

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ



**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ STRESS ΚΑΙ ΤΟΥ
ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ
ΧΛΩΡΙΔΑ ΤΩΝ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΩΝ ΙΧΘΥΩΝ ΣΤΗΝ
ΕΛΛΑΔΑ**

ΜΑΡΙΑ Ε. ΓΙΑΓΝΙΣΗ

Βιολόγος Ωκεανογράφος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας &
Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καρδίτσα 2011

Στην οικογένεια μου

Στην καθηγήτριά μου Δρ. Φωτεινή Αθανασοπούλου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή εστιάζεται αφενός στη μελέτη της επίδρασης της καταπόνησης και αφετέρου στη μελέτη της επίδρασης του αιθέριου ελαίου της ρίγανης στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα και την υγεία των θαλασσινών εκτρεφόμενων στη Μεσόγειο ψαριών, τσιπούρας (*Sparus aurata* L.) και λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax* L.). Η διατριβή χωρίζεται σε επτά κεφάλαια: 1^ο : Εισαγωγή, 2^ο : Επίδραση της οξείας καταπόνησης στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών (λαβρακιού και τσιπούρας), 3^ο : Επίδραση παραγόντων χρόνιας καταπόνησης (χαμηλού οξυγόνου και ροής του νερού) στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα του εκτρεφόμενου λαβρακιού, 4^ο : Επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα και την υγεία της τσιπούρας και του λαβρακιού, 5^ο : Επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε μικτές προσβολές από βακτήρια και παράσιτα (ψείρες και κωπήποδα) στο λαβράκι, 6^ο : Συζήτηση και 7^ο : Βιβλιογραφία.

Στην Εισαγωγή, περιγράφονται η κατάσταση των υδατοκαλλιεργειών σε παγκόσμιο, ευρωπαϊκό και ελληνικό επίπεδο, οι κυριότερες βακτηριακές ασθένειες που πλήττουν τα εκτρεφόμενα στη Μεσόγειο είδη ψαριών, τα κυριότερα βακτήρια που απομονώθηκαν από ασθενή εκτρεφόμενα και άγρια θαλασσινά ψάρια στην Ελλάδα, σε χρονικό διάστημα εννέα ετών, μια προσωπική μελέτη (υπό δημοσίευση) - που δεν έγινε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής αυτής διατριβής- για την περιγραφή της συνήθους εντερικής βακτηριακής χλωρίδας των εκτρεφόμενων ειδών λαβρακιού και τσιπούρας και των αλλαγών της σε εποχιακή βάση, βιβλιογραφική ανασκόπηση για την καταπόνηση (οξεία και χρόνια) στα ψάρια, ο ρόλος της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας των ψαριών και η χρήση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης στην εκτροφή των ψαριών.

Στο δεύτερο κεφάλαιο, περιγράφονται 8 πειραματικές διαδικασίες και περιστατικά νοσημάτων σε εκτροφές ψαριών (6 για τα λαβράκι και 2 για την τσιπούρα) όπου φαίνεται η επίδραση της οξείας καταπόνησης στην εντερική χλωρίδα

και την υγεία των ψαριών. Έγιναν μικροβιολογικές εξετάσεις πρόνεφρου και εντέρου σε ομάδες λαβρακιών, που είχαν μολυνθεί φυσικά αλλά και πειραματικά με το βακτήριο *Listonella anguillarum*, κάτω από συνθήκες οξείας καταπόνησης (στρες) συλλογής και μεταφοράς ψαριών σε άλλες δεξαμενές. Στα περισσότερα ασυμπτωματικά ψάρια, το βακτήριο ανιχνεύθηκε μόνο στο έντερο, ενώ σε όλα τα ημιθανή ψάρια, που παρουσίαζαν συμπτώματα μόλυνσης, το βακτήριο ανιχνεύθηκε και στο έντερο και στον πρόνεφρο. Στις πειραματικές μολύνσεις λαβρακιών με το βακτήριο *Listonella anguillarum* που έγιναν χωρίς πρόκληση καταπόνησης, και μέχρι τη συγκέντρωση του βακτηρίου 10^7 , το βακτήριο δεν ανιχνεύθηκε ούτε στο έντερο αλλά ούτε και στα άλλα όργανα και η μόλυνση δεν κατέστη δυνατή. Επίσης έγιναν μικροβιολογικές εξετάσεις πρόνεφρου και εντέρου σε ομάδες υγιών λαβρακιών, πριν και μετά από έντονους χειρισμούς συλλογής και μεταφοράς τους. Βρέθηκε ότι βακτήρια, που υπήρχαν φυσιολογικά στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα τους, αλλά όχι στον πρόνεφρο, απομονώθηκαν, 1 έως 4 ημέρες μετά τους χειρισμούς, μόνον από τον πρόνεφρο όσων λαβρακιών είχαν ασθενήσει. Η καταπόνηση της συλλογής και της μεταφοράς μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση ασθενειών στα ψάρια, είτε γιατί δίνει την ευκαιρία σε παθογόνα βακτήρια, που υπάρχουν στο θαλασσινό νερό, να εισβάλλουν στο έντερο και από το έντερο στην κυκλοφορία του αίματος, όπως είναι η περίπτωση με το βακτήριο *Listonella anguillarum*, είτε γιατί επιτρέπει σε ευκαιρικά βακτήρια της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας, να μεταναστεύσουν και να εισβάλλουν στην κυκλοφορία του αίματος. Οι συνθήκες πειραματικής οξείας καταπόνησης, που εφαρμόσθηκαν στις τσιπούρες, δεν δημιούργησαν αξιόλογη θνησιμότητα και εισβολή βακτηρίων σε εσωτερικά όργανα. Η τσιπούρα είναι ανθεκτικότερη στην καταπόνηση από ότι το λαβράκι, όπως φάνηκε σε πειράματα οξείας καταπόνησης. Εντούτοις, μία έντονη προσβολή από το βλεφαριδοφόρο παράσιτο *Cryptocaryon irritans* ήταν σε θέση να προκαλέσει, δευτερογενή βακτηριακή προσβολή από το ευκαιρικό παθογόνο βακτήριο *Vibrio harveyi*, που προϋπήρχε στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα.

Στο τρίτο κεφάλαιο έγιναν 3 πειράματα. Στο πρώτο μελετήθηκε η επίδραση τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων οξυγόνου ($3,6 \pm 0,2$ ppm, $4,7 \pm 0,2$ ppm, και $8,2 \pm 0,2$ ppm) στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα λαβρακιών, αρχικού μέσου βάρους $78,9 \pm 3$ g, τα οποία χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες. Έγιναν 3 δειγματοληψίες, στις 6 εβδομάδες, στις 9 εβδομάδες και στις 17 εβδομάδες. Κατά την πρώτη δειγματοληψία, στις 6 εβδομάδες, η μεγαλύτερη συχνότητα του ευκαιριακού παθογόνου βακτηριδίου *Vibrio harveyi* παρατηρήθηκε στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα της ομάδας με την χαμηλότερη συγκέντρωση οξυγόνου. Κατά την δεύτερη δειγματοληψία, στις 9 εβδομάδες, στις υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, παρατηρήθηκε απουσία του *Vibrio harveyi* από την εντερική χλωρίδα. Μετά τις 9 εβδομάδες, οι συγκεντρώσεις του οξυγόνου μειώθηκαν ως εξής: ομάδα 1η: $2,9 \pm 0,2$ ppm, ομάδα 3η: $6,7 \pm 0,2$ ppm. Κατά την τρίτη δειγματοληψία, στις 17 εβδομάδες, το βακτήριο *V. harveyi* επανεμφανίσθηκε στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών της ομάδας με την υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου, αλλά στη χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου αυξήθηκε περαιτέρω η συχνότητά του. Φαίνεται ότι η παραμονή των λαβρακιών σε συνθήκες αυξημένης συγκέντρωσης οξυγόνου δεν ευνοεί την εγκατάσταση του *V. harveyi* στην εντερική τους μικροβιακή χλωρίδα. Στο δεύτερο πείραμα, σε πειραματική εκτροφή 3 ομάδων λαβρακιών, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου, δηλαδή 2,2 3,5 και 7 ppm για δύο μήνες, η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου δεν προκάλεσε αύξηση στο ολικό αερόβιο μικροβιακό φορτίο της εντερικής χλωρίδας των λαβρακιών. Η υψηλότερη πρόσληψη τροφής στην κανονική συγκέντρωση οξυγόνου συγκρινόμενη με την πρόσληψη τροφής, στη χαμηλότερη συγκέντρωση οξυγόνου, είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του ολικού αερόβιου βακτηριδιακού φορτίου κατά 5 τουλάχιστον φορές. Υπήρξε διαφοροποίηση στην εμφάνιση των βακτηριακών ειδών της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας των λαβρακιών στις διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης (80%) του βακτηρίου *Vibrio harveyi* στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών του κανονικού οξυγόνου συνδυάστηκε με το μεγαλύτερο ποσοστό βακτηριακής προσβολής (26,6%), μετά από

οξεία καταπόνηση, στην περίπτωση της επαναφοράς των ψαριών στις αρχικές δεξαμενές εκτροφής. Η περαιτέρω καταπόνηση, λόγω αλλαγής περιβάλλοντος (δεξαμενής), προκάλεσε αύξηση της μέσης βακτηριακής προσβολής των λαβρακιών σε όλες τις συγκεντρώσεις του οξυγόνου. Στο τρίτο πείραμα, παρατηρήθηκε ποσοτική και ποιοτική διαφοροποίηση στο αερόβιο βακτηριακό φορτίο της εντερικής χλωρίδας, μεταξύ δύο ομάδων λαβρακιών που εκτράφηκαν κάτω από διαφορετικές συνθήκες οξυγόνου και ροής. Στην μία ομάδα, οι συνθήκες ήταν υποβαθμισμένες (3 ppm O₂ και ροή νερού 16 L/kg/h) και στην άλλη καλές (8 ppm O₂ και ροή νερού 30 L/kg/h). Η ομάδα των λαβρακιών, με τις υποβαθμισμένες συνθήκες του οξυγόνου και της ροής νερού, έδειξε επτά φορές υψηλότερες τιμές (712,5 CFU/g εντέρου) στο ολικό αερόβιο βακτηριακό φορτίο του εντέρου που ήταν 101,41 CFU/g εντέρου. Στο τέλος του πειράματος, έγινε πειραματική οξεία καταπόνηση μέσω χειρισμών συλλογής, συνωστισμού και μεταφοράς σε δύο δεξαμενές από κάθε ομάδα (οι υπόλοιπες δεξαμενές χρησιμοποιήθηκαν ως μη καταπονημένοι μάρτυρες). 20% των ψαριών στη μία δεξαμενή και 15% στη δεύτερη δεξαμενή, της ομάδας με τις υποβαθμισμένες συνθήκες, πέθαναν κατά τις πρώτες 4 ώρες. Δεν παρατηρήθηκαν θάνατοι (και στις δύο δεξαμενές) στην ομάδα με τις καλές συνθήκες, όπως και στους αρνητικούς μάρτυρες. Η υποβαθμισμένη ποιότητα του νερού στην εκτροφή των ψαριών πιθανόν μειώνει την αντίσταση στην οξεία καταπόνηση.

Επιπλέον έγινε μία σειρά 6 πειραμάτων με τσιπούρες και λαβράκια που είχαν τραφεί με τροφή που περιείχε αιθέριο έλαιο ρίγανης. Το ποσοστό 1% αιθέριου ελαίου ρίγανης (*Oreganum vulgare*) στην τροφή δεν δημιούργησε πρόβλημα στη λήψη της τροφής, τόσο στις τσιπούρες όσο και στα λαβράκια και δεν προκάλεσε διαφορές στην αύξηση των ιχθυδίων τσιπούρας, συγκριτικά με τους μάρτυρες. Ιστολογικές αναλύσεις δεν έδειξαν τοξική δράση του αιθέριου ελαίου στους ιστούς των ψαριών αυτών. Η χρήση 1% αιθέριου ελαίου ρίγανης, καθαρότητας 100%, στην τροφή αλλά και η χρήση του εμπορικού σκευάσματος Orego-Stim (που περιέχει διάλυμα 5% αιθέριου ελαίου ρίγανης *Origanum vulgare hirtum*) στην τροφή σε αναλογία 7,5 ml

αιθέριο έλαιο ρίγανης *Origanum vulgare*/Kg τροφής (δηλαδή 0,75% αιθέριου ελαίου ρίγανης στην τροφή) για 40 ημέρες, στην διατροφή ιχθυδίων τσιπούρας φαίνεται ότι συνέβαλε στην εξάλειψη του βακτηρίου *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα. Η χρήση του ίδιου ποσοστού αιθέριου ελαίου ρίγανης *Oreganum vulgare* (1%), για 67 ημέρες, συνέβαλε στη μείωση κατά 24,46% στις νεκρωτικές βλάβες στο σπλήνα, που προκαλούνται από την πειραματική μόλυνση των ιχθυδίων τσιπούρας από το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου που δεν λάμβανε αιθέριο έλαιο της ρίγανης στην τροφή. Πολλαπλά κοκκιώματα παρατηρήθηκαν μόνο στην ομάδα που τρεφόταν χωρίς την προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης, γεγονός που υποδηλώνει ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης θα μπορούσε να επιβραδύνει την εξέλιξη των βλαβών.

Τα ιχθύδια τσιπούρας δεν κατανάλωναν με ευχαρίστηση τροφή με 3% και 5% αιθέριο έλαιο ρίγανης. Οι τροφές αυτές, με τα υψηλά ποσοστά αιθέριου ελαίου ρίγανης, προκάλεσαν μείωση στην αύξηση των ιχθυδίων, ενώ κατανάλωναν ελάχιστα την τροφή με 10% αιθέριο έλαιο ρίγανης. Ιχθύδια τσιπούρας, που διατράφηκαν με τροφή που περιείχε 5% αιθέριο έλαιο ρίγανης, για 14 ημέρες, σε κλειστό κύκλωμα κυκλοφορίας θαλασσινού νερού, δεν έδειξαν διαφορά στο ποσοστό επιβίωσης στις μολύνσεις με *Photobacterium damsela* subsp. *piscida* και η θνησιμότητα δεν διαφοροποιήθηκαν έναντι των μαρτύρων. Λαβράκια μέσου βάρους 65g που είχαν διατραφεί επί 180 ημέρες (καλοκαιρινή και φθινοπωρινή περίοδο) με τροφή που περιείχε 1% αιθέριο έλαιο ρίγανης, έδειξαν αυξημένο ποσοστό επιβίωσης (48%) έναντι των μαρτύρων, μετά από πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *L. anguillarum*.

Έγιναν άλλα δύο πειράματα για να εξετασθεί η δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης, ως διατροφικό συμπλήρωμα, σε μικτές μολύνσεις από παράσιτα και βακτήρια στο λαβράκι. Στο πρώτο πείραμα, υπήρχε μικτή μόλυνση από την θαλάσσια ψείρα *Ceratothoa oestroides*, Risso, 1826, -φυσική μόλυνση- και το παθογόνο βακτήριο *Listonella (Vibrio) anguillarum* (πειραματική μόλυνση με εμβάπτιση). Χρησιμοποιήθηκαν 180 λαβράκια, μέσου βάρους 150 g , και

χωρίσθηκαν τυχαία σε 2 ομάδες με 3 επαναλήψεις η κάθε μία. Η μία ομάδα τρεφόταν με εμπορική τροφή (μάρτυρας) ενώ η άλλη ομάδα τρεφόταν με την εμπορική τροφή που περιείχε αιθέριο έλαιο ρίγανης *Origanum vulgare*, καθαρότητας 100%, σε συγκέντρωση 1 ml αιθέριο έλαιο /100 g τροφής. Μετά από 100 ημέρες εκτροφής, και οι δύο ομάδες μολύνθηκαν πειραματικά, με εμφάνιση, με το βακτήριο *Listonella (Vibrio) anguillarum*. Δεκαπέντε ημέρες μετά την πειραματική μόλυνση, η τροφή με το αιθέριο έλαιο ρίγανης είχε σαν αποτέλεσμα 34% βελτίωση στην επιβίωση, με ταυτόχρονη μείωση της παρασιτικής προσβολής. Στο δεύτερο πείραμα υπήρχε μικτή φυσική μόλυνση από το κωπήποδο *Lernathropus kroyeri* και το ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο *Vibrio harveyi*. Εκατόν είκοσι λαβράκια, μέσου βάρους 19 g, χωρίσθηκαν σε 3 ομάδες με δύο επαναλήψεις η κάθε μία. Η μία ομάδα τρεφόταν με εμπορική τροφή και ήταν ο μάρτυρας, ενώ οι άλλες δύο τρέφονταν με τροφή που είχε αιθέριο έλαιο ρίγανης (εμπορικό σκεύασμα Orego-Stim, συγκέντρωσης 5% σε αιθέριο έλαιο ρίγανης). Το θεραπευτικό σχήμα ήταν: Για 10 ημέρες οι δύο ομάδες λάμβαναν 0,9 ml αιθέριου ελαίου ρίγανης /100 g τροφής και για άλλες 35 ημέρες οι ομάδες αυτές λάμβαναν 0,45 ml και 0,25 ml αιθέριο έλαιο /100 g τροφής αντίστοιχα. Οι μέσες θνησιμότητες ήταν: ομάδα μάρτυρας 47,5%, ομάδες με 0,25 ml και 0,45 ml αιθέριο έλαιο ρίγανης /100 g τροφής 12,5% και 2,5 % αντίστοιχα. Το διατροφικό συμπλήρωμα αιθέριου ελαίου ρίγανης, στις αναφερόμενες συγκεντρώσεις, έχει σημαντική αντιπαρασιτική-αντιβακτηριακή δράση. Τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου ρίγανης, η καρβακρόλη και η θυμόλη, είναι κυρίως υπεύθυνα για αυτήν την δράση.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα ευρήματα αυτής της διατριβής συνοψίζονται στα εξής:

- Μετά από μία πειραματική ή φυσική μόλυνση λαβρακίων από το βακτήριο *Listonella anguillarum*, το έντερο αποικίζεται, σε μεγάλο βαθμό, γρηγορότερα από τα εσωτερικά όργανα, όπως ο πρόνεφρος. Ο αποικισμός στην

πειραματική μόλυνση, με το συγκεκριμένο βακτήριο, φαίνεται ότι προϋποθέτει προϋποθέτει καταπόνηση.

- Η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου των λαβρακιών εξαρτάται και από το περιβάλλον που διαβιούν. Η αλλαγή περιβάλλοντος είναι σημαντικός παράγοντας καταπόνησης, ιδιαίτερα εάν συνδυαστεί με έντονους χειρισμούς συλλογής και μεταφοράς.
- Το βακτήριο *Listonella anguillarum* μπορεί να προσβάλλει και να δημιουργήσει σηψαιμία στα λαβράκια 18 ώρες μετά από χειρισμούς οξείας καταπόνησης.
- Ένα μήνα μετά από αρχική φυσική μόλυνση από το βακτήριο *L. anguillarum*, οι θάνατοι έχουν σταματήσει τελείως. Οκτώ εβδομάδες μετά την αρχική φυσική μόλυνση από το *L. anguillarum*, το βακτήριο δεν ανιχνεύεται πλέον στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα του προσβεβλημένου πληθυσμού των λαβρακιών.
- Οι συνθήκες πειραματικής οξείας καταπόνησης που εφαρμόσθηκαν στις τσιπούρες δεν δημιούργησαν αξιόλογη θνησιμότητα και βακτηριακές επιμολύνσεις όπως στο λαβράκι. Εντούτοις, μία έντονη προσβολή τους από το βλεφαριδοφόρο παράσιτο *Cryptocaryon irritans* ήταν σε θέση να προκαλέσει, πιθανόν λόγω της μετανάστευσης (translocation) των μικροοργανισμών από το έντερο, δευτερογενή βακτηριακή προσβολή από το ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο *Vibrio harveyi*, που προϋπήρχε στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα χωρίς να προκαλεί πρόβλημα.
- Βακτήρια που προϋπάρχουν στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των λαβρακιών και δεν δημιουργούν προβλήματα, 1 έως 4 ημέρες μετά από χειρισμούς εκτεταμένης καταπόνησης που αφορούν συλλογή, μεταφορά και αλλαγή δεξαμενών, απομονώνονται, από τον πρόνεφρο σε σηψαιμικές καταστάσεις, όπου εμφανίζονται συμπτώματα δονακιώσεων και θάνατοι.

- Φαίνεται ότι, σε συνθήκες ελαφριάς υπεροξυγόνωσης, δεν ευνοείται ο αποικισμός της εντερικής χλωρίδας από το *Vibrio harveyi*.
- Η υποβαθμισμένη ποιότητα του νερού εκτροφής των λαβρακιών ως προς δύο ταυτόχρονους παράγοντες (χαμηλό οξυγόνο και χαμηλή ροή νερού), κατά την διάρκεια θερινής περιόδου, αυξάνει το αερόβιο βακτηριακό φορτίο στην εντερική χλωρίδα των λαβρακιών. Όταν όμως έγινε εκτροφή λαβρακιών, κατά την διάρκεια της άνοιξης, σε θαλασσινό νερό με χαμηλό οξυγόνο (της τάξης του 2,2 ppm), παρατηρήθηκε μείωση στο βάρος των λαβρακιών και στο αερόβιο βακτηριακό φορτίο της εντερικής τους χλωρίδας,
- Η μεγάλη ιχθυοπυκνότητα κατά την διάρκεια χειρισμών είναι σημαντικός παράγοντας καταπόνησης, σημαντικότερος από την εκτροφή σε συνθήκες χαμηλών συγκεντρώσεων οξυγόνου.
- Το είδος της συγκεκριμένης πειραματικής χρόνιας καταπόνησης, λόγω υποβαθμισμένης ποιότητας του νερού εκτροφής (συνδυασμός χαμηλής ροής-χαμηλού οξυγόνου), προκάλεσε μείωση αντοχής των λαβρακιών σε ένα επιπρόσθετο παράγοντα οξείας καταπόνησης.
- Δεν ανιχνεύεται βακτηριακή προσβολή στα ετοιμοθάνατα/ νεκρά λαβράκια 4 έως 5 ώρες μετά από έντονη καταπόνηση. Είναι δυνατόν όμως να ανιχνευθεί σε 18 ώρες μετά την έντονη καταπόνηση.
- Η χρήση $\leq 1\%$ αιθέριου ελαίου ρίγανης στην τροφή ιχθυοδίων τσιπούρας, για 35 ή 40 ημέρες, δεν επηρέασε την αύξησή τους και δεν προκάλεσε βλάβες στους ιστούς, αντίθετα είχε ως αποτέλεσμα την εξάλειψη του *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα.
- Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης (1% στην τροφή) μπορεί να καθυστερήσει την εξέλιξη διαφόρων νοσημάτων, μεταξύ των οποίων και της παστερέλλωσης.
- Η χρήση 1% αιθέριου ελαίου ρίγανης στην τροφή λαβρακιών, για 180 ημέρες (θερινή και φθινοπωρινή περίοδος), είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της

θνησιμότητας, κατά 48%, που προκλήθηκε από την πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *Listonella anguillarum*, συγκριτικά με τα λαβράκια μάρτυρες.

- Η χρήση αιθέριου ελαίου ρίγανης, στο επίπεδο $\leq 1\%$ στην τροφή, σε λαβράκια που είχαν υποστεί μικτή προσβολή από ισόποδα ή κωπήποδα παράσιτα και παθογόνα ή ευκαιριακά βακτηρίδια, έχει ένα σημαντικό αντιπαρασιτικό-αντιβακτηριδιακό αποτέλεσμα.

Ανακοινώσεις σχετιζόμενες με την παρούσα διατριβή

1. **M. Yiagnisis**, M. Alexis, A. Govaris and F. Athanassopoulou. Impact of acute stress on the intestinal microflora of European sea bass *Dicentrarchus labrax* and possible translocation. Book of Abstracts p.349. 13th International Conference on fish and shellfish diseases. 17th-21st September 2007, Grado, Italy.
2. **M. Γιαγνίσση**, M. Αλέξη, A. Γκόβαρης, E. Γκολομάζου και Φ. Αθανασοπούλου. Βακτηρίδια ιατρικής σημασίας του γένους *Vibrio* απομονωμένα από θαλασσινό νερό και ιχθείς στην Ελλάδα. 13^ο Συνέδριο Πανελληνίου Συλλόγου Ιχθυολόγων, 27-30 Σεπτεμβρίου 2007, Μυτιλήνη Λέσβος.
3. **M. Yiagnisis**, E. Golomazou, N. Solomakos, M. Alexis, K. Bitchava and F. Athanassopoulou. *Vibrio* species of medical importance, other than cholera, isolated from diseased farmed marine fish in Greece. Abstract CD.Aquaculture Europe 2007, Competing Claims, October 24-27, 2007, Istanbul, Turkey.
4. Angelidis Panagiotis, **Yiagnisis Mary**, Vatsos Ioannis, Bitchava Konstantina, Telioussis Konstantinos, Solomakos Nikolaos, Athanassopoulou Fotini. Aquaculture bacteria bank in Greece; Methodology and first results. The XVIth Symposium. Danube Delta National Institute for Research and Development, 20/09/2007, Tulcea, Romania.
5. **Γιαγνίσση M.**, Αλέξη M., Σολωμάκος N., Μπιτχαβά K., Γκόβαρης A., Αθανασοπούλου Φ. Η επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης ως διατροφικού

- συμπληρώματος, στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου της τσιπούρας *Sparus aurata*. Τόμος Περιλήψεων σελ.75. 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής παραγωγικών ζώων, υγιεινής- ασφάλειας τροφίμων ζωικής προέλευσης & προστασίας του καταναλωτή. Αθήνα, 14-16 Μαρτίου 2008.
6. Αγγελίδης Π., **Γιαγνίση Μ.**, Βάτσος Ι., Μπιτχαβά Κ., Τελιούσης Κ., Σολωμάκος Ν., Αθανασοπούλου Φ. Διερεύνηση-συλλογή των παθογόνων βακτηριδιακών στελεχών που εμφανίζονται στις ελληνικές υδατοκαλλιέργειες. Τόμος Περιλήψεων σελ.77. 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής παραγωγικών ζώων, υγιεινής- ασφάλειας τροφίμων ζωικής προέλευσης & προστασίας του καταναλωτή. Αθήνα, 14-16 Μαρτίου 2008.
 7. Kalamaki M.S., Teliousis K.C., **Yiagnisi M.**, Vatsos N. I., Mpithava K., Fotiadou V., Solomakos N., Angelidis P. and Athanassopoulou F. Molecular identification of pathogenic bacteria isolated from Greek aquaculture. 3o International Symposium on Hydrobiology and Fishery, Arta Greece, 8-10 October, 2008.
 8. **Γιαγνίση Μ.**, Αλέξη Μ. Ν., Μπιτχαβά Κ., Αγγελίδης Π., Καλαμάκη Μ. Σ., Βάτσος Ι. Ν., Νικολουδάκη Χ. και Αθανασοπούλου Φ. *Vibrio harveyi*: Απομόνωση, χαρακτηρισμός και μοριακή ταυτοποίηση. 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ, 12-14 Δεκεμβρίου 2008, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, Αθήνα .
 9. **Μ. Γιαγνίση**, Μ.Αλέξη, Κ. Μπιτχαβά, Φ. Αθανασοπούλου. Η επίδραση της οξείας καταπόνησης στην εντερική μικροχλωρίδα του λαβρακιού και της τσιπούρας και την πιθανή μετατόπιση παθογόνων βακτηρίων. 11^ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Αθήνα ,19-22 Μαρτίου, 2009, Βιβλίο πρακτικών, σελ. 408-409.
 10. **Μ. Γιαγνίση**, Κ. Μπιτχαβά, Π. Αγγελίδης, Ι.Ν. Βάτσος, Φ. Αθανασοπούλου. Απομόνωση και ταυτοποίηση του βακτηρίου *Vibrio harveyi* από εκτρεφόμενα

- θαλασσινά είδη ψαριών στην Ελλάδα. 11^ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 19-22 Μαρτίου, 2009, Βιβλίο πρακτικών, σελ. 410-411.
11. **Γιαγνίση Μ.**, Αλέξη Μ. Ν., Μπιτχαβά Κ., Γκόβαρης Α. και Αθανασοπούλου Φ. Επίδραση διαφορετικών επιπέδων οξυγόνου στην αερόβια εντερική μικροχλωρίδα του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) L. 9^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Ωκεανογραφίας και Αλιείας. Πάτρα, 13-16 Μαΐου 2009.
 12. **M. Yiagnisis**, M.N. Alexis, K. Bitchava, A. Govaris and F. Athanassopoulou. Effect of dietary oregano essential oil supplementation on combined infections by pathogenic bacteria-parasites (Sea lice and Copepods) in European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. The 14th EAFP International Conference “Diseases of Fish and Shellfish”, Sep 14, 2009- Sep 19, 2009, Prague, Czech Republic. Book of Abstracts, O-123 p.139.
 13. **Μαρία Γιαγνίση**, Ιωάννης Ν. Βάτσος, Κωνσταντίνα Μπιτχαβά, Μαρία Ν. Αλέξη και Φωτεινή Αθανασοπούλου. Επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης, ως διαιτητικού συμπληρώματος, στην ανάπτυξη ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων που προκαλούνται στην εκτρεφόμενη τσιπούρα (*Sparus aurata* L.) από το παθογόνο βακτηρίδιο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Πρακτικά 14^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Ιχθυολόγων, Πειραιάς, 6-9 Μαΐου 2010.
 14. **Yiagnisis M.**, Alexis, M. N. and Athanassopoulou, F. The role of intestinal microflora under acute stress conditions on the health of European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. Possible translocation. 2010 International Aquatic Veterinary Conference, Athens, Greece-July 12-19.
 15. **Yiagnisis M.**, Alexis, M. N., Govaris, A., Bitchava, K. and Athanassopoulou, F. The effect of different oxygen levels on the European sea bass health under conditions of acute stress. 2010 International Aquatic Veterinary Conference, Athens, Greece-July 12-19.
 16. **Yiagnisis, M.**, Alexis, M.N., Govaris, A., Ioakimidou, N., and

Athanassopoulou, F. Effect of different water renewal rates and oxygen levels on the intestinal microflora of European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. and acute stress tolerance. Abstract CD. Aquaculture Europe 2010, Seafarming tomorrow, October 5-8, Porto, Portugal.

