταξε σε 13 οικογένειες ιδρύοντας την βάση δεδομένων *ICTVdb - The Universal Virus Database* (ncbi/ICTV 2006). Περίπου το 96% των βακτηριοφάγων που έχουν περιγραφεί στην βιβλιογραφία ανήκουν στην τάξη Caudovirales που αποτελείται από φάγους με δίκλωνο DNA και ουρά (tailed dsDNA). Οι 3 οικογένειες των Caudovirales χωρίζονται σύμφωνα με τις διακριτές ουρές τους (Εικόνα 6):

- Siphoviridae: μακριές και μη-συσταλτές ουρές (60% των Caudovirales)
- Myoviridae: μακριές συσταλτές ουρές (25% των Caudovirales)
- Podoviridae: κοντές μη-συσταλτές ουρές (15% των Caudovirales)

Οι οικογένειες αυτές μπορούν να χωριστούν και περαιτέρω σε γένη και υπογένη σύμφωνα με το μέγεθος του γονιδιώματος, την διάταξή του (γραμμικό, κυκλικό ή υπερελικωμένο) και το εύρος των βακτηριακών ξενιστών τους (Nelson 2004). Μοριακές προσεγγίσεις για μια ακριβέστερη ταξινόμική των βακτηριοφάγων έχουν γίνει όμως η απουσία ενός γενικού γονιδίου, ομόλογου του βακτηριακού 16S, δυσκολεύει πολύ αυτές τις προσπάθειες. Η χρήση μοριακών εργαλείων με βάση το BLAST έχει πολύ πρόσφατα προταθεί όμως ακόμη δεν έχει αξιολογηθεί από την ICTV (Lavigne et al. 2008).

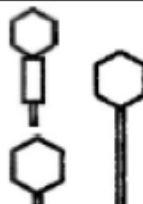
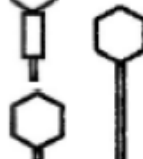







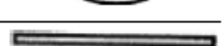





Εικόνα 6 Βασική μορφολογία των τριών οικογενειών των Caudovirales. Από αριστερά προς τα δεξιά παρουσιάζονται οι γραφικές απεικονίσεις ενός Siphovirus (μακριά και μη - συσταλή

ουρά), ενός Myovirus (μακριά και συσταλή ουρά) και ενός Podovirus (κοντή ουρά) (Ceyssens 2009).

Όλοι οι υπόλοιποι βακτηριοφάγοι αποτελούν μόλις το 4% του συνολικού πληθυσμού και κατατάσσονται σε 10 οικογένειες (Πίνακας 1), κάποιες από τις οποίες είναι και πολύ μικρές (Ackermann 2007). Για τον λόγο αυτό, όταν βιβλιογραφικά γίνεται αναφορά σε φάγους εννοείται πάντα στην τάξη των Caudovirales, διαφορετική περίπτωση πάντοτε διευκρινίζεται.

Πίνακας 1 Οι 10 οικογένειες στις οποίες κατατάσσονται οι βακτηριοφάγοι χαρακτηριζόμενες από την φύση του γενετικού τους υλικού, τα κύρια χαρακτηριστικά και την μορφολογία τους. Το 96% ανήκει στις 3 πρώτες οικογένειες και μόλις το 4% κατανέμεται στις υπόλοιπες 7 (Ackermann 2007).

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

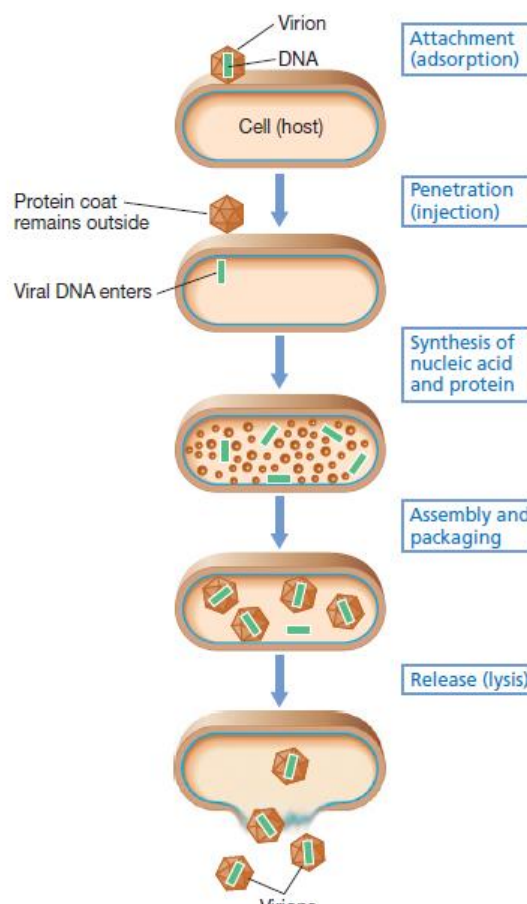
Οι φάγοι της τάξης Caudovirales, αποτελούνται από αναλογία 1 : 1, πρωτεΐνες : dsDNA. Σε όλους τους dsDNA φάγους το χρωμόσωμα βρίσκεται συμπιεσμένο μέσα στο πρωτεϊνικό έλυτρο (κεφαλή) και αποτελεί το 20-50% της μάζας του φάγου (Earnshaw and Harrison 1977). Σε αντίθεση με τους κλασσικούς ιούς των ζώων, οι βακτηριοφάγοι εισάγουν το γενετικό τους υλικό στον βακτηριακό ξενιστή μέσω ενός

ειδικού μηχανισμού έγχυσης (injection mechanism). Η πρωτεΐνη που συνδέει τις δομές κεφαλής και ουράς είναι στοιχείο κλειδί για την μολυσματικότητα του βακτηριοφάγου καθώς ελέγχει την είσοδο του γενετικού υλικού στον ξενιστή και παράλληλα παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην συναρμολόγηση των νέων ιών μέσα στο βακτήριο (Valpuesta et al. 2000). Η ουρά του φάγου είναι το εξάρτημα αποτελούμενο από αιχμηρά στελέχη, το οποίο προσκολλάται στην βακτηριακή επιφάνεια και αποτελεί τον αγωγό εισόδου του ιικού γενετικού υλικού.

ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΑΓΩΝ

Για να πολλαπλασιαστεί ένας βακτηριοφάγος πρέπει να επάγει την αντιγραφή του γενετικού υλικού του καθώς και τη σύνθεση όλων των απαραίτητων συστατικών του χρησιμοποιώντας τους μηχανισμούς ενός ζωντανού-βακτηρίου ξενιστή. Ο ιικός κύκλος ζωής διαιρείται σε 5 βασικά στάδια (Εικόνα 7):

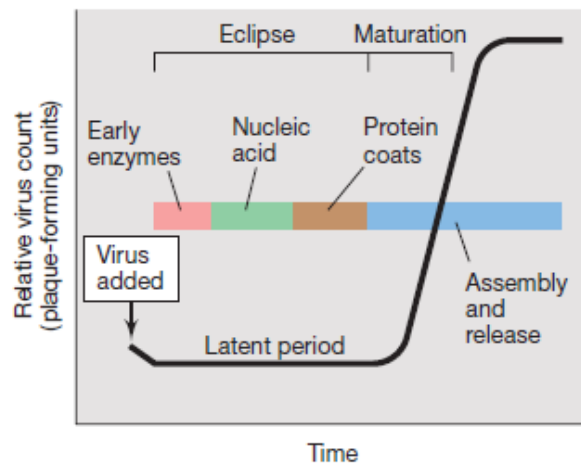
1. **Προσκόλληση και απορρόφηση** (attachment and adsorption) του ιού από τον βακτηριακό ξενιστή.
2. **Διείσδυση και εισαγωγή** (penetration) του γενετικού του υλικού στο βακτήριο.
3. **Σύνθεση** (Synthesis) νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών για τα νέα ιωσώματα με τον τρόπο που ορίζεται από το γενετικό υλικό του φάγου.
4. **Συναρμολόγηση** (Assembly) των πρωτεϊνών του ιού και πακετάρισμα του γενετικού υλικού στις κεφαλές των βακτηριοφάγων μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται *ωρίμανση*.



Εικόνα 7 Τα 5 στάδια του κύκλου ζωής ενός βακτηριοφάγου όταν μολύνει τον βακτηριακό του ξενιστή (Madigan et al. 2010).

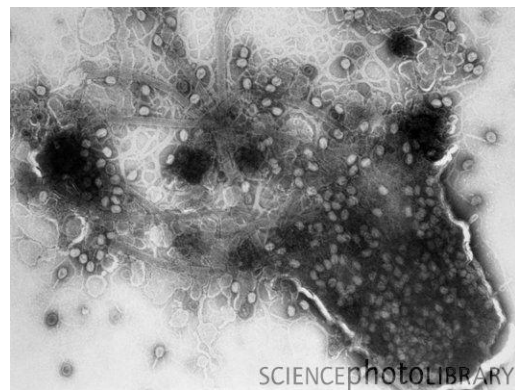
5. **Απελευθέρωση (Release)** των ώριμων νέων ιών στο περιβάλλον και προϋποθέτει την λύση του κυττάρου - ξενιστή.

Τα βασικά βιολογικά χαρακτηριστικά ενός βακτηριοφάγου που προκύπτουν από τα παραπάνω βήματα του κύκλου ζωής του καλείται μονοφασική καμπύλη ανάπτυξης (one-step growth curve, Εικόνα 8).



Εικόνα 8 Τυπική γραφική απεικόνιση μονοφασικής καμπύλης ανάπτυξης ενός βακτηριοφάγου, στην οποία τα στάδια αποτυπώνονται μέσω του πλήθους των λυτικών πλακών που σχηματίζονται, στην πορεία του χρόνου (Madigan et al. 2010).

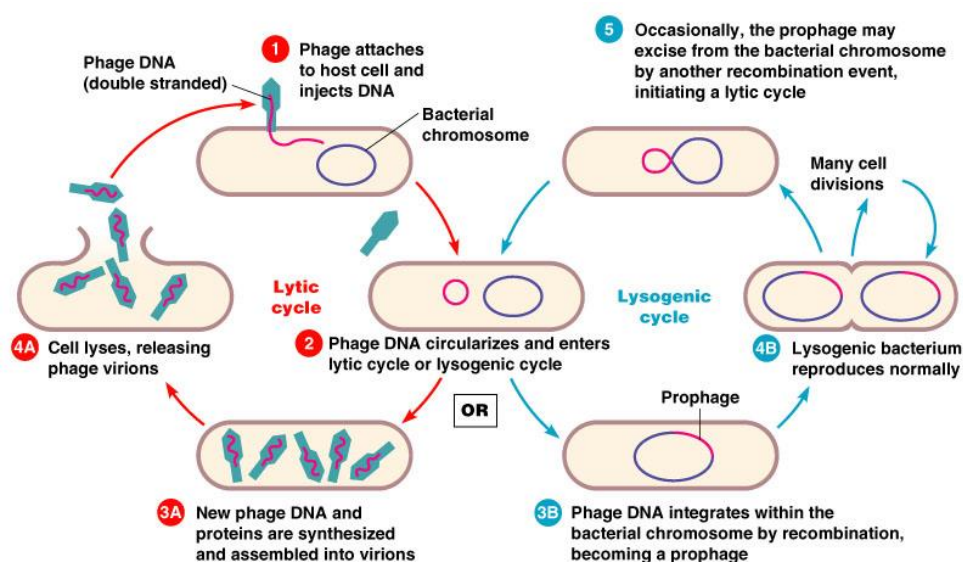
Τα πρώτα λεπτά μετά την προσκόλληση και απορρόφηση των φάγων στο βακτήριο σημειώνεται η **περίοδος έκλειψης** (eclipse time) κατά τη διάρκεια της οποίας δεν εντοπίζονται ιοί στο περιβάλλον του βακτηρίου. Εν συνεχεία το γονιδίωμα των φάγων διεισδύει στο βακτήριο και την στιγμή εκείνη εφόσον το γενετικό υλικό είναι εκτός καψιδίου, ο ιός πλέον δεν υφίσταται σαν μολυσματικός παράγοντας. Σηματοδοτείται τότε η φάση της **ωρίμανσης** στην οποία το γενετικό υλικό του ιού αναπαράγεται και οι ιικές πρωτεΐνες συντίθενται μέσω των βακτηριακών μηχανισμών. Τα ενεργά ιοσωμάτια αυξάνονται μέσα στα βακτήρια αλλά ακόμη δεν εντοπίζονται στο περιβάλλον των βακτηρίων (π.χ. στο θρεπτικό υπόστρωμα). Η περίοδος έκλειψης μαζί με την ωρίμανση



Εικόνα 9 Έκρηξη βακτηρίου το οποίο είχε μολυνθεί από βακτηριοφάγο. Η ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του φάγου σηματοδοτείται με την απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ιοσωμάτων και την

ονομάζονται **λανθάνουσα φάση ανάπτυξης** (latent period) του βακτηριοφάγου. Μετά την ολοκλήρωση της ωρίμανσης οι νέοι φάγοι απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Το **μέγεθος της έκρηξης** (burst size), δηλαδή ο αριθμός των παραγόμενων φάγων ανά βακτήριο, μπορεί να έχει εύρος λίγων έως και εκατοντάδων νέων φάγων. Η διάρκεια του κύκλου ζωής ενός βακτηριοφάγου μπορεί να είναι από 20 έως 60 λεπτά (Madigan et al. 2010).

Οι βακτηριοφάγοι, ως προς τον τρόπο αναπαραγωγής τους, χωρίζονται σε 2 κατηγορίες, τους **ήπιους** (temperate) και τους **λυτικούς** (virulent). Μετά την εισαγωγή του γενετικού τους υλικού στο βακτήριο υπάρχουν δύο τελείως διαφορετικά μονοπάτια αναπαραγωγής για τους φάγους. Στην περίπτωση των λυτικών βακτηριοφάγων ακολουθείται το **λυτικό μονοπάτι** ενώ στην περίπτωση των ήπιων ακολουθείται το **λυσιγονικό μονοπάτι** αναπαραγωγής (Εικόνα 10).



Εικόνα 10 Το λυτικό και το λυσιγονικό μονοπάτι πολλαπλασιασμού των βακτηριοφάγων με την συνοπτική περιγραφή των βημάτων που περιλαμβάνονται (Madigan et al. 2010).

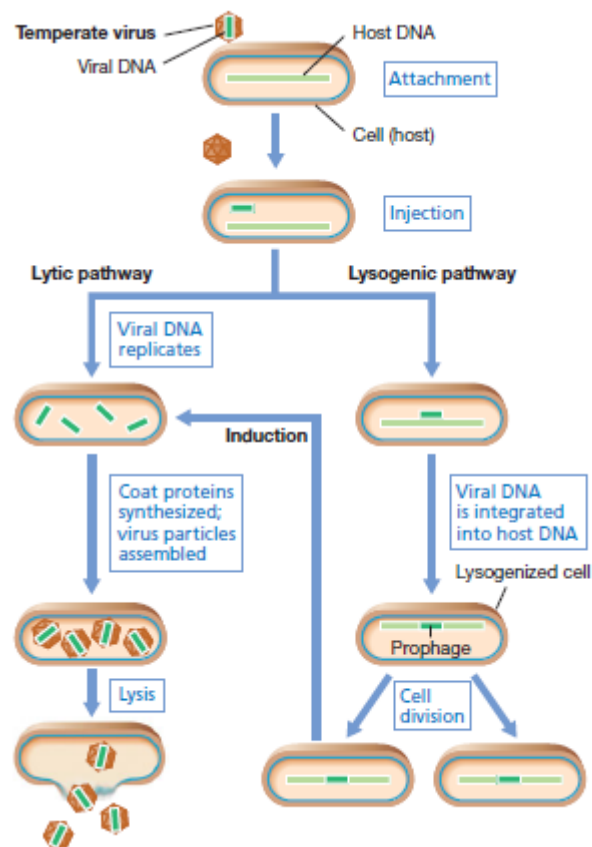
ΛΥΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ

Στην περίπτωση του λυτικού μονοπατιού ακολουθούνται ακριβώς τα 5 βήματα του ιικού πολλαπλασιασμού που σημειώθηκαν παραπάνω. Οι φάγοι αναπαράγονται πολύ γρήγορα και ο βακτηριακός ξενιστής «εκρήγνυται» μετά την ολοκλήρωση του λυτικού κύκλου (Εικόνα 10).

Ο αριθμός των ιών που προκύπτουν ανά βακτήριο που μολύνεται ποικίλει από 50 έως 200 ανάλογα με το είδος και τις συνθήκες (Carlton 1999). Στο εργαστήριο οι λυτικοί φάγοι συνήθως αποδίδουν καθαρές λυτικές πλάκες (ή αρνητικές αποικίες, negative colonies) επάνω στην βακτηριακή χλόη του ξενιστή τους. Οι λυτικοί φάγοι εφόσον οδηγούν στον θάνατο του βακτηριακού ξενιστή είναι αποκλειστικά και **μόνο** αυτοί οι οποίοι επιλέγονται, όπως θα αναφερθεί παρακάτω, για εφαρμογή φαγοθεραπείας.

ΛΥΣΙΓΟΝΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ

Το μονοπάτι της λυσιγονίας που μπορεί να επιλεγεί από τους ήπιους βακτηριοφάγους παρουσιάζει ουσιαστικές διαφορές με το λυτικό μονοπάτι. Τα αρχικά στάδια της μόλυνσης είναι ίδια και στα δύο μονοπάτια όμως στην περίπτωση των ήπιων φάγων, το γενετικό τους υλικό μετά την εισοδό του στο βακτήριο μπορεί είτε να **ενσωματωθεί** στο βακτηριακό χρωμόσωμα (π.χ. φάγος λ), είτε να βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου σαν πλασμίδιο (π.χ. φάγος P1). Σε κάθε περίπτωση το αποτέλεσμα είναι ότι το γονιδίωμα του



Εικόνα 11 Επιμόλυνση βακτηριακού ξενιστή από ήπιο βακτηριοφάγο και οι αναπαραγωγικές επιλογές που μπορεί να ακολουθήσει ο φάγος. Ακολουθώντας το λυτικό μονοπάτι ο βακτηριακός ξενιστής σκοτώνεται ενώ μέσω του λυσιγονικού μονοπατιού το γονιδίωμα του φάγου ενσωματώνεται σε αυτό του ξενιστή (Madigan et al. 2010).

ήπιου φάγου πολλαπλασιάζεται μαζί με το βακτηριακό. Από την στιγμή εκείνη το γονιδίωμα του βακτηριοφάγου ονομάζεται **προφάγος**. Όσο δεν εκφράζονται τα γονίδια του ιού που ενεργοποιούν την λυτική οδό, το γονιδίωμα του φάγου μπορεί να βρίσκεται ενωμένο με το βακτηριακό (λυσιγονικά βακτήρια) χωρίς κανένα απολύτως

πρόβλημα. Η μη ενεργοποίηση της λυτικής οδού οφείλεται σε μία **πρωτεΐνη - καταστολέα** η οποία εκφράζεται συνεχώς και όχι μόνο παρεμποδίζει την έκφραση των λυτικών γονιδίων αλλά δεν επιτρέπει να μολυνθεί το βακτήριο από τον ίδιο ή πολύ συγγενικό φάγο (Madigan et al. 2010).

Οι ήπιοι βακτηριοφάγοι όχι μόνο δεν λύουν άμεσα τον βακτηριακό ξενιστή αλλά μπορούν να συνεισφέρουν και συνεργιστικά στην μολυσματικότητα του όπως στην περίπτωση των shiga toxins και της *E.coli* O157:H7, στέλεχος το οποίο μπορεί να προκαλέσει αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο στον άνθρωπο (Johannes and Römer 2010).

Η λυτική οδός, μπορεί να επαχθεί στον προφάγο με φυσιολογικό τρόπο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες καταπόνησης, κυρίως μετά από κάποια καταστροφή στο βακτήριο, οπότε ο καταστολέας του προφάγου απενεργοποιείται. Στο εργαστήριο, οι ήπιοι βακτηριοφάγοι συνήθως παρουσιάζουν θολές αρνητικές αποικίες πάνω στην βακτηριακή γλότη (Campbell 1996).

ΑΜΥΝΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Παρόλο που τα βακτήρια δεν διαθέτουν ανοσοποιητικό σύστημα, η εξελικτική διαδικασία ανέπτυξε τόσο στα βακτήρια όσο και στα αρχαία έναν αμυντικό μηχανισμό κατά των βακτηριοφάγων που λέγεται **CRISPR** (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) το οποίο χρησιμοποιεί μικρές αλληλουχίες RNA οι οποίες μπορούν εξειδικευμένα να εντοπίζουν και να εξουδετερώνουν γενετικό υλικό το οποίο εισβάλλει στο κύτταρο (Brouns et al. 2008). Επιπλέον, διαθέτουν τα ένζυμα **περιοριστικές ενδονουκλεάσες**, τα οποία μπορούν και πάλι εξειδικευμένα να εντοπίζουν αλληλουχίες δίκλωνου DNA και να το καταστρέφουν αποτρέποντας την έκφραση ή την ενσωμάτωσή του στο βακτήριο. Το βακτηριακό γονιδίωμα προστατεύεται από την δράση των ενδονουκλεασών με γενετικές τροποποιήσεις στις δικές του αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα ένζυμα αυτά. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι προφανώς αναποτελεσματικές όταν πρόκειται για φάγους που έχουν γενετικό υλικό μονοκλωνικό DNA ή RNA. Επιπλέον, κατά τους Levin και Bull (2004) η ύπαρξη **σημειακών μεταλλάξεων** μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια του βακτηριακού υποδοχέα για το βακτηριοφάγο με συνέπεια ο δεύτερος να μην μπορεί να προσκολληθεί στο βακτήριο. Στην ίδια μελέτη γίνεται αναφορά και

για την ύπαρξη **βλενωδών βακτηριακών αποικιών** (mucoid colonies) τις οποίες ο φάγος έχει την δυνατότητα να μολύνει αλλά με πολύ μικρή επιτυχία. Όλοι οι παραπάνω μηχανισμοί μπορούν να κάνουν τα βακτήρια **ανθεκτικά** απέναντι στους βακτηριοφάγους.

Η συνεχής δυναμική αλληλεπίδραση βακτηρίων και φάγων, όμως, δίνει συνεχώς τη δυνατότητα και στους βακτηριοφάγους να παρακάμπτουν τους βακτηριακούς αμυντικούς μηχανισμούς τροποποιώντας και το δικό τους γενετικό υλικό. Αυτό, συνήθως επιτυγχάνεται με δύο τρόπους: γλυκοζυλίωση και μεθυλίωση. Στην περίπτωση των φάγων T2, T4 και T6 για παράδειγμα, οι πολλαπλές γλυκοζυλίωσεις στο γονιδίωμα τους δίνει την δυνατότητα να αποφεύγουν την καταστροφή από τις ενδονουκλεάσες της *E. coli*. Στις περιπτώσεις των T3 και T7 η καταστροφή του γενετικού τους υλικού αποφεύγεται κωδικοποιώντας πρωτεΐνες που καταστέλλουν τα ένζυμα περιορισμού. Για να ανταπεξέλθουν τα βακτήρια με τη σειρά τους, κάποια έχουν τη δυνατότητα χρήσης παράλληλα πολλαπλών συστημάτων άμυνας. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν πως οι βακτηριοφάγοι έχουν την δυνατότητα να απενεργοποιούν και τον αμυντικό μηχανισμό CRISPR, όπως συνέβη στην περίπτωση της *Pseudomonas aeruginosa* (Bondy-Denomy et al. 2013). Η φυσική επιλογή, βεβαίως, ευνοεί την επιβίωση των μεταλλαγμένων βακτηριοφάγων που μπορούν να μολύνουν τα ανθεκτικά βακτήρια. Και με τον τρόπο αυτό η εξέλιξη συνεχίζεται...

Είναι ξεκάθαρο πως στην πορεία του χρόνου τόσο τα βακτήρια όσο και οι βακτηριοφάγοι **συνεξελίσσονται**, όπως και όλα τα συστήματα παρασίτου – ξενιστή, αναπτύσσοντας αμυντικές προσαρμογές οι οποίες απαντούν στους εκατέρωθεν μηχανισμούς άμυνας (Madigan et al. 2010).

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ - ΦΑΓΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ο τρόπος δράσης των λυτικών βακτηριοφάγων οδηγεί σε άμεση εξολόθρευση των βακτηρίων ξενιστών τους, συνεπώς είναι **μόνο** αυτοί που χρησιμοποιούνται στην φαγοθεραπεία (Sulakvelidze et al. 2001).

Στα κράτη – μέλη της ΕΕ, οι εφαρμογές των βακτηριοφάγων είναι από άγνωστες έως ελάχιστα γνωστές, καθώς το νομικό πλαίσιο των φαρμακευτικών εφαρμογών είναι ιδιαίτερα αυστηρό και απαιτητικό. Παρόλα αυτά σε χώρες όπως οι ΗΠΑ, η Γεωργία, η Ρωσία, η Ιαπωνία και η Ν. Κορέα η φαγοθεραπεία είναι σήμερα μια

υπαρκτή επιλογή, με εγκεκριμένα εμπορικά σκευάσματα να διατίθενται στην αγορά. Τα τελευταία χρόνια, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η συνεχής χρήση συγκεκριμένων αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στην **ανάπτυξη ανθεκτικότητας** των βακτηριακών στελεχών στα αντιβιοτικά αυτά. Η φαγοθεραπεία ως εναλλακτική μέθοδος καταπολέμησης παθογόνων βακτηρίων μοιάζει πια ιδανική επιλογή. Η χρήση των βακτηριοφάγων σαν παράγοντες πρόληψης και θεραπείας σημειώνει κάποια πολύ σοβαρά **πλεονεκτήματα** έναντι των αντιβιοτικών, που δικαιολογεί σε μεγάλο βαθμό το ενδιαφέρον που έχουν προσελκύσει. Εφαρμογές φαγοθεραπείας σήμερα πραγματοποιούνται σε τομείς όπως η ιατρική, η κτηνιατρική, η γεωργία και η υδατοκαλλιέργεια (Merril et al. 1996; Barrow 2001; Park and Nakai 2003; Matsuzaki et al. 2005). Συγκεκριμένα τα σπουδαιότερα πλεονεκτήματα των βακτηριοφάγων έναντι των αντιβιοτικών είναι τα εξής:

- 1) Οι φάγοι παρουσιάζουν πολύ υψηλή εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή τους διότι προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς που βρίσκονται αποκλειστικά στην βακτηριακή μεμβράνη του ξενιστή. Αντίθετα, τα αντιβιοτικά καταστέλλουν βασικές βακτηριακές λειτουργίες όπως μεταγραφή και πρωτεϊνοσύνθεση, με αποτέλεσμα να καταστρέφουν ένα πολύ ευρύ φάσμα βακτηρίων χωρίς διάκριση του παθογόνου ή μη χαρακτήρα τους. Έτσι, η βακτηριακή μικροχλωρίδα μεταβάλλεται υπό την πίεση ενός τεχνητού παράγοντα επιλογής.
- 2) Οι βακτηριοφάγοι είναι αποτελεσματικοί ακόμα και απέναντι σε ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια.
- 3) Το κόστος ανάπτυξης νέων βακτηριοφάγων είναι πολύ χαμηλότερο από το αντίστοιχο κόστος ανάπτυξης νέων αντιβιοτικών.
- 4) Ακόμη και στην περίπτωση ανάπτυξης ανθεκτικότητας των βακτηρίων έναντι των φάγων που χορηγούνται, υπάρχει η δυνατότητα απόκρισης των ιών. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι φάγοι ανανεώνονται συνεχώς στο περιβάλλον τους με ρυθμούς που δικαιολογούν γενετικό ανασυνδυασμό μεταξύ βακτηρίων και φάγων (Hendrix 2002). Συνεπώς, είναι αναμενόμενο ότι κάποιοι βακτηριοφάγοι θα ανταπεξέλθουν σε ενδεχόμενη ανθεκτικότητα του ξενιστή τους για να μπορέσουν να επιβιώσουν. Και έτσι δρα και θα δρα η εξέλιξη και για τις δύο πλευρές.

- 5) Δεν έχουν σημειωθεί αλλεργικές αντιδράσεις ή οποιοσδήποτε παρενέργειες στη χρήση βακτηριοφάγων.
- 6) Οι φάγοι πολλαπλασιάζονται εκθετικά μέσα ξενιστή τους και συνεπώς απελευθερώνονται στο σημείο της μόλυνσης όπου χορηγούνται (Carlton 1999; Matsuzaki et al. 2005).

Βέβαια, τόσο η υψηλή εξειδίκευση ξενιστών των βακτηριοφάγων όσο και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας από το βακτήριο έναντι του φάγου, μπορεί να είναι ανασταλτικοί παράγοντες στην εφαρμογή της φαγοθεραπείας. Όμως, το ζήτημα αυτό παρακάμπτεται με επιτυχία χρησιμοποιώντας όχι έναν, αλλά **συνδυασμό βακτηριοφάγων (phage cocktail)** (Levin and Bull 2004). Η χορήγηση των βακτηριοφάγων γίνεται σε **υγρή** είτε **λυοφιλοποιημένη** μορφή, με τον δεύτερο τρόπο να είναι πιο σταθερός καθώς επίσης και πιο πρακτικός από άποψη όγκου (Brüssow 2005).

Η φαγοθεραπεία μπορεί να εφαρμόζεται είτε σαν μόνη επιλογή για την καταπολέμηση βακτηρίων τα οποία είναι ανθεκτικά σε αντιβιοτικά, είτε και συνδυαστικά με τα αντιβιοτικά ώστε να προλαμβάνεται η ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι και των δύο θεραπευτικών παραγόντων.

ΦΑΓΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΗΝ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Η χρήση βακτηριοφάγων για την καταπολέμηση της δονακίωσης σε ψάρια και οστρακοειδή έχει μελετηθεί από αρκετές επιστημονικές ομάδες ανά τον κόσμο. Αρκετές μελέτες έχουν γίνει τόσο πάνω στην φαγοθεραπεία σε ψάρια (Nakai 2010) όσο και πάνω στην φαγοθεραπεία σε ασπόνδυλα (γαρίδες, μαλάκια κ.α.). Εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα φάγων για θαλάσσια ζώα είναι πολύ περιορισμένα . Έχει αποδειχθεί πως η **αποτελεσματικότητα** της φαγοθεραπείας ποικίλει ανάλογα με την **καθαρότητα** των απομονωθέντων φάγων, τον **τρόπο**, την **δόση** και τον **χρόνο χορήγησης**, την **ειδο-ειδικότητα** του φάγου, τους **μηχανισμούς άμυνας** του βακτηρίου και τις **περιβαλλοντικές συνθήκες** όπως **αλατότητα**, **θερμοκρασία** και **pH** (Oliveira et al. 2012). Όλοι αυτοί οι παράγοντες πρέπει να προσδιορίζονται όσο το δυνατόν ακριβέστερα πριν εφαρμοστεί η φαγοθεραπεία οποιασδήποτε βακτηριακής ασθένειας στην υδατοκαλλιέργεια.

Η πρώτη βιβλιογραφική αναφορά για εφαρμογή της φαγοθεραπείας στην υδατοκαλλιέργεια έγινε από τους Park και Nakai (2002) και άρθρα σχετικά με απομόνωση, χαρακτηρισμό και χρήση βακτηριοφάγων στην υδατοκαλλιέργεια δημοσιεύονται με ιδιαίτερα υψηλούς ρυθμούς από ερευνητικές ομάδες από όλον τον πλανήτη (Park and Nakai 2003; Vinod et al. 2006; Higuera et al. 2013; Madsen et al. 2013).

Στην περίπτωση της δονακίωσης, έχουν ήδη απομονωθεί πολύ λίγοι βακτηριοφάγοι έναντι περιορισμένου αριθμού ειδών *Vibrio*, όπως αναφέρεται και στον Πίνακα 2, από πηγές όπως άρρωστα ψάρια, νερά υδατοκαλλιεργειών και φυσικό θαλασσίνο νερό. Όσο οι έρευνες προχωρούν οι αριθμοί αυτοί συνεχώς αυξάνονται.

Πίνακας 2 Εκτίμηση αριθμού απομονωμένων βακτηριοφάγων έναντι των κυριότερων παθογόνων του γένους *Vibrio* και οι αντίστοιχες δημοσιεύσεις.