Δημοσιεύσεις σχετιζόμενες με την παρούσα διατριβή

1. Vatsos I., Colorni, A., Bovo, G., Athanassopoulou, F. and **Yiagnisis, M.** Mediterranean region. In: R. Raynard, T. Wahli, I. Vatsos and S. Mortensen, Editors, *Review of Disease Interactions and Pathogen Exchange Between Farmed and Wild Finfish and Shellfish in Europe* (2007), pp. 248–312 DIP-net, Work Package 1., 2007. 450 pp.
2. Angelidis, P., **Yiagnisis, M.**, Vatsos, I., Bithava, K., Teliousis K., Solomakos N., Athanassopoulou, F., 2008. Aquaculture Bacterial Bank in Greece; Methodology and first results. Scientific Annals of the Danube Delta Institute, Proceedings of the XVIth Annual Scientific Symposium "Deltas & Wetlands" 20- 22 September, 2007, vol 14, pp 5-18.
3. **Yiagnisis, M.**, Solomakos, N., Bitchava, K., Alexis, M.N. and Athanassopoulou, F., 2011. *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* isolated from marine fish in Greece. *Journal of Applied Ichthyology* accepted.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Φ. Αθανασοπούλου, Τακτική Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα
Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας & Υδατοκαλλιεργειών, Τμήμα Κτηνιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Α. Γκόβαρης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Μ. Αλέξη, Ερευνήτρια Α΄, Διευθύντρια Ερευνών, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Διατροφής και Παθολογίας, Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών, Ελληνικό Κέντρο
Θαλασσίων Ερευνών Αθήνας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	
Φ. Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Ε. Μπουρτζή-Χατζοπούλου, Καθηγήτρια	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Α. Γκόβαρης, Αναπληρωτής Καθηγητής	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Μ. Αλέξη, Ερευνήτρια Α΄	Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών Αθήνας
Ι. Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Π. Πανταζής, Λέκτορας	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Ν. Σολωμάκος, Λέκτορας	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE



**IMPACT OF STRESS EFFECT AND OREGANO
ESSENTIAL OIL ON THE MICROFLORA OF FARMED
FISH IN GREECE**

MARY E. YIAGNISIS

Biologist - Oceanographer

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY**

Work carried out at the Laboratory of Ichthyology and Aquatic Animal Health
of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Karditsa Greece 2011

ABSTRACT

The present thesis concerns the study of the impact of stress and oregano essential oil supplementation on the intestinal microflora and health of Mediterranean farmed marine fish European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.) The thesis is divided into seven chapters: 1^o : Introduction, 2^o : Impact of acute stress on the intestinal microflora of farmed sea bass and sea bream, 3^o : Impact of chronic stress (low oxygen and water flow) on the intestinal microflora of farms sea bass, 4^o : Impact of oregano essential oil supplementation on the intestinal microflora and health of sea bream and sea bass., 5^o : Effect of dietary oregano essential oil supplementation on combined infections by pathogenic bacteria-parasites(sea lice and copepods) in European sea bass, 6^o : Discussion and 7^o : Bibliography.

In Introduction, the world, European and Greek aquaculture situation is described as well as main bacteriological diseases affecting Mediterranean farmed fish, main bacteria, isolated by me, from diseased farmed and wild fish in Greece during nine years and a personal study describing normal intestinal microflora of farmed sea bass and sea bream and seasonal changes. Literature review for stress (acute and chronic) in fish is also described in this chapter as well as for the role of intestinal microflora of fish and the role of essential oil of oregano in the rearing of fish.

In the second chapter, eight experimental procedures and natural cases are described (6 for sea bass and 2 for sea bream) where the impact of acute stress on the intestinal microflora and health of fish is described. Microbiological tests of head kidney and intestine in sea bass -naturally and experimentally infected- by *Listonella anguillarum* under acute stress conditions (handling and transportation in other tanks) were performed. In most asymptomatic fish, bacterium was detected only in the gut but in all moribund fish showing symptoms of infection, the bacterium was

detected in both intestine and head kidney. In experimental infections of sea bass - without stress-by *Listonella anguillarum* up to the concentration of 10^7 bacteria/ml sea water, the bacterium was detected neither in the intestine in other organs and the infection was not possible. Microbiological tests of head kidney and intestine were also performed in groups of healthy sea bass, before and after intense manipulations (collection and transportation). It was also found that bacteria existed in the intestinal microflora, but not in the head kidney, were isolated, 1 to 4 days after the manipulation, from the head kidney of those bass that were shown signs of disease. The stress of collection and transportation may play an important role in the occurrence of diseases in fish, either because it gives the opportunity for pathogenic bacteria, present in seawater, to invade the gut and from the gut into the bloodstream, as is the case with bacterium *Listonella anguillarum*, or because it allows dominant opportunistic bacteria of intestinal microflora to translocate and invade the bloodstream, creating disease.

The influence of three different levels of oxygen on the intestinal microflora of sea bass was studied. Fish with initial weigh $78,9 \pm 3$ g were divided in three groups where the levels of oxygen were: $3,6 \pm 0,2$ ppm, $4,7 \pm 0,2$ ppm, and $8,2 \pm 0,2$ ppm. Three samplings were performed, on week 6, 9, and 17. After 6 weeks, the higher incidence of *V. harveyi* in the intestinal microflora was observed in sea bass maintained at the low level of oxygen. After 9 weeks, absence of the *V. harveyi* from the intestinal microflora was observed under conditions of high level of oxygen. After 9 weeks the oxygen levels were decreased as follows: Group 1: $2,9 \pm 0,2$ ppm , Group 3: $6,7 \pm 0,2$ ppm. After 17 weeks *V. harveyi* was appeared again in the intestinal microflora of fish maintained at high level of oxygen but at low level of oxygen the incidence of the bacterium was increased further. It seems that maintaining sea bass at slightly high levels of oxygen does not help the presence of *V. harveyi* in the intestinal microflora. In one experimental trial 3 groups of sea bass were farmed under different oxygen levels 2,2, 3,5 and 7 ppm for two months. The

2,2 ppm oxygen level did not cause an increase in total aerobic bacterial load of the intestinal microflora of sea bass. The higher food intake in normal oxygen level (7 ppm) compared with the lowest oxygen level had probably resulted in an increase of the total aerobic bacterial load for at least 5 times. There was a variation in the appearance of bacterial species of intestinal microflora of sea bass at different oxygen levels. The highest prevalence (80%) of the bacterium *Vibrio harveyi* in the intestinal microflora of fish rearing under normal oxygen level was combined with the highest prevalence of the bacterial infection (26,6%) after acute stress when the fish returned to their original rearing tanks. The additional stress due to change of environment (tank) caused an increase in the average bacterial infection of the bass at all levels of oxygen.

Quantitative and qualitative differentiation was observed in the aerobic bacterial load of the intestinal flora between the two examined groups of sea bass reared under poor (3 ppm O₂, flow rate at 16 L kg⁻¹h⁻¹) and good (8 ppm O₂, flow rate at 30 L kg⁻¹h⁻¹) conditions of oxygen and water flow respectively. The experiment was conducted during spring for 9 weeks at temperature 18,5-20°C. The group of sea bass with the poor conditions indicated higher values (712,5 CFU/g of intestine) of bacterial load in the intestine while the respective load in the group with good conditions was 101,41 CFU/g intestine. At the end of the experiment, an acute stress was experimentally induced in fish from two tanks from each group in the form of intense handling. The remaining tanks were used as unstressed controls. Four fish from the one tank and 3 from the second tank of the group with poor conditions died during the first 4 hours. No mortalities were observed (in both tanks) in the group with normal conditions or in negative controls. Poor water quality in the rearing of fish may reduce the resistance to acute stress.

The experimental conditions of acute stress applied to sea bream did not cause significant mortality and bacterial infections. Sea bream is more resistant to handling stress than bass as shown in previous experiments with acute stress

conditions. However, a strong infestation by the ciliated parasite *Cryptocaryon irritans* was able to induce, possibly due to bacterial translocation, secondary bacterial infection by the opportunistic pathogenic bacterium *Vibrio harveyi*, which pre-existed in intestinal microflora.

A series of 6 experiments with sea bass and sea bream fish fed with food containing essential oil of oregano were performed. One per cent supplementation of oregano essential oil in the diet was well accepted by both bream and bass and did not cause differences in growth of juvenile sea bream compared to controls. Histological analysis showed no toxicity of essential oil in the tissues of fish. The use of 1% oregano essential oil, *Oreganum vulgare* 100% in the food and also the commercial Orego-Stim formulation (containing 5% essential oil of oregano *Oreganum vulgare* hirtum in the ratio 7,5 ml oregano essential oil kg⁻¹ food) applied for 40 days on diet of juvenile sea bream seem to have contributed to the elimination of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from their intestine. The use of the same percentage of oregano essential oil (1%) for 67 days contributed to the 24,46% reduction of necrotic lesions in the spleen caused by experimental infection of juvenile sea bream by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*-compared to controls not receiving essential oil of oregano on food. Multiple granulomas were observed only in group fed without essential oil of oregano, suggesting that oregano essential oil could decrease the development of the lesions. Food supplemented with 3% and 5% oregano essential oil was not desirable in juvenile bream and caused a reduction in their growth, while the food supplemented with 10% essential oil of oregano was not acceptable. Bream fry fed with a diet containing 5% essential oil of oregano for 14 days in a closed circulated sea water system showed no difference in survival to experimental infection by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and mortalities were not significant different compared to controls. Sea bass (with average weight of 65 g) fed for 180 days (summer and autumn) with food containing

1% oregano essential oil showed an increased survival rate (48%) compared to controls after experimental infection by *L. anguillarum*.

Two more experiments were performed in order to examine the effect of dietary supplementation of oregano essential oil on combined infections by bacteria-parasites in farmed sea bass. The first study was carried out to examine the effect of dietary of oregano essential oil on combined infection by the isopod sea lice *Ceratomyxa oestroides* (Risso, 1826), and the orally challenged pathogenic bacterium *Listonella (Vibrio) anguillarum*. A total of 180 sea bass, (mean weigh 150 $\pm$ 30 g) naturally infected by the isopod *Ceratomyxa oestroides*, were randomly divided into 2 groups with three replicates each. One group was given a commercial diet (control) while the other was fed with the commercial diet supplemented with oregano essential oil (100% pure oil at a dose of 1ml essential oil/100 g of food). After 100 days experimental rearing, both groups were experimentally infected by the bacterium *Listonella (Vibrio) anguillarum* at a level of $0,6 \cdot 10^7$ CFU/ ml sea water. Fifteen days after the experimental infection, supplementation with dietary oregano oil resulted in 34% improvement of the survival rate of sea bass treated and in 50% decrease of parasite presence. The second study was carried out in order to evaluate the therapeutic effect on combined natural infection by the copepod *Lernathropus* sp. and the opportunistic pathogen *Vibrio harveyi*. A total of 120 sea bass (mean weigh 19 $\pm$ 4 g), naturally infected by the copepod *Lernathropus* sp. and the opportunistic bacterium *Vibrio harveyi* were divided into 3 groups with two replicates each. One group was given a commercial diet (control) while the other two were fed with the commercial diet supplemented with oregano essential oil. The oregano essential oil was in the form of a liquid, commercially known as Orego - Stim (Ecopharm Hellas, SA, Greece) containing 5% oregano essential oil. The therapeutic scheme was designed as follows: for 10 days both groups had a diet with 0,9 ml of oregano essential oil /100g food. At the end of ten days the dosage of oregano essential oil was adjusted at 0,45ml essential oil /100 g of food for one group and

0.25ml essential oil /100 g food for the other group for 35 days. At the end of the experiment, mean mortalities were estimated: control group 47,5%, group feeding 0,45ml oregano essential oil /100 g of food 2,5% and group feeding 0,25ml oregano essential oil /100 g of food 12.5%. Results showed that dietary oregano oil at the inclusion level of 0,9-1ml /100 g food has an important antiparasitic-antibacterial effect. Carvacrol and thymol, the two major phenols that constitute about 78-82% of the essential oil, are principally responsible for this activity.

From the findings of the present study the following conclusions can be drawn:

- The gut is colonized faster than internal organs (such as head kidney) after an experimental or natural infection of sea bass by the bacterium *Listonella anguillarum*. Colonization, in experimental infection, by this bacterium, involves stress.
- Gut microflora of bass depends on the environment they live. Changing of environment is an important factor of stress, especially when it is combined with intense collection and transport operations.
- *Listonella anguillarum* can infect bass and create sepsis 18 hours after infection, when there is simultaneous acute handling stress.
- Mortality has stopped completely one month after initial natural infection of sea bass by the bacterium *L. anguillarum*. The bacterium is no longer detected in the intestinal microflora of the affected population of sea bass, eight weeks after the initial natural infection.
- Conditions of experimental acute stress applied to the sea bream have not caused significant mortality and bacterial infections such as in sea bass, but a great infestation of sea bream by the ciliated parasite *Cryptocaryon irritans* was able to cause, possibly due to bacterial translocation, secondary bacterial infection by the opportunistic pathogenic bacterium *Vibrio harveyi*, which pre-existed in intestinal microflora, without causing a problem.

- Bacteria pre-existed in the intestinal microflora of sea bass without creating problems, can be isolated from head kidney of fish showing symptoms and mortality, 1-4 days after handling stress like extensive collection, transportation and change of tanks.
- It seems that maintaining sea bass at slightly high levels of oxygen does not help the presence of *V. harveyi* in the intestinal microflora.
- The poor quality of sea water (low dissolved oxygen and low water flow) for sea bass rearing during summer, increased the load of the aerobic bacterial intestinal flora. However it was observed that rearing of sea bass in sea water with low dissolved oxygen (around 2,2 ppm), during spring, reduced the weight of the fish and the aerobic bacterial load in the intestinal flora of bass.
- Hi fish density during handling stress is an important agent for health, more important than rearing under low oxygen levels.
- No detectable bacterial infection can be found in moribund / dead sea bass, 4-5 hours after acute stress. However bacterial infection can be detected, 18 hours after intense stress.
- The specific type of experimental chronic stress (low water flow concentration and low oxygen concentration) caused a reduction in acute stress tolerance for sea bass.
- The use of $\leq 1\%$ dietary oregano essential oil supplementation, for 35 or 40 days, did not affect the growth of juvenile sea bream and did not cause damage to tissues but it had as result the elimination of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from the intestinal microflora.
- The use of 1% dietary oregano essential oil supplementation may delay the development of pasteurellosis in sea bream.
- The use of 1% dietary oregano essential oil supplementation for 180 days (summer and autumn period) resulted in 48% reduction of mortality caused

by *Listonella anguillarum* experimental infection compared to sea bass controls.

- The use of $\leq 1\%$ dietary oregano essential oil supplementation on combined infections by pathogenic bacteria-parasites (sea lice and copepods) in sea bass has an important antibacterial, antiparasitic effect.

ADVISOR COMMITTEE

F. Athanassopoulou, Professor, Supervisor

Laboratory of Fish Pathology, Ichthyology & Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

A. Govaris, Associate Professor, Member of advisory committee

Laboratory of Foods Hygiene of Animal Origin, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

M. Alexi, Researcher A', Member of advisory committee

Laboratory of Nutrition and Pathology, Aquaculture Institute, Hellenic Centre for Marine Research

EXAMINATION BOARD	
Professor F. Athanassopoulou	Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly
Professor E. Bourtzi-Chatzopoulou	School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki
Associate Professor A. Govaris	Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly
Researcher A', M. Alexi	Aquaculture Institute, Hellenic Centre for Marine Research
Associate Professor I. Pappas	Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly
Lecturer P. Pantazis	Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly
Lecturer N. Solomakos	Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

	ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	Σελ
		.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ		3
Ανακοινώσεις σχετιζόμενες με την παρούσα διατριβή		11
ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ- ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ		15
ABSTRACT		17
ADVISORY COMMITTEE – EXAMINATION BOARD		25
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ		26
Σκοποί της παρούσας διατριβής.....		36
Ευχαριστίες.		38
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο</u>		
ΕΙΣΑΓΩΓΗ		40
1.1.	Αλιεία και Υδατοκαλλιέργεια	41
1.2.	Νοσήματα και εκτρεφόμενα θαλασσινά ψάρια	49
1.2.1.	Κυριότερα βακτηριακά νοσήματα που πλήττουν την ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια.....	56
1.2.1.1.	Νοσήματα που οφείλονται σε βακτηριακά είδη της οικογένειας Vibrionaceae.....	56
1.2.1.1.1.	Νοσήματα που οφείλονται σε είδη του γένους <i>Vibrio</i> (Δονακιώσεις).....	57
1.2.1.1.1.1.	<i>Listonella (Vibrio) anguillarum</i>	58
1.2.1.1.1.2.	<i>Vibrio alginolyticus</i>	61
1.2.1.1.1.3.	<i>Vibrio vulnificus</i>	62

1.2.1.1.1.4.	<i>Vibrio harveyi</i>	64
1.2.1.1.1.5.	<i>Vibrio splendidus</i>	68
1.2.1.1.1.6.	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	69
1.2.1.1.1.7.	<i>Vibrio aestuarianus</i>	70
1.2.1.1.2.	Νοσήματα οφειλόμενες στο γένος <i>Photobacterium</i>	70
1.2.1.1.2.1.	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (= <i>Pasteurella piscicida</i>).....	71
1.2.1.1.2.2.	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	73
1.2.1.2.	<i>Aeromonas</i> spp.....	73
1.2.1.3.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	75
1.2.2.	Μελέτη κυριότερων βακτηρίων απομονωμένων από εκτρεφόμενα και άγρια θαλασσινά ψάρια που νοσούν στην Ελλάδα.....	75
1.2.2.1.	Βακτήρια απομονωμένα από λαβράκι.....	76
1.2.2.2.	Βακτήρια απομονωμένα από τσιπούρα.....	79
1.2.3.	Βακτήρια ιατρικής σημασίας απομονωμένα από θαλασσινό νερό και ψάρια στην Ελλάδα.....	82
1.3.	Λειτουργίες του εντέρου των ψαριών	83
1.3.1.	Εντερική μικροβιακή χλωρίδα στα ψάρια.....	84
1.3.2.	Εντερική μικροβιακή χλωρίδα στα ψάρια.....	84
1.3.3.	Μελέτη της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας του εκτρεφόμενου λαβρακιού <i>Dicentrarchus labrax</i>	87
1.3.4.	Μελέτη της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας της εκτρεφόμενης τσιπούρας <i>Sparus aurata</i>	88

1.4.	Χρόνια και οξεία καταπόνηση. Η επίδρασή τους στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των εκτρεφόμενων ψαριών.....	88
1.5.	Η επίδραση της ποιότητας του νερού στην εκτροφή των ψαριών.....	92
1.6.	Αιθέριο έλαιο ρίγανης.....	93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΑΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ ΚΑΙ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ.....		98
2.1.	ΛΑΒΡΑΚΙ-Πειραματικές μολύνσεις (2.1.1.-2.1.3.).....	99
2.1.1.	Πειραματικές μολύνσεις λαβρακιών με <i>Listonella anguillarum</i> . Εντοπισμός του υπεύθυνου βακτηρίου, σε έντερο και πρόνεφρο, σε συνθήκες χωρίς πρόκληση καταπόνησης και με πρόκληση καταπόνησης.....	99
2.1.1.1.	Σκοπός.....	99
2.1.1.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	99
2.1.1.2.1.	Ψάρια.....	99
2.1.1.2.2.	Βακτήρια.....	101
2.1.1.2.3.	Έντερο.....	102
2.1.1.3.	Αποτελέσματα.....	104
2.1.1.4.	Συμπεράσματα.....	107
2.1.2.	Εντοπισμός του βακτηρίου στους ιστούς έντερο και πρόνεφρο, κατά την εμφάνιση συμπτωμάτων μετά από πειραματική μόλυνση λαβρακιών με <i>Listonella anguillarum</i> ..	107

2.1.2.1.	Σκοπός.....	107
2.1.2.2.	Υλικά και μέθοδοι	107
2.1.2.2.1.	Ψάρια.....	107
2.1.2.2.2.	Κατασκευή αυτοσχέδιας πειραματικής μονάδας (challenge unit) πειραματικά προκαλούμενων μολύνσεων για ιχθύδια.	108
2.1.2.3.	Αποτελέσματα.....	109
2.1.2.4.	Συμπεράσματα.....	111
2.1.3.	Πειραματική μόλυνση λαβρακιών με <i>Listonella anguillarum</i> και εντοπισμός του βακτηρίου στους ιστούς έντερο και πρόνεφρο, πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων.....	111
2.1.3.1.	Σκοπός.....	111
2.1.3.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	111
2.1.3.3.	Αποτελέσματα.....	112
2.1.3.4.	Συμπεράσματα.....	114
2.2.	ΛΑΒΡΑΚΙ-Περιστατικά (φυσικές μολύνσεις 2.2.1-2.2.3.).....	115
2.2.1.	Περιστατικό 1. Απομόνωση του βακτηρίου <i>Listonella anguillarum</i> από πρόνεφρο και έντερο λαβρακιών κατά την διάρκεια περιστατικού δονακίωσης (φυσική μόλυνση) σε ιχθυομονάδα.....	115
2.2.1.1.	Σκοπός.....	115
2.2.1.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	115
2.2.1.3.	Αποτελέσματα.....	115
2.2.1.4.	Συμπεράσματα.....	116

2.2.2.	Περιστατικό 2°. Επίδραση του περιβάλλοντος και της καταπόνησης στην ποιοτική σύσταση της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας και την πρόκληση θνησιμότητας στα λαβράκια.....	116
2.2.2.1.	Σκοπός.....	116
2.2.2.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	117
2.2.2.2.1.	Ψάρια.....	117
2.2.2.3.	Αποτελέσματα.....	117
2.2.2.4.	Συμπεράσματα.....	120
2.2.3.	Περιστατικό 3. Παρακολούθηση διάρκειας δώδεκα εβδομάδων, της υγείας λαβρακιών με ταυτόχρονες μικροβιολογικές εξετάσεις πρόνεφρου και εντέρου σε πειραματικές δεξαμενές, κατά την διάρκεια χειρισμών μεταφοράς.....	120
2.2.3.1.	Σκοπός.....	120
2.2.3.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	120
2.2.3.3.	Αποτελέσματα.....	122
2.2.3.4.	Συμπεράσματα.....	127
2.3.	ΤΣΙΠΟΥΡΑ- Πειραματική καταπόνηση.....	128
2.3.1.	Πείραμα 1°. Επίδραση της οξείας καταπόνησης και της αλλαγής δεξαμενής στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα της τσιπούρας.	128
2.3.1.1.	Σκοπός.....	128
2.3.1.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	128

2.3.1.3.	Αποτελέσματα.....	129
2.3.1.4.	Συμπεράσματα.....	129
2.4.	ΤΣΙΠΟΥΡΑ- Περιστατικό (φυσική μόλυνση).....	129
2.4.1.	Περιστατικό 1°. Επίδραση της φυσικής προσβολής, από το παράσιτο <i>Cryptocaryon irritans</i>, ως παράγοντας καταπόνησης στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα της τσιπούρας (<i>Sparus aurata</i>).....	129
2.4.1.1.	Σκοπός.....	129
2.4.1.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	130
2.4.1.3.	Αποτελέσματα.....	130
2.4.1.4.	Συμπεράσματα.....	131
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3°</u> ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΧΡΟΝΙΑΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ (ΧΑΜΗΛΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΡΟΗΣ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ) ΣΤΗΝ ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ ΤΟΥ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟΥ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ.....		132
3.1.	Πείραμα 1° . Επίδραση διαφορετικών επιπέδων οξυγόνου στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα του λαβρακιού.....	133
3.1.1.	Σκοπός.....	133
3.1.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	134
3.1.3.	Αποτελέσματα.....	136
3.1.4.	Συμπεράσματα.....	142
3.2.	Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων οξυγόνου στην υγεία των ψαριών κάτω από συνθήκες οξείας καταπόνησης του λαβρακιού με ταυτόχρονη αλλαγής περιβάλλοντος (δεξαμενής).....	143

3.2.1.	Σκοπός.....	143
3.2.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	144
3.2.3.	Αποτελέσματα.....	149
3.2.4.	Συμπεράσματα.....	154
3.3.	Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων οξυγόνου και ροής νερού στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα του λαβρακιού.....	155
3.3.1.	Σκοπός.....	155
3.3.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	155
3.3.3.	Αποτελέσματα.....	160
3.3.4.	Συμπεράσματα.....	163
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4°</u> ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ.....		165
4.1.	Τσιπούρα.....	166
4.1.1.	Επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης, ως ασφαλούς διατροφικού συμπληρώματος, στην αύξηση του βάρους της τσιπούρας και στην βακτηριακή σύνθεση της χλωρίδας του εντέρου.....	166
4.1.1.1.	Σκοπός.....	166
4.1.1.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	166
4.1.1.3.	Αποτελέσματα.....	169
4.1.1.4.	Συμπεράσματα.....	176
4.1.2.	Η επίδραση του διαιτητικού συμπληρώματος αιθέριου	176

	ελαίου ρίγανης στην μείωση των ιστοπαθολογικών βλαβών που δημιουργούνται στο σπλήνα, μετά από πειραματική μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> στην εκτρεφόμενη τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i> L.).....	
4.1.2.1.	Σκοπός.....	176
4.1.2.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	176
4.1.2.3.	Αποτελέσματα.....	178
4.1.2.4.	Συμπεράσματα.....	179
4.1.3.	Επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων αιθέριου ελαίου ρίγανης στην αύξηση της τσιπούρας και την αντοχή σε πειραματικά επαγόμενη παστερέλλωση.....	179
4.1.3.1.	Σκοπός.....	180
4.1.3.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	180
4.1.3.3.	Αποτελέσματα.....	181
4.1.3.4.	Συμπεράσματα.....	188
4.1.4.	Η επίδραση του OREGOSTIM (υδατικό διάλυμα αιθέριου ελαίου ρίγανης <i>Oreganum vulgare hirtum</i>) ως διατροφικού συμπληρώματος στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου της τσιπούρας.....	188
4.1.4.1.	Σκοπός.....	188
4.1.4.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	188
4.1.4.3.	Αποτελέσματα.....	189
4.1.4.4.	Συμπεράσματα.....	190
4.2.	ΛΑΒΡΑΚΙ.....	190

4.2.1.	Επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης, ως ασφαλούς διατροφικού συμπληρώματος, στην επιβίωση λαβρακιών μετά από πειραματική μόλυνση με το βακτήριο <i>Listonella anguillarum</i>	190
4.2.1.1.	Σκοπός.....	190
4.2.1.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	186
4.2.1.3.	Αποτελέσματα.....	192
4.2.1.4.	Συμπεράσματα.....	194
4.2.2.	Μελέτη επίδρασης της χορήγησης (στην τροφή) αιθέριου ελαίου ρίγανης, με την μορφή του σκευάσματος Orego-Stim, κατά την χειμερινή περίοδο στην επιβίωση λαβρακιών μετά από πειραματική μόλυνση με το βακτήριο <i>Listonella anguillarum</i>	194
4.2.2.1.	Σκοπός.....	195
4.2.2.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	195
4.2.2.3.	Αποτελέσματα.....	196
4.2.2.4.	Συμπεράσματα.....	198
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5° ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ ΣΕ ΜΙΚΤΕΣ ΠΡΟΣΒΟΛΕΣ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΙΤΑ (ΨΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΚΩΠΗΠΟΔΑ) ΣΤΟ ΛΑΒΡΑΚΙ.....		199
5.1.	Επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε μικτές μολύνσεις από το παράσιτο ισόποδο <i>Ceratothoa oestroides</i> και το πειραματικά χορηγούμενο, με εμβάπτιση, βακτήριο <i>Listonella(Vibrio) anguillarum</i>	200
5.1.1.	Σκοπός.....	200
5.1.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	200
5.1.3.	Αποτελέσματα.....	201

5.1.4.	Συμπεράσματα.....	203
5.2.	Μελέτη της θεραπευτικής δράσης του αιθέριου ελαίου ρίγανης, με την μορφή του σκευάσματος Orego-Stim, σε μικτή φυσική προσβολή από το κωπήποδο <i>Lernathropus</i> <i>sp.</i> και το ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο <i>Vibrio harveyi</i>.....	204
5.2.1.	Σκοπός.....	204
5.2.2.	Υλικά και μέθοδοι.....	204
5.2.3.	Αποτελέσματα.....	205
5.2.4.	Συμπεράσματα.....	209
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°</u> ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....		210
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7°..</u> ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		225

Σκοποί της παρούσας διατριβής

Η παρούσα διδακτορική διατριβή υλοποιεί ένα όνειρο της νεότητάς μου, τη έρευνα δηλαδή και την εμβάθυνση στις διεργασίες της μικροβιολογίας του θαλάσσιου περιβάλλοντος και των οργανισμών του. Και είναι το αποτέλεσμα μεγάλης προσπάθειας ή καλύτερα, του ταξιδιού στα απέραντα και απύθμενα νερά της γνώσης και της επιστήμης. Κι ήταν ένα ταξίδι γεμάτο συγκλονιστικές εμπειρίες, ένα ταξίδι στην επιστημονική ωριμότητα και εμβάθυνση, μια πορεία γεμάτη εκπλήξεις που συνοδεύονταν τότε από προβληματισμό και τότε από ενθουσιασμό. Κι είναι το ταξίδι που μετράει και όχι ο προορισμός. Κι όπως κάθε ταξίδι σε άγνωστα νερά, έτσι και αυτό είχε τις δυσκολίες του.

Η παρούσα διατριβή ολοκληρώθηκε με επιστημονικά κριτήρια και δημιουργική διάθεση αν και κατά καιρούς προσέκρουε σε εμπόδια αντικειμενικής φύσεως. Όμως δεν μετάνιωσα ποτέ για τις ατέλειωτες ώρες δουλειάς, τα συνεχή Σαββατοκύριακα δουλειάς, για τον κόπο των πολλών πειραμάτων με τα ψάρια, τις πάμπολλες μικροβιολογικές εξετάσεις στο εργαστήριο. Η χαρά του καλού αποτελέσματος και η απάντηση σε ένα ερώτημα, για τους ανθρώπους που η επιστήμη είναι πάθος, αξίζει όλους τους κόπους και τις θυσίες.

Η θάλασσα της γνώσης και της επιστήμης αποτελεί πρόκληση και φιλοδοξώ να συνεχίσω να αρμενίζω σ' αυτή για όσο χρόνο μου έχει δοθεί.

Ο σκοπός της παρούσης διδακτορικής διατριβής είναι:

- Να περιγραφεί η επίδραση της οξείας καταπύκνωσης στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα του λαβρακιού και της τσιπούρας που έχει σαν αποτέλεσμα την πιθανή μετανάστευση παθογόνων και ευκαιριακών παθογόνων βακτηρίων από το επιθήλιο του εντέρου προς την κυκλοφορία του αίματος, με αποτέλεσμα την εμφάνιση νοσημάτων.

- Να περιγραφεί η επίδραση της χρόνιας καταπόνησης, λόγω υποβαθμισμένης ποιότητας του θαλασσινού νερού εκτροφής, σε παράγοντες όπως το οξυγόνο και η ροή, στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα του λαβρακιού και στην υγεία του όταν προκληθεί και περαιτέρω οξεία καταπόνηση. Το λαβράκι, ως είδος, επιλέχθηκε γιατί είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην καταπόνηση.
- Να μελετηθεί εάν υπάρχει ευεργετική δράση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, ως συμπλήρωμα διατροφής, στην υγεία της τσιπούρας και του λαβρακιού.

Ευχαριστίες

Στο ταξίδι αυτό για την Ιθάκη με βοήθησαν πολλοί άνθρωποι, με τον τρόπο του ο καθένας...Τους ευχαριστώ όλους από καρδιάς που βοήθησαν στο να γίνει το όνειρό μου πραγματικότητα.

Και πρώτα από όλους ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτριά μου την Δρ. Φωτεινή Αθανασοπούλου, στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ένα πολύ δυνατό φως στη ζωή μου, έναν υπέροχο άνθρωπο που συνδυάζει την άριστη επιστημοσύνη και τον ανθρωπισμό μαζί. Της χρωστάω απέραντη ευγνωμοσύνη γιατί μου έδωσε την ευκαιρία εκπόνησης της παρούσας διατριβής, γιατί με τίμησε με την εμπιστοσύνη της, γιατί επένδυσε σε μένα, γιατί μου συμπαραστάθηκε και με βοήθησε σε όλο τον δύσκολο αυτό δρόμο.

Ευχαριστώ πολύ όμως και την Δρ. Μαρία Αλέξη, Διευθύντρια Ερευνών του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛΚΕΘΕ, για την δυνατότητα της χρήσης των πειραματικών εγκαταστάσεων εκτροφής ψαριών που μου έδωσε, για την ηθική και υλική υποστήριξη, συμπαράσταση και βοήθεια σε όλη την διάρκεια της διατριβής.

Ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή Δρ. Αλέξανδρο Γκόβαρη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, για την καλοσύνη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Καθηγήτρια Βακτηριολογίας και Λοιμωδών νοσημάτων του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Δρ. Ε. Μπουρτζή-Χατζοπούλου, για τον πολύτιμο χρόνο της που αφιέρωσε σε αυτή τη διδακτορική διατριβή, κάνοντας εύστοχες υποδείξεις και διορθώσεις.

Ευχαριστώ πολύ τον συνάδελφο Γιάννη Παπαχαλαράμπους για την πολύτιμη βοήθεια στα στατιστικά των πειραμάτων. Ευχαριστώ πολύ τους Δρ. Ιωάννη Βάτσο και Δρ. Κωνσταντίνα Μπιτχαβά για την βοήθειά τους στην εξέταση των ιστολογικών παρασκευασμάτων. Ευχαριστώ πολύ την συνάδελφο Δρ. Ν. Ιωακειμίδου

για την συνεργασία. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον συνάδελφο Δρ. Γιάννη Κοτζαμάνη για την αμέριστη ηθική συμπαράστασή του και τις αέναιες παροτρύνσεις του να είμαι προσηλωμένη στο στόχο μου. Ευχαριστώ πολύ την συνάδελφο Δρ. Ευθυμία Κώτου για την ηθική της συμπαράσταση. Ευχαριστώ πολύ επίσης τις κυρίες Χρυσάνθη Νικολουδάκη και Ευτυχία Τζιρώνη, φίλες και τεχνικούς των Εργαστηρίων Διατροφής και Παθολογίας (ΕΛΚΕΘΕ) και Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας και Υδατοκαλλιεργειών (Κτηνιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας) για την βοήθειά τους στα ιστολογικά παρασκευάσματα και την ηθική τους συμπαράσταση. Ευχαριστώ πολύ και τον συνάδελφο και υποψήφιο διδάκτορα, Βασίλη Ζωναρά, για το χρόνο που διέθεσε στην ανάγνωση και σχολιασμό τμημάτων της διατριβής αυτής. Ευχαριστώ τους τεχνικούς του εργαστηρίου Διατροφής και Παθολογίας, κύριο Π. Κουγιούφα για την μεγάλη βοήθειά του στους δύσκολους χειρισμούς με τα ψάρια και τον κύριο Π. Αρβανίτη για την βοήθειά τους στον έλεγχο και την ρύθμιση του οξυγόνου και της ροής του νερού στα πειράματα εκτροφής. Ευχαριστώ την εταιρεία Biomar και ιδιαίτερα τον κύριο Γιάννη Καρακώστα, για τη δωρεάν διάθεση των τροφών που χρησιμοποιήθηκαν στα περισσότερα πειράματα. Ευχαριστώ τον κύριο Νίτσα, ιδιοκτήτη της εταιρείας Escopharm, για την δωρεάν διάθεση του σκευάσματος OregoStim που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα.

Ένα απέραντο ευχαριστώ στην οικογένειά μου: το σύζυγό μου Γιάννη Μαραθιανό, που στάθηκε ακούραστος σύντροφος με αγάπη, υπομονή και κατανόηση, στηρίζοντάς με όλα αυτά τα χρόνια, τα παιδιά μου Χρήστο και Στρατή για την κατανόηση και υπομονή που έδειξαν, τους γονείς μου Ευστράτιο και Χιονούλα καθώς και τον αδελφό μου Γιάννη για την ηθική συμπαράσταση και το ενδιαφέρον τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

Εισαγωγή

1.1. Αλιεία και Υδατοκαλλιέργεια

Τα ψάρια έχουν μεγάλη διατροφική αξία. Προμηθεύουν όχι μόνο πρωτεΐνη υψηλής διατροφικής αξίας αλλά αντιπροσωπεύουν μία σημαντική πηγή απαραίτητων μεταλλικών στοιχείων και λιπαρών οξέων. Κατά μέσον όρο, τα ψάρια προσδίδουν περίπου 20–30 kcal ανά άτομο την ημέρα. Προμηθεύουν υψηλότερα επίπεδα, μέχρι και 180 kcal ανά άτομο την ημέρα, μόνο σε χώρες όπου υπάρχει έλλειψη εναλλακτικών τροφών, και όπου η προτίμηση για το ψάρι έχει αναπτυχθεί και διατηρηθεί (Ισλανδία, Ιαπωνία και μερικές μικρές νησιωτικές αναπτυσσόμενες πολιτείες). Η διατροφική συνεισφορά των ψαριών είναι σπουδαιότερη όσον αφορά την ζωική πρωτεΐνη, που είναι ένα κρίσιμο στοιχείο για κάποιες πυκνοκατοικημένες χώρες όπου τα επίπεδα πρόσληψης ολικής πρωτεΐνης μπορεί να είναι χαμηλά. Στην πραγματικότητα, πολλοί πληθυσμοί σε αναπτυσσόμενες χώρες πολύ περισσότερο από αυτούς στις ανεπτυγμένες χώρες, εξαρτώνται από τα ψάρια ως μέρος του ημερήσιου διαιτολογίου τους. Γι αυτούς, τα ψάρια και τα αλιευτικά προϊόντα συχνά αντιπροσωπεύουν μια πηγή ζωικής πρωτεΐνης που όχι μόνο είναι φθηνότερη από άλλες πηγές ζωικής πρωτεΐνης, αλλά προτιμώνται και είναι τμήμα τοπικών και παραδοσιακών συνταγών. Ο μέσος όρος κατανάλωσης ψαριού κατά κεφαλήν μπορεί να είναι χαμηλός, αλλά, ακόμα και σε μικρές ποσότητες, τα ψάρια μπορούν να έχουν μια σημαντικά θετική διατροφική επίδραση, προμηθεύοντας απαραίτητα αμινοξέα που υπάρχουν μόνο σε μικρές ποσότητες στα διαιτολόγια που βασίζονται στα λαχανικά (FAO, 2009).

Η υδατοκαλλιέργεια είναι ένας αναδυόμενος βιομηχανικός κλάδος που απαιτεί συνεχή έρευνα με επιστημονικές και τεχνικές εξελίξεις και καινοτομία. Ύστερα από συνεχή ανάπτυξη, ιδιαίτερα τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες, η υδατοκαλλιέργεια συνεισφέρει για πρώτη φορά το 50% των ψαριών που καταναλώνονται από τον ανθρώπινο πληθυσμό σε παγκόσμια βάση (FAO, 2009). Αυτό αντανakλά όχι μόνο την ζωτικότητα του κλάδου της υδατοκαλλιέργειας αλλά και

την παγκόσμια οικονομική ανάπτυξη και τη συνεχή εξέλιξη στην κατεργασία και το εμπόριο των ψαριών.

Με δεδομένο ότι οι ποσότητες, οι προερχόμενες από την αλιευτική δραστηριότητα, έχουν σταθεροποιηθεί σε ένα επίπεδο παραγωγής της τάξης των 90-95 εκατομμυρίων τόνων ανά έτος (Πίνακας 1.1.1.) και, προκειμένου η παραγωγή να συνεχίσει να καλύπτει την ολοένα αυξανόμενη ζήτηση, σε ρυθμό ανάλογο με την αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού, η δυνατότητα για να καταστεί εφικτή η μελλοντική ανάπτυξη, είναι μέσω του κλάδου της υδατοκαλλιέργειας, λαμβανομένης υπόψη βέβαι και της σωστής διαχείρισης των αλιευτικών αποθεμάτων.

Ο κλάδος των ιχθυοκαλλιεργειών συνιστά την ταχύτερα αναπτυσσόμενη βιομηχανία τροφίμων. Οι πολιτικές, που έχουν ως στόχο το περιορισμό της ελεύθερης αλιείας, λόγω της μείωσης των αποθεμάτων ψαριών, δημιουργούν θετικές προοπτικές και περιθώρια ανάπτυξης για το κλάδο των ιχθυοκαλλιεργειών παγκοσμίως. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια αύξηση της διάθεσης των προϊόντων ιχθυοκαλλιέργειας, μέσω των καναλιών λιανικής πώλησης, όπως είναι οι υπεραγορές (super-markets). Αυτό συμβάλλει στην άνοδο των πωλήσεων των εταιριών που ασχολούνται με αυτό το αντικείμενο, δεδομένου ότι οι καταναλωτές πραγματοποιούν τις αγορές τους ως επί το πλείστον μέσω υπεραγορών και μεγάλων καταστημάτων τροφίμων. Επιπλέον, η στροφή των καταναλωτών σε μια πιο υγιεινή διατροφή, τους οδηγεί στη κατανάλωση μεγαλύτερων ποσοτήτων ψαριών, λόγω των θρεπτικών ωφελειών που προσφέρει η κατανάλωση τους. Πιο συγκεκριμένα, αποτελούν πλούσια πηγή πρωτεϊνών, βιταμινών, ιχνοστοιχείων και άλλων θρεπτικών στοιχείων που χρειάζεται το ανθρώπινο σώμα.

Πίνακας 1.1.1. Συνολική παγκόσμια παραγωγή αλιευμάτων (FAO, 2009).

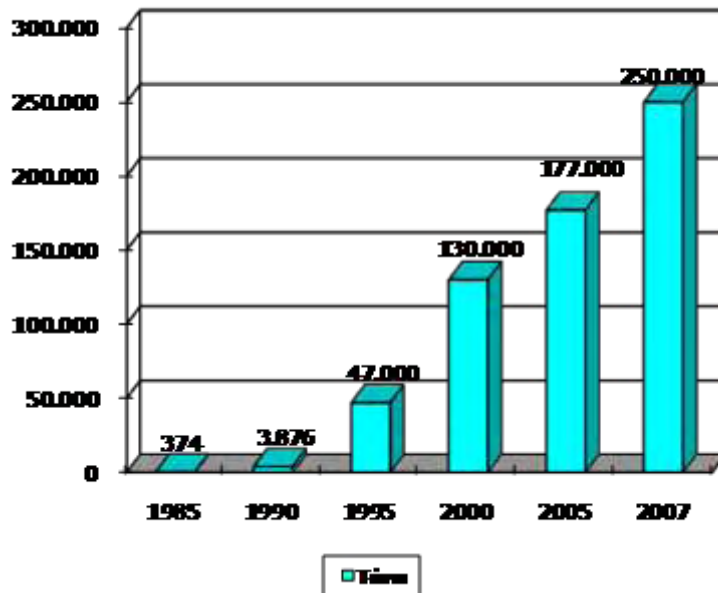
	2002	2003	2004	2005	2006
	(εκατομμύρια τόνοι)				
ΠΑΡΑΓΩΓΗ					
<i>Εσωτερικά ύδατα</i>					
Αλιεία	8,7	9,0	8,9	9,7	10,1
Υδατοκαλλιέργεια	24,0	25,5	27,8	29,6	31,6
Σύνολο εσωτερικών υδάτων	32,7	34,5	36,7	39,3	41,7
<i>Θάλασσα</i>					
Αλιεία	84,5	81,5	85,7	84,5	81,9
Υδατοκαλλιέργεια	16,4	17,2	18,1	18,9	20,1
Σύνολο θάλασσας	100,9	98,7	103,8	103,4	102,0
Σύνολο αλιείας	93,2	90,5	94,6	94,2	92,0
Σύνολο υδατοκαλλιέργειας	40,4	42,7	45,9	48,5	51,7
Σύνολο παγκόσμιας παραγωγής	133,6	133,2	140,5	142,7	143,7
ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ					
<i>Κατανάλωση ως</i>					
τρόφιμα	100,7	103,4	104,5	107,1	110,4
<i>Κατανάλωση εκτός</i>					
τροφίμων	32,9	29,8	36,0	35,6	33,3
Πληθυσμός (δισεκατομμύρια)	6,3	6,4	6,4	6,5	6,6
Κατά κεφαλή κατανάλωση (κιλά)	16,0	16,2	16,3	16,5	16,7

Σημείωση: Εξαιρείται η παραγωγή υδρόβιων φυτών

Τέλος, το γεγονός ότι ο κλάδος των ιχθυοκαλλιέργειών υποστηρίζεται παγκοσμίως από τους κρατικούς μηχανισμούς, μέσω εθνικών και διεθνών προγραμμάτων χρηματοδότησης, συμβάλλει στη μείωση του κόστους των παραγωγών, στη βελτίωση των παραγόμενων προϊόντων και στη συνέχιση της ανάπτυξης του κλάδου (Ιχθυοκαλλιέργειες, 2007).

Η Θαλάσσια Υδατοκαλλιέργεια κυριαρχείται από το σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*) με παραγωγούς την Νορβηγία, την Χιλή, το Ηνωμένο Βασίλειο, τον Καναδά και την Ιρλανδία. Οι κυριότερες χώρες παραγωγής ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας παγκοσμίως είναι η Κίνα, η Ινδία, το Βιετνάμ, η Ταϊλάνδη και η Ινδονησία. Στην Ευρώπη, οι κυριότερες χώρες παραγωγής ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας είναι η Νορβηγία, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Τουρκία, η Ελλάδα, η Ισπανία, η Ιταλία και η Γαλλία. Η παγκόσμια παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού ιχθυοκαλλιέργειας έχει ανοδική πορεία στο χρόνο (Εικόνα 1.1.1.). Η συνολική παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού στην Ευρώπη, όσο και η παραγωγή του κάθε ψαριού ξεχωριστά ακολούθησε ανοδική πορεία. Πιο συγκεκριμένα, το σύνολο της παραγωγής από 92.310 τόνους το 1999 ανήλθε σε 175.196 τόνους το 2006, παρουσιάζοντας μέσο ετήσιο ρυθμό αύξησης 9,6%. Η Ελλάδα είναι η χώρα με τη μεγαλύτερη παραγωγή ευρύαλων ψαριών (τσιπούρας και λαβρακιού) μεταξύ των Μεσογειακών χωρών. Το 2008 η Ελλάδα πραγματοποίησε την μεγαλύτερη παραγωγή (130.000 τόνοι εκ των οποίων 95.000 τόνοι σε τσιπούρα και λαβράκι, Πίνακας 1.1.2.). Η Τουρκία, κατατάσσεται στη δεύτερη θέση με 114.250 τόνους εκ των οποίων 65.000 τόνοι σε τσιπούρα και λαβράκι. Ακολουθεί η Ισπανία με παραγωγή 79.439 τόνων εκ των οποίων 36.800 τόνοι αφορούν την παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού και η Ιταλία, με παραγωγή 60.925 τόνους, εκ των οποίων 19.800 τόνοι αφορούν τσιπούρα και λαβράκι. Οι τέσσερις αυτές χώρες συγκεντρώνουν πάνω από το 90% του συνόλου της παραγωγής των εν λόγω ψαριών στην Ευρώπη. Η Ελλάδα, κατατάσσεται πρώτη στην παραγωγή τσιπούρας στην Ευρώπη για το 2008, παράγοντας 60.000 τόνους με μερίδιο 43,73% στην

παγκόσμια αγορά. Αξιόλογη παραγωγή στην τσιπούρα είχαν και η Τουρκία (27.000 τόνους), η Ισπανία (25.000 τόνους) με την Ιταλία (10.000 τόνοι), οι οποίες κάλυψαν το 45,18% του συνόλου της παραγωγής τσιπούρας (Πίνακας 1.1.4.). Όσον αφορά την παραγωγή λαβρακιού των μεγαλύτερων παραγωγών-χωρών στην Ευρώπη, αυτή ακολούθησε ανοδική πορεία καθ' όλη τη διάρκεια της εξεταζόμενης περιόδου με μέσο ετήσιο ρυθμό αύξησης 9,8%. Η ποσότητα παραγωγής λαβρακιού για το 2008 διαμορφώθηκε στους 105.900 τόνους, από τους οποίους η Ελλάδα παρήγαγε 35.000 τόνους καταλαμβάνοντας ποσοστό 33,05% επί του συνόλου (Πίνακας 1.1.3.). Η Τουρκία παρήγαγε 38.000 τόνους (ποσοστό 35,88% επί του συνόλου), ενώ ακολούθησαν η Ιταλία με 9.800 τόνους (ποσοστό 9,25% επί του συνόλου) και η Ισπανία με 11.800 τόνους (ποσοστό 11,14% επί του συνόλου).



Εικόνα 1.1.1. Παγκόσμια παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού ιχθυοκαλλιέργειας (πηγή: FISHSTAT & FEAP).

Πίνακας 1.1.2. Ευρωπαϊκή παραγωγή εκτρεφόμενων ψαριών ανά χώρα (FEAP, 2008)

ΠΑΡΑΓΩΓΗ (τόνοι)	ΕΤΟΣ							
ΧΩΡΑ	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
ΑΥΣΤΡΙΑ	2,308	2,229	2,148	2,410	2,543	2,632	2,632	2,632
ΒΕΛΓ- ΛΟΥΞΕΜ.	1,520	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200
ΚΡΟΑΤΙΑ	9,840	9,605	8,456	9,350	9,950	9,550	10,430	10,930
ΚΥΠΡΟΣ	1,790	1,861	2,090	3,515	3,598	3,582	3,425	4,000
ΤΣΕΧΙΑ	18,660	17,946	18,337	18,798	19,892	18,870	19,803	19,980
ΔΑΝΙΑ	40,100	39,800	35,550	36,000	36,610	37,760	37,870	37,500
ΝΗΣΙΑ FAROE	49,138	55,000	62,746	37,518	22,677	14,846	25,173	33,800
ΦΙΝΛΑΝΔΙΑ	15,492	14,894	12,201	12,335	13,693	14,000	11,000	12,000
ΓΑΛΛΙΑ	59,155	55,300	49,470	51,010	48,770	50,655	49,194	48,435
ΓΕΡΜΑΝΙΑ	36,150	36,000	36,000	34,750	35,106	35,106	35,106	35,106
ΕΛΛΑΔΑ	66,550	73,500	78,500	79,500	83,600	100,000	72,000	130,000
ΟΥΓΓΑΡΙΑ	17,733	18,408	17,735	17,735	17,837	17,697	15,114	15,114
ΙΣΛΑΝΔΙΑ	8,070	3,467	6,147	8,917	8,355	8,478	6,852	6,852
ΙΡΛΑΝΔΙΑ	24,213	24,173	19,340	15,421	13,220	11,607	13,060	15,420
ΙΤΑΛΙΑ	62,900	60,100	56,900	59,100	59,845	60,705	59,700	60,925
ΜΑΛΤΑ	1,235	1,116	1,000	913	931	931	931	931
ΟΛΛΑΝΔΙΑ	6,700	6,400	8,275	8,475	9,650	9,300	8,640	8,640
ΝΟΡΒΗΓΙΑ	485,400	543,400	594,570	580,570	655,364	690,950	841,450	870,450
ΠΟΛΩΝΙΑ	34,310	30,750	33,760	33,431	33,241	38,831	37,451	37,451
ΠΟΡΤΟΓΑΛΛΙΑ	4,940	5,040	6,040	6,040	6,040	5,040	5,040	5,040
ΙΣΠΑΝΙΑ	54,620	57,200	57,514	62,668	56,835	66,154	61,959	79,439
ΣΟΥΗΔΙΑ	7,254	6,084	6,506	6,828	6,922	6,922	6,922	6,922
ΤΟΥΡΚΙΑ	66,972	62,510	67,250	71,250	78,850	92,750	100,250	114,250
ΗΝΩΜΕΝΟ ΒΑΣ.	165,259	162,461	179,248	168,550	140,793	135,814	159,057	161,367
Σύνολο	1,240,309	1,288,444	1,360,983	1,326,283	1,365,522	1,433,379	1,584,258	1,718,383

- Το επίπεδο παραγωγής περιλαμβάνει επίσης χώρες εκτός Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Πίνακας 1.1.3. Παγκόσμια παραγωγή λαβρακιού ιχθυοκαλλιέργειας ανά χώρα.

Πηγή: FAO/AQUAMEDA (για 2007 και 2008).

Παγκόσμια παραγωγή						
Λαβράκι (<i>Dicentrarchus labrax</i>)						
(1000 τόνοι)						
	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Ελλάδα	25,4	30,0	36,0	40,0	29,0	35,0
Τουρκία	15,0	17,0	21,1	30,0	35,0	38,0
Ιταλία	8,9	9,0	8,6	9,1	9,2	9,8
Γαλλία	3,7	4,0	4,3	5,6	4,6	4,0
Ισπανία	4,5	4,7	5,5	8,9	10,6	11,8
Αίγυπτος	3,2	2,8	5,3	2,1	2,6	2,6
Κροατία	1,8	1,6	1,9	1,6	1,8	2,0
Πορτογαλία	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4	1,4
Τυνησία	0,5	0,5	0,6	0,5	0,8	0,8
Άλλες	5,5	0,7	0,7	0,6	0,6	0,5
Σύνολο	70,0	71,8	85,5	99,8	95,6	105,9

Πίνακας 1.1.4. Παγκόσμια παραγωγή τσιπούρας ιχθυοκαλλιέργειας ανά χώρα.

Πηγή: FAO/AQUAMEDA (για 2007 και 2008).