Αριθμός φάγων	Αιτιολογικός παράγοντας δονακίωσης	Βιβλιογραφικές αναφορές
>10	<i>V. harveyi</i>	(Oakey and Owens 2000; Yuksel et al. 2001; Oakey et al. 2002; Vinod et al. 2006; Karunasagar et al. 2007; Shivu et al. 2007; Srinivasan et al. 2007; Crothers-Stomps et al. 2010; Phumkhachorn and Rattanachaikunsopon 2010)
5	<i>V. parahaemolyticus</i>	(Alagappan et al. 2010)
6	<i>V. anguillarum</i>	(Higuera et al. 2013)
5	<i>V. alginolyticus</i>	(Muramatsu and Matsumoto 1991; Lin et al. 2012; Lin and Lin 2012; Heo et al. 2012)

Η χρήση συνδυασμού βακτηριοφάγων (phage cocktail) όπως αναφέρθηκε παραπάνω σημειώνει πολύ μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση βακτηριακών ασθενειών, όπως συνέβη στην αντιμετώπισης ασθένειας που προκάλεσε το *V.harveyi* σε καλλιέργειες αστακών *Palinurus ornatus* (Crothers-Stomps et al. 2010). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Higuera et al. (2013) έγινε επιμόλυνση με *V.anguillarum* σε καλλιέργειες σολομού όπου οι πληθυσμοί στους οποίους είχε χορηγηθεί συνδυασμός εξειδικευμένων βακτηριοφάγων δεν προκάλεσε δονακίωση. Αντίθετα, οι πληθυσμοί όπου δεν έγινε προσθήκη βακτηριοφάγων νόσησαν και σημείωσαν μεγάλες θνησιμότητες. Σύμφωνα με τα έως τώρα δεδομένα,

συμπεραίνεται πως οι εξειδικευμένοι για *Vibrio* βακτηριοφάγοι έχουν μεγάλες δυνατότητες αντιμετώπισης και πρόληψης των παθογόνων ξενιστών τους στην υδατοκαλλιέργεια τόσο ψαριών όσο και ασπόνδυλων (Park et al. 2000; Nakai 2010).

Το εκκολαπτήριο είναι πολύ ιδιαίτερο και ευαίσθητο περιβάλλον με μικρή ανανέωση νερού, πολύπλοκες μικροβιακές αλληλεπιδράσεις και ευαίσθητες ισορροπίες. Παρόλο που το νερό των εκκολαπτηρίων υφίσταται ειδική επεξεργασία περνώντας από αρκετά φίλτρα καθώς και από υπεριώδη ακτινοβολία, οι βακτηριακές ασθένειες συνεχίζουν να αποτελούν πρόβλημα που προκαλεί θνησιμότητες στα νυμφικά στάδια των ψαριών (Karunasagar et al. 2007). Τα βακτήρια που προκαλούν τις ασθένειες αυτές εισέρχονται στο ευαίσθητο σύστημα του εκκολαπτηρίου μέσω των ζωντανών τροφών *Brachionus plicatilis* (τροχόζωα) και *Artemia salina* (κωπήποδα).

Οι καλλιέργειες των τροχοζώων αναπτύσσονται κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες όμως, κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού τους συσσωρεύεται ένα υψηλό οργανικό φορτίο. Διάφορα ευκαιριακά βακτήρια εκμεταλλεύονται την έντονη αύξηση του οργανικού υποστρώματος και πολλαπλασιάζονται ταχύτατα είτε προσκολλημένα στα κύτταρα των τροχοζώων είτε ως πλαγκτονικά βακτήρια στο περιβάλλον της καλλιέργειας με αποτέλεσμα συχνά να περιορίζουν και την ανάπτυξη των τροχοζώων (Salvesen et al. 2000; Kokou et al. 2007). Στα ευκαιριακά αυτά βακτήρια συμπεριλαμβάνονται και τα βακτήρια του γένους *Vibrio*, τα οποία εντοπίζονται συχνά στις καλλιέργειες τροχοζώων που χρησιμοποιούνται στα εκκολαπτήρια (Skjermo and Vadstein 1993; McIntosh et al. 2008). Πριν τα τροχόζωα χορηγηθούν στις νύμφες των ψαριών υφίστανται μια επεξεργασία ξεπλύματος (rinsing) η οποία απομακρύνει μεγάλο ποσοστό των βακτηρίων που φέρουν. Ακόμη, όμως, κάποια βακτήρια καταφέρνουν να εισέλθουν στο σύστημα του εκκολαπτηρίου και δυνητικά μπορούν να προκαλέσουν πρόβλημα στις νύμφες (Skjermo and Vadstein 1999).

Σχετικά με την περίπτωση της *A. salina* έχει αναφερθεί πως το μεγαλύτερο ποσοστό των βακτηρίων της φυσικής της μικροχλωρίδας ανήκει στο γένος *Vibrio*. Όταν δε οι καλλιέργειες *A. salina* ξεπεράσουν τις 24 ώρες, η μέθοδος του ξεπλύματος δεν έχει αποτέλεσμα στην απομάκρυνση των βακτηρίων όπως στα τροχόζωα. Αντίθετα, τα *Vibrio* μπορούν να χρησιμοποιούν το μικροπεριβάλλον της *A. salina* ώστε να πολλαπλασιάζονται και να προστατεύονται από χειρισμούς που γίνονται για την απομάκρυνσή τους (Villamil et al. 2003).

Άρα, η είσοδος των *Vibrio* στο εκκολαπτήριο μπορεί δυνητικά να προκαλέσει δονακίωση στα ψάρια. Στην περίπτωση αυτή η μόνη μέθοδος που χρησιμοποιείται για να αντιμετωπιστεί η ασθένεια είναι η χρήση αντιβιοτικών. Όμως, η πρακτική αυτή οδηγεί στην δημιουργία ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηριακών στελεχών (Karunasagar et al. 1994), καθώς επίσης και στην μεταβολή της φυσικής μικροχλωρίδας του εκκολαπτηρίου λόγω της μη-ειδικής δράσης των αντιβιοτικών και της μικρής ανανέωσης νερού. Ιδανική εναλλακτική επιλογή για την αντιμετώπιση των *Vibrio* στα εκκολαπτήρια φαίνεται να είναι η χρήση βακτηριοφάγων, κυρίως διότι παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση ξενιστή αλλά και επειδή δεν αφήνουν κατάλοιπα στο περιβάλλον. Χαρακτηριστικό παράδειγμα πολύ καλά μελετημένης περίπτωσης δονακίωσης σε εκκολαπτήριο που αντιμετωπίστηκε επιτυχώς με χρήση βακτηριοφάγων αποτελεί η περίπτωση του *V. harveyi* που προκάλεσε μαζικές θνησιμότητες στα εκκολαπτήρια γαρίδων *Penaeus monodon* (Karunasagar et al. 2007). Στην μελέτη αυτή όχι μόνο η δονακίωση αντιμετωπίστηκε με βιολογικό τρόπο αλλά σημειώθηκε επιβίωση στις γαρίδες ~90% σε σύγκριση με τη χρήση αντιβιοτικών όπου σημειώθηκε επιβίωση ~65%. Η ανάγκη εναλλακτική θεραπείας κορυφώθηκε, όταν εντοπίστηκαν υπολείμματα αντιβιοτικών στους ιστούς των γαρίδων *Penaeus monodon* με αποτέλεσμα η κοινή γνώμη να αντιδράσει και να απαγορευτεί η εισαγωγή γαρίδων από πολλές χώρες (Karunasagar et al. 2007).

ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της εργασίας ήταν ο εντοπισμός, η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός λυτικών βακτηριοφάγων για την καταπολέμηση των παθογόνων *Vibrio* που αποτελούν τμήμα της φυσικής μικροχλωρίδας του εκκολαπτηρίου των εγκαταστάσεων του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε ένας βακτηριακός ξενιστής του γένους *Vibrio* που είναι κοινός στο περιβάλλον του εκκολαπτηρίου και είχε απομονωθεί στις εγκαταστάσεις του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. από κλινική περίπτωση δονακίωσης. Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας των βακτηριοφάγων έγινε σε *in vitro* συνθήκες, μολύνοντας βακτηριακές καλλιέργειες του ξενιστή καθώς και σε *in vivo* συνθήκες, σαν μέσο καταστολής του βακτηριακού φορτίου των *Vibrio* σε τροχόζωα που αποτελούν ζωντανά θηράματα για ιχθυονύμφες.

Το **κύριο ερώτημα** που στοχεύει να απαντήσει η εργασία είναι: Μπορεί η χρήση βακτηριοφάγων να καταπολεμήσει την δονακίωση στην υδατοκαλλιέργεια?

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Ο πειραματικός σχεδιασμός περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Επιλογή βακτηρίου - ξενιστή για το οποίο θα απομονωθούν οι βακτηριοφάγοι. Το βακτήριο αυτό θα πρέπει να είναι παθογόνο αντιπροσωπευτικό της φυσικής μικροχλωρίδας του περιβάλλοντος του εκκολαπτηρίου του ΕΛΚΕΘΕ
- Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός (μοριακός και βιοχημικός) του βακτηρίου - ξενιστή
- Δειγματοληψίες νερών και μυδιών από διαφορετικές περιοχές για τον εντοπισμό βακτηριοφάγων
- Απομόνωση, επιλογή και χαρακτηρισμός λυτικών βακτηριοφάγων έναντι του βακτηρίου - ξενιστή
- Μελέτη της αποτελεσματικότητας των βακτηριοφάγων σε *in vitro* συνθήκες επιμολύνοντας καλλιέργειες βακτηριακού ξενιστή
- Επιλογή διαφορετικών βακτηριοφάγων με στόχο την σύνθεση θεραπευτικού συνδυασμού (cocktail), η αποτελεσματικότητα του οποίου θα δοκιμαστεί *in vivo* σε καλλιέργειες ζωντανών τροφών (τροχόζωα) με στόχο τον περιορισμό του βακτηριακού φορτίου των παθογόνων στο εκκολαπτήριο

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Τέσσερα θρεπτικά υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους τρία εκ των οποίων γενικά ίδιας σύστασης θρεπτικών αλλά διαφορετικής πηκτικότητας (Higuera et al. 2013), και ένα εκλεκτικό υπόστρωμα για *Vibrio* (Colomi et al. 1981) (Πίνακας 3)

Πίνακας 3 Τύποι θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν και σύστασή τους.

Θρεπτικό υπόστρωμα	Σύσταση	Ρευστότητα	
Υγρό (LB)	1% tryptone (Difco)	Ρευστό	
	0,5% yeast extract (Difco)		
Ημίρρευστο (soft agar)	Θαλασσινό νερό	Ημίρρευστο	<u>Αποστείρωση</u> Κλιβανισμός όλων των θρεπτικών υποστρωμάτων στους 121° C για 20 λεπτά.
	1% tryptone (Difco)		
	0,5% yeast extract (Difco)		
	0,6% άγαρ		
Στέρεο σε τρυβλία Petri (solid agar)	Θαλασσινό νερό	Συμπαγές	
	1% tryptone (Difco)		
	0,5% yeast extract (Difco)		
	1,5% άγαρ		
TCBS agar (εκλεκτικό υπόστρωμα για βακτήρια του γένους <i>Vibrio</i>)	Θαλασσινό νερό	Συμπαγές	Βρασμός έως ότου ομογενοποιηθεί το μίγμα με τον διαλύτη
	Εμπορικό σκεύασμα (Difco)		
	Απιονισμένο νερό		

Οι βακτηριακές καλλιέργειες τοποθετούνταν σε επωαστικούς θαλάμους με σταθερή θερμοκρασία 25°C και στην περίπτωση των υγρών υπήρχε παράλληλη ανακίνηση των φιαλιδίων στις 150 rpm.

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

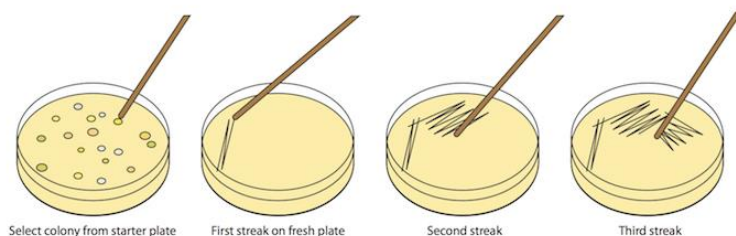
Το βακτήριο ξενιστής (Vow) που χρησιμοποιήθηκε ανήκει στην συλλογή του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. και είχε απομονωθεί από κλινική περίπτωση δονακίωσης, σε

καλλιεργούμενες τσιπούρες *Sparus aurata*. Τα βακτηριακά στελέχη της συλλογής φυλάσσονται σε υπερκαταψύκτη σε θερμοκρασία -80°C σε 50% γλυκερόλη καθώς και με χρήση του του συστήματος Cryobank™ (Εικόνα 12). Το σύστημα αυτό, αποτελείται από αποστειρωμένα φιαλίδια που περιέχουν 25 μικροσφαιρίδια (microbeads) μέσα σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα τα οποία έχουν την δυνατότητα να απορροφούν τα βακτήρια δημιουργώντας κατ' αυτόν τον τρόπο 25 πανομοιότυπες καλλιέργειες. Κάθε μικροσφαιρίδιο μπορεί να αφαιρείται χωρίς να αποψύχεται η υπόλοιπη καλλιέργεια. Έτσι ανακτώνται και ανακαλλιεργούνται όποτε αυτό είναι απαραίτητο.



Εικόνα 12 Σύστημα κρυοσύντηρησης βακτηρίων Cryobank™.

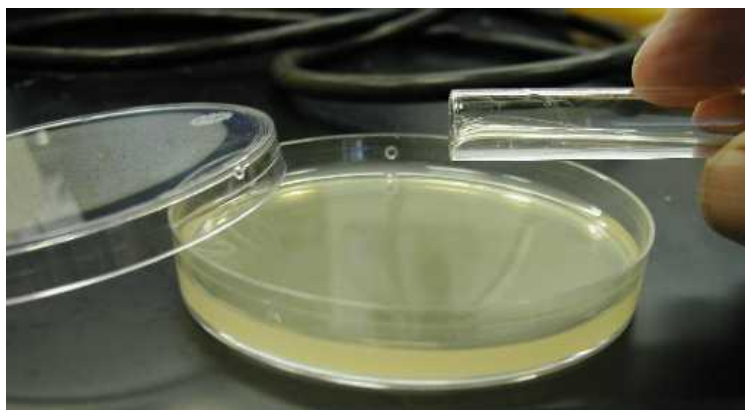
Η ανακαλλιέργειά τους έγινε με τη μέθοδο της επίστρωσης (streaking) χρησιμοποιώντας μικροβιολογικό κρίκο νικελίου και ανανεώνονταν κάθε 2 εβδομάδες ώστε να παραμένουν φρέσκες. Η επίστρωση των βακτηρίων γινόταν με τουλάχιστον 3 διαφορετικές κινήσεις (Εικόνα 13), με ενδιάμεση αποστείρωση του κρίκου σε φλόγα, με απώτερο σκοπό τον σχηματισμό μοναδικών αποικιών (single colonies).



Εικόνα 13 Διαδικασία επίστρωσης με τη χρήση μικροβιολογικού κρίκου. Τα στάδια που παρουσιάζονται είναι: επιλογή βακτηριακής αποικίας, πρώτη επίστρωση σε νέο τρυβλίο, δεύτερη και τρίτη επίστρωση (Madigan et al. 2010).

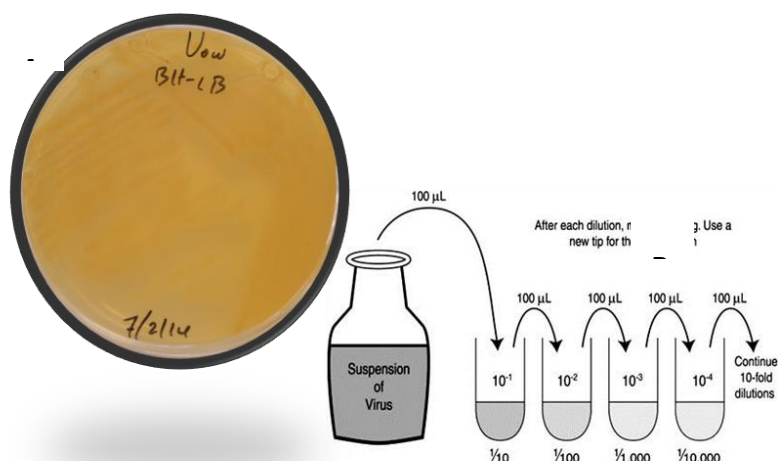
ΤΕΧΝΙΚΗ ΔΙΠΛΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ ΑΓΑΡ

Ένα ml μικροβιακής καλλιέργειας σε εκθετική φάση ανάπτυξης προστίθεται σε 3ml ημίρρευστο θρεπτικό. Το μίγμα απλώνεται πάνω σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με αποτέλεσμα τον σχηματισμό βακτηριακής χλόης (Εικόνα 14).



Εικόνα 14 Τεχνική διπλής στιβάδας άγαρ. Σχηματισμός βακτηριακής χλόης με την προσθήκη του ημίρρευστου θρεπτικού που περιέχει τα βακτήρια πάνω στην επιφάνεια τρυβλίου με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

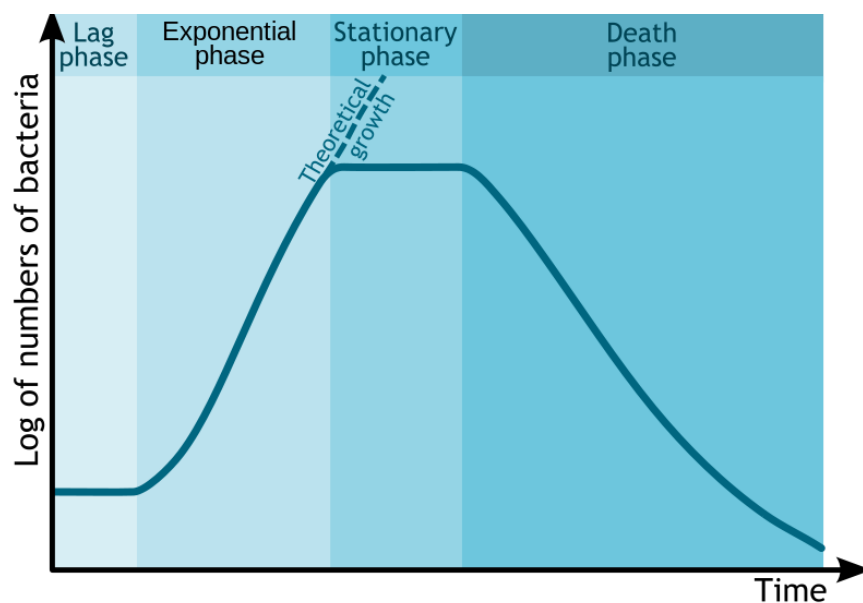
Στην περίπτωση του βακτηρίου της μελέτης οι βακτηριακές αποικίες έχουν την τάση να διαχέονται στο στερεό θρεπτικό. Η τεχνική διπλή στιβάδας άγαρ χρησιμοποιήθηκε προσθέτοντας στο ημίρρευστο (Εικόνα 15Α) θρεπτικό, μέσω της μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων (Εικόνα 15Β) τις αραιώσεις εκείνες στις οποίες θα σχηματιστούν διακριτές και μετρήσιμες αποικίες μετά από 24ωρη επώαση.



Εικόνα 15 Α: Βακτηριακή καλλιέργεια του στελέχους Vow σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, Β: σχηματική απεικόνιση της μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων (FAO 2007).

ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

Η καμπύλη ανάπτυξης του βακτηρίου παρουσιάζει την αύξηση μιας βακτηριακής καλλιέργειας στο χρόνο. Αρχικά, γίνεται εμβολιασμός (inoculation) μικρής ποσότητας από μια καλλιέργεια της προηγούμενης μέρας (overnight, o/n) σε υγρό θρεπτικό LB την χρονική στιγμή t_0 και από εκεί και έπειτα παρακολουθείται η οπτική απορρόφηση (OD) της καλλιέργειας σε μήκος κύματος $\lambda=600\text{nm}$. Παράλληλα, μετά από κάθε μέτρηση οπτικής πυκνότητας γίνονται αραιώσεις της βακτηριακής καλλιέργειας και με την τεχνική της διπλής στιβάδας άγαρ οι βακτηριακές αποικίες καταμετρώνται μετά από 24ωρη επώαση. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας συσχετίζεται η οπτική απορρόφηση με τη συγκέντρωση των βακτηρίων (μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά mL, CFU/mL) μέσω γραμμικής παλινδρόμησης αλλά και περιγράφεται η ανάπτυξη των βακτηρίων στη διάρκεια του χρόνου μέσω απεικόνισης σε γράφημα X-Y από το οποίο προκύπτει το πρότυπο (μοντέλο) ανάπτυξης (Εικόνα 16). Ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων γίνεται κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (exponential phase) η οποία χαρακτηρίζεται από την έντονη κλίση που παρουσιάζει στο γράφημα X-Y (Madigan et al. 2010).



Εικόνα 16 Πρότυπη καμπύλη του πολλαπλασιασμού των βακτηρίων στην πορεία του χρόνου. Απεικονίζονται όλα τα στάδια της βακτηριακής ανάπτυξης: φάση προσαρμογής (lag phase) – εκθετική φάση (log phase) – στατική φάση (stationary phase) – φάση ύφεσης (death phase) (Komorniczak 2009).

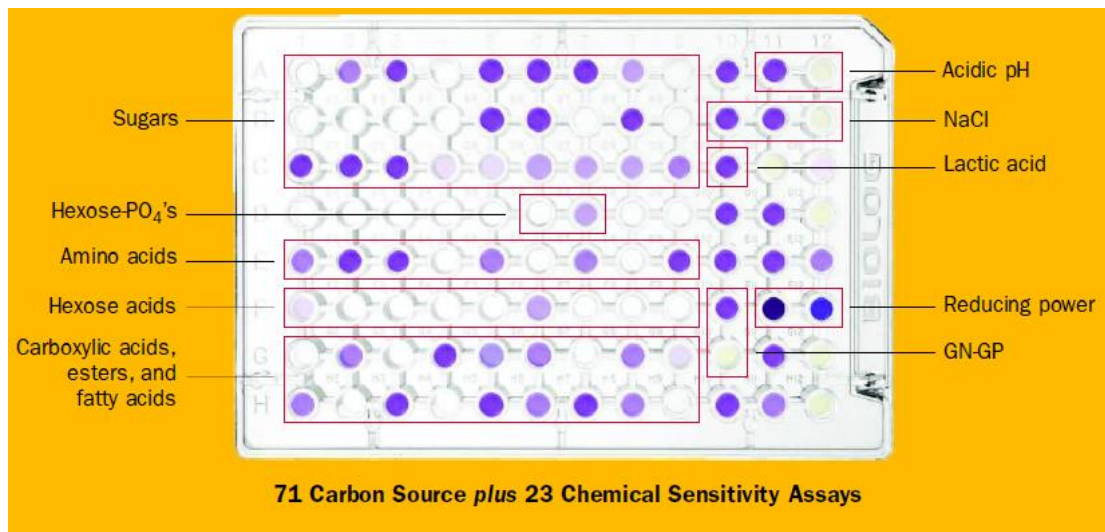
Ο γενικός βιοχημικός χαρακτηρισμός του βακτηρίου βασίστηκε στις ακόλουθες αντιδράσεις:

- ✓ Χρώση Gram
- ✓ Χρώμα αποικιών στο TCBS (υποδηλώνει τον μεταβολισμό της γλυκόζης)
- ✓ Τεστ οξειδάσης και καταλάσης
- ✓ Υδρόλυση ζελατίνης
- ✓ Μεταβολισμός κιτρικού οξέως
- ✓ Ανάπτυξη σε 0, 6 και 8% NaCl
- ✓ Μεταβολισμός ορισμένων πολύ βασικών σακχάρων (σουκρόζη, μαννόζη, λακτόζη, αραβινόζη)
- ✓ Μεταβολισμός ορισμένων πολύ βασικών αμινοξέων (λυσίνη, αργινίνη, ορνιθίνη)
- ✓ Έλεγχος αιμόλυσης σε αιματούχο άγαρ (blood agar)

Οι παραπάνω αντιδράσεις μπορούν να δώσουν μια γενική πρώτη εικόνα σχετικά με το βιοχημικό προφίλ του βακτηρίου (Farmer et al. 2005).

Το μεταβολικό αποτύπωμα του βακτηρίου, προσδιορίστηκε με χρήση του συστήματος **BIOLOG GENIII MicroPlate™**. Το σύστημα αυτό αποτελείται από πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 κυψελίδων (96 – well plates) στον πυθμένα των οποίων βρίσκεται ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα που προκαλεί μια αντίδραση. Οι αντιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν ένα θετικό και ένα αρνητικό μάρτυρα (control), 71 αντιδράσεις χρήσης πηγών άνθρακα και 23 αντιδράσεις χημικής ευαισθησίας (Εικόνα 17). Ποσότητα 100μl από βακτηριακό εναιώρημα αραιωμένο σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα IF-B, που περιείχε το σύστημα BIOLOG τοποθετείται σε κάθε κυψελίδα της πλάκας. Η θολερότητα (turbidity, T) του εναιωρήματος ήταν 96-98% στα 600nm μετά από φωτομέτρηση. Το σύστημα BIOLOG GENIII MicroPlate™ διαθέτει επιπλέον ένα λογισμικό, μια βάση δεδομένων η οποία αποτελείται από περισσότερες από 2000 μεταβολικές ταυτότητες βακτηριακών ειδών. Συνεπώς, πέραν του βιοχημικού προφίλ το οποίο προσδιορίζεται υπάρχει και η δυνατότητα να συγκριθεί με όλα τα υπόλοιπα που υπάρχουν στη βάση δεδομένων και να ταυτοποιηθεί (Middelboe et al. 2009).

Υπόδειγμα πλάκας BIOLOG



Εικόνα 17 Υπόδειγμα πλάκας του συστήματος BIOLOG GENIII MicroPlate™. Απεικονίζονται οι βασικές ομάδες υποστρωμάτων από τις οποίες αποτελείται το σύστημα.

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

ΕΞΑΓΩΓΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Η εξαγωγή του γενετικού υλικού του βακτηρίου έγινε σύμφωνα το ακόλουθο πρωτόκολλο βρασμού. Δύο μl από ο/n βακτηριακή καλλιέργεια προστέθηκαν σε 30μl αποστειρωμένο RNAase DNAase free νερό. Το διάλυμα αυτό τοποθετήθηκε στους 98°C για 5 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρήθηκε στις 14500 rpm (max speed) για 5 λεπτά. Είκοσι μl από το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο σωληνάριο erpendorff (1.5 mL) και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20°C (Englen and Kelley 2000).

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Δύο διαφορετικές αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκαν, η πρώτη με χρήση των γενικών εκκινητών (universal primers) 27-F και 1492-R και η δεύτερη με χρήση των ειδικών εκκινητών (specific primers) VA-F και VA-R (collagenase gene) (Πίνακας 4)

Πίνακας 4 Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) συνοδευόμενοι από τις βιβλιογραφικές τους αναφορές.

Εκκινητές (primers)	Αλληλουχίες	Βιβλιογραφία
<i>Γενικοί (universal)</i>		
Bac27-F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	(Jiang et al. 2006)
Univ1492-R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	(Jiang et al. 2006)
<i>Εξειδικευμένοι (specific)</i>		
VA-F:	CGAGTACAGTCACTTGAAAGCC	(Di Pinto et al. 2006)
VA-R:	CACAACAGAACTCGCGTTACC	(Di Pinto et al. 2006)

Η χρήση γενικών εκκινητών έγινε με στόχο την αλληλούχιση του **γονιδίου 16S** που αφορά το γονίδιο της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας στους προκαρυώτες. Οι εξειδικευμένοι εκκινητές για *Vibrio alginolyticus*, χρησιμοποιήθηκαν για την οριστική ταυτοποίηση του βακτηρίου. Τα συστατικά και στις δύο PCR ήταν τα ίδια με εξαίρεση τους εκκινητές: Τελικός όγκος στα 25μl εκ των οποίων: 1 μl DNA, 12.5 μl Taq PCR Master Mix (Qiagen), 0.2μM από κάθε εκκινητή στην αντίστοιχη PCR και 10.5 μl ddH₂O. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στη συσκευή PCR MJ Mini Personal Thermal Cycler (BioRad) είχε τα εξής στάδια:

- Για την PCR με γενικούς εκκινητές:

Επώαση στους 94°C για 3 λεπτά, 30 κύκλοι αποδιάταξης στους 94°C για 1 λεπτό υβριδοποίησης στους 58°C για 1 λεπτό και επιμήκυνσης στους 72°C για 1.5 λεπτό και τέλος επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά (Jiang et al. 2006).

- Για την PCR με εξειδικευμένους εκκινητές:

Επώαση στους 94°C για 3 λεπτά, 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 94°C για 0.5 λεπτά, υβριδοποίησης στους 57°C για 1 λεπτό και επιμήκυνσης στους 57°C για 0.5 λεπτά και τέλος επιμήκυνση στους 72°C για 5 λεπτά.

Τα προϊόντα των PCR, τοποθετήθηκαν σε gel αγαρόζης 0,8% με EtBr, το οποίο έτρεξε στα 100mV για 45 λεπτά (Di Pinto et al. 2006). Ο καθαρισμός του προϊόντος έγινε με εκχύλιση από το gel (Qiagen gel extraction kit).

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η αλληλούχιση του γονιδίου 16S που προέκυψε από την PCR με γενικούς εκκινητές, πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Sanger σε ABI3730xl sequencer (Applied Biosystems) σύμφωνα με το πρωτόκολλο BigDye Terminators 3.1 (Applied Biosystems). Οι αλληλουχίες των 16S rDNA που περιλαμβάνονται στην φυλογενετική ανάλυση μεταφορτώθηκαν σε μορφή FASTA από την γενετική τράπεζα GenBank, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Οι αλληλουχίες ανήκουν σε 13 διαφορετικά *Vibrio* του κλάδου των *harveyi*, ένα *Vibrio anguillarum*, ένα *Vibrio ordalii* και δύο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* τα οποία είναι βακτηριακά παθογόνα των ψαριών συγγενικά με τα *Vibrio* (παλαιότερα ανήκαν στο γένος *Vibrio*) αλλά διαφορετικά γένη. Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα Clustal X (Thompson et al. 1997) με τις ρυθμίσεις προεπιλογής. Η μέθοδος της φυλογενετικής ανάλυσης ήταν η Neighbor-Joining (NJ) και έγινε στο πρόγραμμα MEGA (Tamura et al. 2011) με ρυθμίσεις Tamura-Nei model, pairwise deletion option και bootstrap: 1000.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ

Οι τεχνικές απομόνωσης και χαρακτηρισμού των βακτηριοφάγων βασίστηκαν στο σύγγραμμα “Bacteriophages Methods and Protocols”, Volume 1 των Clokie & Kropinski (2009). Η απομόνωση των βακτηριοφάγων πραγματοποιήθηκε από δείγματα νερού και μυδιών.

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ

Οι βακτηριοφάγοι υπάρχουν με φυσικό τρόπο στα οικοσυστήματα. Ο στόχος των δειγματοληψιών ήταν να εντοπιστούν οι φάγοι και στην συνέχεια να απομονωθούν. Σαν δείγματα επιλέχθηκαν κυρίως νερά, καθώς το νερό αποτελεί το φυσικό περιβάλλον των βακτηριοφάγων, και μύδια καθώς είναι διηθηματοφάγοι οργανισμοί. Πραγματοποιήθηκαν 20 δειγματοληψίες **υδάτων** σε 9 δειγματοληπτικούς σταθμούς κατά μήκος 30 χλμ. της βόρειας ακτογραμμής της Κρήτης. Ο όγκος νερού

κάθε δείγματος ήταν περίπου 2L. Η δειγματοληψία **μυδιών** έγινε από συνεργαζόμενες μονάδες εκτροφής και τα μύδια απεστάλησαν στο εργαστήριο ταχυδρομικά σε πλαστικά ψυγεία.

Για τον εντοπισμό των φάγων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του **εμπλουτισμού** (enrichment method). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, προστίθεται υγρό θρεπτικό υλικό στα δείγματα και εν συνεχεία ο/η καλλιέργεια του βακτηρίου στόχου. Έτσι, ευνοείται ο πολλαπλασιασμός του βακτηρίου στόχου και παράλληλα δίνεται η δυνατότητα στους φάγους που ενδεχομένως υπάρχουν στα δείγματα να πολλαπλασιαστούν, εκμεταλλευόμενοι την διαθεσιμότητα των βακτηριακών ξενιστών τους. Οι εμπλουτισμένες καλλιέργειες επωάζονταν στους 25°C με ανακίνηση 100 rpm για 24 ώρες (Εικόνα 18).



Εικόνα 18 Βακτηριακές καλλιέργειες εμπλουτισμού σε δείγματα νερών σε γυάλινες φιάσες των 500ml με απώτερο σκοπό τον εντοπισμό και την απομόνωση βακτηριοφάγων.

ΈΛΕΓΧΟΣ ΔΙΗΘΗΜΑΤΩΝ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, 1 ml από κάθε καλλιέργεια εμπλουτισμού φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 6000 rpm και έπειτα διηθείται μέσα από ηθμό διαμέτρου πόρου 0.2μm προσαρμοσμένο σε σύριγγα έτσι ώστε να απομακρυνθούν όλα τα βακτήρια και στο διήθημα να παραμείνουν μόνο οι μικροοργανισμοί μεγέθους μικρότερου των 2 μm δηλαδή οι βακτηριοφάγοι. Ο έλεγχος της παρουσίας βακτηριοφάγων στα διηθήματα γίνεται με την μέθοδο διπλής στιβάδας άγαρ, όπου τοποθετούνται σταγόνες (spots) από τα διηθήματα επάνω στην βακτηριακή χλόη του ξενιστή (spot-test).



Εικόνα 19 Η μέθοδος του spot – test σε βακτηριακή χλόη *V. anguillarum*. Το διήθημα VAS1 παρουσιάζει αναστολή της ανάπτυξης στα σημεία της βακτηριακής χλόης όπου τοποθετήθηκε.

Μετά από 24 ώρες, τα spots ελέγχονται ως προς την αναστολή ή μη της βακτηριακής ανάπτυξης (Εικόνα 19). Τα σημεία όπου παρατηρείται αναστολή βακτηριακής ανάπτυξης, αφαιρούνται και τοποθετούνται σε υγρό θρεπτικό LB. Μετά από 24 ώρες στους 4°C, φυγοκεντρώνονται στις 6000 rpm για 15 λεπτά και το υπερκείμενο διηθείται μέσα από ηθμό διαμέτρου πόρου 0.2μm.

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΥΞΗΣΗ ΤΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΤΩΝ ΦΑΓΩΝ

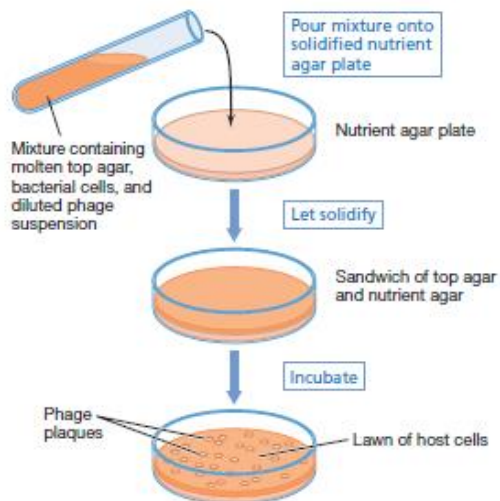
Τα διηθήματα που προκάλεσαν βακτηριακή αναστολή, αραιώνονται διαδοχικά και καθαρίζονται χρησιμοποιώντας μια παραλλαγή της μεθόδου διπλής στιβάδας άγαρ. 100 μl από κάθε αραιώση του αρχικού διηθήματος προστίθεται σε 1 ml ο/η βακτηριακής καλλιέργειας με την οποία και αλληλεπιδρά για 20 λεπτά. Σε κάθε διάλυμα βακτηριακής αραιώσης και φάγων, προστίθενται 3 ml ημίρρευστου θρεπτικού υλικού και μετά από απαλή ανακίνηση, το μίγμα απλώνεται σε στερεό θρεπτικό υλικό. Μετά από 24 ώρες επώαση στους 25°C επιλέγονται τα τρυβλία εκείνα στα οποία οι λυτικές πλάκες (αρνητικές αποικίες ή plaque forming units, PFU) είναι μετρήσιμες και διακριτές μεταξύ τους. Επιλέγεται από το συγκεκριμένο τρυβλίο, **μία και μόνο λυτική πλάκα** η οποία τοποθετείται σε υγρό θρεπτικό (LB). Αφού τοποθετηθεί για 24 ώρες στους 4°C, φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στις 6000 rpm και η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 5 φορές. Αφού ο βακτηριοφάγος είναι πια μονοκλωνικός, απαιτείται η αύξηση του τίτλου του (titer) ώστε να προχωρήσει ο περαιτέρω χαρακτηρισμός του.

Η αύξηση του τίτλου των βακτηριοφάγων μπορεί να γίνει είτε συγκαλλιερώντας τον σε υγρό θρεπτικό μαζί με το βακτήριο – ξενιστή του (liquid

propagation), είτε χρησιμοποιώντας την τεχνική διπλής στιβάδας χρησιμοποιώντας χαμηλές αραιώσεις του φάγου στις οποίες προστίθεται φρέσκια βακτηριακή καλλιέργεια (solid propagation), όπως στην προαναφερθείσα περίπτωση του καθαρισμού. Στην περίπτωση του υγρού πολλαπλασιασμού, μετά από 24ωρη επώαση στους 25°C ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6000 rpm για 20 λεπτά, και το υπερκείμενο το οποίο φιλτράρεται μέσα από φίλτρα σύριγγας πόρου 0.2μm, αποτελεί τον καθαρό και πυκνό φάγο. Στην περίπτωση του πολλαπλασιασμού με την μέθοδο του στερεού θρεπτικού, μετά από 24ωρη επώαση στους 25°C συλλέγονται όλα τα ημίρρευστα θρεπτικά από την επιφάνεια των τρυβλίων σε πλαστικό φιαλίδιο και αφού προστεθούν 2-3 ml LB, ανακινούνται έντονα και φυγοκεντρώνονται στις 6000 rpm για 20 λεπτά. Το υγρό υπερκείμενο συλλέγεται και διηθείται μέσα από ηθμούς πόρου 0.2 μm, και το διήθημα αυτό θα αποτελεί τον καθαρό και πυκνό φάγο.

ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ

Εφόσον, παρασκευάστηκαν μονοκλωνικοί βακτηριοφάγοι υψηλής συγκέντρωσης υπολογίζεται η συγκέντρωσή τους (τιτλοδότηση) και εκτιμάται και η σταθερότητά τους στο χρόνο. Η τιτλοδότηση γίνεται με την μέθοδο διπλής στιβάδας άγαρ όπως αυτή ακολουθείται για τον καθαρισμό των βακτηριοφάγων (Εικόνα 20). Μετά από 24ωρη επώαση στους 25°C γίνεται καταμέτρηση των αρνητικών αποικιών των φάγων και λαμβάνοντας υπόψη την αραιώση στην οποία γίνεται η μέτρηση αλλά και την ποσότητα των φάγων που τοποθετήθηκαν (100μl) εκτιμάται ο αριθμός των PFU του φάγου ανά ml και το νούμερο αυτό καλείται **τίτλος του φάγου**.



Εικόνα 20 Η μέθοδος διπλής στιβάδας άγαρ που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του τίτλου των βακτηριοφάγων. Το μίγμα ημίρρευστου θρεπτικού, βακτηρίων και βακτηριοφάγων χύνεται σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και οι αρνητικές αποικίες του φάγου καταμετρώνται μετά από 24ωρη επώαση (Madigan et al. 2010).

Μετά τον υπολογισμό των τίτλων των μονοκλωνικών φάγων έγινε εκτίμηση της σταθερότητας αποθήκευσής τους στο χρόνο σε 3 συνθήκες:

- 4°C σε LB
- 4°C σε LB με 0,2% χλωροφόρμιο
- -80°C σε LB με 50% γλυκερόλη

Το πείραμα της σταθερότητας είχε διάρκεια 40 ημέρες και βοηθά στον προσδιορισμό του βέλτιστου τρόπου αποθήκευσης των βακτηριοφάγων.

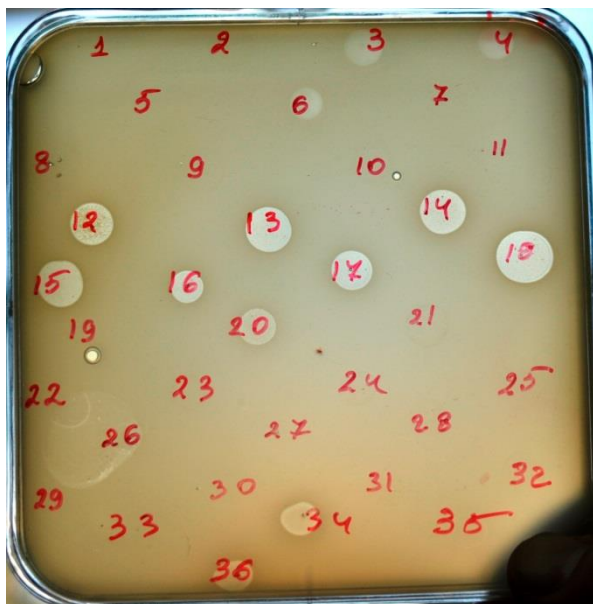
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ

Στο 1^ο στάδιο χαρακτηρισμού βακτηριοφάγων γίνεται διάκριση και ομαδοποίηση των διαφορετικών μεταξύ τους βακτηριοφάγων. Στο 2^ο στάδιο, γίνεται ο χαρακτηρισμός του κύκλου ζωής τους.

ΕΥΡΟΣ ΞΕΝΙΣΤΩΝ ΦΑΓΩΝ

Οι μονοκλωνικοί βακτηριοφάγοι οι οποίοι απομονώθηκαν και έχουν πια υψηλό τίτλο, χαρακτηρίζονται ως προς το **εύρος ξενιστών** τους (host range), τον αριθμό δηλαδή των διαφόρων βακτηριακών στελεχών που μπορούν να μολύνουν (Εικόνα 21). Τοποθετήθηκαν σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα οι βακτηριακές χλόδες από 23 διαφορετικά βακτηριακά στελέχη του γένους *Vibrio* και έπειτα

τοποθετήθηκαν επάνω σταγόνες των βακτηριοφάγων. Μετά από 24ωρη επώαση στους 25°C έγινε έλεγχος της αναστολής της βακτηριακής ανάπτυξης στα σημεία των σταγόνων και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν σε 4 επίπεδα: μηδενική, χαμηλή, μέτρια και έντονη βακτηριακή αναστολή.



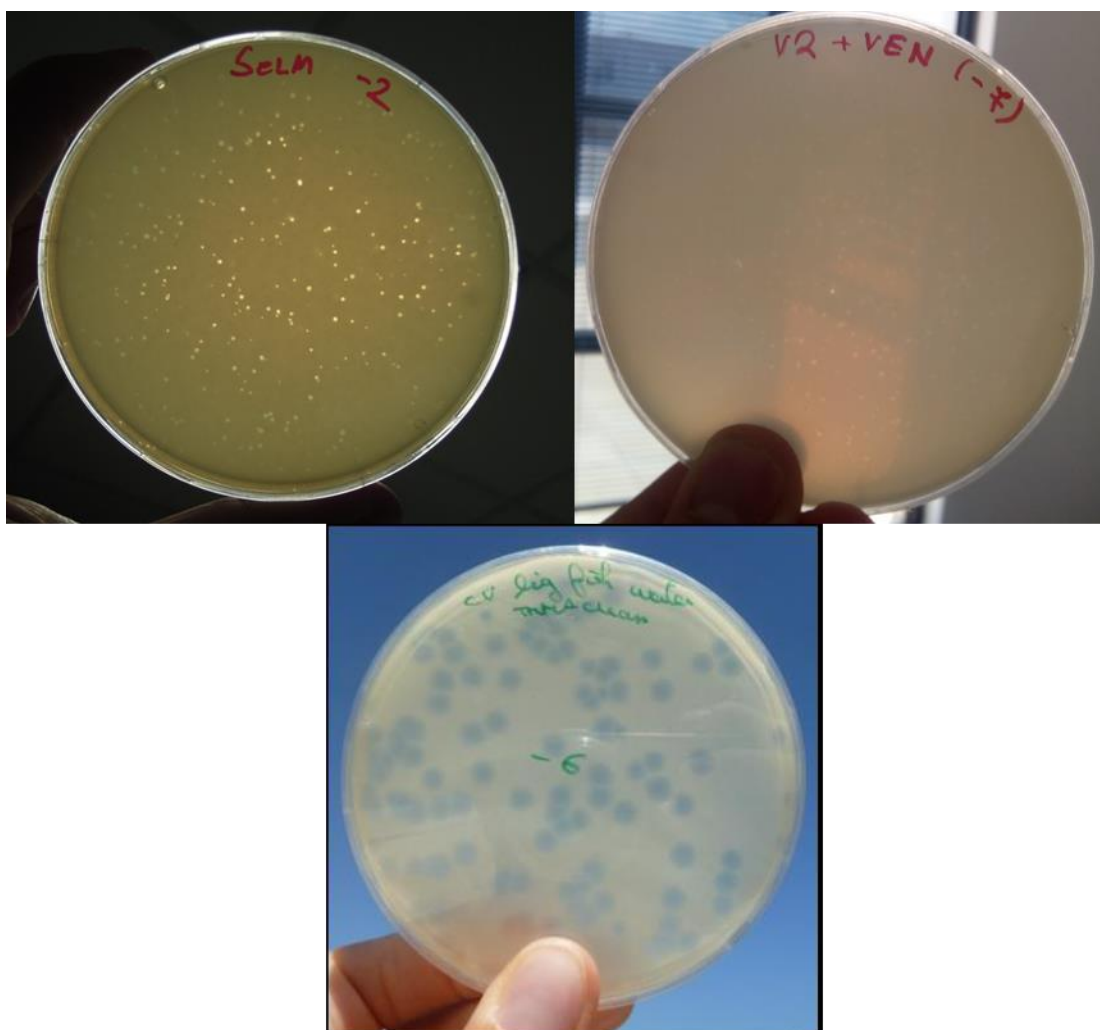
Εικόνα 21 Έλεγχος εύρους ξενιστών 36 βακτηριοφάγων έναντι της βακτηριακής χλόης ενός από τους ξενιστές που ελέγχθηκαν. Ενδεικτικά: μηδενική αναστολή - No1, χαμηλή αναστολή - No3, μέτρια αναστολή - No20 και έντονη αναστολή - No18.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΛΥΣΗΣ (TEM)

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης δίνει την δυνατότητα να υπολογιστεί το μέγεθος και η ακριβής μορφολογία των ιοσωμάτων βάσει των οποίων οι φάγοι κατατάσσονται σε οικογένειες. Χρειάστηκε 1 ml από κάθε μονοκλωνικό βακτηριοφάγο τίτλου $>10^{10}$ PFU/ml και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαίσια κολλοδίου και χαλκού (collodium copper grids) στα οποία προετοιμάστηκε αρνητική αντίθεση με 2% οξικό ουρανυλεστέρα (negatively contrasted with 2% uranyl acetate). Η παρατήρηση των βακτηριοφάγων έγινε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης 100SX (Jeol, Japan) στα 80kV και σε 50000x στο Ινστιτούτο Βακτηριοφάγων, Μικροβιολογίας και Ιολογίας G. Eliava στη Τιφλίδα της Γεωργίας.

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΛΥΤΙΚΩΝ ΠΛΑΚΩΝ

Η τεχνική της διπλής στιβάδας άγαρ που χρησιμοποιείται για την τιτλοδότηση των φάγων απεικονίζει την μορφολογία των πλακών του φάγου επάνω στη βακτηριακή χλόη του ξενιστή. Με αυτόν τον τρόπο, μπορεί να προσδιοριστεί η καθαρότητα της πλάκας και το μέγεθός της, χαρακτηριστικά που πολλές φορές αποτελούν παράγοντες διαφοροποίησης μεταξύ διαφορετικών βακτηριοφάγων (Εικόνα 22)



Εικόνα 22 Λυτικές πλάκες βακτηριοφάγων που παρουσιάζουν διαφορετικές μορφολογίες. Α: φάγος SelM έναντι *V. alginolyticus* – μικρές και διαυγείς πλάκες διαμέτρου 1mm, Β: φάγος VEN έναντι *V. alginolyticus* – μικρές και θολές πλάκες διαμέτρου 1mm Γ: φάγος CV έναντι *Pseudolateromonas* sp. – μεγάλες και διαυγείς πλάκες διαμέτρου 5mm.

Η φύση του γονιδιώματος των βακτηριοφάγων ελέγχθηκε μετά από επώαση με δεοξυριβονουκλεάση (DNAase) και ριβονουκλεάση (RNAase A). Τα προϊόντα της πέψης έτρεξαν σε gel αγαρόζης 0,8% με EtBr.

Το πρότυπο που εμφανίζει το γονιδίωμα ενός φάγου μετά από **πέψη με περιοριστικά ένζυμα** είναι πολύ χρήσιμο στην ομαδοποίηση ή τον διαχωρισμό τους. Η εξαγωγή του γονιδιώματος των βακτηριοφάγων έγινε βάσει του ακόλουθου πρωτοκόλλου εξαγωγής DNA φαινόλης-χλωροφορμίου:

- Επώαση 500μl φάγου (συγκέντρωσης $> 5 \times 10^9$ /ml) + 2,5μl DNAase + 2,5μl RNAase + RNAase buffer για 1 ώρα στους 37°C
- Προσθήκη 12,5μl πρωτεΐνης K (συγκέντρωσης 500μg/ml) και επώασης στους 65°C για ακόμη 15 λεπτά
- Προσθήκη sodium dodecyl sulfate (SDS) σε τελική συγκέντρωση 0,5% και επώαση στους 65°C
- Προσθήκη ενός όγκου από το μίγμα φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1), έντονη ανάδευση (vortex) για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 15000 rpm για 15 λεπτά
- Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης λαμβάνεται και το προηγούμενο βήμα επαναλαμβάνεται
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο φιαλίδιο προσθέτοντας 1/10 του όγκου sodium acetate συγκέντρωσης 3M και pH=5 και δύο όγκους 100% παγωμένης αλκοόλης και φυγοκέντρηση στις 15000 rpm για 10 λεπτά
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και η πελέττα ξεπλένεται δύο φορές με 70% αιθανόλη φυγοκεντρώντας στις 10000 rpm για 5 λεπτά
- Αναμονή σε θερμοκρασία δωματίου ώσπου να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης
- Προσθήκη 50μl TE buffer και αποθήκευση στους -20°C

(Higuera et al. 2013)

Τρία μl του γενετικού υλικού χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του με τα περιοριστικά ένζυμα **BamHI**, **HindIII** και **HaeIII** της Promega. Η πέψη του γονιδιώματος έγινε σε συνολικό όγκο 30 μl τοποθετώντας για το ένζυμο HaeIII: 3 μl

buffer E (Promega), 0.3 μl BSA (Promega), 3 μl, 0.5μl ένζυμο (Promega), 23,2 μl ddH₂O και 3μl γενετικό υλικό και για τα ένζυμα HindIII και BamHI: 3μl buffer C (Promega), 0.3 μl BSA (Promega), 3 μl, 0.5μl ένζυμο (Promega), 23/2 μl ddH₂O και 3 μl γενετικό υλικό. Τα φιαλίδια με τα παραπάνω συστατικά επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C για 3.5 ώρες. Για να σχηματιστεί η εικόνα των αποτελεσμάτων πέψης χρησιμοποιήθηκε 10 μl από την κάθε πέψη μαζί με 2 μl loading buffer αρχικά σε gel αγαρόζης 0.4% στα 30 mV για 3 ώρες και κατόπιν σε gel πολυακρυλαμίδης στα 100 mV για 3 ώρες. Τα δείγματα της πέψης που έτρεξαν στο gel αγαρόζης επώαστηκαν επιπλέον για 1 ώρα μετά την πέψη σε 500 μg/ml πρωτεϊνάσης K (Quiagen).

ΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ

Η διαδικασία ελέγχου της λυτικής δράσης των βακτηριοφάγων γίνεται αρχικά με την μόλυνση του βακτηρίου από το φάγο με πολλαπλότητα μόλυνσης (multiplicity of infection, MOI) ίση με 100 (αναλογία βακτηρίου:φάγου = 1:100) για 15 λεπτά σε υγρό θρεπτικό διάλυμα. Έπειτα, παρασκευάζονται οι αραιώσεις 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , για κάθε φάγο σύμφωνα με τη μέθοδο της διπλής στιβάδας άγαρ χύνονται σε τρυβλία. Μετά από 24ωρη επώαση στους 25°C γίνεται καταμέτρηση των βακτηριακών αποικιών που έχουν επιβιώσει. Οι αποικίες αυτές επιλέγονται με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου και ανακαλλιεργούνται δύο φορές με διάστημα 24ωρης επώασης μεταξύ τους στους 25°C. Στην βακτηριακή χλόη καθεμιάς από αυτές τις αποικίες, τοποθετούνται σταγόνες από τους βακτηριοφάγους ώστε να ελεγχθεί η λυτική τους δράση.

ΜΟΝΟΦΑΣΙΚΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Βακτήριο και βακτηριοφάγος αλληλεπιδρούν σε υγρή καλλιέργεια για 20 λεπτά στους 25° C και παράλληλη ανακίνηση στα 100 rpm. Ανά διαστήματα 10 λεπτών και σε συνολική διάρκεια 60 λεπτών, τοποθετούνται σταγόνες διαδοχικών αραιώσεων από την 10^{-1} έως την 10^{-6} πάνω σε βακτηριακή χλόη. Μετά από 24 ώρες γίνεται καταμέτρηση των PFU που σχηματίζονται στις περιοχές των σταγόνων. Υπολογίζοντας τον τίτλο των βακτηριοφάγων σε κάθε δεκάλεπτο, προκύπτει η **μονοφασική καμπύλη ανάπτυξης** που υποδεικνύει κάποια βασικά βιολογικά χαρακτηριστικά του κύκλου ζωής τους όπως είναι ο χρόνος απορρόφησης

(**adsorption time**), η λανθάνουσα φάση (**latency period**) και το μέγεθος της έκρηξης (**burst size**).

- Adsorption time: Χρόνος που απαιτείται ώστε να απορροφηθεί από το βακτήριο ένας συγκεκριμένος αριθμός φάγων.
- Latency period: Χρόνος που απαιτείται μεταξύ της χρονικής στιγμής t που οι φάγοι απορροφώνται από το βακτήριο – ξενιστή έως τη στιγμή που το βακτήριο θα λυθεί και οι φάγοι θα απελευθερωθούν.
- Burst size: Ο αριθμός των ισοσωμάτων τα οποία απελευθερώνονται μετά από τη λύση κάθε ενός βακτηριακού κυττάρου. (Madigan et al. 2010)



Εικόνα 23 Δειγματοληψία *in vitro* βακτηριακής καλλιέργειας ώστε να μετρηθεί η οπτική απορρόφηση.

IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ

Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας των βακτηριοφάγων *in vitro* γίνεται σε υγρές βακτηριακές καλλιέργειες του βακτηριακού τους ξενιστή ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο μπορεί να περιοριστεί η ανάπτυξή του. Το πείραμα είχε συνολική διάρκεια 681 λεπτά (681'), και ξεκίνησε από βακτηριακή καλλιέργεια όγκου 300 ml η οποία προήλθε από εμβολιασμό ο/η καλλιέργειας *Vibrio alginolyticus* σε 300 ml LB. Κάθε χρονική στιγμή t του πειράματος γινόταν δειγματοληψία 1 ml και υπολογιζόταν στο φωτόμετρο η οπτική απορρόφηση (OD_{600}). Οι μετρήσεις γίνονταν στην βακτηριακή καλλιέργεια τις χρονικές στιγμές 0, 36', 49', 68'. Την χρονική στιγμή $t=68'$ η καλλιέργεια ήταν στην αρχή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης ($OD_{600}=0,251$) και τότε διαιρέθηκε σε τριπλές επαναλήψεις (triplicates), για κάθε φάγο του πειράματος, σε σωληνάρια (falcon tubes) των 50ml στα οποία ο λόγος βακτηριοφάγων / βακτήρια ήταν 100 ($MOI=100$). Τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στους 25°C με παράλληλη ανακίνηση 150 rpm και δείγματα ελήφθησαν τις χρονικές στιγμές 78', 93', 108', 123', 133', 143', 153', 168', 188', 218', 248', 288', 348', 408', 641', 651', 666' και

681'. Παράλληλα, γίνονται μετρήσεις και σε καλλιέργεια ελέγχου (control) επίσης σε τριπλές επαναλήψεις.

IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ

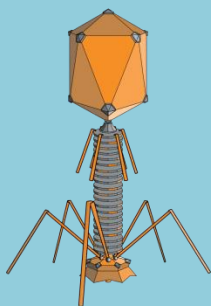
Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας των βακτηριοφάγων ως μέσο πρόληψης βακτηριακών ασθενειών σε εκκολαπτήρια ψαριών πραγματοποιήθηκε σε τροχοζώα (rotifers), *Brachionus plicatilis* τα οποία χρησιμοποιούνται ως ζωντανές τροφές για τις νυμφικές εκτροφές ψαριών στο πειραματικό εκκολαπτήριο του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Η υπόθεση του πειράματος, είναι ότι η προσθήκη εξειδικευμένων βακτηριοφάγων μπορεί να περιορίσει το βακτηριακό φορτίο των *Vibrio* που βρίσκονται με φυσικό τρόπο στις καλλιέργειες.

Διαμορφώθηκαν δοχεία όγκου 2 λίτρων με τροχοζώα και συνεχή αερισμό σε σταθερή θερμοκρασία 27°C. Το πείραμα οργανώθηκε σε δυο ομάδες τριπλών επαναλήψεων (triplicates) σύμφωνα με 2 διαχειριστικές συνθήκες (treatments): μια συνθήκη ελέγχου (A - control) και μία με προσθήκη κοκτέιλ βακτηριοφάγων (B - phage cocktail). Η διάρκεια του πειράματος ήταν 5 ημέρες. Στο πείραμα υπολογίζονταν σε καθημερινή βάση:

- Το ολικό βακτηριακό φορτίο στις καλλιέργειες τροχοζώων σε τρυβλία Petri με γενικό υπόστρωμα θαλασσινού νερού
- Το ολικό βακτηριακό φορτίο των *Vibrio* σε τρυβλία Petri με εκλεκτικό υπόστρωμα TCBS
- Η διακύμανση των βακτηριοφάγων στην συνθήκη όπου είχε προστεθεί το κοκτέιλ βακτηριοφάγων. Αρχικά, έγινε έλεγχος σε όλες τις καλλιέργειες τροχοζώων και διαπιστώθηκε πως δεν υπήρχε **κανένας βακτηριοφάγος** (native phage)
- Ο αριθμός των τροχοζώων στις δυο συνθήκες

Στο κοκτέιλ βακτηριοφάγων περιλαμβάνονται και δυο επιπλέον ιοί που δεν αποτελούν κομμάτι της παρούσας εργασίας όμως είναι μέρος ερευνητικού προγράμματος.

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος απλής παλινδρόμησης του προγράμματος Microsoft Excel για την κατασκευή της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης η οποία συσχέτιζε την οπτική απορρόφηση της βακτηριακής καλλιέργειας με τον αριθμό των βακτηριακών αποικιών ανά ml. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το *in vivo* πείραμα στις καλλιέργειες τροχοζών επεξεργάστηκαν στατιστικά με τη βοήθεια πακέτου ανάλυσης δεδομένων SPSS Statistics 22 (IBM 2012). Η κανονικότητα των αποτελεσμάτων του πειράματος ελέγχθηκε με το τεστ κανονικότητας των Kolmogorov-Smirnov με επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0.05$. Για τον εντοπισμό στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των χειρισμών καθώς και στην πορεία του χρόνου, έγινε ανάλυση διασποράς με 1 παράγοντα (one - way ANOVA) και με 2 παράγοντες (two-way ANOVA) σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$. Η κατασκευή των γραφημάτων που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, έγινε με τη βοήθεια του Graph Pad Prism 5 (Motulsky and Christopoulos 2004).

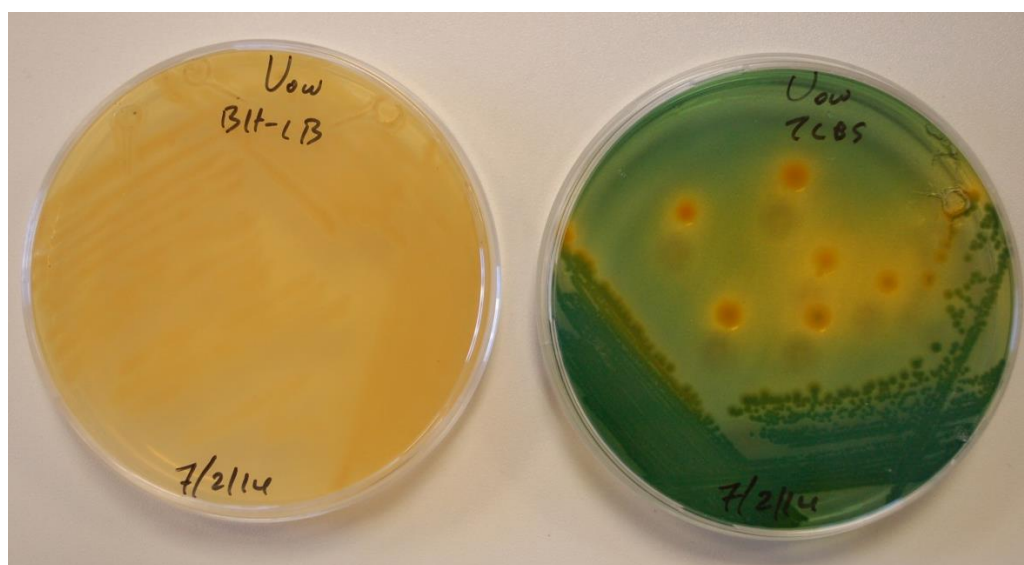


ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ

Οι βακτηριοφάγοι υπάρχουν με φυσικό τρόπο στα οικοσυστήματα όπως ακριβώς και τα βακτήρια. Όπως σε κάθε σχέση παρασίτου με ξενιστή, έτσι και εδώ, η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός των φάγων εξαρτάται άμεσα από την διαθεσιμότητα του ξενιστή του, δηλαδή της τροφής του, στο οικοσύστημα (Rohde, 2005). Η απομόνωση εξειδικευμένων βακτηριοφάγων όχι μόνο στην παρούσα εργασία αλλά παντού, στηρίζεται στον μεγάλο αριθμό δειγματοληψιών και στον παράγοντα τύχη. Οι δειγματοληψίες που έγιναν ήταν θαλασσινό νερό (20) και μύδια (3). Στην περίπτωση του θαλασσινού νερού το σκεπτικό είναι πως εφόσον τα *Vibrio* υπάρχουν στην θάλασσα, είναι βέβαιο να βρίσκονται μαζί του και οι βακτηριοφάγοι που το μολύνουν (Crothers-Stomps et al., 2009). Όσο αφορά τα μύδια, πρόκειται για διηθηματοφάγους οργανισμούς οι οποίοι φιλτράρουν το θαλασσινό νερό προκειμένου να συγκρατήσουν τα θρεπτικά που χρειάζονται για την ανάπτυξή τους (Higuera et al., 2013). Είναι αναμενόμενο κανείς να περιμένει την παρουσία των βακτηρίων και των βακτηριοφάγων που βρίσκονται στο περιβάλλον τους στους ιστούς των μυδιών. Όλες οι αντίστοιχες μελέτες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία βασίζονται στο ίδιο σκεπτικό. Στις περιπτώσεις όπου έχει σημειωθεί έξαρση δονακίωσης, στα κλουβιά ή στο εκκολαπτήριο, και το παθογόνο στέλεχος *Vibrio* έχει απομονωθεί, τότε υπάρχουν αυξημένες πιθανότητες να εντοπιστούν εξειδικευμένοι βακτηριοφάγοι για το στέλεχος αυτό, σε δείγματα νερού από την περιοχή της έξαρσης (Vinod et al., 2006, Shivu et al., 2007). Σύμφωνα με την οικολογία παρασίτου και ξενιστή, είναι δεδομένο πως όσο αυξάνει ο πληθυσμός του παθογόνου βακτηρίου, αυξάνουν και οι αριθμοί των αντίστοιχων βακτηριοφάγων του, εφόσον η «τροφή» τους στο σύστημα υπάρχει σε αφθονία (Rohde, 2005).

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

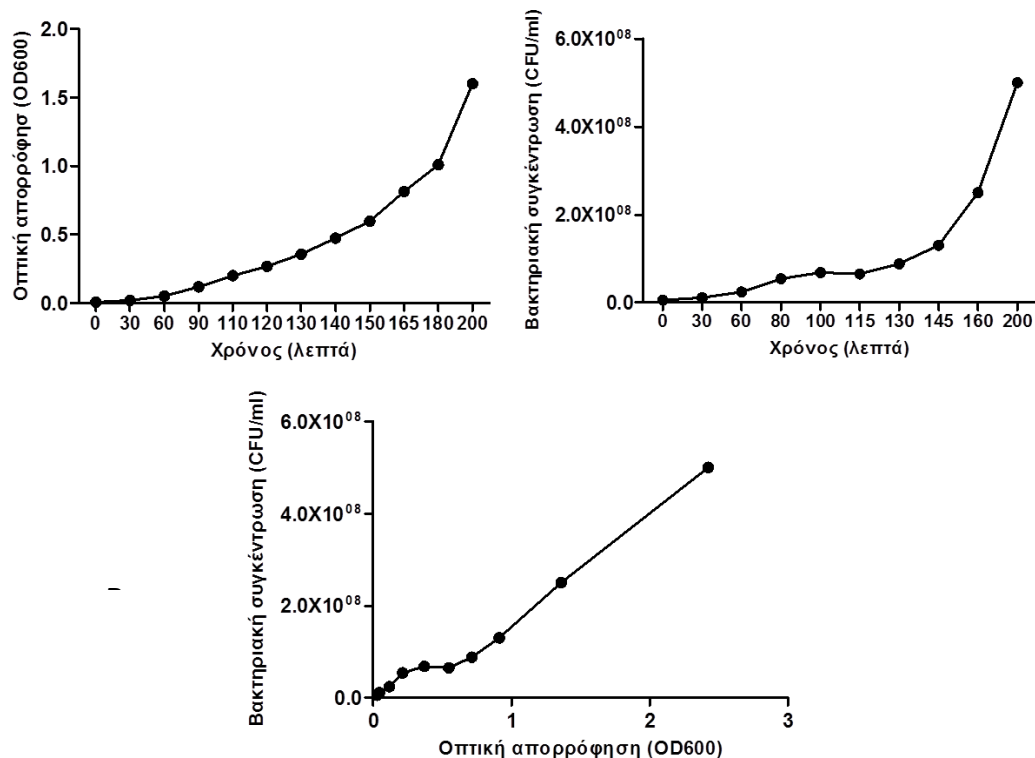
Οι αποικίες του βακτηριακού ξενιστή, Vow, είναι δυσδιάκριτες στο LB καθώς έχουν την τάση να εξαπλώνονται πολύ γρήγορα και να διαχέονται στην επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος. Στο εκλεκτικό υπόστρωμα TCBS είναι μικρότερες σε μέγεθος ενώ αποκτούν κίτρινο χρώμα λόγω του μεταβολισμού της γλυκόζης που αντιδρά με τους δείκτες thymol & bromothymol blue που περιέχει το θρεπτικό (Εικόνα 24).