Παγκόσμια παραγωγή						
Τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>)						
(1000 τόνοι)						
	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Ελλάδα	49,0	46,0	44,0	60,0	43,0	60,0
Τουρκία	12,0	13,0	17,5	22,5	24,0	27,0
Ισπανία	12,4	13,0	15,6	20,2	23,0	25,0
Ιταλία	7,8	8,5	8,5	8,9	9,0	10,0
Αίγυπτος	3,8	3,8	5,7	3,0	4,1	4,1
Ισραήλ	2,5	2,9	3,4	2,8	2,9	2,9
Πορτογαλία	2,5	2,5	2,5	1,6	1,6	2,0
Κροατία	0,7	0,8	1,1	1	1,2	1,5
Γαλλία	1,1	1,6	1,9	2,2	1,5	1,7
Άλλες	2,0	2,2	2,6	2,8	3,1	3,0
Σύνολο	93,8	95,2	102,8	125,0	113,4	137,2

Στην ανάπτυξη του κλάδου στην Ελλάδα συνέβαλαν σημαντικά οι κλιματολογικές και γεωμορφολογικές συνθήκες της χώρας, που ευνοούν την καλλιέργεια ευρύαλων ψαριών, οι επιδοτήσεις που δόθηκαν από το κράτος και τα προγράμματα στήριξης της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η μείωση των αλιευτικών αποθεμάτων και οι περιορισμοί που έχουν επιβληθεί τα τελευταία χρόνια στην αλιεία. Σήμερα ο κλάδος καλύπτει πλήρως της ανάγκες της ελληνικής αγοράς και το μεγαλύτερο μέρος της παραγόμενης ποσότητας εξάγεται στις αγορές του εξωτερικού, με κυριότερες χώρες προορισμού την Ιταλία, την Ισπανία, την Γαλλία, την Αγγλία και την Πορτογαλία. Επιπλέον, από τις δραστηριότητες των ιχθυοκαλλιεργειών

προκύπτει αξιολογή συνεισφορά στο ακαθάριστο εθνικό προϊόν και στο εμπορικό ισοζύγιο της χώρας, ενώ ταυτόχρονα απασχολείται και σημαντικός αριθμός ατόμων.

Ο αριθμός των ιχθυοτροφικών μονάδων που δραστηριοποιείται στην εγχώρια αγορά είναι μεγάλος. Τα τελευταία χρόνια όμως παρατηρούνται τάσεις ανάπτυξης μεγάλων ομίλων, οι οποίοι προβαίνουν σε συνεργασίες, συγχωνεύσεις και εξαγορές, με σκοπό να ισχυροποιήσουν τη θέση τους στην αγορά και να αντεπεξέλθουν στο διεθνή ανταγωνισμό.

1.2. Νοσήματα και εκτρεφόμενα θαλασσινά ψάρια

Η ανάπτυξη της εντατικής εκτροφής θαλασσινών ψαριών, με τη μορφή της συγκέντρωσης μεγάλων ποσοτήτων βιομάζας, σε μικρό σχετικά όγκο νερού, επιφέρει -κάτω από συγκεκριμένες προϋποθέσεις (συνδυασμό παραγόντων)- την εμφάνιση νοσημάτων, τα οποία οδηγούν σε απώλειες του ιχθυοπληθυσμού. Η εμφάνιση ενός νοσήματος μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο ή συμπτώματα, και τα δύο παραπέμπουν σε απόκλιση από την φυσιολογική δομή ή λειτουργία του ξενιστή (Hedrick et al., 1998).

Τα περισσότερα νοσήματα των εκτρεφόμενων ψαριών έχουν προέλθει από τους άγριους πληθυσμούς. Η στενή επαφή μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων ψαριών οδηγεί στην ανταλλαγή παθογόνων.

Τα νοσήματα που έχουν μελετηθεί καλύτερα και είναι περισσότερο γνωστά, είναι αυτά που προσβάλλουν τους εκτρεφόμενους ιχθυοπληθυσμούς. Αυτό συμβαίνει, διότι λόγω του οικονομικού ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν τα εκτρεφόμενα είδη, έχουν αναπτυχθεί διάφορες επιστήμες για να παρέχουν την απαιτούμενη υποστήριξη και επίσης διότι οι διάφορες ασθένειες εμφανίζονται με μεγαλύτερη ένταση σε συνθήκες εκτροφής, όπου έχουμε μεγάλες ιχθυοπυκνότητες, σε σχέση με τη φύση. Επίσης και ο περιορισμένος χώρος της εκτροφής δίδει τη δυνατότητα παρατήρησης διαφόρων παραμέτρων.

Η εμφάνιση και η εξέλιξη ενός νοσήματος των ψαριών είναι το αποτέλεσμα μιας αλληλεπίδρασης μεταξύ του παθογόνου, του ξενιστή και του περιβάλλοντος. Έτσι, μόνο σύνθετες μελέτες που περιλαμβάνουν τα χαρακτηριστικά των πιθανών παθογόνων μικροοργανισμών για τα ψάρια, τη βιολογία των ψαριών ξενιστών καθώς και μια καλλίτερη κατανόηση των περιβαλλοντικών παραγόντων που επηρεάζουν τέτοιες καλλιέργειες, θα επιτρέψουν την εφαρμογή επαρκών μέτρων για την πρόληψη και τον έλεγχο κύριων νοσημάτων που περιορίζουν την παραγωγή των θαλασσιών ψαριών. Συχνά βέβαια μπορούμε πιο εύκολα να απομονώσουμε και να εξετάσουμε εξονυχιστικά το παθογόνο παρά τον ξενιστή ή το περιβάλλον. Οι μεταβλητές του ξενιστή έχουν να κάνουν με την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς επίσης με την επίδραση της γενετικής και της διατροφής στην αντίσταση-ευαισθησία του ξενιστή στο νόσημα.

Ο τρόπος μόλυνσης στα ψάρια συνίσταται σε τρία βασικά στάδια: 1) το βακτήριο διεισδύει στους ιστούς του ξενιστή μέσω χημειοτακτικής κίνησης, 2) μέσα στους ιστούς του ξενιστή το βακτήριο αναπτύσσει συστήματα που χρησιμοποιούν σίδηρο από τον ξενιστή και 3) το βακτήριο τελικά προξενεί βλάβη ψάρια μέσω εξωκυτταρικών προϊόντων, όπως αιμολυσίνες και πρωτεάσες.

Όσον αφορά τα μολυσματικά νοσήματα, που προκαλούνται από βακτήρια στα θαλασσινά ψάρια, μόνο ένας σχετικά μικρός αριθμός βακτηρίων είναι υπεύθυνος για σημαντικές οικονομικές απώλειες στα εκτρεφόμενα ψάρια παγκοσμίως (Πίνακας 1.2.1). Στον Πίνακα 1.2.2 παρουσιάζονται πληροφορίες για τα κυριότερα παθογόνα σε άγρια ή εκτρεφόμενα ψάρια από τη Μεσόγειο. Τα κλινικά συμπτώματα που προκαλούνται από κάθε παθογόνο εξαρτώνται από το είδος του ξενιστή, την ηλικία του ψαριού και το στάδιο του νοσήματος (οξύ, χρόνιο, υποκλινική μορφή). Επιπλέον, σε μερικές περιπτώσεις, δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ εσωτερικών και εξωτερικών βλαβών. Στην πραγματικότητα, συστηματικά νοσήματα (π.χ. παστερέλλωση) με

μεγάλες τιμές θνησιμότητας, προκαλούν εσωτερικές βλάβες στα προσβεβλημένα ψάρια, που έχουν όμως συχνά μια υγιή εξωτερική εμφάνιση. Αντίθετα, άλλα νοσήματα με σχετικά μειωμένη θνησιμότητα (π.χ. φλεξιβακτηρίωση, στρεπτοκοκκίωση) προκαλούν σημαντικές εξωτερικές βλάβες, συμπεριλαμβανομένων ελκών, νέκρωσης, εξόφθαλμου, που κάνουν τα ψάρια ακατάλληλα για την αγορά.

Οι παθογόνοι παράγοντες, που περιγράφονται στα συστήματα υδατοκαλλιέργειας, είναι συνήθως παρόντες και στους άγριους πληθυσμούς ψαριών. Όμως, στα φυσικά περιβάλλοντα σπάνια προκαλούν θνησιμότητα, λόγω έλλειψης καταστάσεων καταπόνησης που συνήθως υπάρχουν στις εγκαταστάσεις εκτροφής (Toranzo et al, 2005). Ανεξάρτητα από την ανασκόπηση των βακτηριακών νοσημάτων που γίνεται σ' αυτό το τμήμα της μελέτης, η θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια προσφέρει στους καταναλωτές ένα προϊόν υψηλής υγειονομικής ποιότητας.

Πίνακας 1.2.1. Αιτιολογικοί παράγοντες οικονομικά σημαντικών βακτηριακών νοσημάτων που προσβάλλουν τα εκτρεφόμενα θαλασσινά ψάρια (Toranzo, 2005).

Παράγοντας	Νόσημα	Κύριοι θαλασσινοί ξενιστές	Κυριότεροι ορότυποι/οροομάδες
Gram αρνητικά βακτήρια			
<i>Listonella anguillarum</i> (παλιότερα <i>Vibrio anguillarum</i>)	Δονακίωση	Σολομοειδή, καλκάνι, λαβράκι, χέλι, <i>Plecoglossus altivelis</i> , μπακαλιάρος, κόκκινη τσιπούρα	3
<i>Vibrio ordalii</i>	Δονακίωση	Σολομοειδή	1
<i>Vibrio salmonicida</i>	Δονακίωση	Σολομός του Ατλαντικού, μπακαλιάρος	1
<i>Vibrio vulnificus</i>	Δονακίωση	Χέλια	1
<i>Moritella viscosa</i> (παλιότερα <i>Vibrio viscosus</i>)	“Έλκος του χειμώνα”	Σολομός του Ατλαντικού	1
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (παλιότερα <i>Pasteurella piscicida</i>)	Φωτοβακτηρίωση (Παστερέλλωση)	Τσιπούρα, λαβράκι, γλώσσα, ραβδωτή πέρκα (<i>Morone saxatilis</i>), yellowtail <i>Seriola quinqueradiata</i>	1
<i>Pasteurella skyensis</i>	Παστερέλλωση	Σολομός του Ατλαντικού	
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>Salmonicida</i>	Δοθιήνωση	Σολομοειδή, καλκάνι	1
<i>Tenacibaculum maritimum</i> (παλιότερα <i>Flexibacter maritimus</i>)	Φλεξιβακτηριδίωση (Μυξοβακτηριδίωση)	Καλκάνι, σολομοειδή, γλώσσα, λαβράκι, τσιπούρα, κόκκινη τσιπούρα	2
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	Ψευδομοναδίωση “Winter disease”	Τσιπούρα, χέλι, καλκάνι, γλώσσα	2
<i>Lactococcus garvieae</i> (παλιότερα <i>Enterococcus seriolicida</i>)	Στρεπτοκοκκίωση ή Λακτοκοκκίωση	<i>Seriola quinqueradiata</i> , χέλι	2

Παράγοντας	Νόσημα	Κύριοι θαλασσινοί ξενιστές	Κυριότεροι ορότυποι/οροομάδες
<i>Streptococcus iniae</i>	Στρεπτοκοκκίωση	<i>Seriola quinqueradiata</i> , καλκάνι, λαβράκι, μπαρμούντι	2
<i>Streptococcus parauberis</i>	Στρεπτοκοκκίωση	Καλκάνι	1
<i>Streptococcus phocae</i>	Στρεπτοκοκκίωση	Σολομός του Ατλαντικού	
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	ΒΚΔ (Βακτηριακή ασθένεια των νεφρών)	Σολομοειδή	1
<i>Mycobacterium marinum</i>	Μυκοβακτηρίωση	Λαβράκι, καλκάνι, σολομός του Ατλαντικού	
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	Ρικέτσια	Σολομοειδή	1

Πίνακας 1.2.2. Περιληπτικός πίνακας πληροφοριών για τα κυριότερα παθογόνα σε άγρια ή εκτρεφόμενα ψάρια από την Μεσόγειο (Vatsos et al., 2007).

Παθογόνο	Είδη που προσβάλλονται:	Πληροφορίες	Επιστημονική απόδειξη για αλληλεπιδράσεις μεταξύ αγρίων και εκτρεφόμενων ειδών ψαριών
<i>Listonella (Vibrio) anguillarum</i> (βακτήριο)	Πάνω από 50 είδη ψαριών, αγριων και εκτρεφόμενων	Νερό, ίζημα και ασπόνδυλα δρουν σαν δεξαμενές του βακτηρίου	Υποψία
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (βακτήριο)	Πάνω από 27 είδη ψαριών, αγριων και εκτρεφόμενων	Το νερό μπορεί να είναι δεξαμενή του βακτηρίου.	Υποψία. Πειραματικά δεδομένα μόνο.
<i>Tenacibaculum maritimum</i> (βακτήριο)	18 είδη ψαριών, αγριων και εκτρεφόμενων.	Δέρμα, βράγχια προσβάλλονται συνήθως. Υπάρχει επίσης συστηματική μορφή. Προσβάλλονται κυρίως νεαρά ψάρια. Η θνησιμότητα μπορούν να φθάσουν το 100% των μολυσμένων ομάδων. Η καταπόνηση είναι σπουδαίος παράγοντας προδιάθεσης.	Δεν υπάρχουν επιδημιολογικές μελέτες.
<i>V. vulnificus</i> , <i>V. alginolyticus</i> (βακτήρια)	10 είδη ψαριών, αγριων και εκτρεφόμενων.	Καταπόνηση ή βλάβη στο δέρμα παίζουν σημαντικό ρόλο.	Δεν υπάρχει απόδειξη ανταλλαγής παθογόνων.
Επιθηλιοκύστη	Από 13 είδη (στα οποία η θνησιμότητα έχει συσχετισθεί με το παθογόνο).	Θνησιμότητα μέχρι και 100% σε μολυσμένες ομάδες, κυρίως νεαρών ψαριών. Αρνητικό αποτέλεσμα στην αύξηση.	Πειραματικά δεδομένα
<i>Streptococcus</i> spp. (βακτήριο)	Τουλάχιστον 19 είδη ψαριών, αγριων και εκτρεφόμενων.	Θανατηφόρα σηψαιμία	Η μετάδοση έχει αποδειχθεί.
<i>Mycobacterium marinum</i> (βακτήριο)	Απομονωμένο από περίπου 25 είδη ψαριών εκτρεφόμενων και αγριων	Η ασθένεια έχει μία χρόνια μορφή. Υπάρχουν συμπτωματικοί φορείς.	Η μετάδοση έχει αποδειχθεί.

Ιοί εγκεφαλίτιδας	Πάνω από 60 είδη ψαριών, άγριων και εκτρεφόμενων.	Τα άγρια ψάρια φαίνεται να ενέχουν χαμηλό κίνδυνο για τα εκτρεφόμενα. Η θνησιμότητα σε νεαρά ψάρια μπορεί να είναι σοβαρές. Οι γεννήτορες μπορεί να είναι μολυσμένοι υποκλινικά.	Πειραματικά δεδομένα. Λίγα επιδημιολογικά δεδομένα.
Ιός λεμφοκύστης	Πάνω από 125 είδη, άγρια και εκτρεφόμενα.	Χρόνια ασθένεια με χαμηλή θνησιμότητα. Προσβάλλει το δέρμα και σπάνια σπλαχνικά όργανα.	Δεν υπάρχουν δημοσιευμένες αναφορές για ανταλλαγή παθογόνων.
<i>Enteromyxum leei</i> (παράσιτο)	Πάνω από 13 οικογένειες ψαριών.	Υψηλές θνησιμότητες	Δεν υπάρχουν δημοσιευμένες αναφορές για ανταλλαγή παθογόνων.
Μονογενή εκτοπαράσιτα	Πολλές οικογένειες ψαριών προσβάλλονται.	Συνήθως χαμηλή θνησιμότητα. Σοβαρή αναιμία αναφέρθηκε σε μερικές περιπτώσεις.	Δεν υπάρχουν δημοσιευμένες αναφορές για ανταλλαγή παθογόνων
Ισόποδα (<i>Ceratomyxa oestroides</i>)	Τουλάχιστον 10 άγρια και εκτρεφόμενα είδη ψαριών.	Αργή ανάπτυξη, ανοσοκαταστολή και μαζικές θνησιμότητες στα νεαρά ψάρια. Άγρια ψάρια που κολυμπούν γύρω από τους κλωβούς είναι πιθανοί φορείς των παρασίτων.	Λίγες επιδημιολογικές μελέτες με απόδειξη όχι ξεκάθαρη.
<i>Amyloodinium ocellatum</i> (παράσιτο)	Πολλά εκτρεφόμενα είδη ψαριών αλλά σπάνια άγρια.	Περιορισμένη βλάβη στα άγρια ψάρια, υψηλή θνησιμότητα στα εκτρεφόμενα	Δεν υπάρχουν δημοσιευμένες αναφορές για ανταλλαγή παθογόνων.
<i>Cryptocaryon irritans</i> (παράσιτο)	Αρκετά άγρια και εκτρεφόμενα είδη ψαριών.	Περιορισμένη βλάβη στα άγρια ψάρια, υψηλή θνησιμότητα στα εκτρεφόμενα.	Έμμεσες αποδείξεις
Άλλα μυξοσπορίδια (παράσιτα)	Σε πολλά είδη ψαριών, εκτρεφόμενων και άγριων.	Χαμηλή θνησιμότητα, οικονομική επίδραση (αύξηση, εμφάνιση)	Λίγες δημοσιευμένες αναφορές στην ανταλλαγή παθογόνων. Πιθανή μεταφορά από τα άγρια ψάρια στα εκτρεφόμενα αναφέρθηκαν στο Ισραήλ.

1.2.1. Κυριότερα βακτηριακά νοσήματα που πλήττουν την ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια.

1.2.1.1. Νοσήματα που οφείλονται σε βακτηριακά είδη της οικογένειας Vibrionaceae

Οι κυριότερες βακτηριακές ασθένειες που πλήττουν την ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια οφείλονται σε είδη της οικογένειας Vibrionaceae.

Οικογένεια Vibrionaceae

Επιστημονική ταξινόμηση

Βασίλειο:	Βακτήρια
Συνομοταξία(Φύλο):	Πρωτεοβακτήρια
Ομοταξία(Κλάση):	Γάμμα Πρωτεοβακτήρια
Τάξη:	Vibrionales
Οικογένεια:	Vibrionaceae, Véron 1965

Η οικογένεια Vibrionaceae είναι μια οικογένεια Πρωτεοβακτηρίων. Τα μέλη της εν λόγω ταξινομικής κατηγορίας εμφανίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης της βιοφωταύγειας, της παθογένειας, της συμβίωσης, της αίσθησης απαρτίας(quorum sensing). Στην οικογένεια αυτή ανήκουν μικροοργανισμοί Gram-αρνητικοί, προαιρετικά αναερόβιοι, ικανοί για ζύμωση. Είναι θετικοί στην οξειδάση και έχουν ένα ή περισσότερα μαστίγια, τα οποία είναι πολικά. Αρχικά αυτά τα χαρακτηριστικά όριζαν την οικογένεια, η οποία ήταν χωρισμένη σε τέσσερα γένη. Δύο από αυτά, το *Vibrio* και το *Photobacterium*, ανταποκρίνονται στη σύγχρονη ομάδα, αν και αρκετά νέα γένη έχουν οριστεί. Γενετικές μελέτες έχουν δείξει άλλα δύο ιδρυτικά μέλη-*Aeromonas* spp. και *Plesiomonas* spp.- ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες. Σήμερα στα είδη της οικογένειας Vibrionaceae βρίσκονται τα γένη *Vibrio* (68 species), *Photobacterium* (15), *Aliivibrio* (4), *Enterovibrio*(2), *Salinivibrio* (2), *Listonella* (2), *Grimontia*(1) και *Catenococcus* (1) για ένα σύνολο 95 ειδών (Euzeby, 2008). Η τελευταία φυλογενετική υπόθεση (Dikow, 2010) βασισμένη σε συνδυασμένη ανάλυση (16S rRNA, gyrB, recA, rpoA, gapA, mreB, topA, atpA) 6

μοριακών τόπων (loci) μας λέει ότι το γένος *Photobacterium* δεν είναι μία μονοφυλετική ομάδα, όπως οριοθετείται σήμερα. Το γένος *Aliivibrio* βρίσκεται εντός του *Photobacterium*, προτείνοντας ένα νέο ορισμό για το γένος *Photobacterium* που περιλαμβάνει όλα τα είδη των *Aliivibrio*. Τα γένη *Enterovibrio*, *Salinivibrio* και *Grimontia*, που παλαιότερα θεωρούνταν ξεχωριστά από τα γένη *Photobacterium* και *Vibrio*, βρίσκονται βαθιά ένθετα μέσα σε ένα μεγάλο κλάδο *Vibrio*.

1.2.1.1.1. Νοσήματα που οφείλονται σε είδη του γένους *Vibrio* (Δονακιώσεις).

Τα είδη *Vibrio* είναι τα πλέον κυρίαρχα ετερότροφα βακτήρια στο θαλάσσιο περιβάλλον και κατανέμονται ευρέως στα παραλιακά θαλασσινά νερά και στα υφάλμυρα. Βρίσκονται επίσης στην επιφάνεια και/ή μέσα στην γαστρεντερική οδό των θαλασσίων ζώων ή άλλων οργανισμών (Colwell and Grimes, 1984; Austin and Austin, 1993). Λόγω της ταχείας εξάπλωσης των εντατικών θαλασσοκαλλιεργειών και της υποβάθμισης των συνθηκών καλλιέργειας, η δονακίωση, το νόσημα που προκαλείται από βακτήρια του γένους *Vibrio*, εμφανίζεται συχνά σε όλο τον κόσμο, και προσβάλλει ένα μεγάλο αριθμό θαλασσίων ειδών (Austin and Austin, 1993). Στην εργασία τους, οι Colwell και Grimes, 1984, θεωρούσαν τα βακτήρια *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*(non 1), *Vibrio vulnificus* (βιότυπος 2), *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio damsela*, *Vibrio carchariae* (σήμερα είναι το ίδιο με το *Vibrio harveyi*) και *Vibrio salmonicida* σαν παθογόνα ψαριών. Από τότε, ολοένα και περισσότερα παθογονικά είδη *Vibrio*, συμπεριλαμβανομένων του *Vibrio harveyi*, *Vibrio marinus*, *Vibrio furnissi*, *Vibrio.mimicus*, *Vibrio pelagius*, *Vibrio splendidus* και *Vibrio tapetis*, έχουν αναφερθεί σε σχέση με επιζωοτικά νοσήματα διαφόρων ειδών ψαριών (Austin and Austin, 1993; Angulo et al., 1994; Esteve et al., 1995; Saeed, 1995; Benediktsdottir et al., 1998; Alvarez et al., 1998; Diggles et al., 2000; Wu and Pan, 1997, 2000; Jensen et al., 2003; Villamil et al., 2003a).

Η δονακίωση είναι μια συστηματική μόλυνση των ψαριών που προκαλείται από βακτήρια του γένους *Vibrio* και ειδικότερα το *Vibrio anguillarum* (σημερινή ονομασία *Listonella anguillarum*). Από τα μεσογειακά εκτρεφόμενα είδη, το λαβράκι παρουσιάζει την μεγαλύτερη ευπάθεια. Στην οξεία μορφή της νόσου, παρατηρούνται ερυθρότητα του στόματος και ερυθρότητα της βάσεως των πτερυγίων και της έδρας. Η μετάδοση της νόσου γίνεται με το νερό, με ψάρια φορείς ή μολυσμένο εξοπλισμό ιχθυοτροφείων. Το βακτήριο αυτό πιστεύεται ότι προσβάλλει τον ξενιστή μέσω του εντέρου ή μέσω της επιδερμίδας.

Η δονακίωση συνδέεται άμεσα με την καταπόνηση. Γενικά συμβαίνει σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 10⁰ C και κυριαρχεί όταν η επιδερμίδα τραυματίζεται και όπου τα ψάρια ζουν σε μεγάλες ιχθυοπυκνότητες. Το νόσημα παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λαμβανομένων υπόψη των χειρισμών που γίνονται στις εντατικές ιχθυοκαλλιέργειες και τα αυξημένα επίπεδα καταπόνησης που υφίστανται τα ψάρια κάτω από τέτοιες συνθήκες.

Παρακάτω δίδεται μία περιγραφή των βακτηρίων που προκαλούν συνήθη προβλήματα στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες και απετέλεσαν και αντικείμενο αυτής της διατριβής.

1.2.1.1.1.1. *Listonella (Vibrio) anguillarum*

Η *Listonella (Vibrio) anguillarum* είναι ένα βακτήριο που δεν σχηματίζει σπόρια, αρνητικό κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιο, οξειδάση θετικό. Θεωρείται ότι είναι ο κύριος παράγοντας της δονακίωσης (Sorensen, 1986; Egidius, 1987; Austin and Austin, 1999). Η *Listonella anguillarum* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της κλασσικής δονακίωσης, ενός από τα μεγαλύτερα βακτηριακά νοσήματα που προσβάλλουν ψάρια, δίθυρα και καρκινοειδή (Bowser et al., 1981; Bolinches et al., 1986; Austin and Austin 1993). Ήταν το πρώτο *Vibrio* που απομονώθηκε από χέλια στη Μεσόγειο. Επιδημίες δονακίωσης έχουν αναφερθεί από το 1500 κατά μήκος των

ιταλικών ακτών. Η *L. anguillarum* αναφέρθηκε για πρώτη φορά στα χέλια στην περιοχή της λίμνης Camachio της Ιταλίας (Hofer, 1904). Είναι το πρώτο παθογόνο που ταυτοποιήθηκε σαν παθογόνο ψαριών σε περισσότερα από 50 είδη σε πολλές περιοχές (Colwell and Grimes, 1984). Η *L. anguillarum* μολύνει άγρια ψάρια όπως κέφαλο (*Mugil cephalus*), (Burke, 1981), γλώσσα (*Pollachius virens*), (Håstein and Smith, 1977; Myhr et al., 1991) άγριο καλκάνι (*Scophthalmus maximus*) (Toranzo et al., 1985), χρυσό κέφαλο (*Mugil auratus*) (Blanch and Jofre, 1992) γλώσσα (*Plecoglossus altivelis*) (Muroga et al., 1984), αθερίνα (*Atherina boyeri*) (Yiagnisis et al., 2007). Στην Ευρώπη, μονάδες με σολομούς στην θάλασσα και υφάλμυρα νερά συχνά υποφέρουν από έντονη δονακίωση. Στην Μεσόγειο η *L. anguillarum* προκαλεί δονακίωση κυρίως στο εκτρεφόμενο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), την τσιπούρα (*Sparus aurata*) και την χιόνα (*Diplodus puntazzo*) (Yiagnisis et al., 1999). Σχετίζεται επίσης και με ασθένειες σε καρκινοειδή και μαλάκια. Η ευαισθησία στις μολύνσεις τις οφειλόμενες στο γένος *Vibrio* σχετίζεται με αρκετούς περιβαλλοντικούς παράγοντες και παράγοντες που έχουν να κάνουν με τον ξενιστή, που μπορούν να προκαλέσουν καταπόνηση στα ψάρια (Anderson, 1990).

Μεγαλύτερη έξαρση παρατηρείται το Φθινόπωρο και την Άνοιξη (όταν η θερμοκρασία του νερού μεταβάλλεται από τους 20°C στους 15°C και αντίστροφα), σχετίζεται δε άμεσα με την καταπόνηση (stress). Οι μεταβολές αυτές συνοδεύονται συνήθως από μεγάλες ημερήσιες διακυμάνσεις. Τα τελευταία χρόνια στην Ελλάδα η νόσος εμφανίζεται και κατά τη διάρκεια του χειμώνα σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 15°C.

Η *Listonella anguillarum* προκαλεί μια τυπική αιμορραγική σηψαιμία. σε θερμά και κρύα νερά. Τα προσβεβλημένα, από αυτή την κλασσική δονακίωση, ψάρια δείχνουν τυπικά σημεία μιας γενικευμένης σηψαιμίας, με αιμορραγία στη βάση των πτερυγίων και εξόφθαλμο. Τα ετοιμοθάνατα ψάρια είναι συχνά ανορεκτικά, με ωχρά βράγχια (αντανακλά μια σοβαρή αναιμία). Οίδηματώδεις βλάβες παρατηρούνται συχνά συγκεντρωμένες υποδερμικά κυρίως.