Εικόνα 24 Βακτηριακές καλλιέργειες του στελέχους Vow A: σε γενικό στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB και B: σε εκλεκτικό στερεό θρεπτικό υπόστρωμα TCBS.

Ο προσδιορισμός της αύξησης του Vow στο χρόνο έγινε με τον υπολογισμό των μονάδων σχηματισμού αποικιών (colony forming units, CFU) καθώς και της οπτικής απορρόφησης (optical density σε $\lambda=600\text{nm}$, OD_{600}) στην πορεία του χρόνου (200 λεπτά) (Εικόνα 25A, B). Οι εξισώσεις που περιγράφουν τις παραπάνω σχέσεις είναι και $y = 6\text{E}+06e^{0,0221x}$ με $R^2=97,9\%$ και $y = 0,0099e^{0,0267x}$ με $R^2=99,3\%$, αντίστοιχα. Από την γραφική απεικόνιση των παραπάνω εξισώσεων προσδιορίζεται το χρονικό σημείο στο οποίο το βακτήριο εισέρχεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης, στοιχείο απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό των βακτηριοφάγων. Συσχετίζοντας τις μετρήσεις αποικιών CFU και οπτικής απορρόφησης (OD_{600}), υπολογίζεται ο αριθμός βακτηριακών αποικιών που αντιστοιχούν σε μία συγκεκριμένη τιμή οπτικής απορρόφησης ακολουθώντας την γραμμική εξίσωση $y = 2\text{E}+08x - 1\text{E}+07$ με $R^2=97\%$ (Εικόνα 25Γ). Δημιουργείται έτσι μια πρότυπη καμπύλη, σύμφωνα με την οποία

μπορεί να προσδιοριστεί ο αριθμός των βακτηριακών αποικιών σε οποιαδήποτε τιμή οπτικής απορρόφησης.



Εικόνα 25 Καμπύλες εκθετικής φάσης ανάπτυξης του *Vov* στην πορεία του χρόνου. Α: Γραφική απεικόνιση οπτικής απορρόφησης βακτηριακής καλλιέργειας *Vov* στην πορεία του χρόνου – εξίσωση πρότυπης καμπύλης $y = 6E+06e0,0221x$ ($R^2=97.9\%$), Β: Γραφική απεικόνιση βακτηριακής συγκέντρωσης της καλλιέργειας *Vov* στην πορεία του χρόνου – εξίσωση πρότυπης καμπύλης $y = 0,0099e0,0267x$ ($R^2=99.3\%$), Γ: Γραφική συσχέτιση βακτηριακής συγκέντρωσης της καλλιέργειας *Vov* και οπτικής απορρόφησης– εξίσωση πρότυπης καμπύλης $y = 2E+08x - 1E+07$ ($R^2=97\%$)

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

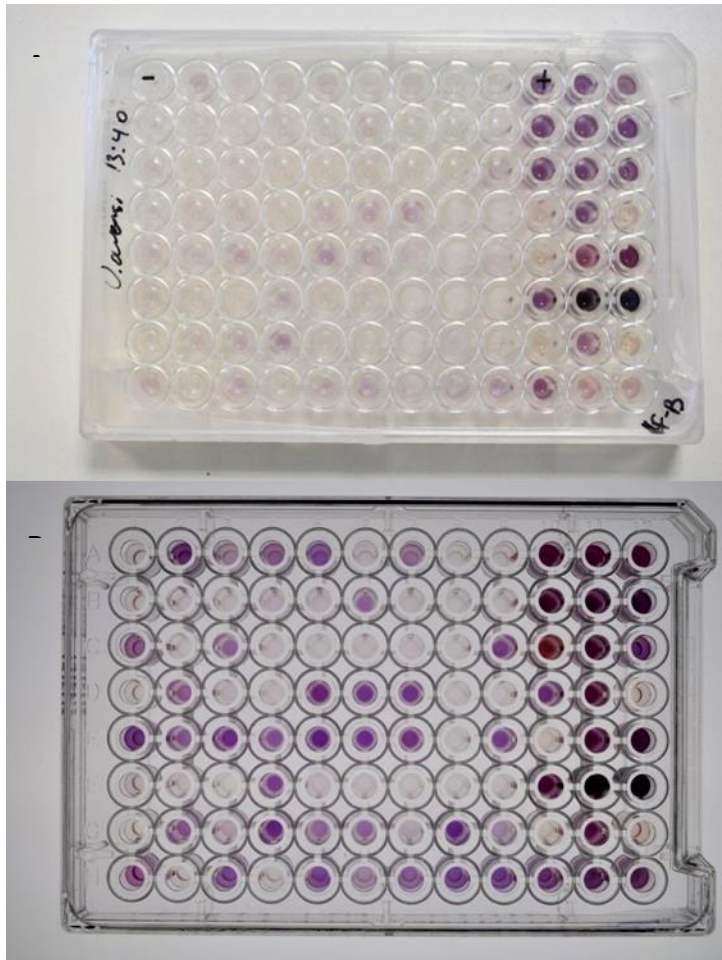
Τα αποτελέσματα του γενικού βιοχημικού χαρακτηρισμού για το στέλεχος *Vibrio alginolyticus* παρουσιάζονται στον Πίνακα 5 :

Πίνακας 5 Μεταβολική απόκριση του στελέχους Vow σε 17 γενικές βιοχημικές αντιδράσεις και αντιπαραβολή με την μεταβολική απόκριση του *V. alginolyticus* σύμφωνα με το *Bergey's manual of systematic bacteriology*

<i>Vibrio sp.</i>		
Υπόστρωμα	Αποτελέσματα	<i>V. alginolyticus</i> Bergey's manual
TCBS	Κίτρινο χρώμα αποικιών	Κίτρινο χρώμα αποικιών
Οξειδάση	+	+
Καταλάση	+	+
Υδρόλυση ζελατίνης	+	+
Κιτρικό	+	Μη διαθέσιμο
0% NaCl	-	-
6% NaCl	+	+
8% NaCl	+	+
Σουκρόζη	+	+
Λακτόζη	-	-
Μαννόζη	-	-
Αραβινόζη	(+)	-
Λυσίνη	+	+
Αργινίνη	-	-
Ορνιθίνη	(+)	(+)
Αιματούχο άγαρ	-	-

Οι βιοχημικές αποκρίσεις του στελέχους φαίνεται να ταιριάζουν με αυτές του *Vibrio alginolyticus* (Bergey's manual of systematic bacteriology).

Οι εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζουν το μεταβολικό αποτύπωμα του βακτηρίου στο σύστημα BIOLOG GENIII μετά από 24 ώρες (Εικόνα 26A) και μετά από 48 ώρες επώασης στους 25°C (Εικόνα 26B).



Εικόνα 26 Τα αποτελέσματα του συστήματος BIOLOG GENIII για το βακτηριακό στέλεχος Vow A: μετά από 24 ώρες επώασης στους 25oC και B: μετά από 48 ώρες επώασης στους 25oC.

Το υπόστρωμα κάθε κυψελίδας της πλάκας μικροτιτλισμού του BIOLOG καθώς και η απόκριση του βακτηριακού στελέχους στα υποστρώματα αυτά αναφέρονται τόσο στον Πίνακα 6 όσο και στην Εικόνα 27.

Πίνακας 6 Τα υποστρώματα που περιλαμβάνει το σύστημα βιοχημικού χαρακτηρισμού BIOLOG GENIII και οι μεταβολικές αποκρίσεις που παρουσίασε το βακτηριακό στέλεχος Vow.

Υπόστρωμα	+/-	Υπόστρωμα	+/-	Υπόστρωμα	+/-
Negative Control	-	8% NaCl	+	Rifamycin SV	+
Dextrin	+	D-Fructose-6-PO4	+	Minocycline	-
D-Maltose	+	D-Aspartic Acid	-	Gelatin	+
D-Trehalose	+	D-Serine	-	Glycyl-L-Proline	+
D-Cellobiose	+	Troleandomycin	-	L-Alanine	+
Gentiobiose	-	α-D-Glucose	+	L-Arginine	+
Sucrose	+	D-Mannose	-	L-Aspartic Acid	+

D-Turanose	-	D-Fructose	+	L-Glutamic Acid	+
Stachyose	-	D-Galactose	-	L-Histidine	+
Positive Control	+	3-Methyl Glucose	-	L-Pyroglutamic Acid	-
pH 6	+	D-Fucose	-	L-Serine	+
pH 5	+	L-Fucose	-	Lincomycin	-
D-Raffinose	-	L-Rhamnose	-	Guanidine HCl	+
α -D-Lactose	-	Inosine	+	Niaproof 4	+
D-Melibiose	-	1% Sodium Lactate	-	Pectin	-
β -Methyl-DGlucoside	(+)	Fusidic Acid	+	D-Galacturonic Acid	-
D-Salicin	+	D-Serine	+	L-Galactonic Acid Lactone	-
N-Acetyl-DGlucosamine	+	D-Sorbitol	-	D-Gluconic Acid	+
N-Acetyl- β -DMannosamine	-	D-Mannitol	+	D-Glucuronic Acid	-
N-Acetyl-DGalactosamine	-	D-Arabitol	-	Glucuronamide	-
N-Acetyl Neuraminic Acid	-	myo-Inositol	-	Mucic Acid	-
1% NaCl	+	Glycerol	+	Quinic Acid	-
4% NaCl	+	D-Glucose-6-PO4	+	D-Saccharic Acid	-
Vancomycin	+	Tetrazolium Violet	+	Tetrazolium Blue	+
p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	-	Methyl Pyruvate	+	D-Lactic Acid Methyl Ester	-
L-Lactic Acid	+	Citric Acid	+	α -Keto-Glutaric Acid	+
D-Malic Acid	(+)	L-Malic Acid	+	Bromo-Succinic Acid	+
Nalidixic Acid	-	Lithium Chloride	+	Potassium Tellurite	-
Tween 40	+	γ -Amino-Butyric Acid	-	α -HydroxyButyric Acid	+
β -Hydroxy-D,LButyric Acid	-	α -Keto-Butyric Acid	(+)	Acetoacetic Acid	+
Propionic Acid	+	Acetic Acid	+	Formic Acid	+
Aztreonam	+	Sodium Butyrate	+	Sodium Bromate	+



Εικόνα 27 Αποτελέσματα του συστήματος BIOLOG GENIII για το βακτηριακό στέλεχος Vow, μετά από επώαση 48 ωρών στους 25oC με επισήμανση διακριτών ομάδων υποστρωμάτων: σάκχαρα – Εξόζη-PO4 – αμινοξέα – καρβοξυλικά οξέα, εστέρες και λιπαρά οξέα – όξινο pH – NaCl – γαλακτικό οξύ – αναγωγικό δυναμικό – έλεγχος χρώσης κατά Gram.

Ομαδοποιώντας τα αποτελέσματα από την μέθοδο του BIOLOG, φαίνεται πως το *Vibrio* μπορεί να χρησιμοποιήσει έναν μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων όπως σάκχαρα, αμινοξέα, καρβοξυλικά οξέα, εστέρες, εξόζη, γαλακτικό οξύ και λιπαρά οξέα. Μπορεί να αναπτυχθεί σε αλατότητα έως και 8% NaCl, σε περιβάλλον με όξινο pH και είναι αρνητικό κατά Gram. Μπορούν, επίσης, να αποθηκεύσουν NAD & NADP (αναγωγικό δυναμικό) και να το χρησιμοποιούν για την κατασκευή των κυτταρικών τους συστατικών.

Το μεταβολικό αποτύπωμα του βακτηριακού στελέχους εισάγεται σε μια βάση δεδομένων η οποία περιέχει περισσότερα από 2000 βιοχημικά αποτυπώματα βακτηρίων. Κατά συνέπεια, η σύγκριση στο λογισμικό αυτό απέδωσε τις παρακάτω πιθανότητες ταυτοποίησης του βακτηρίου (Πίνακας 7):

Πίνακας 7 Οι πιθανότητες ταυτοποίησης του βακτηριακού στελέχους Vow, που προέκυψαν από την εισαγωγή του μεταβολικού του αποτυπώματος στην βάση δεδομένων του συστήματος BIOLOG GENIII συνοδευόμενες από τα αντίστοιχα βακτηριακά είδη.

Πιθανότητα	Βακτηριακό είδος
93,6 %	<i>Vibrio alginolyticus</i>
4,4 %	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
2 %	<i>Vibrio proteolyticus</i>

Το *Vibrio* σύμφωνα με το μεταβολικό του αποτύπωμα φαίνεται κατά ένα μεγάλο ποσοστό, να ανήκει στο είδος *Vibrio alginolyticus* επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα του γενικού βιοχημικού χαρακτηρισμού.

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

Ο μοριακός χαρακτηρισμός του βακτηρίου έγινε κυρίως για λόγους ταυτοποίησης, αλλά και για τον προσδιορισμό της σχετικής φυλογενετικής θέσης του στον κλάδο των *Vibrio*, σύμφωνα με το γονίδιο 16S. Η αλληλούχιση του γονιδίου 16S έδωσε την παρακάτω αλληλουχία μήκους 1419 bp:

```
5'GCGGAACGAGTTATCTGACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGG
CGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCA
TTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGG
ACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGAT
GATCAGCCACACTGGAAGTGAACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGC
GTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAG
GTGGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCAC
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGTGCGAGCGTTA
ATCGGAATTACTGGGCGTAAAAGCGCATGCAGGTGGTTGGTTAAGTCAGA
TGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTTGAAACTGGCAGACT
AGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTACGTGTAGCGGTGAAATTGCGT
AGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTTGGACAGATA
CTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCCTTGAGC
CGTGGCTTTCGGAGCTAACCGCGTCAAGTAGACCGCCTGGGGGAGTACGGT
CGCAAGATTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGAC
ATCCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGAC
AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGA
ACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGT
CAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCG
```

CATACAGAGGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGC
GTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCG
CTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
ACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAGAAGTAGGTAG
TTAACCTCGGGGGACGCTACCACTAAGT3'

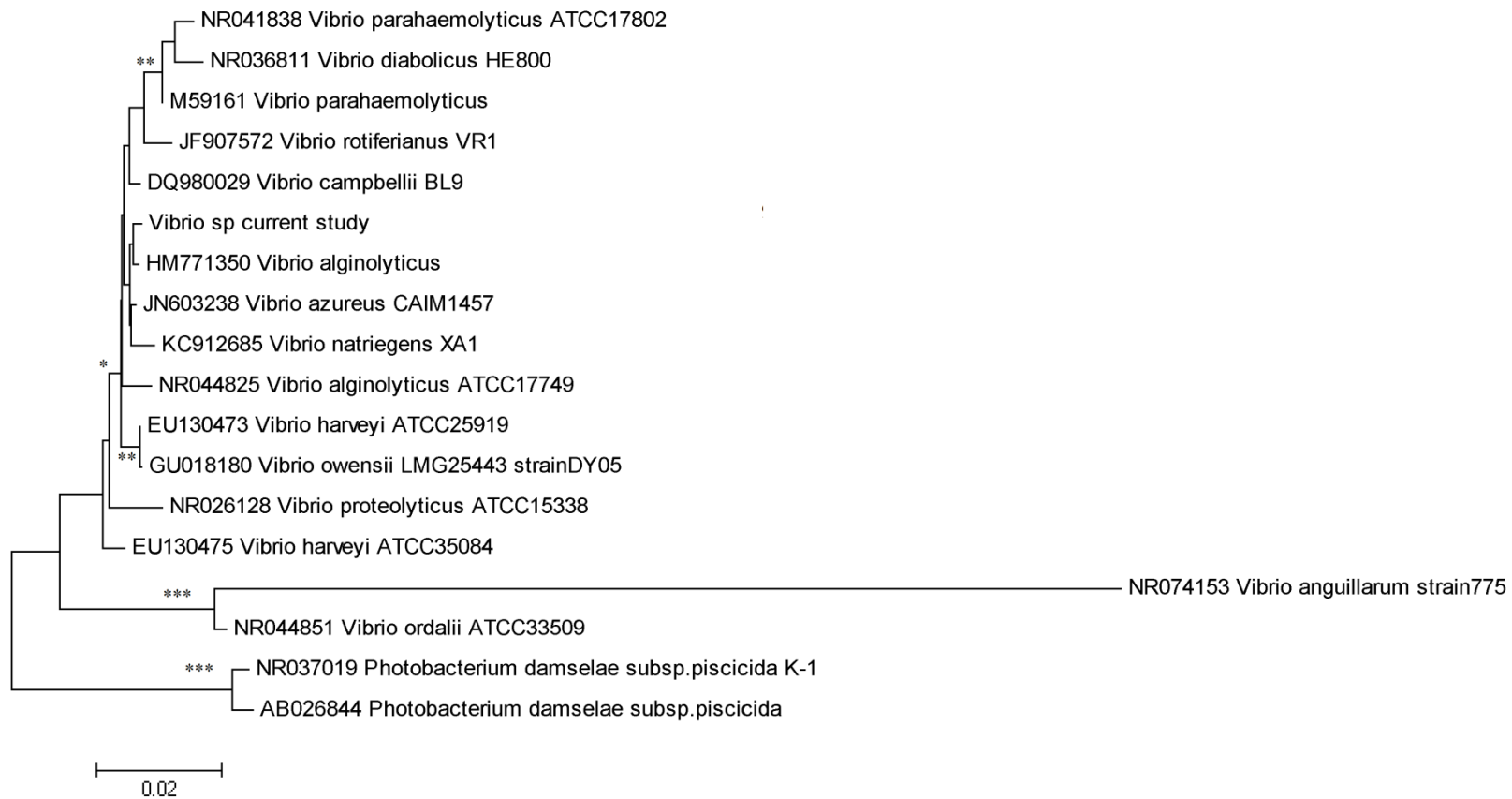
Όταν η αλληλουχία αυτή τοποθετήθηκε στο BLAST,
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> προέκυψαν τα αποτελέσματα που φαίνονται
στην Εικόνα 28.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain M2-41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2551	2551	99%	0.0	99%	KC210812.1
<input type="checkbox"/> Vibrio owensii strain F77007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2549	2549	99%	0.0	99%	HQ908739.1
<input type="checkbox"/> Vibrio parahaemolyticus strain M2-31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2545	2545	99%	0.0	99%	KC210810.1
<input type="checkbox"/> Vibrio parahaemolyticus strain M2-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2545	2545	99%	0.0	99%	KC210809.1
<input type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain ZDS-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2545	2545	99%	0.0	99%	JN188406.1
<input type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain NSA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2543	2543	100%	0.0	99%	JN188404.1
<input type="checkbox"/> Vibrio sp. Y4tang 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2543	2543	99%	0.0	99%	EF187013.1
<input type="checkbox"/> Vibrio natriegens strain AUCASVE5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2542	2542	99%	0.0	99%	JQ277719.1
<input type="checkbox"/> Vibrio parahaemolyticus strain TVS8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2540	2540	99%	0.0	99%	KF142388.1
<input type="checkbox"/> Vibrio sp. P124 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2540	2540	99%	0.0	99%	EU195936.1
<input type="checkbox"/> Vibrio sp. BG-8-E5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2536	2536	99%	0.0	99%	KF560359.1
<input type="checkbox"/> Vibrio sp. H-196 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2536	2536	99%	0.0	99%	KF021866.1
<input type="checkbox"/> Vibrio sp. 307 partial 16S rRNA gene, isolate 307	2536	2536	99%	0.0	99%	HF937146.1
<input type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain L52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2536	2536	99%	0.0	99%	KC884624.1
<input type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain L25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2536	2536	99%	0.0	99%	KC884612.1
<input type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain L6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2536	2536	99%	0.0	99%	KC884603.1
<input type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain ATCC 17749 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2536	2536	99%	0.0	99%	JN188412.1
<input type="checkbox"/> Vibrio sp. CIFRI CH-TSB-27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2536	2536	99%	0.0	99%	JF784044.1
<input type="checkbox"/> Vibrio sp. N377 16S ribosomal RNA gene, partial sequence >qb GU223594.1 Vibrio sp. N382 16S ribosomal RNA gene, partial sequence >qb GU223595.1 Vi	2536	2536	99%	0.0	99%	GU223584.1
<input type="checkbox"/> Vibrio sp. N376 16S ribosomal RNA gene, partial sequence >qb JF836168.1 Vibrio alginolyticus strain V013 16S ribosomal RNA gene, partial sequence >qb JF	2536	2536	99%	0.0	99%	GU223583.1

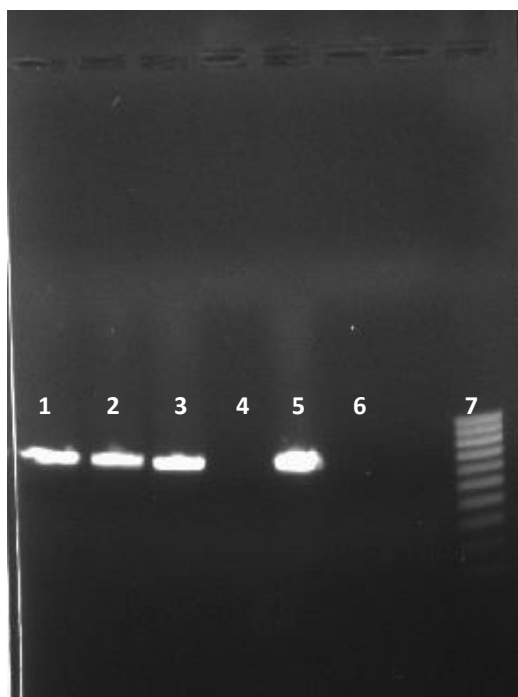
Εικόνα 28 Αποτελέσματα που προέκυψαν στο BLAST από την τοποθέτηση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S του βακτηριακού στελέχους Vow.



Εικόνα 29 Φυλογενετικό δέντρο του γονιδίου 16S για διάφορα βακτηριακά στελέχη *Vibrio* με την μέθοδο Neighbor-Joining. Στατιστική υποστήριξη *:85%, **:95% και ***:100%

Η αλληλουχία του γονιδίου 16S συχνά δεν είναι αρκετή για την ταυτοποίηση βακτηρίων του γένους *Vibrio*, κάτι που φάνηκε και στη παρούσα ανάλυση (Εικόνες 28, 29). Πρόκειται για ένα πολύ συντηρημένο γονίδιο, ομόλογο του 18S στους ευκαρυώτες, το οποίο αποτελεί ένα αρκετά γενικό εργαλείο που, ειδικά στο γένος των *Vibrio*, δεν μπορεί να ταυτοποιήσει το στέλεχος (Clarridge 2004).

(Clarridge 2004) Για τον ακριβή προσδιορισμό του βακτηριακού είδους έγινε εξειδικευμένη PCR με ειδικούς εκκινητές (VA-F και VA-R) για *Vibrio alginolyticus*, η οποία και έδωσε θετικά αποτελέσματα. Το προϊόν της PCR φορτώθηκε σε gel αгарόζης (Εικόνα 30) και εμφανίστηκε μπάντα γενετικού υλικού στο αναμενόμενο σημείο περίπου δηλαδή στα 750bp, γεγονός που προσδιορίζει το βακτήριο ως *Vibrio alginolyticus*.



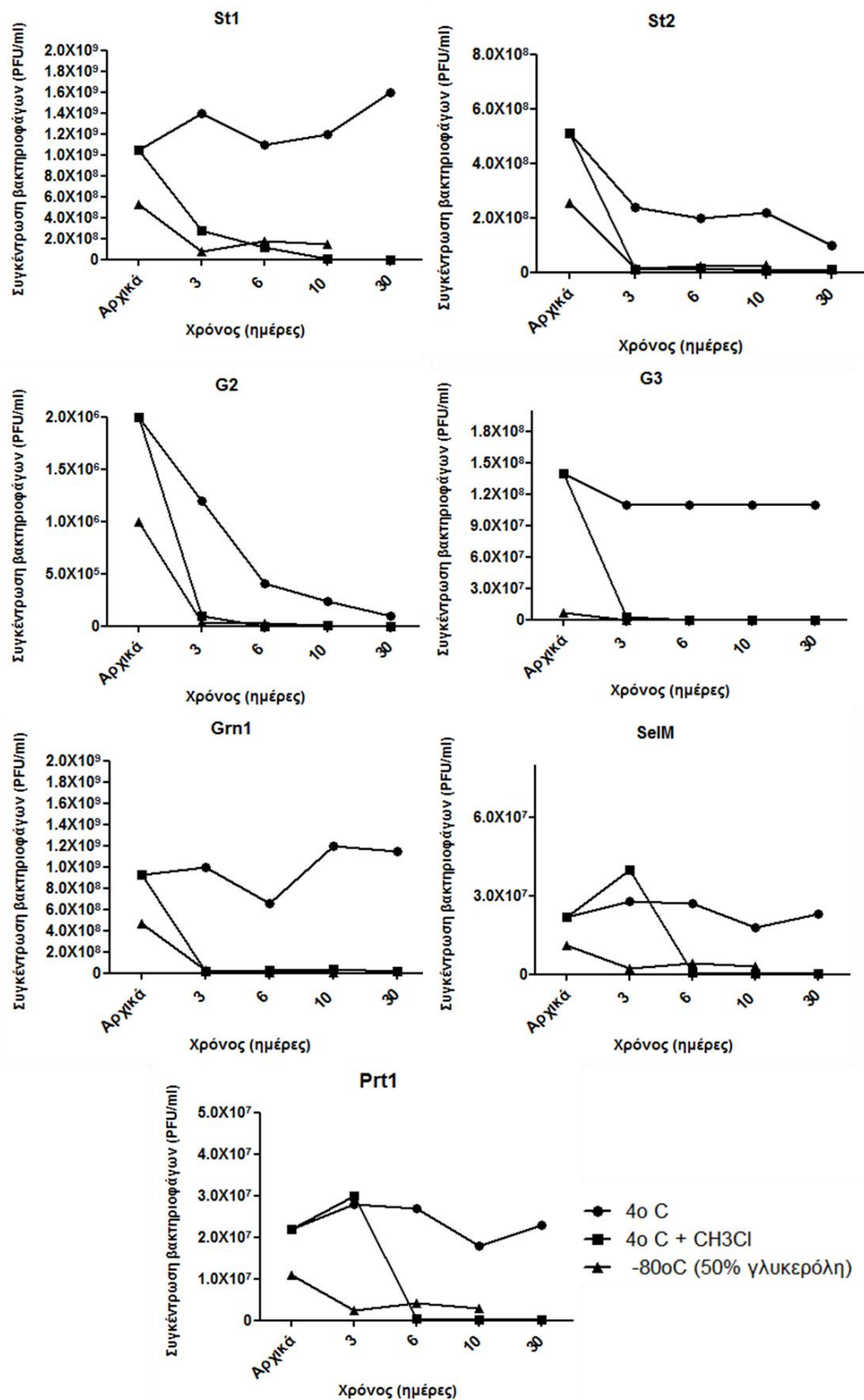
Εικόνα 30 Gel αгарόζης όπου φαίνονται τα αποτελέσματα της PCR με εξειδικευμένους εκκινητές για την ταυτοποίηση του *V. alginolyticus*. Θέσεις: 1 – Vow, 2- Vow, 3 – Vow, 4 – αρνητικός μάρτυρας (*Ph. dams. subsp. piscicida*), 5 - θετικός μάρτυρας (*V. alginolyticus*), 6 – αρνητικός μάρτυρας (*V. anguillarum*), 7 – γενωμική κλίμακα εύρους 100 – 1000 bp.

Πραγματοποιήθηκαν 20 δειγματοληψίες **υδάτων** από διάφορες περιοχές κατά μήκος 30 χλμ της βόρειας ακτογραμμής της Κρήτης, την περίοδο Σεπτέμβρη 2013 - Δεκέμβρη 2013. Επιπλέον, 3 δείγματα **μυδιών** συνολικού βάρους ενός κιλού το καθένα στάλθηκαν από συνεργαζόμενη μονάδα εκτροφής ψαριών. Τα μύδια ήταν προσκολλημένα στους ιχθυοκλωβούς ενώ η εποχή που στάλθηκαν συνέπιπτε με περιόδους στις οποίες αναμένεται η εμφάνιση της δονακίωσης. Καλλιέργειες εμπλουτισμού έγιναν στο σύνολο των δειγμάτων που έφτασαν στο εργαστήριο και ακολούθησε έλεγχος των διηθημάτων των δειγμάτων αυτών στη βακτηριακή χλόη του *Vibrio alginolyticus*. Σε 6 διηθήματα νερού και σε 1 διήθημα μυδιών προκλήθηκε αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης του *Vibrio alginolyticus* (Πίνακας 8).

Πίνακας 8 Αριθμός των δειγματοληψιών που πραγματοποιήθηκαν στις αντίστοιχες γεωγραφικές περιοχές καθώς και οι βακτηριοφάγοι που απομονώθηκαν.

Αριθμός δειγματοληψιών	Περιοχή δειγματοληψίας	Ονομασία βακτηριοφάγου
4	Εμπορικό λιμάνι Ηρακλείου	Prt1
3	Ενετικό λιμάνι Ηρακλείου	-
3	Παγκρήτιο Στάδιο	St1, St2
1	Blue Lagoon	-
1	Παλαιόκαστρο	-
1	Λιμνοπεράματα	-
1	Λυγαριά	-
2	Λιμανάκι Γουρνών	Grn1
3	Κρι-Κρί Γούρνες	G2, G3
3	Αν. Πελοπόννησος (μύδια)	SelM

Έπειτα από επεξεργασία όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι, προέκυψαν μετά από 5 διαδοχικές ανακαλλιέργειες καθαρισμού (purification) **7 μονοκλωνικοί βακτηριοφάγοι: St1, St2, G2, G3, Grn1, Prt1, SelM**. Η σταθερότητά τους ελέγχθηκε στην πορεία του χρόνου, κάτω από 3 διαφορετικές συνθήκες (Εικόνα 31).



Εικόνα 31 Έλεγχος σταθερότητας των 7 βακτηριοφάγων St1, St2, G2, G3, Grn1, Prt1, SelM κάτω από 3 διαφορετικές συνθήκες: 40C, 40C+ 0.2% χλωροφόρμιο και -80oC (50% γλυκερόλη)

Ως βέλτιστη συνθήκη αποθήκευσης επιλέγεται η διατήρηση σε LB στους 4°C και ακολουθούν δύο στάδια χαρακτηρισμού για τους 7 μονοκλωνικούς βακτηριοφάγους.

ΕΥΡΟΣ ΞΕΝΙΣΤΗ

Το εύρος ξενιστών στο οποίο παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα οι 7 βακτηριοφάγοι ελέγχθηκε σε 23 στελέχη του γένους *Vibrio* από τη συλλογή βακτηρίων του ΕΛΚΕΘΕ και ένα παθογόνο στέλεχος *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9. Τα 19 στελέχη *Vibrio* του πίνακα και το *Ph. dams.* subsp. *piscicida* είναι παθογόνα τα οποία είτε απομονώθηκαν από κλινικές περιπτώσεις είτε αγοράστηκαν από διεθνείς βακτηριακές συλλογές. Τα υπόλοιπα τέσσερα στελέχη *Vibrio* E1, Ch1, R3, R4 είναι περιβαλλοντικά και απομονώθηκαν από το εκκολαπτήριο του ΕΛΚΕΘΕ.

Πίνακας 9 Έλεγχος εύρους ξενιστών για τους βακτηριοφάγους St1, St2, G2, G3, Grn1, Prt1, SelM έναντι 23 ειδών του γένους *Vibrio*.

Βακτηρια κά στελέχη	Είδη <i>Vibrio</i>	Περιοχή	G2	G3	St1	St2	Grn1	Prt1	SelM
VaAn	<i>V. anguillarum</i>	Ελλάδα	-	-	-	-	-	-	-
Van1	<i>V. anguillarum</i>	Ελλάδα	-	-	-	-	-	-	-
VaATCC	<i>V. anguillarum</i>	Νορβηγία	-	-	-	-	-	-	-
Vh28	<i>V. harveyi</i>	Η.Π.Α.	-	-	-	-	-	-	-
Vh2	<i>V. harveyi</i>	Ελλάδα	-	-	-	-	-	-	-
Vh4	<i>V. harveyi</i>	Ελλάδα	-	-	-	-	-	-	-
Vh5	<i>V. harveyi</i>	Ελλάδα	-	-	-	-	-	-	-
VhLar	<i>V. harveyi</i>	Ελλάδα	-	-	-	-	-	-	-
VhKar	<i>V. harveyi</i>	Ελλάδα	-	-	-	-	-	-	-
Vow (HOST)	<i>V. alginolyticus</i>	Ελλάδα	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Valgino	<i>V. alginolyticus</i>	Ελλάδα	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Vh29	<i>V. harveyi</i>	Ταϊλάνδη	++	++	++	++	++	++	++
VspNir	<i>V. harveyi</i>	Ελλάδα	+	+	+	+	+	+	+
Vh3	<i>V. harveyi</i>	Ελλάδα	+	+	+	+	+	+	+

Vh1	<i>V. harveyi</i>	Ελλάδα	+	+	+	+	+	+	+
VanS	<i>V. anguillarum</i>	Ελλάδα	-	-	-	-	-	-	-
VoATCC	<i>V. ordalii</i>	Η.Π.Α.	-	-	-	-	-	-	-
PF4	<i>V. anguillarum</i>	Χιλή	-	-	-	-	-	-	-
DY05	<i>V. owensii</i>	Αυστραλία	++	++	++	++	++	++	++
E1	<i>V. harveyi</i>	Ελλάδα	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Ch1	<i>Vibrio sp.</i>	Ελλάδα	++	++	++	++	++	++	++
R3	<i>Vibrio sp.</i>	Ελλάδα	-	-	-	-	-	-	-
R4	<i>Vibrio sp.</i>	Ελλάδα	-	-	-	-	-	-	-
DLK2	<i>Ph.dams.subsp. psicicida.</i>	Ελλάδα	-	-	-	-	-	-	-

Υπόμνημα:

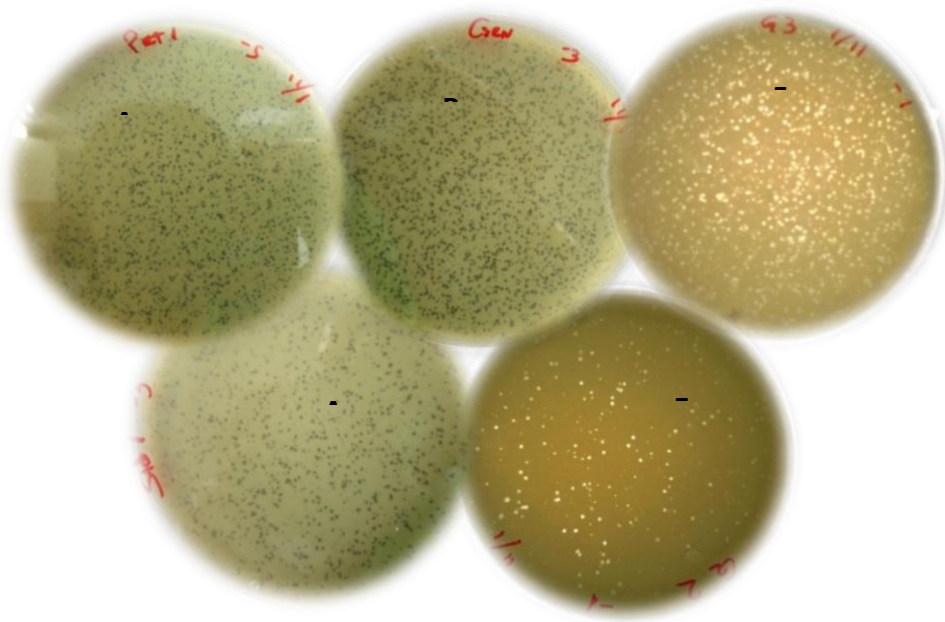
+++	Υψηλής έντασης αναστολή
++	Μέτριας έντασης αναστολή
+	Χαμηλής έντασης αναστολή
-	Μηδενική αναστολή

Το 82% των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στον έλεγχο εύρους ξενιστών των φάγων είναι παθογόνα (19 βακτήρια) και το υπόλοιπο 18% είναι περιβαλλοντικά στελέχη (4 βακτήρια). Όλοι οι φάγοι (7) παρουσιάζουν όμοια δράση αναστολής απέναντι στο **40% του συνόλου των βακτηρίων** που ελέγχθηκαν (9 στα 23 βακτήρια). Η ένταση αναστολής είναι έντονη στο 33% (3 από τα 9 στελέχη), μέτρια στο 33% (3 στα 9 στελέχη) και χαμηλή στο υπόλοιπο 33% (3 στα 9 στελέχη).

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

Η μορφολογία των βακτηριοφάγων ως προς τις λυτικές τους πλάκες απεικονίζονται στην Εικόνα 32, όπου έχουν αλληλεπιδράσει υψηλού τίτλου φάγοι με τη βακτηριακή χλόη του *Vibrio alginolyticus*. Έπειτα από παρατήρηση κάτω από έντονο φωτισμό, φαίνεται πώς οι λυτικές πλάκες που σχηματίζει καθένας από του 7

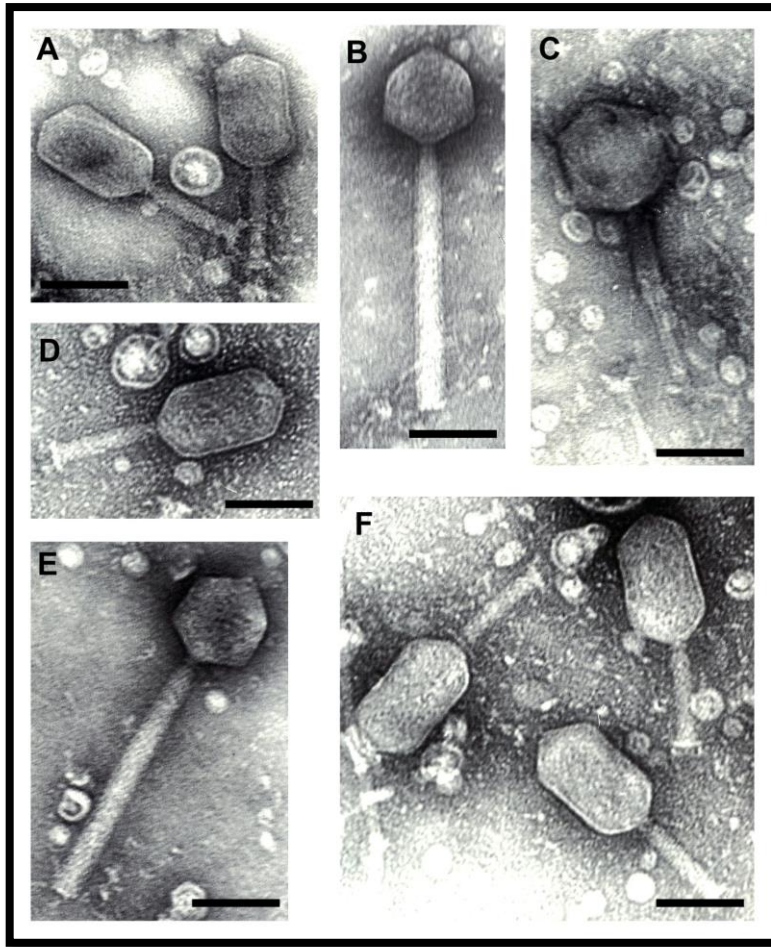
βακτηριοφάγους είναι όμοιες με ίδιο μέγεθος και ίδια θολερότητα. Πρόκειται για πολύ διαυγείς λυτικές πλάκες διαμέτρου περίπου 1 mm.



Εικόνα 32 Λυτικές πλάκες των βακτηριοφάγων A: Prt1, B: Grn1, Γ: G3, Δ: St1 και E: G2, επάνω στην βακτηριακή χλόη του *V. alginolyticus* με την τεχνική διπλής στιβάδας άγαρ.

Για τον προσδιορισμό της μορφολογίας του ισσωματίου η παρατήρηση των βακτηριοφάγων πραγματοποιήθηκε με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM) και κατέταξε τους 7 φάγους στην οικογένεια των Myoviridae (Εικόνα 33) Σύμφωνα με το μέγεθος της κεφαλής τους και τη μορφολογία του ισσωματίου οι βακτηριοφάγοι μπορούν να χωριστούν σε δύο διακριτές ομάδες:

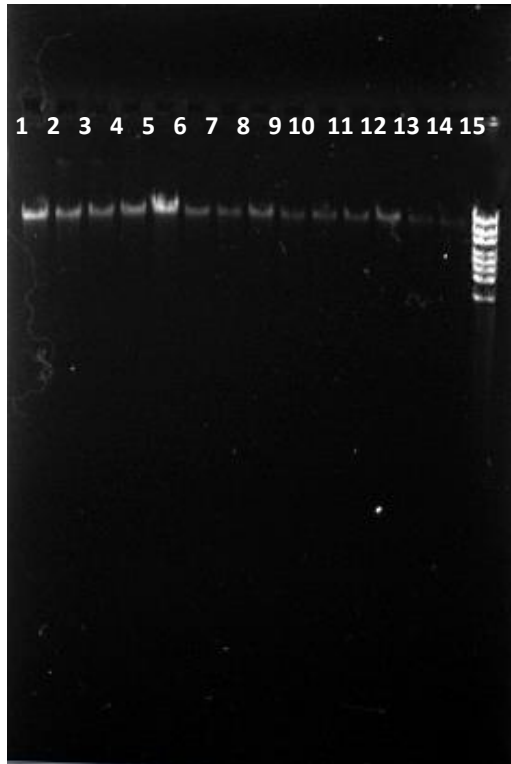
- 1^η ομάδα: SelM, Grn1, Prt1 – διάμετρος κεφαλής: 150nm
- 2^η ομάδα: G2, G3, St2 – διάμετρος κεφαλής: 100nm



Εικόνα 33 Μορφολογία των ιοσωματίων των βακτηριοφάγων (οικογένεια Myoviridae) έπειτα από παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. A:Prt1, B:G3, C:St2, D:Grn1, E:G2, F:SelM, κλίμακα 100 nm (εγκαταστάσεις Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology)

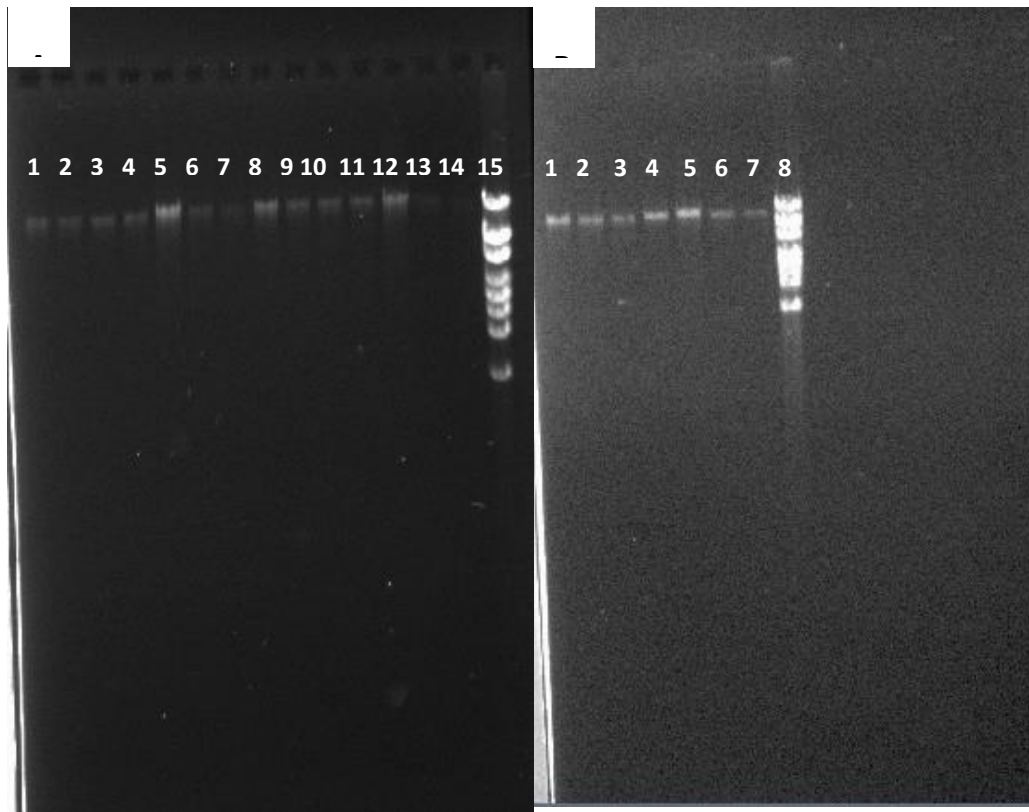
ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Το γονιδίωμα των βακτηριοφάγων ήταν, όπως αναμενόταν, δίκλωνο DNA (dsDNA). Σύμφωνα με τον γενωμικό δείκτη (ladder) που χρησιμοποιήθηκε, το μέγεθος των γονιδιωμάτων όλων των φάγων υπολογίζεται ~ 48kbp (Εικόνα 34).



Εικόνα 34 Gel αγαρόζης όπου έτρεξε το γενετικό υλικό (dsDNA) των βακτηριοφάγων. Θέσεις: 1 – St1, 2- St2, 3 – G2, 4 – G3, 5 – Grn1, 6 – Prt1, 7 – SelM, 8 - St1, 9- St2, 10 – G2, 11 – G3, 12 – Grn1, 13 – Prt1, 14 – SelM, 15 – γενωμική κλίμακα 0.1 – 50kbp.

Εφόσον απομονώθηκε το DNA των 7 βακτηριοφάγων έγινε η πέψη του με 3 διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα (restriction enzymes): **BamHI**, **HindIII** και **HaeIII**. Μετά την ολοκλήρωση της πέψη των γονιδιωμάτων τα προϊόντα φορτώθηκαν σε gel αγαρόζης (Εικόνα 35).



Εικόνα 35 Gel αγαρόζης όπου έτρεξαν τα προϊόντα της πέψης του γενετικού υλικού των βακτηριοφάγων με 3 διαφορετικά ένζυμα. **A:** 1 - 7 *Bam*HI όπου 1 - *St*1, 2- *St*2, 3 - *G*2, 4 - *G*3, 5 - *Grn*1, 6 - *Prt*1, 7 - *Sel*M και 8 - 14 *Hind*III, όπου 8 - *St*1, 9 - *St*2, 10 - *G*2, 11 - *G*3, 12 - *Grn*1, 13 - *Prt*1, 14 - *Sel*M, 15 - γενωμική κλίμακα 0.1 - 50kbp, **B:** 1-7 *Hae*III όπου 1 - *St*1, 2- *St*2, 3 - *G*2, 4 - *G*3, 5 - *Grn*1, 6 - *Prt*1, 7 - *Sel*M, 8 - γενωμική κλίμακα 0.1 - 50kbp.

Τα περιοριστικά ένζυμα (περιοριστικές ενδονουκλεάσες) που χρησιμοποιήθηκαν δεν διέσπασαν το DNA των φάγων. Για την επαλήθευση του παραπάνω αποτελέσματος, η πέψη των γενετικών υλικών των φάγων επαναλήφθηκε υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες και τα προϊόντα της φορτώθηκαν σε gel πολυακρυλαμίδης το οποίο προσφέρει γενικότερα υψηλότερης ευκρίνειας αποτελέσματα (Εικόνα 36).



Εικόνα 36 Gel πολυακρυλαμίδης όπου έτρεξαν τα προϊόντα της πέψης του γενετικού υλικού των βακτηριοφάγων με 3 διαφορετικά ένζυμα. A: 1 - 7 BamHI όπου 1 – St1, 2- St2, 3 – G2, 4 – G3, 5 – Grn1, 6 – Prt1, 7 – SelM και 9 – 14 HindIII, όπου 9 - St1, 10 - St2, 11 – G2, 12 – G3, 13 – Grn1, 14 – Prt1, 15 – SelM και 8 – γενωμική κλίμακα 100 – 1000bp, B: 1-7 HaeIII όπου 1 – St1, 2- St2, 3 – G2, 4 – G3, 5 – Grn1, 6 – Prt1, 7 – SelM, 8 - γενωμική κλίμακα 100 – 1000bp.

Και στην περίπτωση της πολυακρυλαμίδης δεν παρατηρείται πέψη από κανένα από τα 3 ένζυμα περιορισμού. Συνεπώς, προκύπτει το συμπέρασμα, πως οι 7 βακτηριοφάγοι δεν μπορούν να ομαδοποιηθούν σε περισσότερες από μία ομάδα, με βάση το προφίλ κοπής του γενετικού τους υλικού, τουλάχιστον όσο αφορά τα ένζυμα BamHI, HindIII και HaeIII.

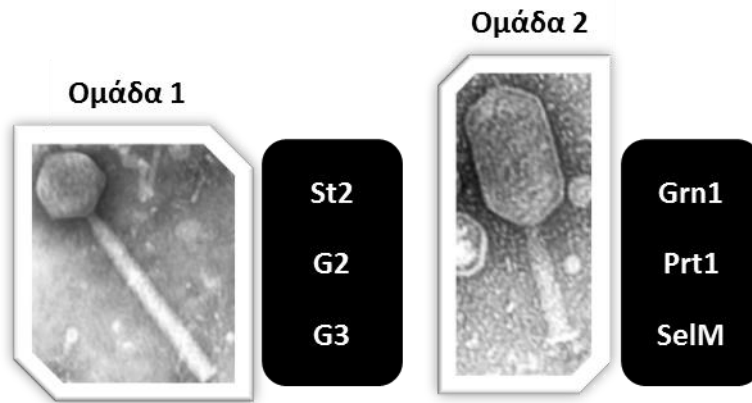
Ολοκληρώνοντας, το πρώτο στάδιο χαρακτηρισμού των 7 βακτηριοφάγων συνδυάστηκαν τα αποτελέσματα από:

A) εύρος ξενιστή → μηδενική διάκριση μεταξύ των φάγων

B) μορφολογικό χαρακτηρισμό → δύο διακριτές ομάδες φάγων

Γ) Πέψη DNA με περιοριστικά ένζυμα → μηδενική διάκριση μεταξύ των φάγων

Συμπεραίνεται, πως η μορφολογία κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης συνιστά τον μόνο παράγοντα διαφοροποίησης μεταξύ των φάγων G2, G3, St1, St2, Grn1, Prt1, SelM και κατά συνέπεια προκύπτουν **2 διακριτές ομάδες βακτηριοφάγων** (Εικόνα 37).



Εικόνα 37 Οι δυο διακριτές ομάδες βακτηριοφάγων που προέκυψαν βάσει της μορφολογίας των ισωματίων των ιών. Ομάδα 1: St2, G2, G3, Ομάδα 2: Grn1, Prt1, SelM

Μετά τον προσδιορισμό 2 διακριτών ομάδων βακτηριοφάγων, επιλέχθηκε ένας αντιπροσωπευτικός φάγος από καθεμία ώστε να γίνει αναλυτικός χαρακτηρισμός των βιολογικών χαρακτήρων. Οι φάγοι αυτοί ήταν ο St2 από την ομάδα 1 και ο Grn1 από την ομάδα 2.

ΉΠΙΟΣ / ΛΥΤΙΚΟΣ

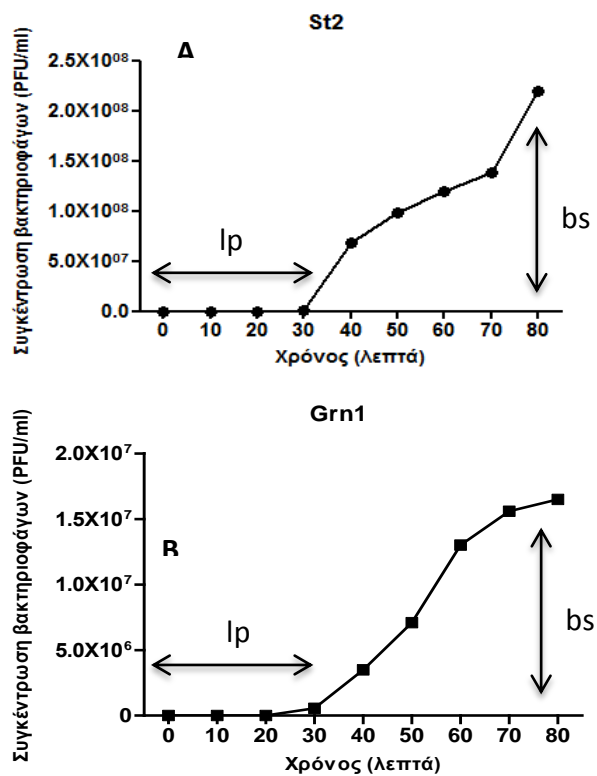
Θεμελιώδους σημασίας πληροφορία για την διεξαγωγή ασφαλούς φαγοθεραπείας, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, είναι η διερεύνηση του κύκλου ζωής του ώστε να διαπιστωθεί αν είναι λυτικός ή λυσιγονικός, γεγονός το οποίο συνδέεται με το είδος της μολυσματικότητας του. Οι φάγοι **Grn1** και **St2** ελέγχθηκαν ως προς τη λυτική τους ικανότητα. Διαπιστώθηκε πως οι αποικίες οι οποίες επιβίωσαν κατόπιν επιμόλυνσης του βακτηρίου – ξενιστή με αναλογία βακτηρίων/βακτηριοφάγων $MOI = 100$ από τους προαναφερθέντες φάγους, επιβίωσαν όχι λόγω ανάπτυξης ανθεκτικότητας αλλά επειδή λόγω τυχαιότητας δεν «συναντήθηκαν» με τους φάγους. Μετά την απομόνωση και ανακαλλιέργεια των αποικιών αυτών, προετοιμάστηκε η βακτηριακή τους χλόη η οποία και επιμολύνθηκε με τους αντίστοιχους φάγους. Οι φάγοι προκάλεσαν αναστολή όλων των αποικιών αποδεικνύοντας πως οι φάγοι **Grn1** και **St2** είναι **λυτικοί** (Εικόνα 38).



Εικόνα 38 Αναστολή ανάπτυξης των αποικιών οι οποίες επιβίωσαν μετά από επιμόλυνση από τους φάγους Grn1 και St2, αποδεικνύοντας τον λυτικό χαρακτήρα των φάγων αυτών.

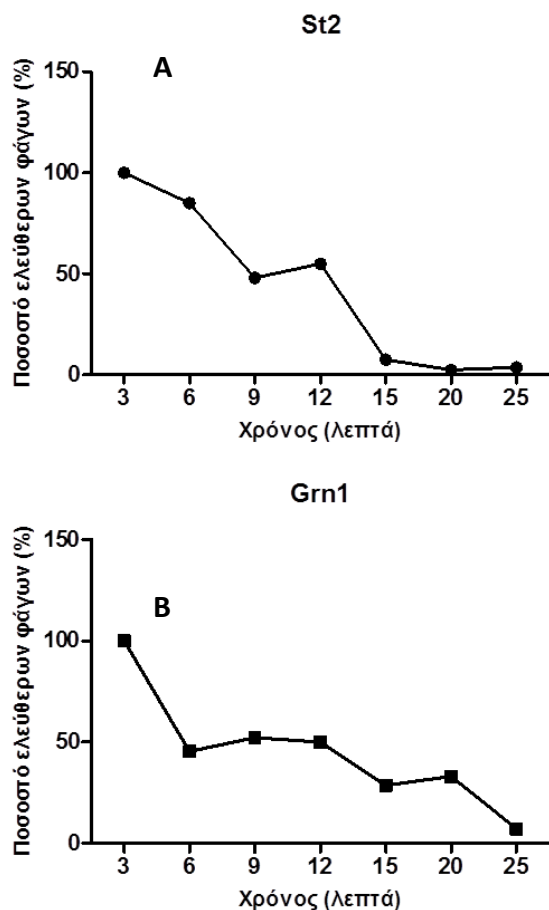
ΧΑΡΑΚΗΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΥΚΛΟΥ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ

Στην Εικόνα 39 παρουσιάζονται οι **μονοφασικές καμπύλες ανάπτυξης** των βακτηριοφάγων Grn1 και St2. Από τις καμπύλες αυτές προκύπτουν οι τιμές για τα βασικότερα χαρακτηριστικά του κύκλου ζωής των φάγων (Πίνακας 10), η **λανθάνουσα περίοδος** (latency period, *lp*) και το **μέγεθος έκρηξης** (burst size, *bs*).



Εικόνα 39 Μονοφασικές καμπύλες ανάπτυξης A: για τον φάγο St2 B: για τον φάγο Grn1

Η εικόνα 40 απεικονίζουν τις καμπύλες απορρόφησης των βακτηριοφάγων Grn1 και St2 από το *Vibrio alginolyticus*, σε σχέση με το χρόνο. Παρατηρείται σταθερά μια μείωση των φάγων οι οποίοι βρίσκονται στο περιβάλλον των βακτηρίων, καθώς σταδιακά εισέρχονται στο βακτήριο για να ξεκινήσουν την λυτική διαδικασία.



Εικόνα 40 Καμπύλες απορρόφησης των βακτηριοφάγων από το *V. alginolyticus* στην πορεία του χρόνου A: για τον φάγο Grn1 B: για τον φάγο St2.

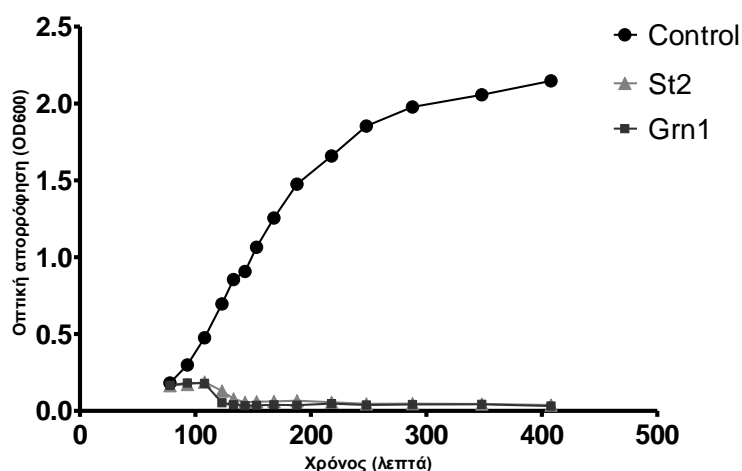
Τα βιολογικά χαρακτηριστικά του κύκλου ζωής των Grn1 και St2 καθώς επίσης και ο χρόνος απορρόφησης τους από τον ξενιστή αθροίζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10 Βιολογικά χαρακτηριστικά (λανθάνουσα περίοδος ανάπτυξης και μέγεθος έκρηξης) του κύκλου ζωής των βακτηριοφάγων Grn1 και St2 και χρόνος απορρόφησης του 95% των βακτηριοφάγων αυτών από το *V. alginolyticus*.

Φάγος	Λανθάνουσα περίοδος	Μέγεθος έκρηξης	95% απορρόφηση φάγων
Grn1	30 λεπτά	25φάγοι/βακτήριο	25 λεπτά
St2	30 λεπτά	120φάγοι/βακτήριο	15 λεπτά

IN VITRO ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ

Εφόσον Grn1 και St2 χαρακτηρίστηκαν ως λυτικοί φάγοι και αφού έχουν ολοκληρωθεί όλες οι απαραίτητες πειραματικές διαδικασίες χαρακτηρισμού του *Vibrio alginolyticus* και των G2, G3, St1, St2, Grn1, Prt1, SelM πραγματοποιήθηκε *in vitro* έλεγχος της αποτελεσματικότητας των βακτηριοφάγων. Είναι το καθοριστικό βήμα που προηγείται του ελέγχου αποτελεσματικότητας σε *in vivo* πειράματα. Σύμφωνα με τις μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης (OD₆₀₀) που έγιναν, προκύπτει το γράφημα της Εικόνας 41 όπου φαίνεται η απόκριση του βακτηριακού πληθυσμού του *Vibrio alginolyticus* παρουσία και απουσία των φάγων. Παρατηρείται ότι παρουσία των φάγων, τα **βακτήρια** όχι μόνο δεν αυξάνονται αλλά φτάνουν **κοντά σε μηδενικά επίπεδα και παραμένουν εκεί για 6 ώρες τουλάχιστον**. Αντίθετα, στη συνθήκη ελέγχου (control) το βακτήριο αυξάνεται κανονικά σύμφωνα με την καμπύλη αύξησής του.



Εικόνα 41 Γραφική απεικόνιση οπτικής απορρόφησης της καλλιέργειας *V. alginolyticus* στην πορεία του χρόνου παρουσία και απουσία των βακτηριοφάγων St2 και Grn1. Η βακτηριακή καλλιέργεια παρουσία βακτηριοφάγων, έχει σχεδόν μηδενική απορρόφηση για πάνω από 6 ώρες.

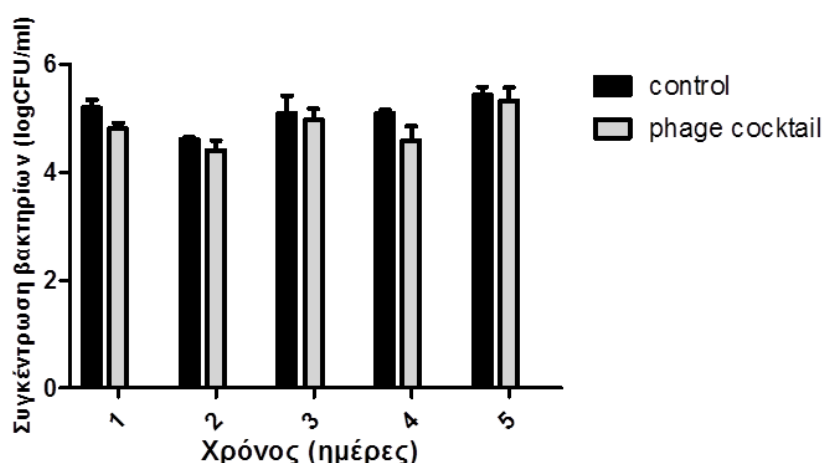
IN VIVO ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΩΝ

Το τελικό στάδιο ελέγχου αποτελεσματικότητας των βακτηριοφάγων εφαρμόζεται σε *in vivo* συνθήκες και συγκεκριμένα σε καλλιέργειες τροχοζώων. Ο τελικός στόχος είναι ο **περιορισμός του βακτηριακού φορτίου των *Vibrio*** τα οποία υπάρχουν με φυσικό τρόπο στο σύστημα. Οι συγκεντρώσεις των βακτηριακών πληθυσμών που προέκυψαν από το πείραμα μετασχηματίστηκαν σε λογαριθμικές

τιμές. Στα γραφήματα των Εικόνων 42 και 43 φαίνεται ο συνολικός πληθυσμός των βακτηρίων (Total bacteria) και ο συνολικός πληθυσμός των *Vibrio* (Total *Vibrio*) στην πορεία του χρόνου ανάλογα με τον κάθε χειρισμό (control και phage cocktail).

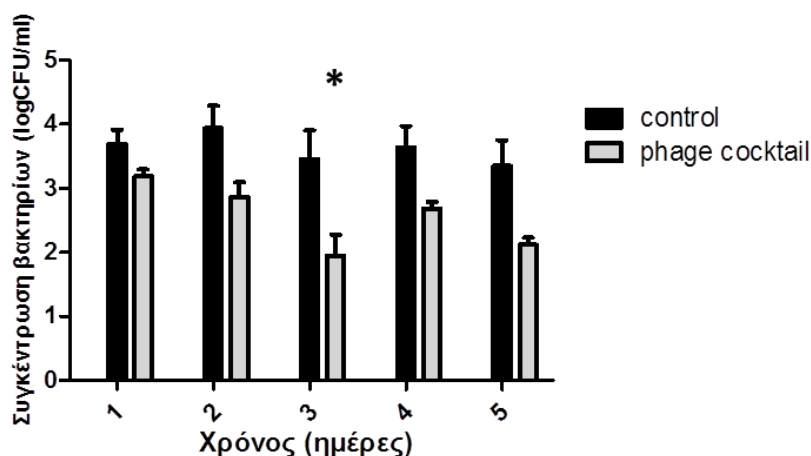
Ο έλεγχος κατανομής των τιμών συγκέντρωσης του ολικού βακτηριακού πληθυσμού και του ολικού πληθυσμού των *Vibrio* έγινε με το τεστ Kolmogorov – Smirnov το οποίο επιβεβαίωσε την **κανονικότητα της κατανομής** των παραπάνω μεταβλητών ($p\text{-value}>0,05$). Συνεπώς, έγινε **ανάλυση διασποράς** με δύο παράγοντες (two - way ANOVA) ώστε να εντοπιστούν, εάν υπάρχουν, στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τόσο των **χειρισμών** (treatment) όσο του **χρόνου** (time) στα αποτελέσματα των βακτηριακών μετρήσεων (ολικά βακτήρια και ολικά *Vibrio*).