Αν και είναι γνωστό ότι υπάρχουν 23 ορότυποι (01-023, Ευρωπαϊκός οροτυπικός προσδιορισμός) μεταξύ των στελεχών *L.anguillarum* (Sorensen and Larsen, 1986; Pedersen et al., 1999), μόνο οι ορότυποι 01, 02 και, σε μικρότερη έκταση, ο ορότυπος 03 έχουν σχετισθεί με θνησιμότητα στα εκτρεφόμενα και άγρια ψάρια ανά τον κόσμο (Tajima et al., 1985; Toranzo et al., 1997). Οι υπόλοιποι ορότυποι έχουν να κάνουν με περιβαλλοντικά στελέχη και μόνο σε σπάνιες περιπτώσεις απομονώνονται σαν υπεύθυνοι δονακίωσης για τα ψάρια. Ενώ οι ορότυποι 01 και 02 έχουν μια ευρεία κατανομή, ο ορότυπος 03 μολύνει κυρίως το χέλι και τη γλώσσα. Σε αντίθεση με τον ορότυπο 01 που είναι αντιγονικά ομογενής, οι ορότυποι 02 και 03 εμφανίζουν αντιγονική ετερογένεια και έχει αποδειχθεί η ύπαρξη δύο υποομάδων μέσα σε κάθε ορότυπο, ονομαζόμενοι 02a και 02b και 03A και 03B (Olsen and Larsen, 1993; Santos et al., 1995). Ενώ ο η υποομάδα 02a συναντάται σε σολομοειδή και μη ψάρια, η υποομάδα 02b έχει ανιχνευθεί μόνο σε θαλασσινά ψάρια. Στην περίπτωση του οροτύπου 03, η υποομάδα 03A ανιχνεύθηκε σε ασθενή ψάρια και η υποομάδα 03B αποτελείται μόνο από περιβαλλοντικά στελέχη. Ο ορότυπος που απαντάται συνηθέστερα στα μεσογειακά εκτρεφόμενα είδη είναι ο ορότυπος 01 (Pedersen et al., 1994). Ο ορότυπος 02 απαντάται στα χέλια ενώ απομονώθηκε ο ορότυπος 03 από λάρβες λαβρακιού στην Γαλλία (Vinguelle et al., 1993). Είναι πάντως γενικά αποδεκτό ότι ο όρος δονακίωση αναφέρεται στη μόλυνση με τον ορότυπο 01. Θεωρείται ως αιτιολογικός παράγων επιζωοτιών σε άγρια και εκτρεφόμενα ψάρια (Bonaveri, 1761).

Η *L. anguillarum* μπορεί να διαγνωσθεί αρχικά με βάση τις τυπικές βιοχημικές δοκιμές. Χρειάζεται όμως και ανοσολογική επιβεβαίωση με πολυκλωνικά αντισώματα. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί εμπορικά ταχυδιαγνωστικά προϊόντα βασισμένα στην συγκόλληση σε αντικειμενοφόρο πλάκα ή στην ELISA (δοκιμή ανοσοαπορρόφησης συνδεδεμένης με ένζυμο) που βοηθούν στην γρήγορη διάγνωση της δονακίωσης. Τα τελευταία χρόνια για την διάγνωση της δονακίωσης από μολυσμένους ιστούς ψαριών έχουν αναπτυχθεί μοριακές μέθοδοι βασισμένες

στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) (Osorio and Toranzo, 2002). Ιστολογικές τομές δείχνουν σοβαρή καρδιακή μυοπάθεια και πολλές φορές νεφρική και σπληνική νέκρωση. Ο τρόπος μετάδοσης είναι μέσω του νερού, ψαριών φορέων, ή μολυσμένο εξοπλισμό της ιχθυομονάδας. Το βακτήριο εισέρχεται μέσω του δέρματος, των πτερυγίων, των βραγχίων και της έδρας (Kanno et al., 1989). Επιβιώνει για μεγάλη χρονική περίοδο στο ίζημα του βυθού, στο νερό και σε ασπόνδυλους οργανισμούς. Σε μικρόκοσμο θαλασσινού νερού δείχνει την ικανότητα να επιβιώνει περισσότερο από 50 μήνες (Hoff, 1989).

1.2.1.1.1.2. *Vibrio alginolyticus*

Το βακτήριο *Vibrio alginolyticus* είναι ένα άλλο παθογόνο των ψαριών, μέσα στο γένος *Vibrio*, και έχει προκαλέσει σοβαρή δονακίωση με μεγάλη θνησιμότητα σε πολλά είδη ψαριών σε όλο τον κόσμο (Colorni et al., 1981; Austin et al., 1993; Lee, 1995; Saeed, 1995; Woo, 1995; Alvarez et al., 1998; Balebona et al., 1998; Zhu et al., 2000). Το *Vibrio alginolyticus* είναι ένας πανταχού παρών οργανισμός στο θαλασσινό νερό και έχει απομονωθεί από διάφορους θαλάσσιους οργανισμούς (Carli et al., 1993). Έχει βρεθεί σε ψάρια, οστρακόδερμα, θαλασσινά ιζήματα (Bullock, 2002) και έχει προταθεί σαν παθογόνο για ανθρώπους (Blake et al., 1980). Έχει απομονωθεί από ασθενή ψάρια ενυδρείου στην Ιταλία (Locatelli et al., 2003). Έχει απομονωθεί επίσης από άγριο ετοιμοθάνατο *Heniochus diphreutes* στην Ερυθρά Θάλασσα (Diamant et al. 2004) και από άγρια πιλάπια στο Salton Sea (Καλιφόρνια κατά την διάρκεια του χειμώνα (Slack, 1997). Επίσης έχει αναφερθεί σαν αίτιο δονακίωσης στον ροφό (*Epinephelus malabaricus*) (Lee, 1995), σε νεαρό καλκάνι (*Scophthalmus maximus*) (Austin et al., 1993), τσιπούρα (*Sparus aurata*) (Colorni et al., 1981; Balebona et al., 1998) και λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) (Bakhrouf et al., 1995). Ειδικά για την τσιπούρα, το *Vibrio alginolyticus* συχνά εμπλέκεται σε ασθένειες που προκαλούν θνησιμότητα στα ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας στην Ερυθρά Θάλασσα

(Colorni et al., 1981; Paperna, 1984). Άλλωστε στο Ισραήλ έχει γίνει και η εκτενέστερη μελέτη για το ρόλο του *V. alginolyticus*, ως παθογόνου για τα ψάρια, και αφορούσε τις παρατηρήσεις της θνησιμότητας στην εκτρεφόμενη τσιπούρα ύστερα από εκτενείς χειρισμούς. Το *V. alginolyticus* θεωρείται ως παθογόνο για την τσιπούρα, όταν ο βλεννογόνος αφαιρείται και προκαλείται τραυματισμός του δέρματος (Colorni and Diamant, 1992; Balebona, 1998). Εντούτοις, οι μολυσματικές ιδιότητες του *V.alginolyticus* για τα ψάρια δεν μπορούν να πιστοποιηθούν με ασφάλεια γιατί η μολυσματικότητα φαίνεται να διαφέρει από είδος σε είδος, και σε μερικές περιπτώσεις η μολυσματικότητα διαφέρει ακόμα και μέσα στο ίδιο είδος ψαριού. Επιπλέον, η προσβολή των ψαριών από αυτό το βακτήριο σχετίζεται πάντοτε με την υποβάθμιση των συνθηκών εκτροφής ή την φυσική βλάβη των εκτρεφόμενων ψαριών και κατά συνέπεια θεωρείται πάντοτε ως ευκαιριακό παθογόνο (Colorni et al., 1981; Austin et al., 1993; Balebona et al., 1998). Συμπτώματα των μολυσμένων ψαριών περιλαμβάνουν σκούρο χρωματισμό δέρματος, σηψαιμία, αιμορραγίες και μερικές φορές έλκη στο δέρμα (Colorni et al., 1981). Ο τρόπος εισόδου του μικροβίου είναι μέσω αμυχών του δέρματος. Η κύρια αιτία θανάτου στην δονακίωση, λόγω προσβολής από το *V. alginolyticus*, οφείλεται σε βλάβη του κυκλοφορικού και του ανοσοποιητικού συστήματος (Lee et al., 1995, Austin and Austin, 2007, Vatsos et al., 2007).

1.2.1.1.1.3. *Vibrio vulnificus*

Το *Vibrio vulnificus* είναι ένα θαλασσινό βακτηριακό είδος από τροπικά και θερμά υφάλμυρα νερά, που αποτελείται από στελέχη που είναι πιθανά παθογόνα για τον άνθρωπο και τους υδρόβιους οργανισμούς (Amaro and Biosca, 1996; Bisharat et al., 1999; Dalsgaard et al., 1996). Το *V. vulnificus* αποτελείται από δυο βιοτύπους. Ο βιότυπος 1, είναι ένα ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο για τον άνθρωπο, τα στελέχη του είναι ινδόλη θετικά, και προκαλεί νοσήματα που σχετίζονται με το χειρισμό ή την

κατανάλωση ωμών οστρακόδερμων, ενώ στελέχη του βιότυπου 2 είναι μολυσματικά για το χέλι. Ο βιότυπος 2, χωρίζεται σε τρεις διαφορετικούς ορότυπους, εκ των οποίων ο ορότυπος E, αντιστοιχεί στις αρχικές απομονώσεις που οδήγησαν στο διαχωρισμό του είδους σε βιοτύπους (Vatsos et al., 2007). Η πλειονότητα των στελεχών του βιότυπου 2 είναι ινδόλη αρνητικά (Amaro et al., 1992).

Ο ορότυπος E του είδους *V. vulnificus*, αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα για τα κυριότερα νοσήματα των εκτρεφόμενων χελιών και θεωρείται υποχρεωτικά παθογόνο για το χέλι, ενώ σχετίζεται και με σποραδικές μολύνσεις στον άνθρωπο. Το *V. vulnificus* αποτελεί τον κύριο παράγοντα οικονομικών ζημιών στις εκτροφές χελιού στην Ευρώπη (Vatsos et al., 2007).

Ο βιότυπος 2 του βακτηρίου, απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1974 στην Ιαπωνία και την Ταϊβάν. Στη συνέχεια όμως, το 1989, ταυτοποιήθηκε από δείγματα νεκρών χελιών στην Ισπανία και στη συνέχεια επεκτάθηκε σε Σουηδία, Ολλανδία και Δανία (Austin and Austin, 2007, Vatsos et al., 2007). Το 2005, ταυτοποιήθηκε σε εκτροφή *Trachinotus ovatus* στην Κίνα, όπου και προκάλεσε υψηλή θνησιμότητα (Austin and Austin, 2007).

Μια νέα ορολογική ομάδα, που ονομάστηκε *V. vulnificus* βιότυπος 2 ορότυπος A, ταυτοποιήθηκε στην Ισπανία, το 2000, και τη Δανία, το 2004, σε χέλια μεγέθους 5-10g, με σοβαρά συμπτώματα που περιελάμβαναν εκτεταμένες αιμορραγίες και νεκρώσεις (Austin and Austin, 2007).

Το *V. vulnificus*, έχει απομονωθεί από άγρια ψάρια (*Pomacentrus trichourus*, *Variola louti*) και έχουν αναφερθεί ασθένειες σε τσιπούρα και λαβράκι (Vatsos et al., 2007). Γενετικές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση των παθογόνων για τα χέλια στελεχών και των κλινικών και περιβαλλοντικών στελεχών (Aznar et al., 1993; Arias et al., 1997). Αυτό το *Vibrio* είναι παρόμοιο σε παθολογία με τη *L. anguillarum* και προκαλεί βακτηριακή αιμορραγική σηψαιμία. Διασπείρεται μέσω του

νερού και μολύνει υγιή χέλια, προκαλώντας την ανάπτυξη αιμορραγικών βλαβών που συνοδεύονται με οίδημα στον κορμό ή την ουρά (Tison et al., 1982).

Τα συμπτώματα της ασθένειας, που προκαλείται από μόλυνση με *V. vulnificus*, είναι αιμορραγίες, με ερυθρότητα στο σώμα, στη σάρκα ή/και στην ουρά. Σε προχωρημένα στάδια, παθολογικές μεταβολές παρατηρούνται στα σπλάχνα, στα βράγχια, την καρδιά, το συκώτι και το σπλήνα (Austin and Austin, 2007).

Η κύρια πύλη εισόδου στο σώμα του χελιού είναι μέσω των βραγχίων (Marco-Noales et al., 2001). Το παθογόνο μπορεί επίσης να μολύνει τα χέλια μέσω της γαστρεντερικής οδού, από μολυσμένη τροφή, ενώ μπορεί να επιβιώσει σε υφάλμυρα νερά ή στην επιδερμίδα του χελιού, για διάστημα τουλάχιστον 14 ημερών (Austin and Austin, 2007). Η διάδοση της ασθένειας εξαρτάται από την θερμοκρασία και την αλατότητα. Τα χέλια μπορούν να μεταδώσουν το βακτήριο *V. vulnificus* στους ανθρώπους όπως έχει δειχθεί σε 4 κλινικές περιπτώσεις (Veenstra et al., 1993; Dalsgaard et al., 1996). Σηψαιμία συμβαίνει κυρίως σε ανθρώπους που έχουν καταναλώσει ωμά θαλασσινά. Το *V. vulnificus* προκαλεί μολύνσεις πληγών, εισερχόμενο σε προϋπάρχουσες δερματικές πληγές κατά την διάρκεια έκθεσης σε θαλασσινό νερό.

1.2.1.1.1.4. *Vibrio harveyi*

Το *Vibrio harveyi* είναι ένα από τα συνηθέστερα θαλάσσια δονάκια και μπορεί εύκολα να βρεθεί και ως ελεύθερο και ως μέλος της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας (Ramesh et al, 1990; Makemson and Hermosa, 1999). Το αρχικό του όνομα ήταν *Achromobacter harveyi*, στη συνέχεια ονομάστηκε *Lucibacterium harveyi* και *Beneckea harveyi*, μέχρι την ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων, οπότε κατατάχθηκε οριστικά στο γένος *Vibrio*, ως ένα από τα κύρια είδη του γένους (Austin and Zhang, 2006).

Με τις μοριακές αναλύσεις προέκυψε άλλο ένα σημαντικό στοιχείο· ότι τα είδη *V. harveyi* και *V. carchariae* είναι συνώνυμα, οπότε επικράτησε η ονομασία *V.*

Harvey, ως αρχαιότερη (Austin and Zhang, 2007; Noguerola and Blanch, 2008).

Το *Vibrio harveyi* παρουσιάζει το φαινόμενο της βιοφωταύγειας. Είναι δε το κυρίαρχο ετεροτροφικό είδος στο θαλασσινό νερό και τα θαλάσσια δίθυρα της δυτικής Μεσογείου κατά την διάρκεια της θερμής εποχής (Arias et al, 1999). Είναι πρωτογενώς παθογόνο για πολλά εκτρεφόμενα είδη ασπόνδυλων οργανισμών, ιδιαίτερα της οικογένειας *Penaeidae*. Αν και δεν συμπεριλαμβάνεται μεταξύ των κύριων κλασσικών παθογόνων για τα ψάρια, το *V. harveyi* σχετίζεται με αρκετές ευκαιριακές μολύνσεις διακοσμητικών ή εδωδιμων εκτρεφόμενων ψαριών την τελευταία δεκαετία (Saeed, M.O., 1995; Hispano et al., 1997). Τελευταίες αναφορές επιβεβαιώνουν τη μολυσματικότητα κάποιων στελεχών για το λαβράκι, την τσιπούρα, και τη συναγρίδα τους ζεστούς μήνες (Pujalte et al, 2003). Το *V. harveyi* δείχνει ομοιότητες με το *V. alginolyticus*, κυρίως λόγω της ιδιότητας ερπητικής κινητικότητας (swarming motility- γρήγορη 2-10 $\mu\text{m/s}$) και συντονισμένη μετατόπιση του βακτηριακού πληθυσμού σε στερεές ή ημιστερεές επιφάνειες άγαρ. Το *V. harveyi* αυξάνεται σε συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου 3-8%, αλλά όχι σε 0% ή 10% (w/v).

Το *Vibrio harveyi* απομονώθηκε από τα εσωτερικά όργανα εκτρεφόμενων νοσούντων ψαριών λαβρακιού και τσιπούρας, σε εκτροφές της Ελλάδας. Η απομόνωση του εν λόγω βακτηρίου έγινε σε εκτροφές, όπου έλαβε χώρα καταπόνηση των ψαριών, από χειρισμούς ή έντονη παρασιτική λοίμωξη. Οι ασθενείς τσιπούρες παρουσίαζαν ανορεξία, ακανόνιστη κολυμβητική συμπεριφορά, σκούρο χρωματισμό του δέρματος, απώλεια λεπιών και έλκη στο δέρμα. Τα ασθενή λαβράκια παρουσίαζαν αιμορραγίες στην επιφάνεια του δέρματος, της κεφαλής και των σιαγόνων και μερικές φορές και εξόφθαλμο. Και στα δύο είδη ψαριών, κατά το καλοκαίρι και το φθινόπωρο, παρατηρήθηκε έξαρση των νοσηρών καταστάσεων που σχετίστηκαν με το εν λόγω βακτήριο. Το λαβράκι εμφάνισε μεγαλύτερη ευαισθησία στο βακτήριο. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η θνησιμότητα στο λαβράκι ξεπέρασε το 50%.

Οι μηχανισμοί της παθογένειας δεν έχουν κατανοηθεί ακριβώς, με πιθανούς μηχανισμούς να περιλαμβάνουν: την ικανότητα να σχηματίζει βιοφίλμ, την αίσθηση απαρτίας, την παραγωγή διαφόρων εξωκυτταρικών προϊόντων όπως πρωτεάσες, αιμολυσίνες, λιποπολυσακχαρίτες και την αλληλεπίδραση με βακτηριοφάγους. Τα βακτήρια *Vibrio harveyi* παρουσιάζουν μία ιδιότητα μόνο όταν βρεθούν σε μία αρκετά μεγάλη ομάδα (γνωστή σαν απαρτία). Με την χρήση χημικής στρατηγικής, που λέγεται quorum sensing (αίσθηση απαρτίας), αξιολογούν τον πληθυσμό τους και ξεχωρίζουν τον εαυτό τους από άλλα είδη βακτηρίων.

Η αίσθηση απαρτίας στο βακτηρίδιο οδηγεί άμεσα σε αλλαγές στη συμπεριφορά, την εμφάνιση και το μεταβολισμό, ρυθμίζει δε την έκφραση γονιδίων που περιλαμβάνουν μολυσματικότητα, συμβίωση, κινητικότητα και βιοφωταύγεια. Οι παρακάτω εικόνες 1.2.1.1.4.α και β δείχνουν τις εξωτερικές αλλοιώσεις (ελαφρές αιμορραγίες στα βραγχιακά επικαλύματα, κοιλιακά, εδρικά και ουραία πτερύγια) που προκαλεί το βακτήριο σε λαβράκι και η εικόνα 1.2.1.1.4.γ σε τσιπούρα. Οι εικόνες 1.2.1.1.4.δ,ε,στ δείχνουν ιστολογικές αλλοιώσεις εντέρου λαβρακιού (εντερίτιδα, διογκωμένες λάχνες) και καρδιάς (φλεγμονή).



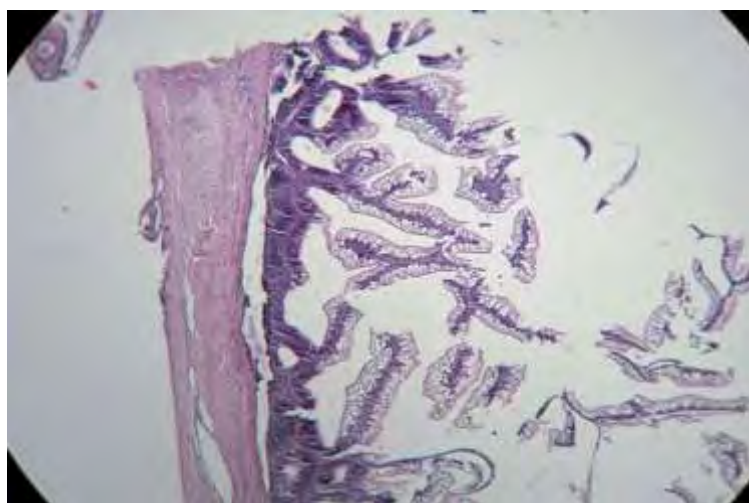
Εικόνα 1.2.1.1.4.α. Εξωτερικές αλλοιώσεις (αιμορραγίες) σε λαβράκια λόγω προσβολής από το βακτήριο *Vibrio harveyi*.



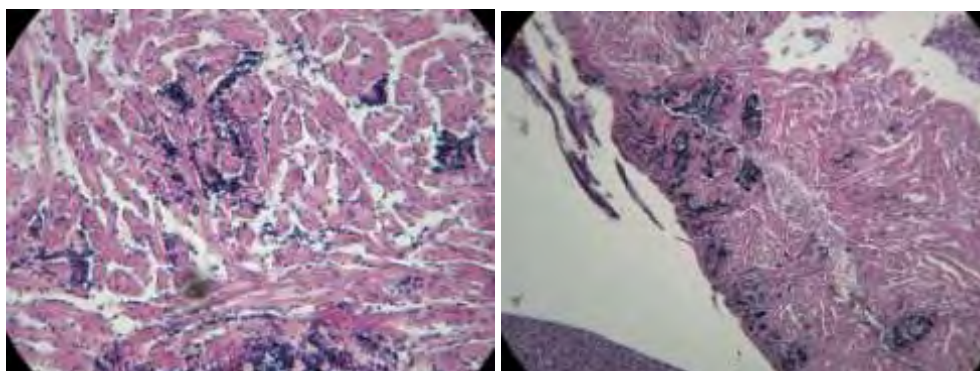
Εικόνα 1.2.1.1.4.β. Εξωτερικές αλλοιώσεις σε λαβράκια, λόγω προσβολής από το βακτήριο *Vibrio harveyi* .



Εικόνα 1.2.1.1.4.γ. Εξωτερικές αλλοιώσεις σε τσιπούρα, λόγω προσβολής από το βακτήριο *Vibrio harveyi* . Παρατηρούνται αιμορραγίες στα βραγχιακά επικαλύμματα και πληγές στο σώμα.



Εικόνα 1.2.1.1.1.4.δ. Ιστολογικές αλλοιώσεις εντέρου λαβρακιού που νοσεί, λόγω προσβολής από το βακτήριο *Vibrio harveyi*. Παρατηρείται εντερίτιδα και διόγκωση λαχνών.



Εικόνες 1.2.1.1.1.4.ε και στ. Ιστολογικές αλλοιώσεις καρδιάς λαβρακιού που νοσεί λόγω προσβολής από το βακτηρίδιο *Vibrio harveyi*. Παρατηρείται φλεγμονή.

1.2.1.1.1.5. *Vibrio splendidus*

Αποτελεί έναν ευρέως διαδεδομένο μικροοργανισμό των θαλάσσιων οικοσυστημάτων και για μεγάλο χρονικό διάστημα, θεωρούνταν μέρος των μικροβιακής πανίδας του περιβάλλοντος, χωρίς παθογόνα δράση (Gay et al., 2004). Παρόλα αυτά, για αρκετά χρόνια, διάφορα στελέχη του βακτηρίου είχαν συσχετιστεί με θνησιμότητα σε ψάρια (καλκάνι - *Scophthalmus maximus*) (Gay et al., 2004). Το

βακτήριο έχει απομονωθεί επίσης, από σολομό του Ατλαντικού, λαβράκι, λάρβες καλκανιού και τσιπούρα (Austin and Austin, 2007).

Στη Μεσόγειο έχει απομονωθεί σε λάρβες τσιπούρας και λαβρακιού (Grisez et al., 1997), αλλά και σε ενήλικα άτομα εκτρεφόμενης τσιπούρας (Balebona et al., 1998; Pujalte et al., 2003a). Μαζί με το *V. harveyi*, κυριαρχούν σε συχνότητα εμφάνισης στις βακτηριακές μολύνσεις τσιπούρας (Pujalte et al., 2003a) και προκαλεί υψηλή θνησιμότητα (Balebona et al., 1998). Έχει συσχετιστεί με εξάρσεις ασθένειας σε λάρβες τσιπούρας (Sitja-Bobadilla et al., 2006). Θεωρείται ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο για τα εκτρεφόμενα είδη της Μεσογείου.

1.2.1.1.1.6. *Vibrio parahaemolyticus*

Βακτήριο του γένους *Vibrio* που απαντάται στο θαλασσινό νερό και έχει συσχετιστεί με τροφικές δηλητηριάσεις, λόγω της κατανάλωσης ωμών αλιευμάτων. Στις Ασιατικές χώρες αποτελεί την κύρια αιτία τροφικής δηλητηρίασης και συγκεκριμένα στελέχη του βακτηρίου (KP+)¹ συσχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες (Ministry of Health – New Zealand, 2001). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το KP αποτελεί δείκτη και όχι επιβεβαιωμένο παράγοντα μολυσματικότητας (Lake et al, 2003). Θεωρείται βακτήριο της φυσιολογικής πανίδας του θαλασσινού νερού και η παρουσία του επηρεάζεται από την εποχή· συχνότερη κατά τους θερινούς μήνες. Απομονώσεις στελεχών του βακτηρίου, από δείγματα θαλασσινού νερού σε ποσοστό >99%, δεν άνηκαν στο παθογόνο –για τον άνθρωπο– στέλεχος (ήταν δηλαδή KP-) (Ministry of Health – New Zealand, 2001).

Προσβάλλει θαλάσσια ζώα, συμπεριλαμβανομένων των θηλαστικών, ψάρια, οστρακοειδή, καρκινοειδή, γαστερόποδα και πλαγκτονικούς οργανισμούς (Ministry of Health – New Zealand, 2001, Cai et al., 2007; Kandhasamy and Arunachalam, 2008). Η παθογένειά του, για τον άνθρωπο, δεν έχει πλήρως αποκωδικοποιηθεί.

¹ Kanagawa phenomenon-positive

Όμως, η σχετικά άμεση έξαρση της ασθένειας (κατά μέσο όρο 12 ώρες) συνιστά εμπλοκή εντεροτοξίνης (Lake et al., 2003).

Υπάρχει αντιπαράθεση για το ρόλο του *V. parahaemolyticus*, ως παθογόνου ψαριών, και οι ενασχολούμενοι επιστήμονες δεν είναι ικανοποιημένοι με τις αποδείξεις που υπάρχουν. Έτσι συμπεραίνεται ότι ο οργανισμός δεν συνιστά ένα κύριο παθογόνο ψαριών. Σε μια τελευταία δημοσίευση προτείνεται ότι τα *V. campbellii*, *V. nereis* και το *V. tubiashii* μπορεί να σχετίζονται με νοσήματα στην τσιπούρα στην Ισπανία (Balebona et al, 1998).

1.2.1.1.1.7. *Vibrio aestuarianus*

Είδος του γένους *Vibrio* που απομονώθηκε για πρώτη φορά σε σύστημα εκβολής στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, από όπου και πήρε το όνομά του (*aestuarianus*: pertaining to an estuary= που αφορά στις εκβολές) (Tison and Seidler, 1983). Η απομόνωση του βακτηρίου έγινε από δείγματα που λήφθηκαν από τη στήλη του νερού, αλλά και από στρείδια, χτένια καβούρια· για τα οποία θεωρείται ευκαιριακά παθογόνο (Tison and Seidler, 1983).

Σε βακτηριολογικές μελέτες στη νοτιοδυτική Ισπανία, απομονώθηκε από νεκρές εκτρεφόμενες τσιπούρες, με την παθογένεια του να παραμένει αδιευκρίνιστη (Balebona et al, 1998), ενώ έχει καταγραφεί και ένα περιστατικό σε μελέτες ταξινόμησης, σε σολομό του Ατλαντικού, στην Τασμανία (Austin and Austin, 2007).

1.2.1.1.2. Νοσήματα οφειλόμενα στο γένος *Photobacterium*

Δύο είδη εμπλέκονται στα νοσήματα αυτά, το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* και το *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*.

1.2.1.1.2.1. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (=Pasteurella piscicida)

Το βακτήριο *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* (παλιότερα *Pasteurella piscicida*) είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της παστερέλλωσης ή παστεριδιάσης, μιας ασθένειας γνωστής και σαν ψευδοφυματίωση, λόγω του σχηματισμού βλαβών στο σπλήνα και τους νεφρούς των μολυσμένων ψαριών στην χρόνια, προχωρημένη μορφή (Kusuda and Yamaoka, 1972). Το βακτήριο απομονώθηκε αρχικά, κατά την διάρκεια θανάτων σε φυσικούς πληθυσμούς της λευκής πέρκας (*Morone americanus*) και του ραβδωτού λαβρακιού (*M. saxatilis*) το 1963 στον κόλπο Chesapeake ΗΠΑ (Snieszko et al. 1964). Υπολογίσθηκε ότι το βακτήριο σκότωσε περίπου το 50% του πληθυσμού. Αρχικά, το παθογόνο τοποθετήθηκε στο γένος *Pasteurella*, με βάση τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά. Ο όρος παστερέλλωση είναι ακόμα σε χρήση για την κατανόηση των βιβλιογραφικών αναφορών. Αργότερα και με βάση το γονίδιο 16S rRNA, τοποθετήθηκε κάτω από το παρόν γένος *Photobacterium* (Gauthier et al., 1995; Trüper and Clari 1997). Το νόσημα θεωρείται μία από τις σοβαρότερες βακτηριακές παθογόνες καταστάσεις σε πάνω από 20 είδη ψαριών στην Ιαπωνία, ΗΠΑ και, από το 1990, στην Ευρώπη επίσης (Toranzo et al., 1991). Στην περιοχή της Μεσογείου, το βακτήριο έχει προκαλέσει μεγάλες απώλειες στην θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια, ειδικά στην τσιπούρα και το λαβράκι (Kvitt et al., 2002; Toranzo et al., 2005). Βαριά θνησιμότητα, της τάξης των 40-50% των πληθυσμών, έχουν αναφερθεί κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών. Εξωτερικά, τα μολυσμένα ψάρια εμφανίζονται σκουρότερα και σε μερικές περιπτώσεις υπάρχουν αιμορραγικές περιοχές στο κεφάλι και στα βράγχια. Εσωτερικά, οι παθολογικές αλλαγές εξαρτώνται από το εάν ή όχι η ασθένεια είναι οξεία ή χρόνια. Στην οξεία μορφή, τα εσωτερικά όργανα δείχνουν πολυεστιακή νέκρωση. Στην χρόνια μορφή, σχηματίζονται υπόλευκοι όζοι στα προσβεβλημένα όργανα, αν και ο σχηματισμός τους εξαρτάται από το είδος του ψαριού και από το εάν η μόλυνση είναι φυσική ή πειραματική (Magariños et al.,

1996). Υποκλινικές μολύνσεις, όπου τα ψάρια γίνονται φορείς, συμβαίνουν επίσης σε χαμηλές θερμοκρασίες (Magariños et al., 2001). Νεαρά ψάρια τείνουν να είναι πιο ευαίσθητα στο παθογόνο (Toranzo et al., 2005). Ο τρόπος μετάδοσης είναι κάθετος, μέσω των ωοθηκικών και σπερματικών υγρών από τους φαινομενικά υγιείς γεννήτορες (Romalde et al., 1999) αλλά και οριζόντιος, μέσω του νερού (Fouz et al. 2000), δηλαδή από τα βράγχια, τα γαστρεντερική οδό και το δέρμα. Το παθογόνο μεταπίπτει σε μορφή που δεν μπορεί να καλλιεργηθεί (VBNC) αλλά επιβιώνει στην στήλη του νερού για μακρές περιόδους (Magariños et al., 1994, 1994a). Θεωρείται ότι η μόλυνση λαμβάνει χώρα στο θαλασσινό νερό, σε θερμοκρασίες περίπου 25°C (Yasunaga et al., 1983). Ανεξάρτητα της γεωγραφικής προέλευσης και πηγής της μόλυνσης, αυτό το παθογόνο δείχνει ομοιογενή βιοχημικά και ορολογικά χαρακτηριστικά (Magariños et al., 1992a,b; Bakopoulos et al., 1997). Εντούτοις, μέθοδοι όπως του γενετικού αποτυπώματος, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) και RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), μπορούν να διαφοροποιήσουν τα Ευρωπαϊκά από τα Ιαπωνικά στελέχη (Kvitt et al., 2002). Μέθοδοι απομόνωσης και ταυτοποίησης του βακτηρίου περιλαμβάνουν :

1. Απομόνωση από εσωτερικά όργανα ασθενών ψαριών σε tryptic soy agar (TSA), brain heart infusion agar (BHIA) και αιματούχο agar, όλα με προσθήκη 1-2% NaCl, ύστερα από 2-4 ημέρες επώαση στους 22°C. Πιθανή ταυτοποίηση γίνεται σύμφωνα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά (μικρά gram-αρνητικά, μη-κινητά βακτήρια με διπολική χρώση) και με τη χρήση βιοχημικών δοκιμών.
2. Ανοσολογικές τεχνικές, όπως ELISA, τεχνικές φθορίζοντων αντισωμάτων και ανοσοϊστοχημεία έχουν αναπτυχθεί για την ταυτοποίηση όλων των στελεχών. Χρήση εμπορικών kit με πολυκλωνικά αντισώματα.
3. Χρήση εργαλεία μοριακής βιολογίας, όπως αλυσιδωτή αντίδραση (PCR) (Osorio et al., 1999, 2000; Osorio and Toranzo, 2002).

1.2.1.1.2.2. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*

Ο μικροοργανισμός σχετίστηκε αρχικά με ελκώδεις βλάβες κατά μήκος των πτερυγίων του ψαριού *Chromis punctipinnis*. Αυτά τα έλκη παρουσιάστηκαν το καλοκαίρι και το φθινόπωρο μεταξύ των ιχθυοπληθυσμών στα παράκτια νερά της Νότιας Καλιφόρνιας. Έρευνες άγριων ιχθυοπληθυσμών οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα έλκη ήταν περιορισμένα στο είδος *Chromis punctipinnis*. Επιπρόσθετες πληροφορίες επεσήμαναν ένα ρόλο στη μόλυνση του ανθρώπου, εφόσον ο μικροοργανισμός έχει απομονωθεί από ανθρώπινες πληγές (Love et al, 1981). Μεταγενέστερες εργασίες έδειξαν ότι αυτός ο οργανισμός απομονώθηκε από καρχαρία (Grimes et al., 1984 a,b; Fujioka et al, 1988), καλκάνι (Fouz et al, 1991, 1992) και πέστροφα στη Δανία (Pedersen et al, 1997a). Τα ψάρια με πληγές, πιθανόν το αποτέλεσμα της προσβολής από το *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, αντιπροσώπευαν το 10-70% του πληθυσμού στο King Harbor στην Καλιφόρνια, από τον Αύγουστο ως τον Οκτώβριο, και από τον Ιούνιο μέχρι τον Οκτώβριο. Αυτό δείχνει μια εποχιακή κατανομή στην συχνότητα του νοσήματος, και πιθανόν συμπίπτει με υψηλότερες θερμοκρασίες νερού και χαμηλότερη ανοχή, που προκαλείται από φυσιολογικές αλλαγές του ξενιστή κατά την διάρκεια γεννητικής ωριμότητας. Το *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* υπάρχει φυσιολογικά στο θαλάσσιο περιβάλλον, όπου θα μπορούσε να είναι μια σταθερή απειλή σε ευαίσθητα είδη ψαριών. Το θαλασσινό νερό είναι το πιθανό μέσον μετάδοσης των λοιμογόνων κυττάρων του παθογόνου, με τα κύτταρα να προσκολλώνται και να ανθίστανται στη βακτηριοκτόνο δράση της βλέννας. Αυτό δείχνει ότι το δέρμα του ξενιστή είναι μια θύρα εισόδου (Fouz et al., 2000).

1.2.1.2. *Aeromonas* spp.

Gram αρνητικά βακτήρια, τα οποία ανήκουν στη φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα του θαλάσσιου περιβάλλοντος (Santos et al., 1988; Athanassopoulou et al.,

1999; Paniagua et al., 2001; Francis-Floyd, 2002) και αναφέρονται στη βιβλιογραφία, ως παθογόνα για τα ψάρια (Santos et al., 1988, Austin and Austin, 2007), συνήθως ως αποτέλεσμα καταπόνησης ή άλλων χειρισμών (Francis-Floyd, 2002).

Τα είδη που προκαλούν προβλήματα στις υδατοκαλλιέργειες θερμόφιλων ψαριών –στα οποία ανήκουν και τα Μεσογειακά είδη– είναι τα: *Aeromonas hydrophila* και *Aeromonas sobria*.

Η θνησιμότητα που προκαλούν οι μολύνσεις με *Aeromonas spp.* είναι συνήθως μικρή (<10%) και οι απώλειες παρατηρούνται σε διάστημα 2 – 3 εβδομάδων (ή και περισσότερο). Για την εκδήλωση των συμπτωμάτων, έχει προηγηθεί κάποιος παράγοντας καταπόνησης (stress), όπως κακή ποιότητα νερού, υψηλή ιχθυοπυκνότητα ή βάνασοι χειρισμοί (Francis-Floyd, 2002).

Τα συνήθη συμπτώματα που παρουσιάζουν ψάρια προσβεβλημένα με *Aeromonas spp.*, περιλαμβάνουν: εστιακές αιμορραγίες στη βάση των πτερυγίων ή στο δέρμα, διογκωμένη κοιλία, εξόφθαλμο. Εσωτερικά διακρίνονται: παρουσία υγρού στην κοιλιακή χώρα και στα σπλάχνα, τα οποία είναι διεσταλμένα, και διόγκωση στο ήπαρ και το σπλήν (Francis-Floyd, 2002 ; Austin and Austin, 2007).

Το βακτήριο έχει απομονωθεί από δείγματα πολλών ειδών ψαριών, όπως: παλαμίδα (*Dorosoma cepedianum*), εκτρεφόμενη πέρκα (*Perca fluviatilis*), ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), διάφορα διακοσμητικά είδη, τσιπούρα, λαβράκι και μυτάκι (*Puntazzo puntazzo*) τα οποία δεν εμφάνιζαν πάντοτε συμπτώματα (Santos et al., 1988; Balebona et al., 1998; Athanassopoulou et al., 1999; Paniagua et al., 2001; Austin and Austin, 2007).

Το είδος *Aeromonas hydrophila* θεωρείται υποχρεωτικά παθογόνο για τα εκτρεφόμενα είδη τσιπούρας, λαβρακιού και μυτακιού (Athanassopoulou et al., 1999; Paniagua et al., 2001), ενώ έχει βρεθεί ότι είναι ευκαιριακά παθογόνο για χερσαία

ζώα και τον άνθρωπο (Paniagua et al., 2001), οπότε απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά τους ιχθυοκομικούς χειρισμούς.

1.2.1.3. *Pseudomonas fluorescens*

Το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* είναι ένα κυρίαρχο συστατικό του οικοσυστήματος του γλυκού νερού (Allen et al, 1983b). Κατά καιρούς το βακτήριο *P. fluorescens* έχει θεωρηθεί ως οργανισμός αλλοίωσης των ψαριών (Shewan et al, 1960), παράγοντας μόλυνσης ή δευτερογενής εισβολέας σε ιστούς (ψαριών) που έχουν υποστεί βλάβη (Otte, 1963), καθώς και ως πρωτογενές αλλά ελαφρώς παθογόνο (Roberts and Home, 1978).

1.2.2. Μελέτη κυριότερων βακτηρίων απομονωμένων από εκτρεφόμενα και άγρια θαλασσινά ψάρια που νοσούν στην Ελλάδα

Κατά την διάρκεια εννέα ετών (1997-2005) απομονώθηκαν 2124 συνολικά στελέχη βακτηρίων από 430 περιστατικά, όπως φαίνεται στον πίνακα 1.2.2.1. (Yiagnisis et Athanassopoulou, υπό δημοσίευση).

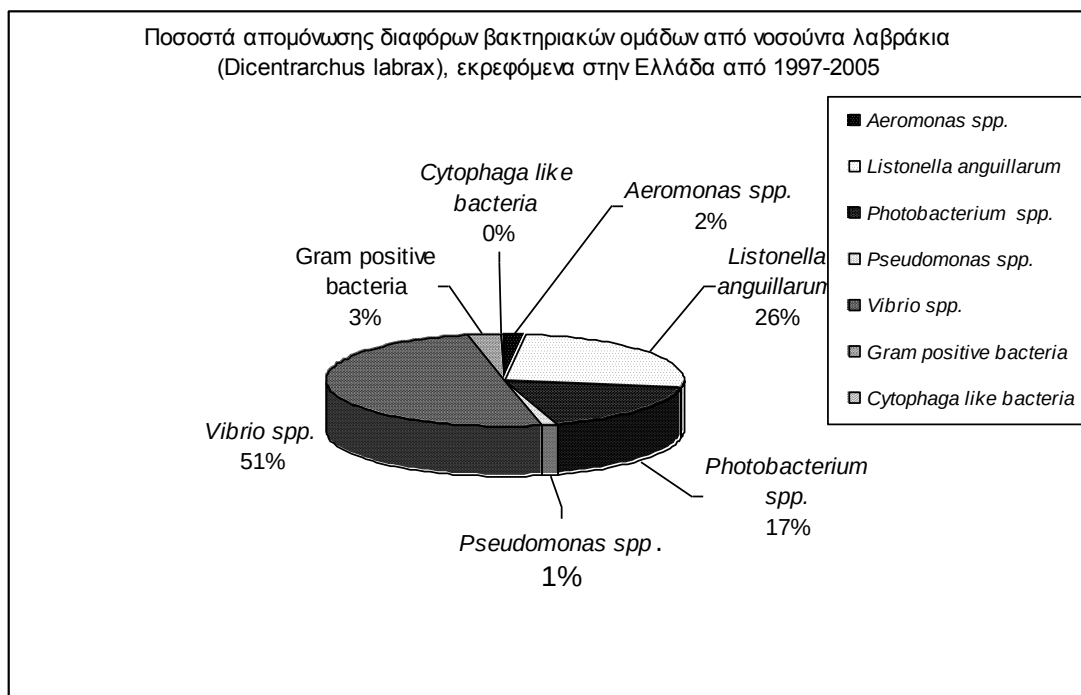
Πίνακας 1.2.2.1. Αριθμός και προέλευση βακτηριδίων που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν.

Λατινικό όνομα		Αριθμός απομονωμένων βακτηριακών	
είδους	Είδος ψαριού	στελεχών	
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Λαβράκι	1017	
<i>Sparus aurata</i>	Τσιπούρα	887	
<i>Puntazzo puntazzo</i>	Μυτάκι	99	
<i>Pagellus erythrinus</i>	Λυθρίνι	21	
<i>Pagrus pagrus</i>	Φαγκρί	19	
<i>Diplodus sargus</i>	Σαργός	12	
<i>Dentex dentex</i>	Συναγρίδα	12	
<i>Mugil cephalus</i>	Κέφαλος	6	
<i>Epinephelus</i>			
<i>marginatus</i>	Ροφός	4	
<i>Lithognathus</i>			
<i>mormyrus</i>	Μουρμούρα	4	
	άγρια είδη	43	
Σύνολο			
απομονωμένων			
βακτηριακών			
στελεχών		2124	

Τα βακτήρια χαρακτηρίστηκαν κατ αρχάς σε επίπεδο γένους και κατόπιν σε επίπεδο είδους.

1.2.2.1. Βακτήρια απομονωμένα από λαβράκι

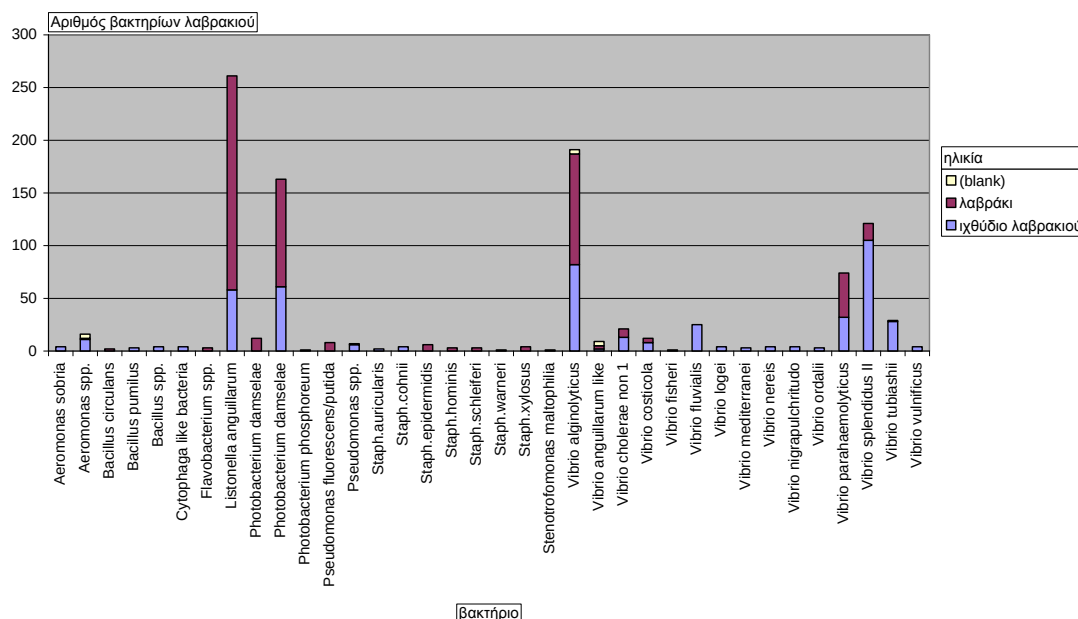
Στο σχήμα 1.2.2.1.1. παρουσιάζονται τα ποσοστά απομόνωσης βακτηριακών ομάδων, από λαβράκια που νοσούν, εκτρεφόμενα στην Ελλάδα από 1997-2005 (Yiagnisis et Athanassopoulou, υπό δημοσίευση).



Σχήμα 1.2.2.1.1. Ποσοστά απομόνωσης βακτηριακών ομάδων, από λαβράκια που νοσούν, εκτρεφόμενα στην Ελλάδα από 1997-2005.

Παρατηρείται ότι τα διάφορα είδη *vibrio* μαζί με την *Listonella (Vibrio) anguillarum* συνιστούν το 77% των βακτηρίων που απομονώνονται από τα νοσούντα λαβράκια. Το γένος *Photobacterium* απομονώνεται κατά 17%, με κύριο αντιπρόσωπο το *Photobacterium damsela subsp. piscicida*. Οι υπόλοιπες ομάδες βακτηρίων απομονώνονται σε χαμηλά ποσοστά.

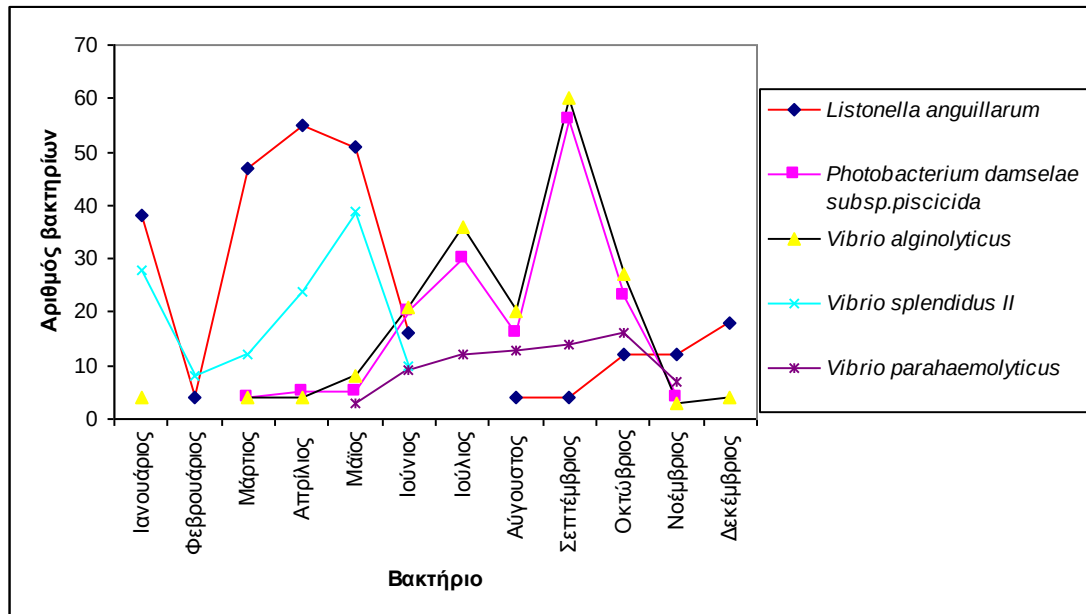
Στο σχήμα 1.2.2.1.2. παρουσιάζονται τα βακτήρια που έχουν απομονωθεί από ηλικιακές ομάδες του λαβρακιού (Yiagnisis et Athanassopoulou, υπό δημοσίευση).



Σχήμα 1.2.2.1.2. Αριθμός και είδη βακτηρίων από ιχθύδια λαβρακιού και μεγαλύτερα λαβράκια. Ιχθύδια: 0,2-6 g.

Από το σχήμα 1.2.2.1.2. φαίνεται ότι τα βακτηριακά είδη με τη μεγαλύτερη συχνότητα απομόνωσης, από το λαβράκι, είναι η *Listonella anguillarum*, το *Vibrio alginolyticus*, το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, το *Vibrio splendidus* II και το *Vibrio parahaemolyticus*. Τα βακτήρια αυτά απομονώθηκαν από το λαβράκι τόσο στο στάδιο του ιχθυδίου, όσο και από μεγαλύτερα ψάρια. Η *Listonella anguillarum* και το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* απομονώνονται κυρίως από μεγαλύτερα λαβράκια. Το *Vibrio splendidus* II έχει τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στα ιχθύδια. Όπως φαίνεται από το σχήμα 1.2.2.1.3., η μεγαλύτερη συχνότητα απομόνωσης της *Listonella anguillarum* παρατηρείται το μήνα Απρίλιο, του *Vibrio splendidus* II το μήνα Μάιο ενώ των *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* και *Vibrio alginolyticus* η μεγαλύτερη συχνότητα απομόνωσης είναι το μήνα Σεπτέμβριο.

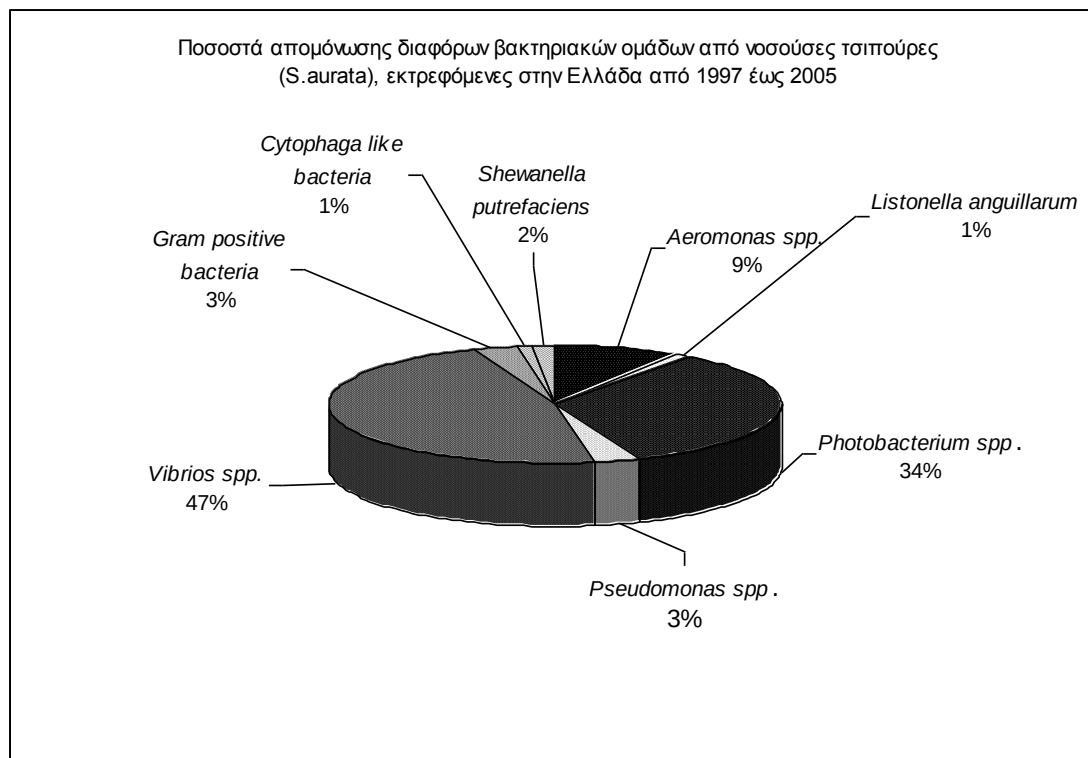
Το βακτήριο *Vibrio parahaemolyticus* έχει τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης τον Αύγουστο.



Σχήμα 1.2.2.1.3. Αριθμός και είδη βακτηρίων, με τη μεγαλύτερη συχνότητα απομόνωσης, από το λαβράκι σε σχέση με το μήνα (Yiagnisis et Athanassopoulou, υπό δημοσίευση).

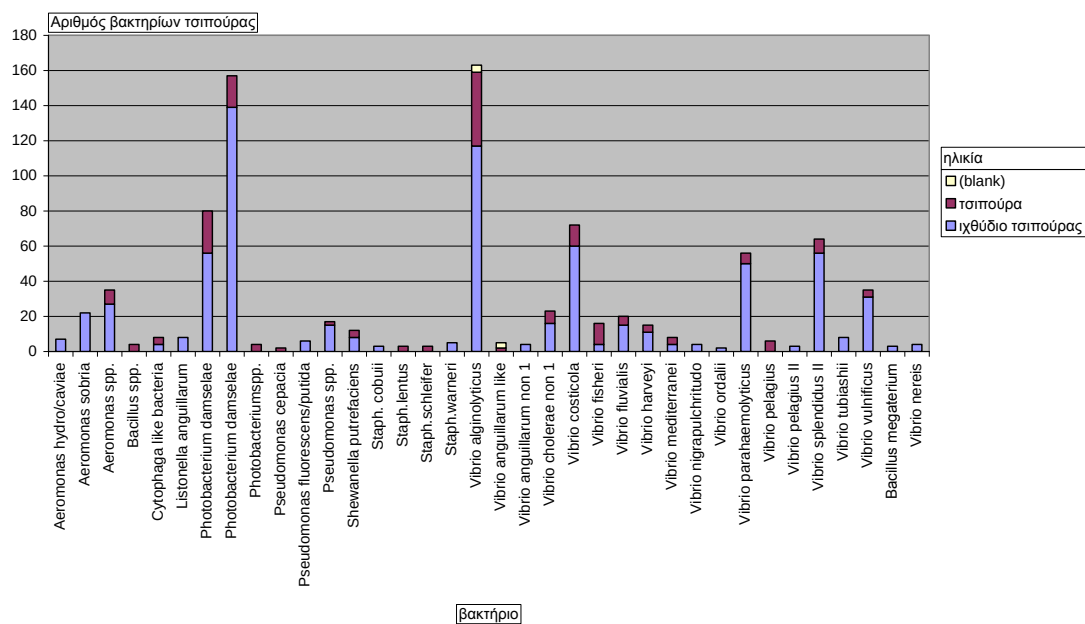
1.2.2.2. Βακτήρια απομονωμένα από τσιπούρα (*Sparus auratus*)

Στο σχήμα 1.2.2.2.1. παρουσιάζονται τα ποσοστά απομόνωσης διαφόρων βακτηριακών ομάδων από τσιπούρες που νοσούν, εκτρεφόμενες στην Ελλάδα από το 1997 έως το 2005 (Yiagnisis et Athanassopoulou, υπό δημοσίευση).



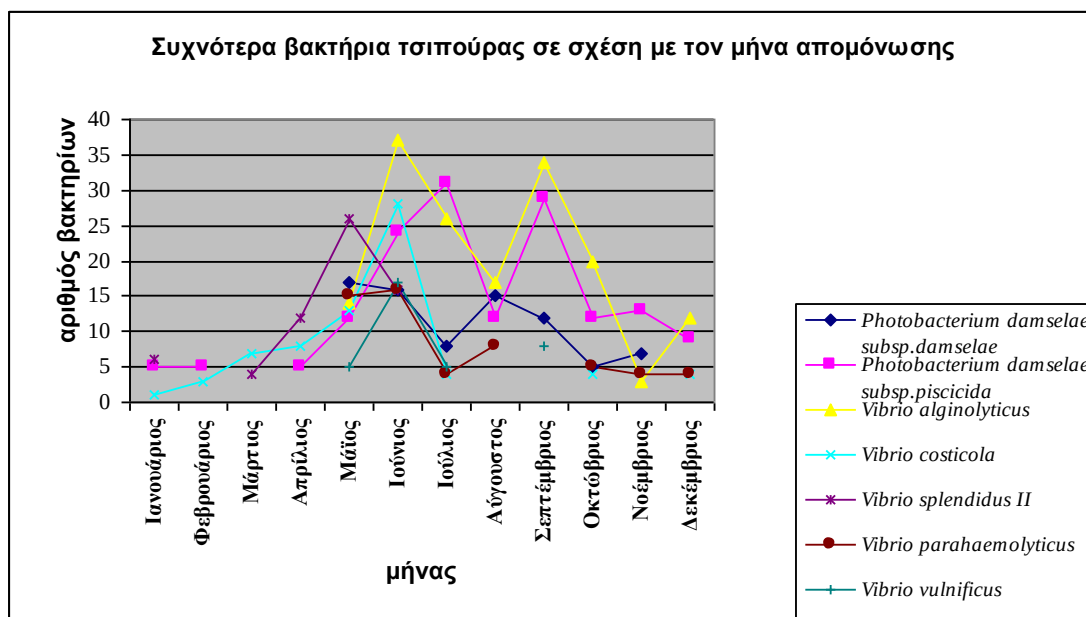
Σχήμα 1.2.2.2.1. Ποσοστά απομόνωσης διαφόρων βακτηριακών ομάδων, από τσιπούρες που νοσούν , εκτρεφόμενες στην Ελλάδα από το 1997 έως το 2005 (Yiagnisis et Athanassopoulou, υπό δημοσίευση).