Ο παραμετρικός έλεγχος έδειξε ότι ο συνολικός βακτηριακός πληθυσμός που υπήρχε στις καλλιέργειες των τροχοζώων διέφερε στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ μεταξύ των συνθηκών ελέγχου και χορήγησης βακτηριοφάγων με $F(1, 29) = 4.88$ $p = 0.04$ (Εικόνα 42). Παρόλα αυτά ο έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων τόσο με το τεστ του Bonferroni όσο και με το τεστ του Tukey, δεν επαλήθευσε την παραπάνω διαφορά. Συνεπώς, δεν φαίνεται τελικά να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον ολικό βακτηριακό πληθυσμό μεταξύ των χειρισμών.



Εικόνα 42 Συγκέντρωση ολικών βακτηρίων στις καλλιέργειες των τροχοζώων στην πορεία του χρόνου για τις δύο συνθήκες του πειράματος (control και phage cocktail). Δεν εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Ο πληθυσμός των *Vibrio* στη συνθήκη ελέγχου (control) διαφέρει στατιστικά σημαντικά από αυτόν της συνθήκης χορήγησης φάγων με $F(1, 29) = 62.8297$ $p = 0.0000002$ κατά την ημέρα 3 του πειράματος και τα αποτελέσματα φαίνονται στο γράφημα της Εικόνας 43.



Εικόνα 43 Συγκέντρωση βακτηριακού φορτίου των *Vibrio* στις καλλιέργειες των τροχοζώων στην πορεία του χρόνου για τις δύο συνθήκες του πειράματος (control και phage cocktail). Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των χειρισμών control και phage cocktail κατά την ημέρα 3 του πειράματος.

Αναφορικά με τους βακτηριοφάγους που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, ανήκαν σε δύο ομάδες:

ΟΜΑΔΑ 1 (OM1): Φάγοι από τις 2 διακριτές ομάδες της παρούσας εργασίας (Grn1, Prt1, G3, St2)

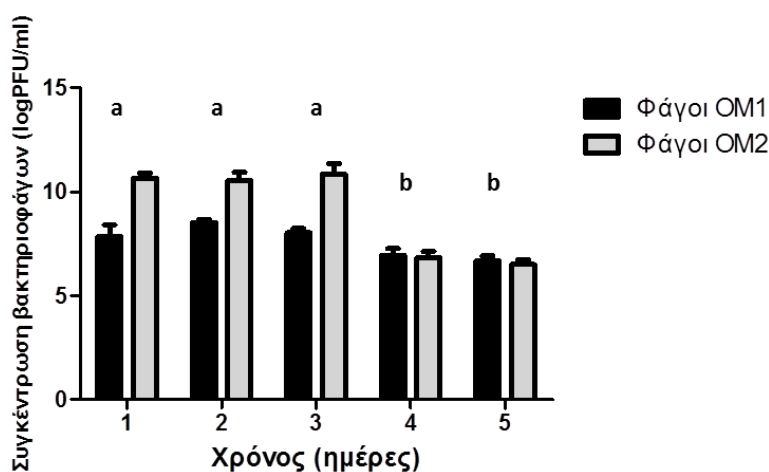
ΟΜΑΔΑ 2 (OM2): Οι φάγοι A11 και T11 για τους οποίους τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται εδώ και αποτελούν υλικό παράλληλου ερευνητικού προγράμματος.

Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο ειδών φάγων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το διαφορετικό εύρος ξενιστών τους. Επίσης, οι A11 και T11 χρησιμοποιούν σαν είδος ξενιστή ένα βακτήριο του είδους *Vibrio harveyi*. Η σύνθεση του κοκτέιλ των φάγων (phage cocktail) ήταν:

Συνδυασμός βακτηριοφάγων:

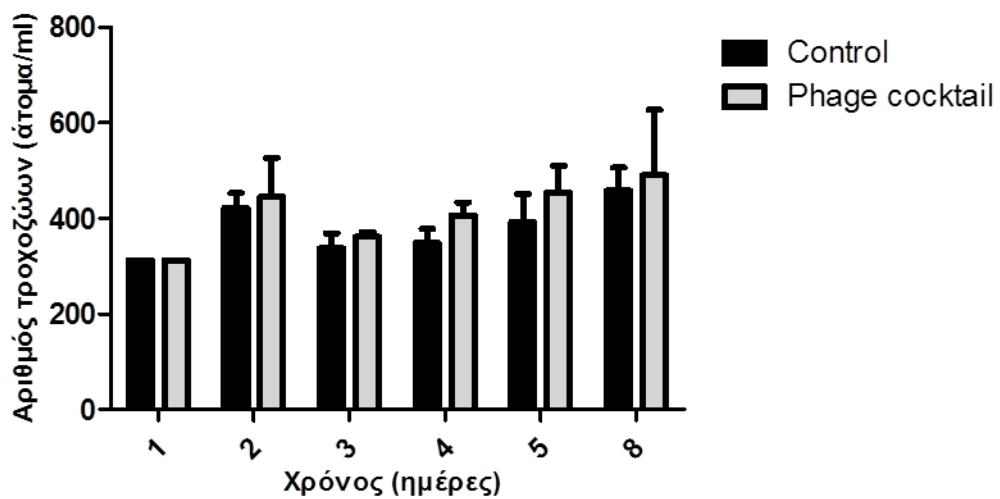
(Phage cocktail): Grn1 (10^8 PFU/ml) + Prt1(10^8 PFU/ml) + G3(10^8 PFU/ml) + St2(10^8 PFU/ml) + A11(10^{10} PFU/ml) + T11(10^{10} PFU/ml)

Η σύνθεση αυτή χρησιμοποιήθηκε ώστε να διευρυνθεί η αποτελεσματικότητα των βακτηριοφάγων σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο εύρος βακτηρίων του γένους *Vibrio*. Στην Εικόνα 44, απεικονίζεται η συνολική συγκέντρωση των 2 ομάδων βακτηριοφάγων στις 3 καλλιέργειες τροχοζώων όπου προστέθηκαν (phage cocktail) και η πορεία τους στην διάρκεια των ημερών του πειράματος. Οι τίτλοι των βακτηριοφάγων και σε αυτήν την περίπτωση έχουν λογαριθμηθεί και έγινε ανάλυση διακύμανσης με έναν παράγοντα, τον χρόνο (one-way ANOVA). Εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους πληθυσμούς των βακτηριοφάγων της ομάδας 1 με $F(4, 14) = 16.730$ $p = 0.0002$ και της ομάδας 2 με $F(4, 14) = 122.166$ $p = 0.00000002$, σχηματίζοντας δύο στατιστικά σημαντικές υποομάδες (subsets) a και b (Εικόνα 44).



Εικόνα 44 Συγκέντρωση των βακτηριοφάγων των δύο ομάδων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Παρατηρούνται δύο χρονικές ομαδοποιήσεις στις ημερών 1, 2,3 (υποομάδα a) και 4, 5 (υποομάδα b) μεταξύ των οποίων σημειώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά.

Ολοκληρώνοντας, όσο αφορά τους πληθυσμούς των τροχοζώων του πειράματος, δεν εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους δύο χειρισμούς με $F(1, 12) = 1.83$ $p = 0.209$. Άρα, η προσθήκη βακτηριοφάγων δεν φαίνεται να έχει κάποια θετική ή αρνητική επίπτωση στην αύξηση της ζωντανής τροφής (τροχοζώα) (Εικόνα 45).



Εικόνα 45 Ο πληθυσμός των τροχοζώων στην πορεία του χρόνου. Δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στην αύξηση των τροχοζώων μεταξύ των δύο χειρισμών (control και phage cocktail).

Στόχος της εργασίας ήταν να απομονωθούν λυτικοί βακτηριοφάγοι που να είναι δραστικοί απέναντι σε βακτήρια του γένους *Vibrio* τα οποία είναι κοινά και απαντούν στις εγκαταστάσεις του εκκολαπτηρίου ιχθύων του ΕΛ.ΚΕΘ.Ε., έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν ως μέσο μείωσης του βακτηριακού φορτίου του νερού εκτροφής. Το βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε σ' αυτή τη μελέτη για την απομόνωση φάγων ταυτοποιήθηκε ως *Vibrio alginolyticus*. Ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας της δονακίωσης είναι το *V.anguillarum* όμως πολλές βιβλιογραφικές αναφορές τεκμηριώνουν το γεγονός πως και το *V. alginolyticus* μπορεί να προκαλέσει την ασθένεια τόσο σε ψάρια όσο και σε ασπόνδυλα. Οι πρώτοι που ασχολήθηκαν με την περίπτωση του παθογόνου *V. alginolyticus* ήταν οι Colorni et al. (1981)στις εγκαταστάσεις του ινστιτούτου υδατοκαλλιέργειας του Ελιάτ όπου μετά από έξαρση δονακίωσης σε καλλιεργούμενες τσιπούρες, *Sparus aurata*, απομόνωσαν 116 στελέχη *Vibrio* από το αίμα 88 ψαριών που έφεραν έντονα συμπτώματα της ασθένειας. Το 70% των στελεχών αυτών χαρακτηρίστηκαν σαν *V. alginolyticus* και σύμφωνα με τις τότε διαθέσιμες βιοχημικές τεχνικές (Pathotek και Minitek KIT αναγνώρισης) αποδείχθηκε πως ανήκουν σε 6 διαφορετικά μεταβολικά προφίλ.

Επιπλέον, δημοσιευμένες μελέτες από την περιοχή της νοτιοδυτικής Ισπανίας τεκμηρίωσαν την μολυσματικότητα του *V. alginolyticus* σε καλλιεργούμενες τσιπούρες. Οι ερευνητές απομόνωσαν βακτηριακά στελέχη *V. alginolyticus* από σπλήνα, νεφρό και συκώτι των άρρωστων ψαριών και πραγματοποίησαν ελέγχους μολυσματικότητας για τα στελέχη αυτά. Η μέση θανατηφόρος δόση (LD₅₀) των απομονωθέντων στελεχών κυμάνθηκε από 5.4×10^4 έως 10^6 ανά γραμμάριο βάρους ψαριού και οι θνησιμότητες καταγράφηκαν σε διάστημα 5 ημερών (Balebona et al. 1998). Σύμφωνα με το μολυσματικό μηχανισμό του *V. alginolyticus* που προτάθηκε από τη μελέτη αυτή, το βακτήριο αρχικά προσκολλάται στην βλέννα της τσιπούρας και με τη βοήθεια των υδρολυτικών του ενζύμων την χρησιμοποιεί σαν πηγή θρεπτικών και πολλαπλασιάζεται διεισδύοντας στο υποκείμενο επιθήλιο. Διαφορετικά υδρολυτικά ένζυμα του *V. alginolyticus* ευθύνονται για τις εξελκώσεις και την καταστροφή των ιστών που περιλαμβάνονται στα κλινικά σημάδια της δονακίωσης. Στην ίδια περιοχή σε μεταγενέστερη μελέτη, το *V. alginolyticus* αποδείχτηκε και πάλι το πιο κοινό *Vibrio* που απομονώθηκε από όλες τις εξάρσεις δονακίωσης επί σειρά 4 ετών (1997-2000) (Zorrilla et al. 2003). Το LD₅₀ που ελέγχθηκε κυμάνθηκε από 1×10^5 έως 4×10^6 ανά γραμμάριο βάρους ψαριού. Επίσης,

στην μελέτη αυτή τα στελέχη του *V. alginolyticus* παρουσίασαν επίσης και ανθεκτικότητα έναντι των αντιβιοτικών οξυτετρακυκλίνη, τετρακυκλίνη και SXT, καταδεικνύοντας την άμεση ανάγκη εύρεσης εναλλακτικής λύσης για την καταπολέμηση της δονακίωσης στην περιοχή. Επιπλέον, ο LeBretton (1999) αναφέρει το *V. alginolyticus* ως ένα από τα βασικά παθογόνα που προκαλούν δονακίωση στην περιοχή της Μεσογείου χαρακτηρίζοντάς το σαν ευκαιριακό είδος το οποίο πρέπει οπωσδήποτε να αντιμετωπιστεί.

Ένα ακόμη περιστατικό δονακίωσης σε τσιπούρες καλλιέργειας στην Τουρκία φαίνεται να είχε ως αιτιολογικό παράγοντα και πάλι το *V. alginolyticus* (Akayli et al. 2008). Από ψάρια 4 έως 20 γραμμαρίων απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν 12 διαφορετικά στελέχη *V. alginolyticus*. Οι ερευνητές έλεγξαν την παθογένεια 4 διαφορετικών στελεχών εμβαπτίζοντας για 60 λεπτά υγιείς τσιπούρες 20 γραμμαρίων σε συγκέντρωση 10^7 βακτήρια/ml καθώς και με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση στην ίδια συγκέντρωση. Στην περίπτωση της εμβάπτισης η ασθένεια δεν εκδηλώθηκε όμως η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση προκάλεσε 100% θνησιμότητα στις τσιπούρες μετά από 7 ημέρες.

Θνησιγόνο έχει αποδειχτεί το *V. alginolyticus* όχι μόνο σε ψάρια παραγωγής αλλά και σε διακοσμητικά ψάρια όπως στην περίπτωση του *Pomacentrus caeruleus* από όπου απομονώθηκε παθογόνο στέλεχος. Πειραματικά, χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις βακτηρίων 10^7 , 10^6 και 10^5 , προκαλώντας 100%, 80% και 20% θνησιμότητες αντίστοιχα (Sonia and Lipton 2012).

Το *V. alginolyticus* έχει αναφερθεί σαν αιτιολογικός παράγοντας δονακίωσης και σε ασπόνδυλα. Το παθογόνο στέλεχος VaI απομονώθηκε από έξαρση δονακίωσης σε καλλιέργειες γαρίδων *Penaeus monodon* στην Ταιβάν. Η παθογένεια του VaI εξετάστηκε σε πληθυσμούς δυο διαφορετικών ειδών γαρίδας, σε *Penaeus monodon* και *Penaeus japonicus* και αποδείχτηκε θνησιγόνο και για τα δύο είδη με θανατηφόρο δόση του 50% (LD_{50}) στα 1.13×10^5 βακτήρια/ml και 2.46×10^5 /ml, αντίστοιχα (Lee et al. 1996). Στο πανεπιστήμιο της Σάντα Κατερίνα της Βραζιλίας απομονώθηκαν παθογόνα στελέχη του *V. alginolyticus* έπειτα από έξαρση δονακίωσης σε καλλιέργειες υπόκαμπων, *Hippocampus reidi*. Πειραματική επιμόλυνση σε υγιείς υπόκαμπους εμβαπτίζοντας τους σε συγκέντρωση 10^7 βακτήρια/ml για 15 λεπτά είχε σαν αποτέλεσμα 100% θνησιμότητα μετά από 24 ώρες (Martins et al. 2010).

Οι Zhao et al. (2010) μελέτησαν αναλυτικά τον μολυσματικό μηχανισμό του *V. alginolyticus* χρησιμοποιώντας το στέλεχος ZJO. Το στέλεχος αυτό χρησιμοποιούσε το εκκριτικό του σύστημα τύπου III (T3SS) για να θανατώσει τα κύτταρα του ψαριού που μόλυνε. Το σύστημα αυτό κωδικοποιείται στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια από μια πολύ συντηρημένη ομάδα γονιδίων. Στο *V. alginolyticus* το εκκριτικό σύστημα T3SS ενεργοποιεί την κασπάση-3 η οποία δημιουργεί έναν πόρο στην μεμβράνη των κυττάρων του μολυσμένου ξενιστή και τα κυτταρικά συστατικά απελευθερώνονται μέσω αυτού του πόρου, καταστρέφοντας το κύτταρο.

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε πως καθοριστικό ρόλο για την μολυσματικότητα του *V. alginolyticus* παίζει ο μηχανισμός του quorum sensing. Το quorum sensing είναι ένα σύστημα που αποτελείται από σηματοδοτικά μόρια που απελευθερώνονται στο περιβάλλον από τα βακτήρια. Όσο αυξάνονται τα βακτήρια τόσο αυξάνει και η συγκέντρωση των σηματοδοτικών αυτών μορίων στο περιβάλλον με αποτέλεσμα τα βακτήρια να «επικοινωνούν» κατά κάποιο τρόπο μεταξύ τους. Η «επικοινωνία» αυτή παίζει καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση βακτηριακών μηχανισμών όπως η μολυσματικότητα, οι αλληλεπιδράσεις βακτηρίου και φάγων και η προσκόλληση των βακτηρίων επάνω στην υποκείμενη επιφάνεια (σχηματισμός biofilm) (Høyland-Kroghsbo et al. 2013). Η εσκεμμένη καταστολή του γονιδίου LuxS που εμπλέκεται στο μηχανισμό του quorum sensing, οδήγησε σε χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης του *V. alginolyticus*, σχηματισμό ελαττωματικού μαστιγίου, μειωμένη παραγωγή πρωτεασών και αυξημένη παραγωγή εξωκυττάρων ουσιών. Συμπεραίνεται, λοιπόν, πως το σύστημα quorum sensing είναι πολύ βασικός ρυθμιστής των στοιχείων μολυσματικότητας του *V. alginolyticus* (Ye et al. 2008).

Το *V. alginolyticus*, εκτός του ότι είναι κινητό όπως όλα τα *Vibrio*, παρουσιάζει έντονη τάση διάχυσης των αποικιών του πάνω στο στερεό θρεπτικό υλικό. Τόσο στην παρούσα εργασία όσο και στην υπόλοιπη βιβλιογραφία η τάση αυτή επιβεβαιώνεται για όλα τα στελέχη *V. alginolyticus* όταν τοποθετούνται σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα (Farmer et al. 2005; Akayli et al. 2008).

Συγκρίνοντας τις βιοχημικές ιδιότητες του *V. alginolyticus* αυτής της εργασίας με στελέχη του είδους που αναφέρονται σε άλλες εργασίες, παρατηρούνται ομοιότητες μεταξύ των στελεγχών αλλά και διαφορές. Συγκεκριμένα, το στέλεχος του

ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. δεν μπορεί να μεταβολίσει μαννόζη και σουκρόζη σε αντίθεση με το *V. alginolyticus* της εργασίας των Sonia και Lipton (2012). Από την άλλη, βιοχημικά αποτελέσματα όπως μηδενική ανάπτυξη σε 0% NaCl, αδυναμία μεταβολισμού αργινίνης και μεταβολισμός κιτρικού οξέως και ορνιθίνης συμφωνούν απόλυτα με τους Akayli et al. (2008) οι οποίοι χαρακτήρισαν βιοχημικά 12 νέα παθογόνα στελέχη *V. alginolyticus* αντιπαραβάλλοντάς τα με το *V. alginolyticus* CECT521, παθογόνο στέλεχος διεθνούς συλλογής. Επίσης, *V. alginolyticus* παθογόνο σε γαρίδες (Martins et al. 2010), εμφανίζει ομοιότητες στα βιοχημικά χαρακτηριστικά του με αυτά του στελέχους της παρούσας μελέτης, όπως είναι ο μεταβολισμός της ορνιθίνης, του κιτρικού, της σουκρόζης και της γλυκόζης. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, δεν φαίνεται τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των *V. alginolyticus* να διαφέρουν ιδιαίτερα ανάλογα των ξενιστών ή των διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών που έχουν απομονωθεί. Ομαδοποιώντας τα θρεπτικά υποστρώματα, το *V. alginolyticus* αποδεικνύεται πως μπορεί να μεταβολίσει το 88% των αμινοξέων της πλάκας BIOLOG. Όπως ανέφερε ο Schwarz (1980) και επιβεβαίωσαν αργότερα και οι Middelboe et al. (2009) οι υποδοχείς πρόσληψης αμινοξέων συχνά σχετίζονται και με την διαδικασία προσκόλλησης βακτηριοφάγων πάνω στην κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου. Συνεπώς, η χρήση βακτηριοφάγων για την καταπολέμηση του *V. alginolyticus* φαίνεται να ευνοείται και από τις βιοχημικές ιδιότητες του βακτηρίου.

Το βιοχημικό αποτύπωμα του *V. alginolyticus* καθώς και η ταυτοποίησή του έγιναν χρησιμοποιώντας το σύστημα BIOLOG GENIII. Η τεχνική αυτή είναι αρκετά αξιόπιστη διότι ελέγχει την αντίδραση του βακτηρίου σε 71 πηγές άνθρακα και σε 23 τεστ χημικής ευαισθησίας με αποτέλεσμα να προκύπτει η βιοχημική ταυτότητα του βακτηρίου και έχει χρησιμοποιηθεί είτε αυτόνομα του είτε σε συνδυασμό με το K17 API20E για την ταυτοποίηση κλινικών περιπτώσεων *Vibrio* όπως τα *V.harveyi* και *V.aestuarianus* subsp. *francensis* (Liu et al. 2004; Garnier et al. 2008). Το σύστημα BIOLOG χρησιμοποιείται επίσης για να μελετηθεί πιθανή μεταβολή στο βιοχημικό προφίλ μεταξύ βακτηριακών στελεχών που ανέπτυξαν ανθεκτικότητα σε βακτηριοφάγους και του άγριου (αρχικού) τύπου τους. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας πολλές φορές συνοδεύεται με κάποιο μεταβολικό κόστος για τα ανθεκτικά στελέχη που εκφράζεται ως απώλεια της δυνατότητας μεταβολισμού συγκεκριμένου αριθμού υποστρωμάτων, κυρίως αμινοξέων. Αυτό συμβαίνει διότι τα βακτήρια στην προσπάθεια άμυνάς τους έναντι της επίθεσης των φάγων, μειώνουν τον αριθμό

υποδοχέων πρόσδεσης στην κυτταρική τους μεμβράνη. Οι υποδοχείς αυτοί, όμως εκτός από το να αναγνωρίζονται από τους βακτηριοφάγους, εμπλέκονται και στην πρόσληψη θρεπτικών, συνεπώς η τροποποίησή τους συνεπάγεται και κάποια μεταβολική αδυναμία (Middelboe et al. 2009).

Ο μοριακός χαρακτηρισμός του *V. alginolyticus* έγινε αρχικά με την τεχνική PCR με γενικούς εκκινητές για το γονίδιο 16S, το αποτέλεσμα που προέκυψε όμως δεν ήταν ξεκάθαρο. Όταν η αλληλουχία τοποθετήθηκε στο BLAST απέδωσε ποσοστά ταυτοποίησης >99% για πολλά διαφορετικά είδη *Vibrio* όπως *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. owensii* καθώς και πολλά μη ταυτοποιημένα *Vibrio* sp. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο διότι ειδικά στην περίπτωση του γένους των *Vibrio* οι αλληλουχίες των 16S είναι τόσο συντηρημένες ώστε δεν μπορούν να δείξουν διαφοροποιήσεις παρά μόνο μεταξύ πολύ λίγων ειδών. Χαρακτηριστική περίπτωση είναι τα *V. anguillarum* τα οποία διαφοροποιούνται βάσει του 16S από τα υπόλοιπα είδη *Vibrio*, αποτέλεσμα που επιβεβαιώνει και η παρούσα μελέτη σύμφωνα με το φυλογενετικό δέντρο που παρατίθεται στο κεφάλαιο των Αποτελεσμάτων. Η μελέτη των Sawabe et al. (2007) επισήμανε πως η διάκριση μεταξύ των 5 σημαντικότερων γενών της οικογένειας Vibrionaceae είναι εφικτή βάσει του γονιδίου 16S. Έτσι, ομαδοποιήθηκαν φυλογενετικά με υψηλή στατιστική υποστήριξη 78 είδη της οικογένειας Vibrionaceae σε 5 γένη: *Vibrio*, *Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Enterovibrio* και *Grimontia* (Thompson et al. 2005; Thompson et al. 2001; Thompson et al. 2004). Για περαιτέρω διαφοροποιήσεις μεταξύ των ειδών που βρίσκονται μέσα στα παραπάνω γένη, στις περισσότερες περιπτώσεις δεν αρκεί μόνο η χρήση του γονιδίου 16S. Μια αξιόπιστη λύση είναι η ανάλυση πολλαπλής αλληλούχισης γενετικών τόπων (Multi Locus Sequences Analysis, MLSA). Η διαδικασία αυτή βασίζεται στην αλληλούχιση βακτηριακών γονιδίων «οικιακής οικονομίας» (housekeeping genes) όπως το γονίδιο τοποισομεράσης I, *topA*, της DNA γυράσης *gyrB*, της κυτταροσκελετικής πρωτεΐνης *mreB* και πολλά ακόμη γονίδια τα οποία βρίσκονται σε όλα τα *Vibrio*. Συνδυάζοντας τις αλληλουχίες των γονιδίων αυτών προκύπτουν πιο ξεκάθαρες φυλογενετικές σχέσεις με υψηλή διακριτική ικανότητα μεταξύ ειδών. Όσο περισσότερα γονίδια τόσο καλύτερη και πιο αξιόπιστη η διάκριση (Sawabe et al. 2007; Thompson et al. 2005). Η MLSA, όμως, είναι δαπανηρή διαδικασία από άποψη κόστους, χρόνου και ενέργειας, συνεπώς πραγματοποιείται σε περιπτώσεις όπου πρέπει να ομαδοποιηθούν πολύ συγγενικά μεταξύ τους είδη και δεν

υπάρχουν εξειδικευμένοι εκκινητές για PCR που να ταυτοποιούν τα είδη αυτά. Στην περίπτωση του *V. alginolyticus*, έχει ήδη περιγραφεί στη βιβλιογραφία τεχνική PCR με εξειδικευμένους εκκινητές που κατασκευάστηκε με στόχο την εύκολη και γρήγορη διάκριση των *V. alginolyticus*, *V. cholerae* και *V. parahaemolyticus* (Di Pinto et al. 2006). Η PCR αυτή χρησιμοποιήθηκε και στην περίπτωση του *V. alginolyticus* της παρούσας διατριβής, και έχει χρησιμοποιηθεί και σε ανάλογες περιπτώσεις (Jing-jing et al. 2011), επιβεβαιώνοντας την αρχική εκτίμηση για την ταυτότητα του βακτηρίου που συμφωνεί με το αποτέλεσμα από το BIOLOG. Άρα, τόσο ο μοριακός όσο και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του στελέχους είχαν το ίδιο αποτέλεσμα: *Vibrio alginolyticus*.

Μετά τον εμπλουτισμό των δειγμάτων νερού και μυδιών και την απομόνωση των 7 μονοκλωνικών βακτηριοφάγων G2, G3, St1, St2, Grn1, Prt1, SelM, ακολούθησε αύξηση του τίτλου (PFU/ml) ώστε να γίνει πλήρης χαρακτηρισμός τους και να αποδειχτεί εάν πρόκειται για διαφορετικούς μεταξύ τους βακτηριοφάγους και αν ναι πόσοι είναι αυτοί.

Προσδιορίστηκαν εξ αρχής οι βέλτιστες συνθήκες αποθήκευσης των βακτηριοφάγων ούτως ώστε να διατηρούν σταθερό τον τίτλο τους στην πορεία του χρόνου, άρα να παραμένουν ενεργοί. Ελέγχθηκε η σταθερότητα των βακτηριοφάγων στη διάρκεια ενός μήνα σε LB στους 4°C με και χωρίς χλωροφόρμιο καθώς και στους -80°C με 50% γλυκερόλη, (Higuera et al. 2013). Η προσθήκη χλωροφορμίου χρησιμοποιείται, αντί για διήθηση, για να αποτρέψει την παρουσία βακτηρίων στο φιαλίδιο που βρίσκονται οι βακτηριοφάγοι. Εάν οι βακτηριοφάγοι δεν παρουσιάζουν ευαισθησία στο χλωροφόρμιο τότε η χρήση του ενδείκνυται και μάλιστα είναι και πολύ πιο πρακτική από τη διήθηση (Jun et al. 2013). Η αποθήκευση στους 4°C ήταν η καλύτερη μέθοδος και για τους 7 φάγους (G2, G3, St1, St2, Grn1, Prt1, SelM). Το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί με άλλες εργασίες που έχουν δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία (Crothers-Stomps et al. 2010).

Οι 7 βακτηριοφάγοι είχαν το ίδιο ακριβώς εύρος ξενιστών με συνέπεια ο έλεγχος αυτός να μην αποτελεί παράγοντα διαφοροποίησης τους. Για τη μελέτη του εύρους ξενιστών χρησιμοποιήθηκαν 23 στελέχη *Vibrio* τα οποία ανήκαν στα είδη *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. ordalii*, *V. alginolyticus* και *V. owensii*. Οι 7 βακτηριοφάγοι παρουσίασαν αναστολή απέναντι στα *V. alginolyticus*, *V. harveyi* και

V. owensii. Όπως έδειξε και το φυλογενετικό τους δέντρο (βλ. Αποτελέσματα Εικόνα 28) πρόκειται για τρία είδη τα οποία ομαδοποιούνται μαζί με αρκετά *Vibrio* χωρίς να μπορεί ο μοριακός δείκτης 16S να διακρίνει περαιτέρω διαφορές μεταξύ τους. Οι βακτηριοφάγοι έχουν την δυνατότητα να μολύνουν ένα είδος βακτηρίου ή περισσότερα πολύ συγγενικά μεταξύ τους είδη (Madigan et al. 2010). Οι συγκεκριμένοι φάγοι δεν παρουσιάζουν εξειδίκευση σε επίπεδο ενός και μόνο στελέχους, όπως αναφέρεται σε άλλες μελέτες (Jun et al. 2013), αλλά σίγουρα μολύνουν μόνο βακτήρια με τα οποία φυλογενετικά βρίσκονται κοντά. Αυτό συμβαίνει γιατί παρά το γεγονός ότι ανήκουν σε διαφορετικά είδη, πιθανόν δεν υπάρχουν μεγάλες διαφοροποιήσεις στους μεμβρανικούς υποδοχείς όπου προσδένονται οι φάγοι. Άλλωστε, η εξειδίκευση σε επίπεδο στελέχους συχνά είναι μειονέκτημα για έναν βακτηριοφάγο όταν ο στόχος είναι να χρησιμοποιηθεί για φαγοθεραπεία. Πρέπει να μπορεί τουλάχιστον να εξολοθρεύσει την πλειονότητα των στελεχών του βακτηρίου στόχου (Sulakvelidze et al. 2001; Vinod et al. 2006; Chan et al. 2013). Στην εργασία των Crothers-Stomps et al. (2010), οι βακτηριοφάγοι που απομονώθηκαν έναντι του *V. harveyi*, μπορούσαν και σε αυτή την περίπτωση να αναστείλουν την ανάπτυξη και άλλων συγγενικών ειδών *Vibrio* όπως *V. campbelli*, *V. rotiferianus*, *V. parahaemolyticus* και *V. proteolyticus*. Δεν έγινε έλεγχος αναστολής του *V. alginolyticus* στην προαναφερθείσα εργασία ώστε να αντιπαραβληθούν τα αποτελέσματα. Παρόλο που οι φάγοι παρουσιάζουν, τόσο στην παρούσα εργασία αλλά και γενικότερα στη βιβλιογραφία, στενό εύρος λύσης υπάρχουν και περιπτώσεις που ισχύει το αντίθετο. Σε έρευνα που χρησιμοποίησε σαν ξενιστή ένα συγγενικό στο *V. owensii* βακτήριο, απομονώθηκαν 5 λυτικοί βακτηριοφάγοι. Έγινε έλεγχος του λυτικού εύρους των φάγων απέναντι σε 60 στελέχη *Vibrio* που απομονώθηκαν από δείγματα νερού, χωρίς όμως να ταυτοποιηθούν. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ο συνδυασμός αυτών των βακτηριοφάγων μπορούσε να σκοτώσει 39 από τα 60 *Vibrio* που απομονώθηκαν, ενώ ο πιο αποτελεσματικός φάγος από όλους ήταν αποτελεσματικός σε 23 από τα 60 στελέχη (Yu et al. 2013). Πρόκειται για μια αρκετά αποτελεσματική περίπτωση συνδυασμού βακτηριοφάγων που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν phage cocktail σε εφαρμογές φαγοθεραπείας.

Κανένας από τους G2, G3, St1, St2, Grm1, Prt1, SelM δεν μπόρεσε να σκοτώσει κάποιο *V. anguillarum* κάτι που εξηγείται και από τις φυλογενετικές διαφορές του συγκεκριμένου είδους με τα υπόλοιπα *Vibrio* (Sawabe et al. 2007).