Στο σχήμα 1.2.2.2.1. παρατηρείται ότι τα διάφορα είδη *vibrio* μαζί με την *Listonella anguillarum* συνιστούν μόνο το 48% των βακτηρίων που απομονώνονται από τις νοσούσες τσιπούρες. Το γένος *Photobacterium* απομονώνεται κατά 34%, με κύριο αντιπρόσωπο το *Photobacterium damsela subsp. piscicida*. Οι αερομονάδες έχουν συχνότητα εμφάνισης 9%, οι ψευδομονάδες 3%, η *Shewanella putrefaciens* το 2%, Gram θετικοί κόκκοι 3% και τα *Cytophaga like bacteria* 1%. Όπως φαίνεται στο σχήμα 1.2.2.2.2. η πλειονότητα των βακτηρίων απομονώνεται από τα ιχθύδια τσιπούρας. Τα βακτήρια, με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στην τσιπούρα, είναι το *Photobacterium damsela subsp. piscicida*, το *Vibrio alginolyticus*, το *Photobacterium damsela subsp. damsela*, το *Vibrio costicola*, το *Vibrio splendidus*, το *Vibrio parahaemolyticus* και το *Vibrio vulnificus*.



Σχήμα 1.2.2.2.2. Αριθμός και είδη βακτηρίων, απομονωμένων από ιχθύδια τσιπούρας και μεγαλύτερες τσιπούρες (Yiagnisis et Athanassopoulou, υπό δημοσίευση).

Στο σχήμα 1.2.2.2.3. παρουσιάζονται τα συχνότερα απομονωμένα, από νοσούσες τσιπούρες, βακτήρια σε σχέση με τα τον μήνα απομόνωσης. Παρατηρείται ότι το βακτήριο *Vibrio alginolyticus* απομονώνεται ταυτόχρονα με το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.



Σχήμα 1.2.2.2.3. Κατανομή συχνότερα απομονωμένων βακτηρίων τσιπούρας σε σχέση με τον μήνα απομόνωσης (Yiagnisis et Athanassopoulou, υπό δημοσίευση).

1.2.3. Βακτήρια ιατρικής σημασίας, απομονωμένα από θαλασσινό νερό και ψάρια στην Ελλάδα.

Μέλη του γένους *Vibrio* είναι κοινά βακτήρια σε περιβάλλοντα θαλασσινά, παράκτια και υφάλμυρα. Σήμερα, έχειδειχθεί ότι 12 είδη της οικογενείας *Vibrionaceae*, που προέρχονται από το θαλάσσιο περιβάλλον, προκαλούν νοσήματα σε ανθρώπους (Tantillo et al., 2004). Τα τελευταία χρόνια η έρευνα δεν εστιάζεται μόνο στη χολέρα αλλά και σε άλλα είδη της οικογένειας *Vibrionaceae*. Νοσήματα που προκαλούνται από αυτά τα είδη έχουν αναφερθεί από όλες τις ηπείρους, ειδικά σε ανθρώπους ανοσοκατασταλμένους. Τέτοια είδη είναι το *Vibrio parahaemolyticus*, το *Vibrio vulnificus*, το *Vibrio alginolyticus* και το *Photobacterium damsela subsp. damsela*. Το *Vibrio parahaemolyticus*, ένα αλόφιλο δονάκιο που σχετίζεται με γαστρεντερίτιδα, μπορεί να μολύνει με κατανάλωση ωμών ή ακατάλληλα μαγειρεμένων θαλασσινών. Ένα άλλο αλόφιλο δονάκιο το *V. vulnificus* σχετίζεται με μολύνσεις τραυμάτων, ειδικά μαλακών ιστών, και θανατηφόρο σηψαιμία (Oliver, 2005). Οι Amaro και Biosca, 1996, ανέφεραν ότι ο βióτυπος 2 του *V. vulnificus*, που θεωρείται υποχρεωτικό

παθογόνο για τα χέλια (*Anguilla* spp.), μπορεί να είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο για τους ανθρώπους. Το *Photobacterium (Vibrio) damsela* είναι ένα αλόφιλο βακτήριο και είναι παθογόνο σε θαλάσσιους οργανισμούς και ανθρώπους (Yamane et al., 2004; Knight-Madden et al., 2005, προκαλεί μολύνσεις τραυμάτων, ύστερα από έκθεσή τους σε υφάλμυρα νερά ή τραυματισμό από θαλάσσια ζώα και θανατηφόρο ασθένεια σε ψάρια, μεταξύ των οποίων η τσιπούρα (*Sparus aurata*)(Vera et al., 1991). Το *Vibrio alginolyticus* είναι ένα ευρέως διαδεδομένο δονάκιο στο θαλασσινό νερό, θεωρείται δε μέρος της φυσιολογικής θαλάσσιας χλωρίδας. Έχει απομονωθεί ως παθογόνο από αρκετά θαλάσσια ζώα και ανθρώπους. Σχετίζεται με ασθένειες των αυτιών και επιφανειακών τραυμάτων, που προέρχονται από προηγούμενη έκθεση σε μολυσμένο θαλασσινό νερό.

Απομονώθηκαν επτακόσια είκοσι εννιά βακτήρια ιατρικής σημασίας (696 απομονωμένα από νοσοούντα εκτρεφόμενα και άγρια είδη ψαριών και 33 από θαλασσινά νερά) σε διάρκεια εννέα ετών (Yiagnisis et al., accepted). Το πλέον διαδεδομένο βακτηριακό είδος είναι το *Vibrio alginolyticus* (61,4%), ακολουθεί το *Vibrio parahaemolyticus* με συχνότητα απομόνωσης 18,6%, το *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* με συχνότητα απομόνωσης 14,5% και το βακτήριο με τη χαμηλότερη συχνότητα απομόνωσης είναι το *Vibrio vulnificus*. Και ενώ το *V. alginolyticus* απομονώθηκε από όλα τα είδη ψαριών, το είδος *V. vulnificus* απομονώθηκε κυρίως από τσιπούρα. Το *Vibrio parahaemolyticus* απομονώθηκε από λαβράκι, τσιπούρα και μυτιάκι. Η συχνότητα εμφάνισης του βακτηρίου *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* είναι μεγαλύτερη στην τσιπούρα και το μυτιάκι από ότι στο λαβράκι. Το *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* έχει μεγάλη συχνότητα εμφάνισης στα νοσοούντα άγρια ψάρια.

1.3. Λειτουργίες του εντέρου των ψαριών

Το έντερο είναι ένα σύνθετο όργανο με πολλές λειτουργίες. Εκτός από την πέψη και την απορρόφηση της τροφής, το έντερο είναι σημαντικό για το ισοζύγιο του ύδατος

και των ηλεκτρολυτών, την ενδοκρινή ρύθμιση της πέψης και του μεταβολισμού και την ανοσία. Το έντερο έχει πολλές παραλλαγές στο μήκος, η δε δομική του ποικιλία στα ψάρια (Suychiro, 1942) υπερβαίνει αυτήν που βρίσκεται σε άλλα σπονδυλωτά (Steves, 1988). Το οπίσθιο τμήμα του εντέρου (hindgut) θεωρείται ότι είναι η κύρια θέση για την εντερική απορρόφηση των μακρομορίων στα σολομοειδή και κάποια άλλα είδη ψαριών (Dalmo et al, 1997). Το μεσαίο τμήμα του εντέρου ξεκινά αμέσως πίσω από τον πυλωρό και έχει ευδιάκριτα επιθηλιακά, απορροφητικά και εκκριτικά κύτταρα. Το οπίσθιο τμήμα του εντέρου είναι μία επέκταση του μεσαίου τμήματος με βαθμιαία μειούμενες πεπτικές και απορροφητικές λειτουργίες και αυξημένα τα επίπεδα παραγωγής βλέννας. Το γαστρεντερικό σύστημα είναι ουσιαστικά μία μυϊκή έκταση επενδυμένη με βλεννογόνο μεμβράνη που παρουσιάζει παραλλαγές στη δομή που αντανακλούν τις διαφορές στην λειτουργία. Το εντερικό PH κυμαίνεται μεταξύ 7,0 και 8,0 και 7,5 και 9,0 στο μικρό και μεγάλο έντερο, αντίστοιχα (Ranson et al., 1984; Gislason et al., 1996).

1.3.2. Εντερική μικροβιακή χλωρίδα στα ψάρια

Η πρώτη παρατήρηση της εμφάνισης ενός γαστροεντερικού μικροοργανισμού σε ξενιστή έγινε από τον Leewenhock το 1674 (DoBell, 1932). Ωστόσο, η εμπειριστατωμένη μελέτη των εντερικών βακτηρίων ξεκίνησε μόνο μετά την ανακάλυψη της *Escherichia* στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα, που έθεσε τα θεμέλια της γαστρεντερικής μικροβιακής χλωρίδας σε άλλα είδη. Τα ψάρια έχουν ειδική εντερική μικροβιακή χλωρίδα που συνίσταται από αερόβια, προαιρετικά αναερόβια, και υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια, αλλά η βακτηριακή σύσταση μπορεί να αλλάξει ανάλογα με την ηλικία, το επίπεδο διατροφής και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η εντερική μικροβιακή χλωρίδα έχει ταξινομηθεί σαν αυτόχθονη ή γηγενής (όταν τα βακτήρια είναι ικανά να αποικίσουν την επιθηλιακή επιφάνεια του εντέρου του ξενιστή) ή σαν αλλόχθονη ή προσωρινή (Ringo et al., 2003). Είναι γενικά αποδεκτό ότι το

περιβάλλον μπορεί να επηρεάσει τη μικροβιακή χλωρίδα που σχετίζεται με το δέρμα, τα βράγχια και τα έντερα των ψαριών (Wood, 1953; Liston, 1957; Shewan, 1971; Horsley, 1973). Ένα ευρύ φάσμα μικροβίων που προέρχονται από το εγγύς υδάτινο περιβάλλον, το ίζημα και τις ζωοτροφές έχει βρεθεί ότι αποικίζουν την γαστρεντερική οδό των ψαριών (Nayak, 2010). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, σημαντική έρευνα έχει πραγματοποιηθεί για το χαρακτηρισμό της γαστρεντερικής μικροβιακής χλωρίδας σε ένα ευρύ φάσμα ειδών ψαριών (Ringo et al., 1995; Ringo and Gatesoupe 1998; Ringo et al., 2001; Ward et al., 2009).

Η γαστρεντερική οδός είναι μία πιθανή είσοδος παθογόνων (Chair et al., 1994; Olsson, 1995; Olsson et al., 1996; Grisez et al., 1996.; Romalde et al., 1996; Joborn et al., 1997; Robertson et al., 2000; Lodemel et al., 2001). Ο βακτηριακός πληθυσμός των εντέρων έχει μελετηθεί σε αρκετές μελέτες (Cahill, 1990; Ringo et al., 1995) και οι περισσότερες απ' αυτές τις μελέτες έχουν δείξει μια προοδευτική αύξηση στον αριθμό των αεροβίων ετεροτροφικών βακτηρίων που σχετίζονται με το έντερο, από περίπου 10^5 στο λεπτό έντερο, σε 10^7 στο μεγάλο έντερο των ενηλίκων ψαριών. Οι Magarinos et al., 1996, έδειξαν ότι στελέχη του βακτηρίου *Pasteurella piscicida* προσκολλώνται ισχυρά στα έντερα της τσιπούρας, του λαβρακιού και του καλκανιού, σε αριθμούς από 10^4 έως 10^5 βακτήρια ανά γραμμάριο εντέρου, ανάλογα από το βακτηριακό στέλεχος και το είδος του ψαριού. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί εντός της πεπτικής οδού των ψαριών είναι πυκνοί, με αριθμούς μικροοργανισμών πολύ υψηλότερους από αυτούς των περιβαλλόντων υδάτων. Αυτό δείχνει ότι η πεπτική οδός προσφέρει επιθυμητές και κατάλληλες οικολογικές θέσεις γι αυτούς τους μικροοργανισμούς (Trust and Sparrow, 1974; Horsley, 1977; Austin and Al-Zahrani, 1988; Sakata, 1990). Παρόλα αυτά, η γαστρεντερική μικροχλωρίδα των ψαριών φαίνεται ότι είναι πιο απλή από αυτή των ενδόθερμων. Η γαστρεντερική οδός των θηλαστικών περιέχει μια τεράστια ποικιλία από αερόβια και αναερόβια μικρόβια που αλληλεπιδρούν στο σύνθετο οικοσύστημα της (Eckburg et al., 2005) αλλά η γαστρεντερική οδός των ψαριών πιστεύεται ότι είναι απλούστερη και η χλωρίδα είναι

μικρότερη σε αριθμό από των ενδοθερμών ζώων (Sakata, 1990). Ενώ η πεπτική οδός των ενδοθερμών αποικίζεται κυρίως από υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια (Finegold, Suter and Mathisen., 1983), τα κυρίαρχα βακτηριακά γένη που απομονώνονται από τα περισσότερα έντερα των ψαριών είναι αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια (Trust and Sparrow, 1974; Horsley, 1977; Sakata 1990). Τα βακτήρια, που είναι παρόντα στο έντερο των ψαριών, μπορεί να είναι ωφέλιμα για το ψάρι, ως προς την διατροφή του (Hamid et al., 1979; Campell and Buswell, 1983; Macdonald et al., 1986) ή ως προς την πρόληψη του αποικισμού του εντέρου από παθογόνα βακτήρια (Westerdahl et al., 1991), μπορεί να μην εμπλέκονται σε κανένα από τα παραπάνω ή ακόμη μπορεί να προκαλούν μαζικούς θανάτους, ανάλογα με το είδος που εμπλέκεται. Εφόσον το έντερο των νυμφών των ψαριών εν τη γενέσει, είναι θεωρητικά στείρο (Lesel, 1081), τα βακτήρια που υπάρχουν στο περιβάλλον και στην ζωντανή τροφή είναι οι πρώτοι αποικιστές. Σύμφωνα με τους Grisez et al., 1997, οι διακυμάνσεις στην σύνθεση της κυρίαρχης εντερικής μικροβιακής χλωρίδας των λαρβών λαβρακιού και τσιπούρας εμφανίζονται να αντανakλούν την βακτηριακή σύνθεση της πεπτόμενης ζωντανής τροφής. Στα νεαρά και ενήλικα θαλασσινά ψάρια, η εντερική μικροβιακή χλωρίδα κυριαρχείται από τα δονάκια (Newmann et al., 1972; Muroga et al., 1987). Η παθογένεση των λοιμώξεων, που οφείλονται σε δονάκια στα θηλαστικά, είναι πρωτογενώς μια εντερική λοίμωξη και είναι λογικό να διερωτηθούμε εάν ισχύει το ίδιο και στα ψάρια. Παθογόνα βακτήρια ψαριών, όπως η *Listonella anguillarum* και το *Vibrio salmonicida*, έχει δειχθεί ότι προσκολλώνται στο εντερικό επιθήλιο των νυμφών των ψαριών και προκαλούν σοβαρή καταστροφή των μικρολαχνών (microvilli).

Είναι σημαντικό να έχουμε σταθερή εντερική μικροβιακή χλωρίδα ως ένα μέρος της φυσικής αντίστασης των ψαριών σε μολύνσεις. Φυσιολογική χλωρίδα είναι μικροοργανισμοί που αποικίζουν τον ξενιστή αλλά δεν προκαλούν λοίμωξη. Όλα τα ζώα (και τα φυτά) έχουν χαρακτηριστική φυσιολογική χλωρίδα. Η φυσιολογική χλωρίδα και ο ξενιστής έχουν εξελικτικά προσαρμοσθεί μεταξύ τους να συνυπάρχουν

και αυτή η σχέση υπάρχει εδώ και πολλά εκατομμύρια χρόνια. Ευκαιριακά παθογόνα είναι φυσιολογικά μη παθογόνοι οργανισμοί (συχνά φυσιολογική χλωρίδα) που προκαλούν λοίμωξη κάτω από καταστάσεις όπου η αντίσταση του ξενιστή είναι χαμηλή (δευτερογενής λοίμωξη). Υπάρχει ένα κατάλληλο ισοζύγιο μεταξύ της ενδογενούς μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου και του μηχανισμού ελέγχου του ξενιστή. Ωστόσο, εάν αυτό το ισοζύγιο διαταραχθεί, αρκετοί μικροοργανισμοί, που παροδικά θα βρεθούν στην μικροβιακή χλωρίδα (transient), μπορούν να δημιουργήσουν μολύνσεις (Sekirov and Finlay, 2009).

Δεν υπάρχει πολύ μεγάλη πληροφορία για τη σύνθεση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας και τον αποικισμό του εντέρου, από διαφορετικά βακτηριακά είδη, στην εκτρεφόμενη τσιπούρα και στο λαβράκι των ελληνικών ιχθυοκαλλιεργειών, παρά μόνο στο επίπεδο των λαβρών (Κυρκούδης, 2006). Ειδική προσοχή δίδεται στη χλωρίδα της οικογένειας *Vibrionaceae*, αφού είδη αυτής της οικογένειας περιγράφονται ως τα κυρίαρχα εντερικά είδη στα θαλασσινά ψάρια.

1.3.3. Μελέτη της εντερικής χλωρίδας του εκτρεφόμενου λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*)

Για την μελέτη της εντερικής χλωρίδας του εκτρεφόμενου λαβρακιού, έγινε μία σειρά από 5 εποχιακές δειγματοληψίες υγιών ψαριών σε μία συγκεκριμένη μονάδα εκτροφής λαβρακιών στο Σαρωνικό Κόλπο και συγκεκριμένα στον Πόρο (Γιαγνίστη αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Οι δειγματοληψίες έδειξαν το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* ως το κυρίαρχο είδος της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας των ενηλίκων λαβρακιών της συγκεκριμένης μονάδας, το οποίο επικρατεί σε όλες τις εποχές πλην του χειμώνα, όπου επικρατούν οι ψευδομονάδες, η *Shewanella putrefaciens* και το *Vibrio tubiashii*. Το *Vibrio harveyi* καθώς και οι αερομονάδες είναι και αυτά από τα επικρατούντα είδη της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας. Επίσης έγιναν βακτηριολογικές εξετάσεις εντερικής μικροβιακής χλωρίδας λαβρακιού 6 και 7

γραμμαρίων αντίστοιχα, από δύο πειράματα κατά τη χειμερινή περίοδο, με σκοπό να μελετηθεί η βακτηριολογική ποιοτική σύσταση της εντερικής χλωρίδας του λαβρακιού κατά την περίοδο αυτή. Ψευδομονάδες βρέθηκαν στην εντερική χλωρίδα των λαβρακιών και δονάκια (*Vibrio tubiashii*, *Vibrio anguillarum* like, *Vibrio* sp.) αλλά και βακτήρια και κόκκοι θετικοί κατά Gram (σταφυλόκοκκοι). Ένα μήνα αργότερα, η εντερική χλωρίδα των λαβρακιών του δεύτερου πειράματος εμφανίζεται να απαρτίζεται από ψευδομονάδες, βακτήρια θετικά κατά Gram, δονάκια (*Vibrio tubiashii*), κόκκους θετικούς κατά Gram και μυξοβακτήρια (*Chytophaga*- like bacteria).

1.3.4. Μελέτη της εντερικής χλωρίδας της εκτρεφόμενης τσιπούρας *Sparus aurata*

Για τη μελέτη της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας της τσιπούρας έγιναν 3 δειγματοληψίες σε τσιπούρες διαφορετικών μεγεθών και χρονικών περιόδων (Γιαγνίση αδημοσίευτα αποτελέσματα). Το *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* είναι το βακτηριακό είδος που επικρατεί στην εντερική χλωρίδα της τσιπούρας στις δύο από τις τρεις δειγματοληψίες. Όσο πλησιάζουμε προς το χειμώνα, εμφανίζονται στην χλωρίδα ψυχρόφιλα είδη όπως ψευδομονάδες και *Shewanella putrefaciens*. Άλλα είδη βακτηρίων όπως τα *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio costicola*, *Vibrio splendidus* II εμφανίζονται στην εντερική χλωρίδα.

1.4. Χρόνια και οξεία καταπόνηση. Η επίδρασή τους στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των εκτρεφόμενων ψαριών.

Σαν καταπόνηση (στρες) ορίζεται οποιαδήποτε ενόχληση στη λειτουργία του οργανισμού, η οποία οφείλεται σε ερεθίσματα του εξωτερικού περιβάλλοντος, τεχνητά και φυσικά ή σε ψυχολογικούς παράγοντες. Η καταπόνηση(στρες) διακρίνεται σε οξεία και χρόνια. Η οξεία καταπόνηση στα ψάρια συμβαίνει για μικρή

περίοδο (μερικά λεπτά της ώρας έως ώρες) και είναι έντονη όπως είναι οι χειρισμοί (συλλογή, διαλογή, εμβολιασμοί). Χρόνια καταπόνηση ορίζεται ως η συνεχής (ημέρες –εβδομάδες) και επαναλαμβανόμενη έκθεση που προκαλεί μια παρατεταμένη φυσιολογική αντίδραση (συνωστισμός, κακή ποιότητα νερού, κοινωνική ιεραρχία, έκθεση σε νέα περιβάλλοντα).

Οι Mazeaud, Mazeaud and Donaldson, 1977, ταξινομούν τις φυσιολογικές αντιδράσεις που προκαλούνται από την καταπόνηση σαν πρωτογενείς, δευτερογενείς και τριτογενείς αντιδράσεις. Οι πρωτογενείς αντιδράσεις σχετίζονται με γρήγορη αύξηση στην κατεχολαμίνη του πλάσματος και στη συγκέντρωση των κορτικοστεροειδών. Είναι οι αντιδράσεις συναγερμού που είναι η αρχικές αποκρίσεις στο ερέθισμα. Η απελευθέρωση ορμονών προκαλεί δευτερογενείς αντιδράσεις που περιλαμβάνουν την απελευθέρωση της γλυκόζης στο αίμα για την παραγωγή ενέργειας, ακολουθούμενη από την αύξηση του καρδιακού ρυθμού, της ροής του αίματος στα βράγχια και του μεταβολικού ρυθμού που προκαλεί αλλαγές στο γαλακτικό οξύ του αίματος και αύξηση του αιματοκρίτη. Οι δευτερογενείς αυτές αντιδράσεις καθιστούν ικανά τα ψάρια να αντιδρούν καλλίτερα στις έντονες καταστάσεις καταπόνησης. Είναι ένα στάδιο αντίστασης, καθώς ο οργανισμός προσαρμόζει ή εξισορροπεί την διαταραχή, ώστε να ανακτήσει την ομοιόσταση. Αν ο οργανισμός δεν μπορεί να αντιμετωπίσει με επιτυχία την προκύπτουσα καταπόνηση, ακολουθούν οι τριτοβάθμιες αντιδράσεις. Οι αλλαγές που συνδέονται με τις τριτοβάθμιες αντιδράσεις συμπεριλαμβάνουν μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης, μειωμένη αντίσταση στις ασθένειες, εξάντληση, μεταβαλλόμενη συμπεριφορά και μειωμένη ικανότητα επιβίωσης. Η χρόνια καταπόνηση μπορεί να ευθύνεται για πολλά προβλήματα που παρατηρούνται στις εγκαταστάσεις των υδατοκαλλιεργειών, όπως αυξημένη ευαισθησία στις ασθένειες, αυξημένη μεταβολική τιμή και χρήση ενέργειας, μειωμένες τιμές ανάπτυξης, ανοσοκαταστολή και αναστολή ωρίμανσης γονάδων ή παραγωγής ωαρίων(Wendelaar Bonga, 1997) που ταξινομούνται σαν τριτογενείς αντιδράσεις στην καταπόνηση (Mazeaud and Mazeaud, 1981).

Το γαστρεντερικό σύστημα των θηλαστικών είναι πολύ ευαίσθητο σε διάφορους παράγοντες που προκαλούν καταπόνηση. Σύμφωνα με αρκετούς ερευνητές, η καταπόνηση προκαλεί εκφυλισμό του εντερικού επιθηλίου των θηλαστικών και διαταράσσει την λειτουργία του εντερικού φραγμού, καθώς και τους μηχανισμούς πρόσληψης στοιχείων (Sengupta and Sharma, 1993; Saunders et al., 1994; Prabhu et al., 2000; Santos et al., 2000), με αποτέλεσμα να ενισχύεται η πρόσληψη πιθανών βλαβερών υλικών, να αυξάνεται η βακτηριακή μετανάστευση (Tamayo et al., 1996) και έτσι να διευκολύνεται η εμφάνιση μολυσματικών ασθενειών. Στα θηλαστικά, η βακτηριακή μετανάστευση από την γαστρεντερική οδό είναι ένα ευρέως γνωστό φαινόμενο και ορίζεται σαν το πέρασμα ζωντανών βακτηριδίων από την γαστρεντερική οδό σε εξω-εντερικές θέσεις όπως το ήπαρ, ο σπλήνας ή η κυκλοφορία του αίματος (Berg, 1995). Οι Jutfelt et al., 2006, έδειξαν την πιθανότητα βακτηριδιακής μετανάστευσης *in vitro*, κατά μήκος του εντερικού επιθηλίου της ιριδιζουσας πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) με την χρήση της τεχνολογίας του θαλάμου (chamber) Ussing.

Εντερικές πρωτεΐνες, που εκκρίνονται από τα ειδικευμένα επιθηλιακά κύτταρα goblet που βρίσκονται μέσα στο εντερικό επιθήλιο, σχηματίζουν ένα παχύρρευστο, ένυδρο κάλυμμα πάνω στην επιφάνεια του βλεννογόνου που προστατεύει το ευαίσθητο επιθήλιο. Αυτό το βλεννώδες κάλυμμα θεωρείται ότι είναι ένα ζωτικό συστατικό του εντερικού βλεννώδους φραγμού στην πρόληψη του μικροβιακού αποικισμού από βακτήρια παθογόνα σε ψάρια και ενδοθερμικά ζώα (Westerdahl et al., 1991, Maxson et al., 1994; Mims et al., 1995). Έτσι η ενδογενής εντερική χλωρίδα εμποδίζεται από το να εισβάλλει σε άλλα όργανα.

Η καταπόνηση μειώνει την παραγωγή αντισωμάτων (Pickering, 1987; Pickering and Pottinger, 1987b), καθυστερεί την απόκριση του σώματος στα τραύματα ή στην μόλυνση και αυξάνει την ευαισθησία στα παθογόνα. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα με τα ευκαιριακά παθογόνα.

Ο κύριος φραγμός μεταξύ των ιστών των τελεοστέων ψαριών και του περιβάλλοντος νερού είναι το περίβλημα γλυκοπρωτεΐνης του βλεννογόνου που καλύπτει την επιδερμίδα, τα βράγχια και την γαστρεντερική οδό και είναι και το πρώτο εμπόδιο για την είσοδο ενός παθογόνου βακτηρίου σε ένα ψάρι ξενιστή (Ingram, 1980). Η καταπόνηση στα ψάρια σχετίζεται με μειωμένη επιφάνεια παραγωγής βλέννας. Εφόσον το στρώμα της βλέννας είναι ένας μεγάλος φραγμός άμυνας στα παθογόνα, λιγότερη βλέννα μπορεί να σημαίνει αυξημένη ευαισθησία στη μόλυνση. Η μειωμένη ικανότητα εγκλεισμού (φαγοκυττάρωσης) των βακτηριακών εισβολέων οφείλεται στην δράση της αυξημένης κορτιζόλης του αίματος, που επηρεάζει την ρευστότητα των μεμβρανών των μακροφάγων κυττάρων, αλλά το πιο σημαντικό είναι ότι τα μακροφάγα δεν μπορούν να καταστρέψουν τα παθογόνα, ακόμα και στην περίπτωση της φαγοκυττάρωσης.