Ο μορφολογικός χαρακτηρισμός των βακτηριοφάγων που βασίστηκε στην παρατήρηση των λυτικών πλακών που σχηματίζουν επάνω στην βακτηριακή χλόη του ξενιστή, δεν οδήγησε και πάλι σε καμία διαφοροποίηση μεταξύ των βακτηριοφάγων. Οι αρνητικές αποικίες και των 7 ήταν όλες πολύ μικρές και διαυγείς με διάμετρο ~1mm. Η παρατήρηση της μορφολογίας τους με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης μπόρεσε να διαχωρίσει τους βακτηριοφάγους σε δύο διακριτές ομάδες οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια Μυονιρίδαε και μάλιστα στο γένος που καλείται T4-like genus λόγω της παρόμοιας μορφολογίας τους με τον φάγο της *E.coli* T4 (Kim and Davidson 1974).

Η πρώτη προσπάθεια, ανεπιτυχής όμως, για την απομόνωση φάγων του *V. alginolyticus* αναφέρεται πριν περίπου 35 χρόνια στη βιβλιογραφία (Baross Ja Fau - Liston et al. 1978). Βέβαια, η πρώτη αναφορά βακτηριοφάγου για το *V. alginolyticus* έγινε από τους Muramatsu and Matsumoto οι οποίοι απομόνωσαν τους φάγους φVP143 και φVP253 εξειδικευμένους για παθογόνο *Vibrio parahaemolyticus*. Ο φάγος φVP143 αποδείχτηκε λυτικός και για το *V. alginolyticus* αφού μπόρεσε να σκοτώσει το 71% των βακτηριακών στελεχών του *V. alginolyticus* που ελέγχθηκαν. Τόσο ο φάγος φVP143 όσο και ο φVP253 είχαν μέγεθος ~48kb ακριβώς το ίδιο με το μέγεθος των φάγων που απομονώθηκαν στην παρούσα διατριβή. Επίσης, η μορφολογία τους ήταν παρόμοια με την μορφολογία των G2, G3, St1 και St2 με διάμετρο κεφαλής 100 nm και ανήκοντας όλοι στην οικογένεια Μυονιρίδαε.

Στην βιβλιογραφία αναφέρονται επίσης και κάποιες πρόσφατες μελέτες με φάγους εξειδικευμένους για το *V. alginolyticus*. Ο φάγος φA318 απομονώθηκε χρησιμοποιώντας σαν βακτηριακό ξενιστή ένα παθογόνο *V. alginolyticus* και η μορφολογική του ανάλυση έδειξε ότι ανήκει στην οικογένεια Ροδονιρίδαε με διάμετρο κεφαλής 50-55 nm. Το μέγεθος έκρηξης του φA318 ήταν 78 φάγοι ανά βακτήριο και η λανθάνουσα περίοδος του διάρκειας 10 λεπτών. Το εύρος ξενιστών του φάγου αυτού ήταν αρκετά περιορισμένο εφόσον από τα 6 βακτήρια του κλάδου των *V. harveyi* που ελέγχθηκαν, λυτική δράση παρατηρήθηκε μόνο εναντίον των *V. harveyi* και *V. damsela* (Lin et al. 2012). Μορφολογικά ο φA318 διαφέρει από τους φάγους της παρούσας μελέτης καθώς αυτοί ανήκουν στην οικογένεια Μυονιρίδαε και επίσης εμφανίζουν μεγαλύτερης διάρκειας λανθάνουσα περίοδο. Παρόλα αυτά, το εύρος ξενιστών τους φαίνεται να συμφωνεί καθώς και στις δύο περιπτώσεις είναι

περιορισμένο και έχει σαν κοινό σημείο αναφοράς την αποτελεσματική αναστολή της ανάπτυξης του *V. harveyi*. Εξειδικευμένος φάγος της οικογένειας Podoviridae διαμέτρου κεφαλής 60 nm, έναντι παθογόνου *V. alginolyticus* απομονώθηκε και από τους Heo et al. (2012). Πολύ κοντά με τους βακτηριοφάγους Grn1, Prt1 και SelM φαίνεται ο φάγος ppp2 που απομόνωσαν οι Lin and Lin (2012). Η μορφολογία όλων των παραπάνω ιών είναι σχεδόν πανομοιότυπη και κατατάσσονται στη οικογένεια των Myoviridae με διάμετρο κεφαλής 150 nm. Το εύρος ξενιστών είναι και στις δύο περιπτώσεις περιορισμένο όμως πέραν του *V. alginolyticus* δεν συγκρίθηκαν *Vibrio* κοινά και στις δυο μελέτες. Πρόσφατη επίσης αναφορά σχετικά με φάγους για το *V. alginolyticus* αναφέρεται η μεταπτυχιακή διατριβή του YuGe (2011) από το Πανεπιστήμιο του Guangdong της Κίνας για την οποία όμως δεν υπάρχουν επιπλέον στοιχεία εφόσον δεν έχει δημοσιευθεί σε κάποιο διεθνές επιστημονικό περιοδικό και τα αποτελέσματα δεν διατίθενται από το πανεπιστημιακό αρχείο.

Ως προς το γενετικό υλικό των βακτηριοφάγων της εργασίας, εφόσον ανήκουν στην τάξη των Caudovirales (οικογένεια: Myoviridae), είναι δεδομένο πως το γονιδίωμα τους θα ήταν δίκλωνο DNA και αυτό ακριβώς αποδείχθηκε και στο gel αγαρόζης. Η μέθοδος κοπής του γονιδιώματος με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων είναι η πιο διαδεδομένη και αξιόπιστη μέθοδος που χρησιμοποιείται στην βιβλιογραφία για να μπορέσουν να διακριθούν μεταξύ τους οι βακτηριοφάγοι. Αρκετές φορές τα αποτελέσματα της πέψης του ιικού γονιδιώματος με περιοριστικά ένζυμα δίνουν ξεκάθαρη απάντηση στο εάν είναι διαφορετικοί κάποιοι φάγοι μεταξύ τους αλλά αυτό δεν συμβαίνει πάντα. Υπάρχει μεγάλος αριθμός διαφορετικών περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιούνται για την κοπή των φαγικών γονιδιωμάτων εκ των οποίων επιλέγηκαν τα BamHI, HindIII και HaeIII σε αυτή τη μελέτη. Τα 3 αυτά ένζυμα δεν κατάφεραν να κόψουν το γονιδίωμα κανενός από τους 7 φάγους, συνεπώς ούτε αυτή η μεθοδολογία κατάφερε να αποδείξει πως οι G2, G3, St1, St2, Grn1, Prt1, SelM δεν αφορούν τον ίδιο βακτηριοφάγο. Σε πολλές ακόμη δημοσιεύσεις χαρακτηρισμένων βακτηριοφάγων συμβαίνει κάποια ένζυμα να μην μπορούν να κόψουν το γονιδίωμα των φάγων. Οι Kim et al. (2012) δοκίμασαν 12 διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες και μόνο οι 5 από αυτές μπόρεσαν να κόψουν το DNA των βακτηριοφάγων που μελετούσαν. Στην περίπτωση των Higuera et al. (2013) το ένζυμο HindIII μπόρεσε να κόψει και να διακρίνει διαφορετικούς βακτηριοφάγους ενώ αντίθετα στην παρούσα διατριβή το ένζυμο ήταν εντελώς

αναποτελεσματικό. Αυτό βέβαια δεν είναι παράξενο διότι λαμβάνοντας υπόψη πως οι βακτηριοφάγοι είναι η μορφή ζωής με την μεγαλύτερη γενετική ποικιλομορφία στον πλανήτη, δεν μπορεί τα ένζυμα να κόβουν με τον ίδιο τρόπο το γονιδίωμα όλων των φάγων. Εκεί άλλωστε στηρίζεται και η λογική της χρήσης των περιοριστικών ενζύμων σαν παράγοντα διάκρισης. Συνεπώς, η αναποτελεσματικότητα των 3 ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν στην διατριβή θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί μόνο συνεχίζοντας τις δοκιμές με άλλα ένζυμα και ελπίζοντας ότι αυτά θα κόψουν το γονιδίωμα των φάγων. Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα από το εύρος ξενιστών των φάγων, την μορφολογία τους και του προτύπου κοπής με τα περιοριστικά ένζυμα φαίνεται ότι ο μόνος διακριτικός παράγοντας μεταξύ τους ήταν οι μορφολογία η οποία υπέδειξε δύο διαφορετικές κατηγορίες φάγων (βλ. Αποτελέσματα Εικόνα 44).

Μειώνοντας πλέον τον αριθμό των διαφορετικών βακτηριοφάγων από 7 σε 2 έγινε επιλογή ενός αντιπροσωπευτικού φάγου από κάθε μορφολογική κατηγορία. Από την ομάδα 1 επιλέχθηκε ο St2 και από την ομάδα 2 ο Grn1, ώστε να προσδιοριστούν ο χαρακτήρας της λυτικής τους δράση καθώς επίσης και τα βιολογικά χαρακτηριστικά του κύκλου ζωής τους.

Βασική προϋπόθεση ασφαλούς φαγοθεραπείας (προληπτικής ή θεραπευτικής) είναι η χρήση αποκλειστικά και μόνο λυτικών βακτηριοφάγων. Πρέπει η μόλυνση του βακτηριακού ξενιστή από τους φάγους να συνεπάγεται τον θάνατο του βακτηρίου αμέσως μόλις ο φάγος ολοκληρώσει την λανθάνουσα φάση ανάπτυξης του (Sulakvelidze 2011). Στην αντίθετη περίπτωση, όχι μόνο δεν θα αντιμετωπιστεί η ασθένεια αλλά υπάρχει σοβαρή περίπτωση να υπάρξει γενετική μεταφορά ανθεκτικών ή μολυσματικών γονιδίων εκατέρωθεν μεταξύ βακτηρίων και βακτηριοφάγων με αποτελέσματα απρόβλεπτα και μάλλον ανεπιθύμητα. Η ραγδαία ανάπτυξη των γενωμικών εργαλείων έχει αποδείξει πως ένα σημαντικό τμήμα του βακτηριακού DNA δεν μεταφέρεται κάθετα, δηλαδή από το πατρικό βακτήριο στον απόγονο, αλλά οριζόντια μέσω μετασχηματισμού, βακτηριακής σύζευξης και βακτηριακής μεταγωγής (Bushman 2002). Η αλλαγή αυτής της θεώρησης έχει αλλάξει και την γενικότερη αντίληψη σχετικά με την εξέλιξη των βακτηρίων. Στα πλαίσια της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων ένας πολύ σημαντικό στοιχείο «κινητού» DNA είναι και οι βακτηριοφάγοι. Η μόλυνση ενός βακτηρίου από έναν ήπιο βακτηριοφάγου έχει δύο πιθανές καταλήξεις, είτε την επακόλουθη λύση του είτε την

λυσιγονική οδό για τον κύκλο ζωής του φάγου. Η περίπτωση της λυσιγονικής οδού, όμως, αποτελεί τον κανόνα στις περιπτώσεις των ήπιων βακτηριοφάγων και αυτό σημαίνει πως το γενετικό υλικό του βακτηριοφάγου θα ενσωματωθεί σε αυτό του βακτηρίου. Λαμβάνοντας δε υπόψη πως αρκετοί ήπιοι φάγοι φέρουν στο γονιδίωμά τους ακόμη και γονίδια που αλλάζουν τον φαινότυπο του ξενιστή, αυξάνονται όλο και περισσότερα τα στοιχεία προς την κατεύθυνση πως η λυσιγονία είναι ουσιαστικά ένας κινητήριος μοχλός της εξελικτικής διαδικασίας των βακτηρίων μέσα σε ένα ιδιαίτερα σύντομο χρονικό διάστημα (Canchaya et al. 2003). Συνεπώς, πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία στον προσδιορισμό των βακτηριοφάγων ως ήπιους ή λυτικούς πριν την πραγματοποίηση οποιουδήποτε ελέγχου αποτελεσματικότητας *in vivo* ή *in vitro*.

Η πρώτη ένδειξη για τον λυτικό χαρακτήρα των βακτηριοφάγων St2 και Grn1 ήταν η διαύγεια των πλακών τους επάνω στην βακτηριακή χλόη. Για να επιβεβαιωθεί πως πρόκειται για λυτικούς φάγους, επιλέχθηκαν τυχαία βακτηριακές αποικίες μετά από επιμόλυνση καλλιέργειας του *V. alginolyticus* με τους St2 και Grn1. Στην περίπτωση που οι φάγοι ήταν ήπιοι, κάποιο ποσοστό των βακτηριακών αποικιών θα είχε ενσωματώσει το γονιδίωμα τους και θα είχε αποκτήσει ανοσία στους φάγους αυτούς. Κάτι τέτοιο, όμως, δεν συνέβη εφόσον το 100% των αποικιών που επιλέχθηκαν και στις δύο περιπτώσεις των φάγων ήταν ευαίσθητες απέναντι στους φάγους αυτούς. Οι φάγοι St2 και Grn1 θεωρήθηκαν κατάλληλοι για την εφαρμογή φαγοθεραπείας συνεπώς προσδιορίστηκαν οι μονοφασικές καμπύλες ανάπτυξής τους ώστε να προσδιοριστούν τα χαρακτηριστικά του κύκλου ζωής τους. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι απαραίτητο πριν από οποιονδήποτε έλεγχο αποτελεσματικότητας, είτε *in vivo* είτε *in vitro*, να έχουν χαρακτηριστεί πλήρως οι φάγοι που θα χρησιμοποιηθούν (Kocharunchitt et al. 2009; Martínez-Díaz and Hipólito-Morales 2013; Oliveira et al. 2012).

Με την απεικόνιση των μονοφασικών καμπυλών ανάπτυξης και της καμπύλης απορρόφησης για τους φάγους St2 και Grn1 προσδιορίστηκε το μέγεθος της έκρηξης, η λανθάνουσα φάση ανάπτυξης αλλά και ο ρυθμός με τον οποίο οι φάγοι απορροφώνται από το βακτηριακό τους ξενιστή. Κάθε νέος βακτηριοφάγος που απομονώνεται και χαρακτηρίζεται εμφανίζει διαφορετική διάρκεια λανθάνουσας περιόδου και διαφορετικά μεγέθη έκρηξης, επιβεβαιώνοντας για ακόμη μία φορά την μεγάλη ποικιλομορφία που παρουσιάζουν οι βακτηριοφάγοι. Στη βιβλιογραφία

αναφέρονται μεγάλες διακυμάνσεις στις τιμές των παραπάνω βιολογικών χαρακτηριστικών. Έχει παρατηρηθεί πολύ εκτενής λανθάνουσα φάση διάρκειας 120 λεπτών (Phumkhachorn and Rattanachaikunsorn 2010) αλλά και πολύ σύντομη διάρκειας 10 λεπτών (Yu et al. 2013). Όσο αφορά το μέγεθος της έκρηξης φαίνεται να παρουσιάζει επίσης μεγάλο εύρος καθώς ο φάγος P9C απελευθερώνει 331 φάγους ανά βακτήριο ενώ ο φάγος P4A μόλις 23 φάγους ανά βακτήριο (Yu et al. 2013). Κατά συνέπεια οι φάγοι St2 και Grn1 χαρακτηρίζονται από σχετικά σύντομη λανθάνουσα περίοδο ανάπτυξης (30 λεπτά) και από μικρό για τον Grn1 (24 φάγοι ανά βακτήριο) και μεσαίο για τον St2 (98 φάγοι ανά βακτήριο) μεγέθη έκρηξης.

Η διαδικασία της απορρόφησης των βακτηριοφάγων από τον ξενιστή είναι το αποτέλεσμα της σύγκρουσης φάγου και ξενιστή οποία συμβαίνει τυχαία εφόσον οι βακτηριοφάγοι δεν μπορούν να κινηθούν αυτόνομα (Schlesinger 1932). Η απορρόφηση του ιού από το βακτήριο μπορεί να είναι είτε αναστρέψιμη είτε μη - αναστρέψιμη, με τους μοριακούς μηχανισμούς αλληλεπίδρασης μεταξύ βακτηρίων και βακτηριοφάγων να διαφέρουν μεταξύ των ταξινομικών ομάδων των ιών. Στην μη - αναστρέψιμη περίπτωση, ο φάγος εγχύει το γενετικό του υλικό στο βακτήριο (Rakhuba et al. 2010). Οι Phumkhachorn και Rattanachaikunsorn (2010) προσδιόρισαν τον ρυθμό απορρόφησης για τον βακτηριοφάγο PW2 έναντι του παθογόνου σε καλλιέργειες γαρίδας *V. harveyi*, και παρατηρήθηκε πως 30 λεπτά μετά την προσθήκη των φάγων, περίπου το 90% είχε απορροφηθεί από το *V. harveyi* σημειώνοντας έναν ρυθμό απορρόφησης χαμηλότερο και από τον Grn1 και από τον St2. Από την άλλη ο φάγος AP22 έναντι του *Acinetobacter baumannii*, παρουσίασε απορρόφηση 99% 5 λεπτά μετά τη μόλυνση του βακτηρίου (Porova et al. 2012). Οι δύο αυτές περιπτώσεις διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους όμως φαίνεται πως οι φάγοι Grn1 και St2 είχαν ρυθμούς απορρόφησης πιο κοντινούς με τον PW2, το οποίο μπορεί να δικαιολογηθεί από την στιγμή που και οι 3 αυτοί φάγοι μολύνουν βακτήρια του γένους *Vibrio*.

Έχοντας ολοκληρώσει τον χαρακτηρισμό των νέων βακτηριοφάγων St2 και Grn1, στα πλαίσια της δοκιμασίας *in vitro* αποτελεσματικότητας, επιμόλυναν βακτηριακή καλλιέργεια *V. alginolyticus* και κατάφεραν να περιορίσουν την ανάπτυξή του σχεδόν σε μηδενικά επίπεδα για πάνω από 6 ώρες. Το γεγονός αυτό απέδειξε και στην πράξη ότι υπό εργαστηριακές συνθήκες οι φάγοι St2 και Grn1

έχουν την δυνατότητα να εξαλείψουν τον βακτηριακό πληθυσμό του ξενιστή τους με μεγάλη αποτελεσματικότητα μέχρι το σημείο που θα καταφέρουν να πολλαπλασιαστούν οι ανθεκτικές στον βακτηριοφάγο αποικίες. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτά με άλλες εργασίες, στην περίπτωση του φάγου VHCCS-06 εναντίον του *V. harveyi* παρατηρήθηκε αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης του ξενιστή για περίπου 8 ώρες (Crothers-Stomps et al. 2010). Οι Chibani-Chennoufi et al. (2004), μελετώντας βακτηριοφάγους για την καταπολέμηση του *E. coli* παρατήρησαν αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης *in vitro* για χρονικό διάστημα περίπου 3,5 ωρών. Η ανασταλτική δράση των βακτηριοφάγων απέναντι στους ξενιστές τους δεν είναι η ίδια, παρόλα αυτά έχει αποδειχτεί πως η αποτελεσματικότητά τους αυξάνεται εάν χρησιμοποιηθούν συνδυασμοί βακτηριοφάγων (phage cocktails) οι οποίοι αθροιστικά να προσβάλλουν ένα μεγάλο σχετικά εύρος βακτηρίων. Πολύ πρόσφατες δημοσιεύσεις (Chan et al. 2013; Mateus et al. 2014) υποστηρίζουν πως η αντιμετώπισης της δονακίωσης στην υδατοκαλλιέργεια αλλά και γενικότερα των βακτηριακών ασθενειών με τη χρήση βακτηριοφάγων μπορεί να είναι εξαιρετικά αποτελεσματική με τη χρήση συνδυασμού βακτηριοφάγων (phage cocktails).

Ο *in vivo* έλεγχος αποτελεσματικότητας των βακτηριοφάγων βασίστηκε στην λογική της δημιουργίας ενός συνδυασμού βακτηριοφάγων ώστε να συμπεριληφθούν περισσότερα *Vibrio* στο λυτικό πεδίο των χορηγούμενων βακτηριοφάγων. Ο περιορισμός του βακτηριακού φορτίου των *Vibrio* θεωρείται πως επιτεύχθηκε εφόσον παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους πληθυσμούς των *Vibrio* μεταξύ της συνθήκης ελέγχου (control) και της συνθήκης χορήγησης βακτηριοφάγων (phage treatment). Διαφορά μεταξύ των χειρισμών σημειώθηκε την τρίτη ημέρα του πειράματος. Οι Christiansen et al. (2013) υποστήριξαν σε πολύ πρόσφατη μελέτη τους πως καταλυτική σημασία στην αποτελεσματικότητα των βακτηριοφάγων στην καταπολέμηση των βακτηριακών ξενιστών τους παίζει ο τρόπος χορήγησης. Η εργασία αυτή έγινε με στόχο τον περιορισμό του *Flavobacterium psychrophilum* σε καλλιέργειες πέστροφας χρησιμοποιώντας συνδυασμό βακτηριοφάγων. Όταν οι βακτηριοφάγοι χορηγούνταν σε καθημερινή βάση, το *Flavobacterium psychrophilum* είχε περιοριστεί σημαντικά. Αντίθετα, όταν χορηγήθηκαν εφάπαξ στην αρχή του πειράματος, μετά από λίγες ημέρες τα βακτήρια είχαν επανέλθει στα φυσιολογικά τους επίπεδα. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να συμφωνούν και με την παρούσα

εργασία ειδικά όταν παρατηρηθούν τα επίπεδα των βακτηριοφάγων που υπάρχουν στις καλλιέργειες τροχοζώων στην πορεία του χρόνου. Τις 3 πρώτες μέρες του πειράματος οι πληθυσμοί των βακτηριοφάγων βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα ενώ την τέταρτη και πέμπτη μέρα σημειώνουν στατιστικά σημαντική μείωση. Η παρατήρηση αυτή συνδέεται με το γεγονός πως την τρίτη ημέρα που ήταν και η τελευταία στην οποία ο πληθυσμός των φάγων ήταν αρκετά υψηλός, επιτυγχάνεται και ο περιορισμός του βακτηριακού φορτίου των *Vibrio* στα τροχόζωα όπου χορηγήθηκαν. Κατά συνέπεια, σε μελλοντικό πειραματικό σχεδιασμό θα μπορούσε να ελεγχθεί και η συνθήκη χορήγησης βακτηριοφάγων ανά 3 ημέρες. Σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα ο περιορισμός του βακτηριακού φορτίου των *Vibrio* στις καλλιέργειες των τροχοζώων αναμένεται ακόμη πιο αποτελεσματικός. Η τακτική αυτή έχει αναφερθεί ξανά στην βιβλιογραφία με αποτέλεσμα τον επιτυχή περιορισμό του βακτηριακού φορτίου των *Vibrio* σε εκκολαπτήρια νυμφών γαρίδας *Penaeus monodon* (Karunasagar et al. 2007).

Η χορήγηση βακτηριοφάγων δεν επηρέασε τη βιωσιμότητα των τροχοζώων κάτι που άλλωστε ήταν αναμενόμενο καθώς τα *Vibrio* δεν θεωρούνται παθογόνα των ζωντανών τροφών. Αντίθετα οι ζωντανές τροφές αποτελούν «όχημα» εισόδου των παθογόνων στο περιβάλλον των δεξαμενών νυμφικής εκτροφής στο εκκολαπτήριο (Munro et al. 1993; Prol-García et al. 2010). Το ίδιο ισχύει και για την *Artemia salina*, που είναι επίσης ζωντανή τροφή που χορηγείται στα εκκολαπτήρια των υδατοκαλλιεργειών της Μεσογείου (Campbell 1996; Høj et al. 2009). Εξάλλου, μελλοντικός στόχος είναι ο σχεδιασμός ενός αντίστοιχου *in vivo* πειράματος και σε καλλιέργειες *Artemia salina*.

Ολοκληρώνοντας την συζήτηση των αποτελεσμάτων πρέπει να διευκρινιστεί πως η χρήση των βακτηριοφάγων δεν αποσκοπεί στην παντελή εξάλειψη των *Vibrio*, αλλά στον περιορισμό του πληθυσμού τους. Τα *Vibrio* βρίσκονται στην θάλασσα με φυσικό τρόπο καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, όμως η αύξηση των πληθυσμών τους και συνεπώς οι εξάρσεις δονακίωσης συνδέονται άμεσα με την αύξηση της θερμοκρασίας και εκδηλώνονται τους θερινούς μήνες (Pruzzo et al. 2005). Όταν γίνεται αναφορά σε περιβάλλον υδατοκαλλιέργειας, εκτός από τους φυσικούς παράγοντες που καθορίζουν την δονακίωση, προστίθεται και η καταπόνηση λόγω χειρισμών από τους παραγωγούς. Άρα, το ζητούμενο είναι τα *Vibrio* στην

υδατοκαλλιέργεια να διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα με την χρήση βακτηριοφάγων σαν μέτρο πρόληψης, ούτως ώστε σε συνδυασμό πάντα με την προσεκτική διαχείριση των ψαριών να προλαμβάνονται οι εξάρσεις δονακίωσης.

Τα *Vibrio* σε χαμηλά επίπεδα, δεν προκαλούν ασθένεια στα ψάρια, επιτρέποντας παράλληλα και την επαφή των ψαριών με τα παθογόνα εκθέτοντας το αναπτυσσόμενο ανοσοποιητικό τους σύστημα σε χαμηλά επίπεδα ζωντανών αντιγόνων. Όταν, λοιπόν, τα ψάρια φύγουν από το εκκολαπτήριο και μεταφερθούν σε ιχθυοκλωβούς στη θάλασσα θα έχουν ήδη αναπτύξει αντισώματα έναντι των παθογόνων που συνάντησαν στο εκκολαπτήριο άρα και πολύ αυξημένες πιθανότητες επιβίωσης.

Είναι κοινώς αποδεκτό πως οι βακτηριοφάγοι είναι καταλυτικός παράγοντας στην ρύθμιση των βακτηριακών πληθυσμών στο περιβάλλον (Jensen et al. 2006; Rodríguez-Valera et al. 2009) και έχουν επίσης προταθεί σαν μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική για την καταπολέμηση παθογόνων βακτηρίων στην υδατοκαλλιέργεια (Park and Nakai 2003; Karunasagar et al. 2007; Shivu et al. 2007; Higuera et al. 2013). Η έρευνα πάνω στην φαγοθεραπεία οδηγεί στην ανάπτυξη μιας καινοτόμου βιοτεχνολογικής προσέγγισης που προσδοκά να επιλύσει προβλήματα βακτηριακών ασθενειών στην υδατοκαλλιέργεια ενώ ταυτόχρονα βρίσκεται σε συμφωνία με την κοινή γνώμη που επιτάσσει τον περιορισμό της χρήσης αντιβιοτικών. Οι βακτηριοφάγοι που απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής κατάφεραν να περιορίσουν σημαντικά το βακτηριακό φορτίο των *Vibrio* που υπήρχε στις ζωντανές τροφές των εγκαταστάσεων του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. και μεταφερόταν μέσω αυτών στο εκκολαπτήριο.

ΕΣΤΙΑΖΟΝΤΑΣ ΣΤΗΝ ΦΑΓΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Παρόλο που η φαγοθεραπεία παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σαν μέθοδος καταπολέμησης βακτηριακών ασθενειών, δεν είναι πανάκεια. Στην πολύ πρόσφατη μελέτη των Oliveira et al. (2012) θίγονται εύστοχα και συνοπτικά όλα τα θέματα της φαγοθεραπείας επισημαίνοντας τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που παρουσιάζουν (Πίνακας 11).

Πίνακας 11 Σύνοψη πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων που παρουσιάζονται στα κυριότερα θέματα που άπτονται της φαγοθεραπείας (Oliveira et al. 2012).

Θέμα	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Βιβλιογραφικές αναφορές
Αφθονία	Υπάρχουν παντού συνιστώντας μια μεγάλη φυσική δεξαμενή ποικιλότητας	Πρέπει να επιλέγονται μόνον τα λυτικά στελέχη	(Morrison and Rainnie 2004)
Πολλαπλασιασμός και περιορισμός	Γρήγορος πολλαπλασιασμός παράλληλα με την βακτηριακή ανάπτυξη με μηδενικό οικολογικό κίνδυνο	Κάθε περίπτωση πρέπει να εξετάζεται χωριστά, δεν είναι δυνατόν να δημιουργηθεί ένα μοντέλο που να τροποποιείται ανάλογα με την περίπτωση	(Inal 2003; Weld et al. 2004)
Εξειδίκευση ξενιστή	Θεωρητικά δεν απαιτείται επαναλαμβανόμενη χορήγηση	Πρέπει να αναγνωριστεί το βακτηριακό στέλεχος το οποίο προκαλεί την ασθένεια	(Barrow and Soothill 1997; Carlton 1999; Nakai and Park 2002; Mathur et al. 2003)
Απομόνωση, επιλογή και συντήρηση	Στενό εύρος ξενιστή με συνέχεια να σκοτώνονται μόνο τα ανεπιθύμητα βακτήρια αφήνοντας την υπόλοιπη βακτηριακή μικροχλωρίδα ανέπαφη	Πολλές φορές η εξειδίκευση των φάγων σε επίπεδο στελέχους δυσκολεύει την αντιμετώπιση βακτηριακών ειδών με μεγάλη ποικιλομορφία	(Yuksel et al. 2001; Wagner and Waldor 2002; Mathur et al. 2003; Brussow et al. 2004; Flegel et al. 2005; Nakai 2010; Scott et al. 2007; Stenholm et al. 2008)
Βακτηριακά υπολείμματα	Περιορισμένη δυνατότητα ανάπτυξης δευτερογενούς μόλυνσης και επίσης δεν έχουν αναφερθεί παρενέργειες	Η αυστηρή επιλογή λυτικών φάγων και ο έλεγχος της μολυσματικότητας τους ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μεταφοράς τοξικών γονιδίων μεταξύ των βακτηρίων	Μπορεί να οδηγήσουν σε αποτυχία της θεραπείας εάν είναι βλαβερά για τον οργανισμό όπου θα χορηγηθούν οι φάγοι
Χορήγηση	Απομακρύνονται εύκολα με τη σημερινή τεχνολογία	Τα άρρωστα ψάρια δεν τρώνε	(Carlton 1999; Inal 2003; Morrison and Rainnie 2004)
Δοσολογία	Μέσω της τροφής, σε ενέσιμη μορφή ή σε μπάνιο επιτρέποντας την εφαρμογή φαγοθεραπείας από το στάδιο του αυγού έως και των γεννητόρων	Η ενέσιμη μορφή δεν είναι πρακτική όταν πρόκειται για μεγάλους πληθυσμούς	(Barrow and Soothill 1997; Inal 2003; Mathur et al. 2003; Nakai 2010; Nakai and Park 2002)
	Δεν είναι απαραίτητος ο ακριβής περιορισμός της δόσης καθώς οι φάγοι μπορούν να πολλαπλασιάζονται παρουσία του ξενιστή τους	Περιορισμένα δεδομένα σχετικά με την ποσότητα της αποτελεσματικής δόσης, κάθε περίπτωση εξετάζεται ξεχωριστά	(Inal 2003; Mathur et al. 2003; Nakai 2010)

Περιβάλλον	Μόλις οι φάγοι σκοτώσουν τα βακτήρια στόχους οι πληθυσμοί τους περιορίζονται χωρίς να προκαλείται περιβαλλοντικός κίνδυνος		(Barrow and Soothill 1997; Phumkhachorn and Rattanachaikunsopon 2010; Lorch 1999)
Πολλαπλές μολύνσεις	Συνδυασμός βακτηριοφάγων δρα συνεργιστικά και αυξάνει την αποτελεσματικότητα	Όλα τα βακτηριακά στελέχη που είναι ξενιστές των φάγων πρέπει να έχουν αναγνωρισθεί	(Carlton 1999)
Ανθεκτικότητα βακτηρίων	Η μεγάλη ποικιλομορφία των φάγων και η συνεξέλιξη τους με τα βακτήρια αντιμετωπίζει την ανάπτυξης ανθεκτικότητας από τα βακτήρια	Τα βακτηριακά στελέχη που είναι ανθεκτικά στους φάγους είναι αρκετά συχνά και εμφανίζονται σχετικά γρήγορα	
	Τα ανθεκτικά στους φάγους στελέχη δεν είναι κατ' ανάγκη παθογόνα καθώς η εύνοια της ανθεκτικότητας από την φυσική επιλογή μπορεί να κοστίζει την μολυσματικότητα του βακτηρίου	Κάθε νέος φάγος που απομονώνεται χρειάζεται να προσδιορισθεί ως προς την αποτελεσματικότητά του	(Levin and Bull 2004; Merrill et al. 2006; Nakai 2010; Sandeep 2006)
Ανοσολογία	Υψηλότερη δόση φάγων μπορεί να υποκαταστήσει του φάγους που εξουδετέρωσαν τα αντισώματα των ψαριών	Τα αντισώματα έναντι των φάγων μπορεί να περιορίσουν σε ένα ποσοστό την δυνατότητα των ιών να προσκολληθούν στο βακτηριακό ξενιστή τους	(Carlton 1999; Morrison and Rainnie 2004)
Χρόνος θεραπείας	Η παραγωγή αντισωμάτων έναντι των φάγων είναι πολύ πιο αργή από την κινητική των ίδιων των φάγων	Χρόνιες θεραπείες με βακτηριοφάγους μπορεί να αποτύχουν λόγω παραγωγής αντισωμάτων έναντι τους	(Inal 2003; Sulakvelidze and Morris J.G 2001)
Οικονομικό κόστος	Το κόστος ανάπτυξης βακτηριοφάγων έναντι βακτηριακών παθογόνων είναι πολύ χαμηλότερο από το ανίστοιχο κόστος των αντιβιοτικών	Επιπλέον κόστος λόγω της συνεχούς έρευνας που απαιτείται πάνω στους φάγους, εφόσον το σύστημα βακτηρίου και φάγων είναι δυναμικό και εξελίσσεται συνεχώς	(Carlton 1999; Matsuzaki et al. 2005; Miedzybrodzki et al. 2007)

Άρα, το τελικό συμπέρασμα είναι ότι οι βακτηριοφάγοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσο καταπολέμησης των βακτηριακών ασθενειών στις ιχθυοκαλλιέργειες και αποτελούν ένα πολύ σημαντικό πεδίο έρευνας που θα βοηθήσει στη μείωση της χρήσης των αντιβιοτικών χρησιμοποιώντας «συστατικά» προερχόμενα από το ίδιο το σύστημα αρκεί η επιλογή τους να γίνεται με αυστηρά κριτήρια και προσεκτικό τρόπο.

- Ackermann H (2007) Phages examined in the electron microscope. . <http://www.springerlink.com/index/X27715407XN9Q721.pdf> 152 (2):227-243
- Akayli T, Timur G, Aydemir B, Kiziler AR, Coskun O, Albayrak G, Arican E (2008) Characterization of *Vibrio alginolyticus* Isolates from Diseased Cultured Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata*. The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, 60 (2):89-94
- Alagappan KM, Deivasigamani B, Somasundaram ST, Kumaran S (2010) Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Specific Phages from Shrimp Ponds in East Coast of India. Current Microbiology 61 (4):235-240. doi:10.1007/s00284-010-9599-0
- Angulo FJ, Nargund Vn Fau - Chiller TC, Chiller TC (2004) Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. (0931-1793 (Print))
- Angulo L, Lopez JE, Vicente JA, Saborido AM (1994) Haemorrhagic areas in the mouth of farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Journal of Fish Diseases 17 (2):163-169. doi:10.1111/j.1365-2761.1994.tb00209.x
- Aoki T, Nomura J, Crosa J (1985) Virulence of *Vibrio anguillarum* with particular emphasis on the outer membrane components. Bull Jap Soc Sci Fish doi:10.2331/suisan.51.1249
- Ashelford KE, Day MJ, Fry JC (2003) Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. Applied and Environmental Microbiology 69:285-289
- Austin B (2010) *Vibriosis* as causal agents of zoonoses. Vet Microbiol 140 ((3-4)):310-317. doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.015
- Austin B, Austin D, Sutherland R, Thompson F, Swings J (2005) Pathogenicity of *Vibriosis* to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia* nauplii. Environmental Microbiology 7 (9):1488-1495
- Austin B, Austin DA (1993) Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish 2nd edition Chichester: Ellis Horwood Ltd
- Balebona MC, Andreu MJ, Bordas MA, Zorilla I, Moriño MA, Borrego JJ (1998) Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). Applied and Environmental Microbiology 64 (11):4269-4275
- Baross Ja Fau - Liston J, Liston J Fau - Morita RY, Morita RY (1978) Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages and other *Vibrio* bacteriophages in marine samples. (0099-2240 (Print))
- Barrow PA (2001) The use of bacteriophages for treatment and prevention of bacterial disease in animals and animal models of human infection. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 76 (7):677-682
- Barrow PA, Soothill JS (1997) Bacteriophage therapy and prophylaxis: Rediscovery and renewed assessment of potential. Trends in Microbiology 5 (7):268-271
- Barton MD (2000) Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. Nutrition Research Reviews 13 (2):279-299

- Biosca EG, Amaro C (1996) Toxic and enzymatic activities of *Vibrio vulnificus* biotype 2 with respect to host specificity. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (7):2331-2337
- Bonaveri GF (1761) quoted by Drouin de Bouville (1907).
- Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR (2013) Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature* 493 (7432):429-432
- Brüssow H (2005) Phage therapy: The *Escherichia coli* experience. *Microbiology* 151 (7):2133-2140
- Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, Van Der Oost J (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321 (5891):960-964
- Brussow H, Canchaya C Fau - Hardt W-D, Hardt WD (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. (1092-2172 (Print))
- Burton DR, Stanfield RL, Wilson IA (2005) Antibody vs. HIV in a clash of evolutionary titans. *PNAS* published ahead of print October 11, 2005 102 (42):14943-14948. doi:10.1073/pnas.0505126102
- Bushman F (2002) *Lateral DNA Transfer*. Cold Spring Harbor, New York: CSH Laboratory press
- Campbell AM (1996) Bacteriophages In *Fields Virology* Edited by Fields BN KnipeDMand Howley PM. New York:Raven Press:587-607
- Canchaya C, Fournous G, Chibani-Chennoufi S, Dillmann ML, Brüssow H (2003) Phage as agents of lateral gene transfer. *Current Opinion in Microbiology* 6 (4):417-424
- Canestrini G (1893) La malattia dominante delle anguilla *Atti istituto delle scienze* 7:809-817
- Carlton RM (1999) Phage therapy: past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 47 (5):267-274. doi:citeulike-article-id:306404
- Ceyssens P-J (2009) Isolation and characterization of lytic bacteriophages infecting *Pseudomonas aeruginosa*. *Katholieke Univeriteit Leuven*
- Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C (2013) Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology* 8 (6):769-783
- Chanishvili N, Tediashvili M, Chanishvili T (2002) Phages and experience for their application in the former Soviet Union. *IUMS Congress, Paris*
- Chibani-Chennoufi S, Sidoti J Fau - Bruttin A, Bruttin A Fau - Kutter E, Kutter E Fau - Sarker S, Sarker S Fau - Brussow H, Brussow H (2004) *In vitro* and *in vivo* bacteriolytic activities of *Escherichia coli* phages: implications for phage therapy. (0066-4804 (Print))
- Christiansen RH, Madsen L, Dalsgaard I, Middelboe M (2013) Detection and quantification of *Flavobacterium psychrophilum* specific bacteriophages in rainbow trout upon different administration methods: implications for disease control in aquaculture. *European Association of Fish Pathologists Conference in Tampere, Finland*

- Chu C, Do Y, Kim Y, Saito Y, Lee SD, Park H, Lee JK (2011) Mathematical modeling of *Vibrio vulnificus* infection in Korea and the influence of global warming. *Osong Public Health and Research Perspectives* 2 (1):51-58
- Clarridge JE (2004) Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Review* 17 (4):840-862. doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004
- Clokie MRJ, Kropinski AM (2009) *Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* (eds) John M. Walker. Humana Press
- Colorni A, Paperna I, Gordin H (1981) Bacterial infections in gilthead sea bream *Sparus aurata* culture in Elat. *Aquaculture* 23:257-267
- Crothers-Stomps C, Høj L, Bourne DG, Hall MR, Owens L (2010) Isolation of lytic bacteriophage against *Vibrio harveyi*. *Journal of Applied Microbiology* 108 (5):1744-1750
- Di Pinto A, Ciccarese G Fau - Tantillo G, Tantillo G Fau - Catalano D, Catalano D Fau - Forte VT, Forte VT (2006) A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus*. (0362-028X (Print))
- Diggles BK, Carson J, Hine PM, Hickman RW, Tait MJ (2000) *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium nudipinnis*) and brill (*C. guntheri*) in New Zealand. *Aquaculture* 183 (1–2):1-12. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00280-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00280-X)
- Earnshaw WC, Harrison SC (1977) DNA arrangement in isometric phage heads. *Nature* 268 (5621):598-602
- Eaton MD, Bayne-Jones S (1934) Bacteriophage therapy: Council on pharmacy and chemistry. *JAMA*
- Egidius E, Wiik R, Andersen K (1986) *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36 (4):518-520
- Englen MD, Kelley LC (2000) A rapid DNA isolation procedure for the identification of *Campylobacter jejuni* by the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology* 31 (6):421-426. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00841.x
- FAO (2007) State of world aquaculture 2006. In: *Fisheries Technical Paper* (FAO ed City 134
- Farmer J, Janda M, Brenner FW, Cameron DN, Birkhead KM (2005) Genus I *Vibrio* Pacini 1854, 411AL In Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology The Proteobacteria. Part B. The Gammaproteobacteria* 2nd edn vol.2. Springer, New York:494-546
- Farmer JJ, Hickman-Brenner FW (1992) The genera *Vibrio* and *Photobacterium* In Balows, Truper, Dworkin, Harder and Schleifer (Editors) *The Prokaryotes. A handbook on the Biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications* 2nd ed vol.3. Springer-Verlag, New York:2952-3011

- Farto R, Pérez MJ, Fernández-Briera A, Nieto TP (2002) Purification and partial characterisation of a fish lethal extracellular protease from *Vibrio pelagius*. *Veterinary Microbiology* 89 (2–3):181-194. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00172-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00172-4)
- Flegel TW, Pasharawipas T, Owens L, Oakey HJ (2005) Evidence for Phage-induced virulence in the shrimp pathogen In: Proceedings of the Fifth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (Diseases in Asian Aquaculture V, 24-28 November 2005, Gold Coast, QLD, Australia:329-337
- Furuse K (1987) Distribution of the coliphages in the general environment: general considerations In *Phage Ecology* Edited by Goyal SM, Gerba C, Bitton G. New York, NY: John Wiley & sons:87-124
- Garnier M, Labreuche Y, Fau - Nicolas J-L, Nicolas JL (2008) Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. (0723-2020 (Print))
- Gomez-Gil B, Thompson FL, Thompson CC, Swings J (2003) *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53 (1):239-243
- Hedrick RP (1998) Relationships of the host, pathogen, and environment: Implications for diseases of cultured and wild fish populations. *Journal of Aquatic Animal Health* 10 (2):107-111
- Hendrix RW (2002) Bacteriophages: Evolution of the Majority. *Theoretical Population Biology* 61 (4):471-480. doi:<http://dx.doi.org/10.1006/tpbi.2002.1590>
- Hendrix RW, Smith MCM, Burns RN, Ford ME, Hatfull GF (1999) Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (5):2192-2197
- Heo YJ, Lee CH, Baek MS, Ahn HM, Hwang YS, Park KH, Choi SH (2012) Morphological characterization of *Vibrio alginolyticus* specific bacteriophage isolated from fish farms on west coast of Korea. *Journal of fish pathology, The Korean Society of Fish Pathology* 25 (3):165-172. doi:10.7847/jfp.2012.25.3.165
- Higuera G, Bastías R, Tsertsivadze G, Romero J, Espejo RT (2013) Recently discovered *Vibrio anguillarum* phages can protect against experimentally induced vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 392–395 (0):128-133. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.013>
- Høj L, Bourne DG, Hall MR (2009) Localization, abundance and community structure of bacteria associated with *Artemia*: Effects of nauplii enrichment and antimicrobial treatment. *Aquaculture* 293 (3-4):278-285
- Høyland-Kroghsbo N, Mærkedahl R, Svenningsen S (2013) A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism. *mBio* 4(1):e00362-12 doi:10.1128/mBio00362-12
- IBM C (2012) IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.

- Inal JM (2003) Phage therapy: A reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 51 (4):237-244
- Inamura H, Nakai T, Muroga K (1985) An extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum*. *Bull Jap Soc Sci Fish* 51:1915-1920
- Jensen EC, Schrader HS, Rieland B, Thompson TL, Lee KW, Nickerson KW, Kokjohn TA (1998) Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (2):575-580
- Jensen MA, Faruque SM, Mekalanos JJ, Levin BR (2006) Modeling the role of bacteriophage in the control of cholera outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (12):4652-4657
- Jiang H, Dong H, Zhang G, Yu B, Chapman LR, Fields MW (2006) Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (6):3832-3845
- Jing-jing Z, Chang C, Peng L, Chun-hua R, Xiao J, Zhe Z, Chao-qun H (2011) SYBR Green I-based real-time PCR targeting the rpoX gene for sensitive and rapid detection of *Vibrio alginolyticus*. *Molecular and Cellular Probes* 25 (2-3):137-141. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2011.02.002>
- Joerger RD (2003) Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science* 82 (4):640-647
- Johannes L, Römer W (2010) Shiga toxins from cell biology to biomedical applications. *Nature Reviews Microbiology* 8 (2):105-116
- Jun JW, Kim JH, Shin SP, Han JE, Chai JY, Park SC (2013) Protective effects of the *Aeromonas* phages pAh1-C and pAh6-C against mass mortality of the cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 416-417 (0):289-295. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.045>
- Kahla-Nakbi AB, Chaieb K Fau - Besbes A, Besbes A Fau - Zmantar T, Zmantar T Fau - Bakhrouf A, Bakhrouf A (2006) Virulence and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Tunisian cultured gilthead sea bream and sea bass outbreaks. (0378-1135 (Print))
- Kanno T, Nakai T, Muroga K (1989) Mode of Transmission of Vibriosis among Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Journal of Aquatic Animal Health* 1 (1):2-6. doi:10.1577/1548-8667(1989)001<0002:motova>2.3.co;2
- Karunasagar I, Pai R, Malathi GR (1994) Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128 (3-4):203-209
- Karunasagar I, Shivu MM, Girisha SK, Krohne G (2007) Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture* 268 (1-4 SPEC. ISS.):288-292
- Kim JF, Davidson N (1974) Electron microscope heteroduplex study of sequence relations of T2, T4, and T6 bacteriophage DNAs. (0042-6822 (Print))

- Kim JH, Son Js Fau - Choi YJ, Choi Yj Fau - Choresca CH, Choresca Ch Fau - Shin SP, Shin Sp Fau - Han JE, Han Je Fau - Jun JW, Jun Jw Fau - Kang DH, Kang Dh Fau - Oh C, Oh C Fau - Heo SJ, Heo Sj Fau - Park SC, Park SC (2012) Isolation and characterization of a lytic Myoviridae bacteriophage PAS-1 with broad infectivity in *Aeromonas salmonicida*. (1432-0991 (Electronic))
- Kocharunchitt C, Ross T, McNeil DL (2009) Use of bacteriophages as biocontrol agents to control *Salmonella* associated with seed sprouts. *International Journal of Food Microbiology* 128 (3):453-459
- Kokou F, Ferreira T, Tsigenopoulos CS, Makridis P, Kotoulas G, Magoulas A, Divanach P (2007) Identification of bacteria growing in association with batch cultures of the microalgae *Chlorella minutissima*. 8th International Marine Biotechnology at Conferencen Eilat, Israel:105
- Komorniczak M (2009) http://en.wikipedia.org/wiki/File:Bacterial_growth_en.svg.
- La Scola B, Desnues C, Pagnier I, Robert C, Barrassi L, Fournous G, Merchat M, Suzan-Monti M, Forterre P, Koonin E, Raoult D (2008) The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature* 455 (7209):100-104
- Lavigne R, Seto D, Mahadevan P, Ackermann HW, Kropinski AM (2008) Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the Podoviridae using BLASTP-based tools. *Research in Microbiology* 159 (5):406-414
- Le Breton AD (1999) Mediterranean finfish pathologies: Present status and new developments in prophylactic methods. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 19 (6):250-253
- Lee K-K (1995) Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabaricus*, Bloch et Schneider. *Microbial Pathogenesis* 19 (1):39-48. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0882-4010\(85\)90000-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0882-4010(85)90000-2)
- Lee KK, Yu SR, Chen FR, Yang TI, Liu PC (1996) Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Current Microbiology* 32 (4):229-231
- Levin BR, Bull JJ (2004) Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nature Reviews Microbiology* 2 (2):166-173
- Li J (2002) *Vibrio alginolyticus*: pathogenicity and its immunological control via vaccination in silver sea bream *Sparus sarba* Ph. D. Thesis. The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong
- Li J, Feng F, Liu X, Li QF, Woo NYSea (1998) *Vibrio alginolyticus* a pathogen of silver sea bream *Sparus sarba* cultured in Hong Kong. *J Fish China* 22:275-278
- Li J, Yie J, Foo RWT, Ling JML, Xu H, Woo NYS (1999) Antibiotic resistance and plasmid profiles of *Vibrio* isolates from cultured silver sea bream, *Sparus sarba*. *Marine Pollution Bulletin* 39 (1-12):245-249
- Lin YR, Chiu Cw Fau - Chang F-Y, Chang Fy Fau - Lin C-S, Lin CS (2012) Characterization of a new phage, termed varphiA318, which is specific for *Vibrio alginolyticus*. (1432-8798 (Electronic))

- Lin YR, Lin CS (2012) Genome-wide characterization of *Vibrio* phage phipp2 with unique arrangements of the mob-like genes. (1471-2164 (Electronic))
- Liu PC, Lin Jy Fau - Hsiao P-T, Hsiao Pt Fau - Lee K-K, Lee KK (2004) Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum*. (0233-111X (Print))
- Lorch A (1999) Bacteriophages: An alternative to antibiotics? Biotechnology and Development Monitor (39):14-17
- Love M, Teebken-Fisher D, Hose JE (1981) *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. Science 214 (4525):1139-1140
- Lunder T, Evensen O, Holstad G, Hastein T (1995) Winter ulcer' in the Atlantic salmon *Salmo salar*. Pathological and bacteriological investigations and transmission experiments. Diseases of Aquatic Organisms 23 (1):39-49
- Madigan M, Martinko J, Stahl D, Clark D (2010) Brock Biology of Microorganisms (13th Edition). Benjamin Cummings. doi:citeulike-article-id:10894293
- Madsen L, Bertelsen SK, Dalsgaard I, Middelboe M (2013) Dispersal and survival of *Flavobacterium psychrophilum* phages in vivo in rainbow trout and *in vitro* under laboratory conditions: Implications for their use in phage therapy. Applied and Environmental Microbiology 79 (16):4853-4861
- Magariños B, Couso N, Noya M, Merino P, Toranzo AE, Lamas J (2001) Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture 195 (1-2):17-21. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00547-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00547-0)
- Martínez-Díaz SF, Hipólito-Morales A (2013) Efficacy of phage therapy to prevent mortality during the vibriosis of brine shrimp. Aquaculture 400-401:120-124
- Martins ML, Mouriño JLP, Fezer GF, Buglione Neto CC, Garcia P, Silva BC, Jatobá A, Vieira FN (2010) Isolation and experimental infection with *Vibrio alginolyticus* in the sea horse, *Hippocampus reidi* ginsburg, 1933 (Osteichthyes: Syngnathidae) in Brazil. Isolamento e infecção experimental de *Vibrio alginolyticus* em cavalo-marinho, *Hippocampus reidi* ginsburg, 1933 (Osteichthyes: Syngnathidae) no Brasil 70 (1):205-209
- Mateus L, Costa L, Silva YJ, Pereira C, Cunha A, Almeida A (2014) Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. Aquaculture 424-425:167-173
- Mathur MD, Vidhani S, Mehndiratta PL (2003) Bacteriophage therapy: An alternative to conventional antibiotics. Journal of Association of Physicians of India 51 (JUN):593-596
- Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, Ikeuchi M, Tani T, Fujieda M, Wakiguchi H, Imai S (2005) Bacteriophage therapy: A revitalized therapy against bacterial infectious diseases. Journal of Infection and Chemotherapy 11 (5):211-219
- Matyar F (2007) Distribution and antimicrobial multiresistance in Gram-negative bacteria isolated from Turkish sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1781) farm. Annals of Microbiology 57 (1):35-38

- McIntosh D, Ji B, Forward BS, Puvanendran V, Boyce D, Ritchie R (2008) Culture-independent characterization of the bacterial populations associated with cod (*Gadus morhua* L.) and live feed at an experimental hatchery facility using denaturing gradient gel electrophoresis. *Aquaculture* 275 (1-4):42-50
- Merril CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S, Adhya S (1996) Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (8):3188-3192
- Merril CR, Scholl D, Adhya S (2006) Phage therapy In: Calendar R (ed) *The Bacteriophage*. Oxford University Press, New York:725-741
- Middelboe M, Holmfeldt K, Riemann L, Nybroe O, Haaber J (2009) Bacteriophages drive strain diversification in a marine *Flavobacterium*: implications for phage resistance and physiological properties. *Environmental Microbiology* 11 (8):1971-1982. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01920.x
- Miedzybrodzki R, Fortuna W, Weber-Dabrowska B, Górski A (2007) Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment. *Postepy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)* 61:461-465
- Morrison S, Rainnie DJ (2004) Bacteriophage therapy: an alternative to antibiotic therapy in aquaculture? *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Science*:2532
- Motulsky H, Christopoulos A (2004) *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression : A Practical Guide to Curve Fitting: A Practical Guide to Curve Fitting*. Oxford University Press, New York
- Munro PD, Birkbeck TH, Barbour A (1993) Influence of rate of bacterial colonisation of the gut of the turbot larvae on larval survival In Reinertsen H Dahle LA Jorgensen L Tvinnereim K (eds). *Fish Farming Technology* AA Balkema, Rotterdam:85-92
- Muramatsu K, Matsumoto H (1991) Two generalized transducing phages in *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*. *Microbiology and Immunology* 35 (12):1073-1084
- Muroga K, De La Cruz MC (1987) Fate and location of *Vibrio anguillarum* in tissues of artificially infected ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Fish Pathology*, 22 (2):99-103.
- Nakai T (2010) Application of bacteriophages for control of infectious diseases in aquaculture. In "Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens". Ed Sabour and Griffiths, ASM Press, Washington, DC 257-272
- Nakai T, Park SC (2002) Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in Microbiology* 153 (1):13-18. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01280-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01280-3)
- ncbi/ICTV (2006) The Universal Virus Database, 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB>
- Nelson D (2004) Phage Taxonomy: We Agree To Disagree. *Journal of Bacteriology - American Society of Microbiology* 186 (21). doi:10.1128/JB.186.21.7029-7031.2004

- Oakey HJ, Cullen BR, Owens L (2002) The complete nucleotide sequence of the *Vibrio harveyi* bacteriophage VHML. *Journal of Applied Microbiology* 93 (6):1089-1098
- Oakey HJ, Owens L (2000) A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia. *Journal of Applied Microbiology* 89 (4):702-709
- Oliveira J, Castilho F, Cunha A, Pereira MJ (2012) Bacteriophage therapy as a bacterial control strategy in aquaculture. *Aquaculture International* 20 (5):879-910
- Oliver JD, Pruzzo C, Vezzulli L, Kaper JB (2013) *Vibrio* species In: Doyle MP Buchanan RS (eds) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* 4th edn. ASM, Washington:401-440
- Otto BR, Verweij-Van Vught AMJJ, MacLaren DM (1992) Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 18 (3):217-233
- Park SC, Nakai T (2003) Bacteriophage control of *Pseudomonas plecoglossicida* infection in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 53 (1):33-39
- Park SC, Shimamura I, Fukunaga M, Mori KI, Nakai T (2000) Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4):1416-1422
- Pereira C, Silva YJ, Santos AL, Cunha Â, Gomes NCM, Almeida A (2011) Bacteriophages with potential for inactivation of fish pathogenic bacteria: Survival, host specificity and effect on bacterial community structure. *Marine Drugs* 9 (11):2236-2255
- Phumkhachorn P, Rattanachaiakunsopon P (2010) Isolation and partial characterization of a bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*. *African Journal of Microbiology Research* 4 (16):1794-1800
- Plumb JA (1999) *Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes*. Iowa: Iowa State University Press
- Popova AV, Zhilenkov EL, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Volozhantsev NV (2012) Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters* 332 (1):40-46
- Prol-García MJ, Planas M, Pintado J (2010) Different colonization and residence time of *Listonella anguillarum* and *Vibrio splendidus* in the rotifer *Brachionus plicatilis* determined by real-time PCR and DGGE. *Aquaculture* 302 (1-2):26-35
- Pruzzo C, Huq A, Colwell RR, Donelli G (2005) Pathogenic *Vibrio* species in marine and estuarine environment In Belkin, S. Colwell, R.R. (eds) *Ocean and Health pathogens in the marine environment*. Springer, Heidelberg:217-252
- Rakhuba DV, Kolomiets EI, Szwajcer Dey E, Novik GI (2010) Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology* 59 (3):145-155
- Rigos G, Nengas I Fau - Alexis M, Alexis M Fau - Troisi GM, Troisi GM (2004) Potential drug (oxytetracycline and oxolinic acid) pollution from Mediterranean sparid fish farms. (0166-445X (Print))

- Roch P (1999) Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172 (1-2):125-145
- Rodgers LJ, Burke JB (1988) Aetiology of 'red spot' disease (vibriosis) with special reference to the ectoparasitic digenean *Prototransversotrema steeri* (Angel) and the sea mullet, *Mugil cephalus* (Linnaeus). *Journal of Fish Biology* 32 (5):655-663
- Rodriguez-Valera F, Martin-Cuadrado AB, Rodriguez-Brito B, Pašić L, Thingstad TF, Rohwer F, Mira A (2009) Explaining microbial population genomics through phage predation. *Nature Reviews Microbiology* 7 (11):828-836
- Rogers R (1989) The bacteriology of teleosts In Roberts RJ *Fish Pathology* 2nd edition Bailliere Tindall, London 289-319
- Romero J, Feijoo CG, Navarrete P (2012) Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives, Health and Environment in Aquaculture, Dr. Edmir Carvalho (Ed.), ISBN: 978-953-51-0497-1, InTech, DOI: 10.5772/28157. Available from: <http://www.intechopen.com/books/health-and-environment-in-aquaculture/antibiotics-in-aquaculture-use-abuse-and-alternatives>.
- Salvesen I, Reitan K, Skjermo J, Øie G (2000) Microbial environments in marine larviculture: Impacts of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. *Aquaculture International* 8 (4):275-287. doi:10.1023/a:1009200926452
- Sandeep K (2006) Bacteriophage precision drug against bacterial infections. *Current Science* 90 (5):631-633
- Santos Y, Bandín I, Nieto TP, Barja JL, Toranzo AE, Ellis AE (1991) Cell-Surface-Associated Properties of Fish Pathogenic Bacteria. *Journal of Aquatic Animal Health* 3 (4):297-301. doi:10.1577/1548-8667(1991)003<0297:csapof>2.3.co;2
- Sawabe T, Kita-Tsukamoto K, Thompson FL (2007) Inferring the Evolutionary History of *Vibriosis* by Means of Multilocus Sequence Analysis. *Journal of Bacteriology - American Society of Microbiology* 189 (21):7932-7936. doi:10.1128/JB.00693-07
- Schaperclaus W (1991) *Fish diseases* (eds) Schaperclaus, W. Kulow, H. Schreckenbach, K. (translated from German). Published for the US Dept of the Interior and the National Science Foundation, Washington DC BY Amerind Pub Co New Delhi
- Schiewe M (1983) *Vibrio ordalii* as a cause of vibriosis in salmonid fish In: Crosa J.H. (eds) *Bacterial and Viral Diseases of Fish*. Washington Sea Grant, Seattle:31-40
- Schlesinger M (1932) Adsorption of bacteriophage to homologous bacteria. 11. Quantitative investigation of adsorption velocity and saturation, estimation of particle size of the bacteriophage. *Z Hyg Infektionskrankh* 114 149-160 (Translated in *Papers on Bacterial -Viruses*, Edited by G S STENT Little Brown & Co, Boston, 1960)
- Schwartz M (1980) Interactions of phages with their receptor proteins. In *Virus Receptors (Receptors and Recognition)* Randall, L.L., and Philipson, L. (eds). London, UK: Chapman & Hall:59-94.
- Scott AE, Timms Ar Fau - Connerton PL, Connerton PI Fau - Loc Carrillo C, Loc Carrillo C Fau - Adzfa Radzum K, Adzfa Radzum K Fau - Connerton IF, Connerton IF (2007) Genome

- dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. (1553-7374 (Electronic))
- Shivu MM, Rajeeva BC, Girisha SK, Karunasagar I, Krohne G (2007) Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India. *Environmental Microbiology* 9 (2):322-331
- Skjermo J, Vadstein O (1993) Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 255-256 (1):185-191
- Skjermo J, Vadstein O (1999) Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177 (1-4):333-343
- Sobhana KS (2009) Diseases of seabass in cage culture and control measures. National Fisheries Development Board:87-93
- Sonia AS, Lipton AP (2012) Pathogenicity and antibiotic susceptibility of *Vibrio* species isolated from the captive-reared tropical marine ornamental blue damsel fish, *Pomacentrus caeruleus* (Quoy and Gaimard, 1825). *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 41 (4):348-354
- Spanggaard B, Huber I, Nielsen J, Nielsen T, Gram L (2000) Proliferation and location of *Vibrio anguillarum* during infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 23 (6):423-427
- Srinivasan P, Ramasamy P, Brennan GP, Hanna REB (2007) Inhibitory Effects of Bacteriophages on the Growth of *Vibrio* sp., Pathogens of Shrimp in the Indian Aquaculture Environment. *Asian J Anim Vet Adv* 2:166-183
- Stenholm AR, Dalsgaard I, Middelboe M (2008) Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (13):4070-4078
- Sulakvelidze A (2011) The challenges of bacteriophage therapy. *Industrial Pharmacy* (31):14-18
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris J.G, Jr. (2001) Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (3):649-659
- Sulakvelidze A, Morris J.G, Jr. (2001) Bacteriophages as therapeutic agents. *Annals of Medicine* 33 (8):507-509
- Summers WC (1999) Bacteriophage discovered In Felix d'Herelle and the origins of Molecular Biology. Yale University Press, New Heaven CT:47-59
- Suttle CA (2005) Viruses in the sea. *Nature* 437 (7057):356-361
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28 (10):2731-2739. doi:10.1093/molbev/msr121
- Thompson FL, Gevers D, Thompson CC, Dawyndt P, Naser S, Hoste B, Munn CB, Swings J (2005) Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9):5107-5115

- Thompson FL, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Swings J (2001) Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Systematic and Applied Microbiology* 24 (4):520-538
- Thompson FL, Iida T, Swings J (2004) Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68 (3):403-431
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research* 25 (24):4876-4882. doi:10.1093/nar/25.24.4876
- Toranzo AE, Barja JL (1993) Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3 (0):5-36. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030\(93\)90027-9](http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030(93)90027-9)
- Valpuesta JM, Sousa N, Barthelemy I, Fernández JJ, Fujisawa H, Ibarra B, Carrascosa JL (2000) Structural Analysis of the Bacteriophage T3 Head-to-Tail Connector. *Journal of Structural Biology* 131 (2):146-155. doi:<http://dx.doi.org/10.1006/jsbi.2000.4281>
- Villamil L, Figueras A, Planas M, Novoa B (2003) Control of *Vibrio alginolyticus* in Artemia culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture* 219 (1-4):43-56
- Vinod MG, Shivu MM, Umesha KR, Rajeeva BC, Krohne G, Karunasagar I, Karunasagar I (2006) Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture* 255 (1-4):117-124. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.12.003>
- Wagner PL, Waldor MK (2002) Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infection and Immunity* 70 (8):3985-3993
- Wang XH, Leung KY (2000) Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. *Microbiology* 146 (4):989-998
- Wang XH, Oon HL, Ho GWP, Wong WSF, Lim TM, Leung KY (1998) Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in vibrio-fish epithelial cell interactions. *Microbiology* 144 (11):2987-3002
- Weld RJ, Butts C, Heinemann JA (2004) Models of phage growth and their applicability to phage therapy. *Journal of Theoretical Biology* 227 (1):1-11
- Ye J, Ma Y, Liu Q, Zhao DL, Wang QY, Zhang YX (2008) Regulation of *Vibrio alginolyticus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. *Journal of Fish Diseases* 31 (3):161-169
- Yu Y-P, Gong T, Jost G, Liu W-H, Ye D-Z, Luo Z-H (2013) Isolation and characterization of five lytic bacteriophages infecting a *Vibrio* strain closely related to *Vibrio owensii*. *FEMS Microbiology Letters* 348 (2):112-119. doi:10.1111/1574-6968.12277
- YuGe usoPQ (2011) Comparison on Immunoprotective Effect of Bacteriophages of *Vibrio alginolyticus* and Vaccines of Bacterial Ghost. Guangdong Ocean University MSc thesis

- Yuksel SA, Thompson KD, Ellis AE, Adams A (2001) Purification of *Piscirickettsia salmonis* and associated phage particles. *Diseases of Aquatic Organisms* 44 (3):231-235
- Zhang XH, Austin B (2000) Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *Journal of Fish Diseases* 23 (2):93-102. doi:10.1046/j.1365-2761.2000.00214.x
- Zhao Z, Chen C, Hu CQ, Ren CH, Zhao JJ, Zhang LP, Jiang X, Luo P, Wang QB (2010) The type III secretion system of *Vibrio alginolyticus* induces rapid apoptosis, cell rounding and osmotic lysis of fish cells. *Microbiology* 156 (9):2864-2872
- Zorrilla I, Chabrillón M, Arijó S, Díaz-Rosales P, Martínez-Manzanares E, Balebona MC, Moriñigo MA (2003) Bacteria recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain. *Aquaculture* 218 (1-4):11-20