Υπάρχουν πληροφορίες για την επίδραση της καταπόνησης στην ακεραιότητα της γαστρεντερικής οδού των ψαριών και αφορούν τα είδη *Anguilla anguilla* L (Peters, 1982), *Cyprinus carpio* (Szakolczai, 1997) και *Salmo salar* L (Olsen et al., 2002, Olsen et al., 2005). Υπάρχει μεγάλη σχέση μεταξύ καταπόνησης στα ψάρια και αυξημένης ευαισθησίας σε μολυσματικά νοσήματα (Snieszko, 1974; Mazeaud et al., 1977; Peters et al., 1988).

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η χρόνια καταπόνηση και η κοινωνική ιεραρχία αυξάνουν την εντερική μικροχλωρίδα των ενδοθερμικών ζώων (Tannock and Savage, 1974; Tannock, 1983). Η κοινωνική καταπόνηση επίσης αυξάνει την βακτηριακή χλωρίδα του εντέρου του ψαριού *Salvelinus alpinus* L. (Ringo et al., 1997).

Η οξεία καταπόνηση επηρεάζει την εντερική μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών. Τα προσκολλημένα βακτήρια μειώνονται τόσο στο μεσαίο όσο και στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου στον καταπονημένο σολομό του Ατλαντικού *Salmo salar* L. και αυτό συνοδεύεται από μια σημαντική αύξηση στο βακτηριακό περιεχόμενο των περιττωμάτων (Olsen et al. 2002). Αυτό επιτρέπει στα εναπομείναντα βακτήρια να

αποικίσουν την επιφάνεια των εντεροκυττάρων. Η γαστρεντερική οδός πιθανόν προσφέρει μια οδό μόλυνσης για τα παθογόνα στελέχη των βακτηρίων (Sakai, 1979; Rose et al., 1989; Olsson 1995; Grisez et al., 1996; Lodeme et al., 2001).

Ο πληθυσμός της εντερικής χλωρίδας μπορεί να αλλάξει λόγω περιβαλλοντικών παραγόντων. Καθώς τα ψάρια είναι ποικιλόθερμα, η εντερική χλωρίδα τους εξαρτάται από την θερμοκρασία. Πολλά βακτηριακά νοσήματα έχουν προέλευση το έντερο, και σε τέτοιες περιπτώσεις η φυσιολογική χλωρίδα χάνει την ισορροπία της εξαιτίας των παθογόνων που μπορούν να προκαλέσουν σηψαιμία (Gatesoupe and Lesel., 1998).

Δεν υπάρχουν αρκετές αναφορές για το λαβράκι, που να περιγράφουν την επίδραση της καταπόνησης στα βακτήρια της γαστρεντερικής οδού ή την πιθανή μετανάστευσή τους (translocation). Οι Vingneulle and Laurencin, 1991 χορήγησαν βακτηρίνη του *Vibrio anguillarum* από το στόμα και την έδρα σε πέστροφα, καλκάνι(turbot) και λαβράκι. Το αντιγόνο ανιχνεύθηκε στο οπίσθιο μέρος του εντέρου. Η πρόσληψη από την έδρα ήταν περισσότερο αποτελεσματική στο λαβράκι και το καλκάνι απ' ότι στην πέστροφα.

1.5. Η επίδραση της ποιότητας του νερού στην εκτροφή των ψαριών

Τα συστήματα εκτροφής ψαριών ποικίλουν σε σχεδιασμό και βαθμό εντατικοποίησης και είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με τα χαρακτηριστικά του νερού από άποψη ποιότητας, ποσότητας και της θερμοκρασίας. Οι εμπορικές εγκαταστάσεις υδατοκαλλιέργειας απαιτούν άφθονο νερό σωστής ποιότητας και θερμοκρασίας, τόσο στο αρχικό στάδιο και στο σύστημα παραγωγής. Παραλλαγές πέρα από το αποδεκτό εύρος των παραμέτρων για το νερό οδηγεί σε καταπόνηση, διαταραχή της υγείας και θνησιμότητα (Conte, 1992). Οι επιπτώσεις της καταπόνησης, που σχετίζεται με την ποιότητα του νερού και την υγεία των ψαριών, είναι καλά τεκμηριωμένες (Schreck and Li, 1991). Παρόλο που η καταπόνηση υπάρχει σε όλους στη ζωή, το αντικείμενο της διαχείρισης της καταπόνησης είναι η διατήρηση του επιπέδου της καταπόνησης

κάτω από το όριο της προπαθολογικής εκδήλωσης (TPM) (Moberg, 1985 ; Moberg, 2000).

Τα χαρακτηριστικά του νερού στην εκτροφή των ψαριών επηρεάζονται από παράγοντες όπως, το είδος του συστήματος που εφαρμόζεται στην παραγωγή, την πυκνότητα των ψαριών, καθώς και το ποσό και το είδος της τροφής. Οι κλωβοί των ψαριών μπορεί να τοποθετούνται στην θάλασσα, σε υφάλμυρα νερά ή λίμνες. Η ποιότητα του νερού διατηρείται στον κλωβό με τον όγκο της ανταλλαγής του νερού, που προέρχεται από τα ρεύματα, την παλίρροια, ή μέσω μεταφοράς των κλωβών.

Η εκτροφή ψαριών σε νερό χαμηλής περιεκτικότητας σε οξυγόνο, αρχικά προκαλεί διαφοροποιήσεις στο αναπνευστικό σύστημα, έτσι ώστε να αυξάνεται η ποσότητα του αίματος που έρχεται σε επαφή με τις επιφάνειες ανταλλαγής αερίων, αλλά με το χρόνο το φαινόμενο αυτό αμβλύνεται, καθώς το ψάρι υιοθετεί νέες ισορροπίες (Hughew, 1981).

1.6. Αιθέριο έλαιο ρίγανης

Ο άνθρωπος ανακάλυψε τις ιδιότητες των φυτών από πολύ νωρίς. Οι αρχαίοι Κινέζοι ήξεραν καλά τα μυστικά της αρωματοθεραπείας και ήταν οι πρώτοι που μελέτησαν τις θεραπευτικές ιδιότητες των φυτών γύρω στα 4.500 π.Χ. Η πρώτη όμως καταγραφή των τεχνικών της αρωματοθεραπείας έγινε σε πάπυρους από τους Αιγυπτίους. Στα φυτά στηρίχθηκαν ακόμη και οι μάγοι και οι ιερείς, οι οποίοι καθιέρωσαν τη θεραπεία των ασθενειών σαν επάγγελμά τους (Λίγγα, 2000). Οι αρχαίοι Έλληνες είχαν ασχοληθεί διεξοδικά με τις αρωματικές ιδιότητες φυτών. Είναι γνωστό ότι οι αρχαίοι Έλληνες πολεμιστές μετά τις μάχες άλειφαν τις πληγές τους με λάδι που είχε μύρο για γρήγορη επούλωση αλλά και λόγω της αντιμικροβιακής ιδιότητας του μύρου. Ο Ιπποκράτης (460-370 π. Χ.), πατέρας της Ιατρικής, για να αντιμετωπίσει την πανώλη των Αθηνών, ζήτησε από τους Αθηναίους να γεμίζουν τα σπίτια τους με λουλούδια και να καίνε αρωματικά φυτά στα σταυροδρόμια. «Τα

αιθέρια έλαια είναι οργανικές πτητικές χημικές ενώσεις σε υγρή μορφή, με ελαιώδη εμφάνιση, και χημική σύσταση διάφορη κάθε φορά. Δεδομένου ότι είναι πτητικές, τα μόριά τους εξατμίζονται εύκολα και διασκορπίζόμενα στον ατμοσφαιρικό αέρα, έρχονται σε επαφή με τα όργανα όσφρησης, τα οποία και διεγείρουν. Προκαλούν, έτσι, μία συνήθως ευχάριστη αίσθηση, χαρακτηριστική για κάθε είδος φυτού, που αντιστοιχεί στο χαρακτηριστικό για το κάθε είδος άρωμα (Σαρλής, 1994). Η παρουσία ενός συστατικού στα αιθέρια έλαια, σε αναλογία 1% ή μικρότερη, προσδίδει σ' αυτό, το χαρακτηριστικό άρωμα (Simon, 1990). Οι αρχαίοι Έλληνες γιατροί χρησιμοποιούσαν πολύ τα αιθέρια έλαια. Πολλοί από αυτούς διετέλεσαν αργότερα και προσωπικοί γιατροί των Ρωμαίων Αυτοκρατόρων όπως ο Διοσκουρίδης, ο Αναζαρβέας και ο Γαληνός (ο πατέρας της Φαρμακευτικής Επιστήμης). Ο Διοσκουρίδης, στο σύγγραμμά του με τίτλο "De Materia medica" συγκέντρωσε διάφορες θεραπευτικές συνταγές με αιθέρια έλαια, μερικές από τις οποίες χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα. Σύμφωνα με ιστορικές πηγές, στο Μεσαίωνα σε επιδημίες πανώλης και χολέρας, παρατηρήθηκε ότι οι παραγωγοί αιθέριων ελαίων δεν προσβάλλονταν από τα νοσήματα αυτά. Στις αρχές του εικοστού πρώτου αιώνα, οι επιστήμονες ασχολήθηκαν ιδιαίτερα με τις θεραπευτικές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων. Ο Rene-Maurice Gattefosse (1881-1950), Γάλλος χημικός, ήταν ουσιαστικά αυτός που με την έρευνά του εδραίωσε τη χρήση των αιθέριων ελαίων στην κοσμετολογία. Η κλινική αρωματοθεραπεία, δηλαδή η μελέτη της επίδρασης αιθέριων ελαίων στη θεραπεία διαφόρων νοσημάτων, θεωρείται και επίσημα ένας κλάδος της ιατρικής, ο οποίος μάλιστα συνεχώς αναπτύσσεται.

Οι πιθανές αντιμικροβιακές ιδιότητες των φυτών έχουν σχετισθεί με την ικανότητά τους να συνθέτουν, μέσω δευτερογενούς μεταβολισμού, αρκετά χημικά συστατικά, σχετικά σύνθετων δομών, με αντιμικροβιακή ικανότητα, μεταξύ των οποίων αλκαλοειδή, φλαβονοειδή, ισοφλαβονοειδή, ταννίνες, κουμαρίνες, γλυκοσίδες, τερπένια, φαινυλπροπάνια και οργανικά οξέα (Nychas, 1996).

Στην αρχαία Ελλάδα, η ρίγανη ή το αιθέριο έλαιο της χρησιμοποιείτο στην θεραπεία των τραυμάτων, των δαγκωμάτων από φίδια και αράχνες καθώς και στα αναπνευστικά προβλήματα. Η ρίγανη (*Origanum vulgare*, Linnaeus 1753) είναι ένα αρωματικό ποώδες, πολυετές, και θαμνώδες φυτό της Μεσογείου και της Κεντρικής Ασίας, μέλος της οικογένειας Χειλανθών (Labiatae). Το όνομα ρίγανη προέρχεται από τις λέξεις «όρος» και «γάνος» (χαρά) που σημαίνει η χαρά του βουνού (Αναπτυξιακή Εταιρεία Δυτικής Μακεδονίας (ΑΝ. ΚΟ), 2000). Στην Ελλάδα η ρίγανη είναι αυτοφυής και βρίσκεται σε ορεινές και βραχώδεις περιοχές, είναι εξαιρετικής ποιότητας και θεωρείται από τις καλλίτερες στον κόσμο. Εξάλλου οι εδαφοκλιματικές συνθήκες της Ελλάδας ευνοούν ιδιαίτερα την ανάπτυξη φυτών που δίδουν προϊόντα εξαιρετικής ποιότητας (Παπαναγιώτου, κ.α., 2001).

***Origanum vulgare* L.**

Πρόκειται για την άγρια ρίγανη που συναντάται σε χερσότοπους σε διάφορα μέρη της Ηπειρωτικής Ελλάδας, καθώς και σε πολλά νησιά. Είναι φυτό φρυγανώδες, έχει βλαστό λεπτό και εύθραυστο με ύψος 20-50cm. Συλλέγεται σε μικρές ποσότητες (Τσιγαρίδα, 2008).

***Origanum herakleoticum* L.**

Πρόκειται για φρυγανώδες φυτό με βλαστό τριχωτό, όρθιο και πολύκλαδο, ύψους 3-80 cm. Τα φύλλα του είναι κωνοειδή, πριονωτά και έμμισχα, ενώ από την κάτω επιφάνεια είναι τριχωτά. Τα άνθη διαθέτουν ωοειδή ή επιμήκη σταχύδια με μακριές κορυφές. Συλλέγεται σε όλα τα μέρη της χώρας μας και αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος της ρίγανης που εξάγεται .

Εργαστηριακές μελέτες και μελέτες σε ζώα και ανθρώπους δείχνουν ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης (*Origanum vulgare*) έχει αντιβακτηριδιακή, αντιμυκητική, αντιπαρασιτική, και μη ειδική ανοσοενισχυτική δράση (Scandamis and Nychas, 2000; Tsigarida et al, 2000; Force 2000; Lambert et al, 2001; Sokovic et al, 2002;

Giannenas, 2003; Walter and Bilkei. 2004; Athanassopoulou et al, 2004; Chorianopoulos et al, 2005; Karagouni et al, 2005; Govaris et al., 2010). Άλλες μελέτες (Proestos et al, 2005) δείχνουν ότι η ρίγανη είναι ένα φυτό με πολύ μεγάλη αντιοξειδωτική δραστηριότητα, μεγαλύτερη και από αυτήν της βιταμίνης E (Zheng et al, 2002; Govaris et al., 2004).

Μελέτες έχουν δείξει ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης έχει πολλές αντιμικροβιακές ιδιότητες (Hammer et al., 1999; Dorman and Deans, 2000). Χημική ανάλυση του αιθέριου ελαίου ρίγανης έχει δείξει ότι τα συστατικά του είναι κυρίως οι φαινόλες καρβακρόλη και θυμόλη (Salzer, 1977; Charai and Mosaddak, 1996; Burt et al., 2005), αν και η σύνθεση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης από ένα συγκεκριμένο είδος φυτού μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την εποχή συγκομιδής (McGimpsey et al., 1994) και την γεωγραφική περιοχή της καλλιέργειας (Cosentino et al., 1999). Το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου ρίγανης, η καρβακρόλη, έχει ισχυρές βακτηριοστατικές και βακτηριοκτόνες ιδιότητες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προληπτική και θεραπευτική χρήση στα ζώα (Walter and Bilkei, 2004). Άλλα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου ρίγανης είναι δύο μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες, γ-τερπινένιο και ρ-κυμένιο (5.54 και 7.35% του συνολικού ελαίου, αντίστοιχα). Ένας αριθμός συστατικών του αιθέριου ελαίου ρίγανης (oregano essential oil - OEO) έδειξε σημαντικές αντιμικροβιακές ιδιότητες όταν ελέγχθηκαν ξεχωριστά (Ultee et al., 1999) αλλά υπάρχει απόδειξη ότι η αντιμικροβιακή δράση του OEO είναι μεγαλύτερη από την αθροιστική δράση των πρωτευόντων συστατικών (Zheng et al., 2009). Αυτό συμβαίνει όπως φαίνεται διότι δευτερεύοντα συστατικά διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο (Lattaoui and Tantaoui –Elaraki, 1994). Σε σχέση με τον τρόπο δράσης των αιθέριων ελαίων στα βακτήρια, είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τις βιολογικές μεμβράνες των βακτηρίων, προκαλώντας αλλαγή στα χαρακτηριστικά των λιπαρών οξέων. Τα αιθέρια έλαια μπορούν να προκαλέσουν μετουσίωση πρωτεϊνών και διακοπή στη δομή των μεμβρανών, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενδοκυτταρικού ATP και κυτταρικό θάνατο (Rhayour et al., 2003).

Το αιθέριο έλαιο ρίγανης έχει δείξει διάφορους βαθμούς προστασίας από παρασιτώσεις από μυξοσπορίδια στην τσιπούρα (*Sparus aurata* Linnaeus 1758) και στο μυτάκι (*Puntazzo puntazzo*, Cetti 1977), (Athanassopoulou et al., 2004 a,b). Στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque 1818) έχει δείξει προστασία από το παθογόνο *Aeromonas hydrophila* (Zheng et al., 2009), ενώ στον κυπρίνο (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758), από *A. sombria*. Τέλος, στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758), αύξησε την προστασία από μικτές μολύνσεις που παράσιτα (ψείρες, κωπήποδα) και βακτήρια του γένους *Vibrio* spp. (Yiagnisis et al., 2009).

Υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τα ιατρικά βότανα, ως μέρος των εναλλακτικών μεθόδων θεραπείας ασθενειών στην Μεσογειακή εκτροφή ιχθύων. Βακτηριακά παθογόνα μπορούν να προκαλέσουν απώλειες σε εκτρεφόμενα ψάρια. Η θεραπεία με αντιβιοτικά δεν είναι πάντοτε αποτελεσματική και δημιουργεί πρόβλημα με τα κατάλοιπα στη σάρκα των ψαριών και το περιβάλλον. Ένα πλεονέκτημα των αιθέριων ελαίων, ως προς τα αντιβιοτικά, είναι ότι τα βακτήρια δεν αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στα αιθέρια έλαια (Hitokoto et al., 1980). Στο κεφάλαιο 4 και 5 της παρούσης διατριβής, μελετήθηκε η επίδραση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, ως διαιτητικό συμπλήρωμα, στην ανθεκτικότητα των εκτρεφόμενων ψαριών (τσιπούρες και λαβράκια) σε νοσήματα προκαλούμενα από βακτήρια και παράσιτα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

**Επίδραση της οξείας καταπόνησης στην
εντερική μικροβιακή χλωρίδα
εκτρεφόμενων ψαριών λαβρακιού και
τσιπούρας**

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η επίδραση της οξείας καταπόνησης στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των εκτρεφόμενων ψαριών λαβρακιού και τσιπούρας κατά την διάρκεια πειραματικών και φυσικών μολύνσεων από παθογόνους μικροοργανισμούς.

2.1. ΛΑΒΡΑΚΙ-Πειραματικές μολύνσεις (2.1.1.-2.1.3.)

2.1.1. Πείραμα 1.

Πειραματικές μολύνσεις λαβρακιών με *Listonella anguillarum*. Εντοπισμός του υπεύθυνου βακτηρίου, σε έντερο και πρόνεφρο, σε συνθήκες χωρίς πρόκληση καταπόνησης και με πρόκληση καταπόνησης.

2.1.1.1. Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν να δειχθεί η επίδραση των συνθηκών (χωρίς ή με καταπόνηση) στον εντοπισμό του βακτηρίου *L. anguillarum* στο έντερο και στον πρόνεφρο, κατά την διάρκεια πειραματικών μολύνσεων στα λαβράκια.

2.1.1.2. Υλικά και μέθοδοι

2.1.1.2.1. Ψάρια

Εβδομήντα δύο λαβράκια υγιή (προήρθαν από ψάρια που είχαν μεταφερθεί ανεμβολίαστα από μονάδα όταν ήταν βάρους 1-2 g), μέσου βάρους 60 g, υπεβλήθησαν σε 3 πειραματικές μολύνσεις σε διάστημα 30 ημερών. Η κάθε πειραματική μόλυνση είχε απόσταση 15 ημερών από την άλλη. Έγιναν οι εξής 3 πειραματικές μολύνσεις:

- 10^4 cfu *L.anguillarum*/ml θαλασσινού νερού, διάρκεια μόλυνσης: 35 λεπτά της ώρας, θερμοκρασία 26⁰C. Μολύνθηκαν 3 δεξαμενές (24 ψάρια ανά δεξαμενή 100 L).

- 10^5 cfu *L.anguillarum*/ml θαλασσινού νερού, διάρκεια μόλυνσης: 35 λεπτά της ώρας, θερμοκρασία 26°C. Μολύνθηκαν 3 δεξαμενές (22 ψάρια ανά δεξαμενή 100 L).
- 10^6 cfu *L.anguillarum*/ml θαλασσινού νερού, διάρκεια μόλυνσης: 35 λεπτά της ώρας, θερμοκρασία 26°C. Μολύνθηκαν 3 δεξαμενές (20 ψάρια ανά δεξαμενή 100 L).

Προηγουμένως είχε γίνει τυχαία δειγματοληψία, από ψάρια της ίδιας εκτροφής, τα οποία ελέγχθηκαν μικροβιολογικά και είχε διαπιστωθεί η απουσία του βακτηρίου *L.anguillarum* από την εντερική τους μικροβιακή χλωρίδα και από τον πρόνεφρο. Έγινε προσπάθεια να μην υπάρξει ενόχληση των ψαριών από την όλη διαδικασία της μόλυνσης. Για τον σκοπό αυτό, η μόλυνση έγινε πολύ προσεκτικά, με χαμήλωμα της στάθμης του νερού μόνο, τόσο ώστε να μην προκληθεί δυσφορία και καταπόνηση, στις δεξαμενές διαβίωσης των ψαριών και προσθήκη του βακτηρίου χωρίς μεταφορά τους σε άλλες δεξαμενές με χρήση απόχης. Παράλληλα υπήρχαν και τρεις δεξαμενές με αντίστοιχα ψάρια μάρτυρες (control) της ίδιας ηλικίας και εκτροφής τα οποία υπέστησαν την ίδια διαδικασία, χωρίς όμως να προστεθεί βακτήριο. Μετά από κάθε μόλυνση γινότανε ανάλυση της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας δυο ψαριών από κάθε δεξαμενή, για απομόνωση του βακτηρίου *L.anguillarum* από το έντερο. Επειδή το βακτήριο δεν απομονώθηκε από το έντερο, κατά την διάρκεια των τριών πειραματικών μολύνσεων, έγινε και νέα πειραματική μόλυνση των ίδιων λαβρακιών (πεννηντατεσσάρων σε αριθμό), σε 3 δεξαμενές, με 10^7 cfu *L.anguillarum*/ml θαλασσινού νερού, με συνθήκες ίδιες με αυτές του τέταρτου πειράματος δηλαδή με προσεκτικές διαδικασίες, χωρίς καταπόνηση. Η θερμοκρασία ήταν 20°C και η διάρκεια της μόλυνσης 30 λεπτά της ώρας. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε ομάδα 54 υγιών ανεμβολίαστων λαβρακιών, που μολύνθηκαν πειραματικά με την ίδια συγκέντρωση του βακτηριδίου (10^7 cfu *L.anguillarum*/ml θαλασσινού νερού), αλλά σε συνθήκες καταπόνησης, δηλαδή εκτεταμένους χειρισμούς συλλογής των ψαριών με απόχη και μεταφορά τους σε δεξαμενές που

περιείχαν θαλασσινό νερό με το βακτήριο *L.anguillarum*, καθώς επίσης και ομάδα λαβρακιών, ως αρνητικός μάρτυρας (υπέστησαν την ίδια διαδικασία χωρίς βακτήριο). Τρεις ημέρες μετά την πειραματική μόλυνση, στις δεξαμενές όπου τα λαβράκια είχαν υποστεί καταπόνηση, παρουσιάσθηκαν τα πρώτα ψάρια με συμπτώματα δονακίωσης. Έγινε εξέταση της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας και του προνέφρου σε δείγματα ψαριών από όλες τις ομάδες [από όλα τα ψάρια που ήταν νεκρά με συμπτώματα δονακίωσης και από τα ψάρια (τρία ψάρια /δεξαμενή) που υπέστησαν ευθανασία και προήρχοντο από την ομάδα που μολύνθηκε χωρίς καταπόνηση] για απομόνωση του βακτηρίου *L.anguillarum*. Μία εβδομάδα μετά, η θνησιμότητα σταμάτησε. Τα ψάρια κρατήθηκαν για άλλες δύο εβδομάδες, στην διάρκεια των οποίων δεν εμφανίστηκαν νέοι θάνατοι. Το πείραμα, με την πειραματική μόλυνση λαβρακιών από άλλο αρχικό πληθυσμό παρομοίου μεγέθους (70 g περίπου) με 10^7 cfu *L.anguillarum/ml* θαλασσινού νερού, χωρίς καταπόνηση (αλλά και χωρίς να έχουν υποστεί προηγούμενες μολύνσεις με το ίδιο βακτήριο χωρίς καταπόνηση), επαναλήφθηκε και έδωσε τα ίδια αποτελέσματα. Και στο πείραμα αυτό είχε συμπεριληφθεί ομάδα λαβρακιών μάρτυρες.

2.1.1.2.2 Βακτήρια

Η *Listonella anguillarum* που χρησιμοποιήθηκε στις πειραματικές δοκιμασίες μόλυνσης, απομονώθηκε από τον πρόνεφρο λαβρακιών με συμπτώματα δονακίωσης, ταυτοποιήθηκε με βιοχημικές και ορολογικές μεθόδους και καλλιεργήθηκε σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Tryptic Soya Agar (Oxoid) εμπλουτισμένο με 2% NaCl και επωάσθηκε στους 22°-25 ° C για 24 ώρες και αραιώθηκε με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό. Η συγκέντρωση και η βιωσιμότητα του στελέχους ελέγχθηκε με μέτρηση των μονάδων σχηματισμού αποικιών (CFU) σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Tryptic Soya Agar (Oxoid) εμπλουτισμένο με 2% NaCl.

Η παθογόνος δράση του στελέχους διαπιστώθηκε με μικρής έκτασης προκαταρκτική μόλυνση λαβρακιών(σε λίγα άτομα).

2.1.1.2.3. Έντερο

Το έντερο αφαιρέθηκε άσηπτα από το ύψος των πυλωρικών τυφλών έως την έδρα, πλύθηκε με διάλυμα 75% παλαιωμένου στείρου θαλασσινού νερού και το περιεχόμενό του μεταφέρθηκε με εξώθηση και απόξεση σε στείρο δοχείο, όπου αραιώθηκε με διάλυμα 50% παλαιωμένου στείρου θαλασσινού νερού. Δείγματα από το περιεχόμενο του εντέρου εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υλικό Tryptic Soya Agar (Oxoid) εμπλουτισμένο με 2% NaCl(TSAS) κα επωάσθηκαν στους 22°C για 4 ημέρες. Ένας αντιπροσωπευτικός αριθμός από διάφορους τύπους αποικιών συλλέχθηκε από τα τρυβλία. Ο έλεγχος της καθαρότητας των αποικιών έγινε με μεταφορά της καλλιέργειας στα αντίστοιχα θρεπτικά μέσα με τη μέθοδο της γραμμικής μετασποράς (streaking).

Ταυτοποίηση των απομονωμένων βακτηριδίων

Καθαρές καλλιέργειες από τα απομονωμένα βακτήρια ταυτοποιήθηκαν με βιοχημικές δοκιμές,ακολουθώντας τα κριτήρια των Alsina and Blanch, 1994 και Austin et al., 1995. Βακτήρια ταυτοποιημένα ως *Listonella anguillarum* και *P.damselae* subsp.*piscicida* επιβεβαιώθηκαν ορολογικά με τη δοκιμή οροσυγκόλλησης (σύστημα BIONOR).

Για την ταυτοποίηση των ειδών *vibrio* έγινε χρήση βιοχημικών κλειδιών που περιγράφηκαν από τους Alsina and Blanch, 1994. Αυτά τα βιοχημικά κλειδιά έχουν σχεδιαστεί για περιβαλλοντικά και κλινικά στελέχη και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για στελέχη που είναι Gram αρνητικά, δίνουν θετική την αντίδραση της οξειδάσης, αναπτύσσονται στο θρεπτικό μέσο TCBS και είναι προαιρετικά αναερόβια. Μερικές δοκιμές περιλαμβάνονται στο σύστημα ταυτοποίησης Api 20E.

Έγιναν οι ακόλουθες φυσιολογικές και βιοχημικές δοκιμές: Χρώση κατά Gram, κυτταρική μορφολογία, οξειδάση, κινητικότητα, δοκιμή O-F, αύξηση σε TCBS άγαρ, ερπητική ικανότητα των αποικιών σε TSAS, αύξηση σε 0, 3,6,8 και 10% NaCl, αύξηση σε 4°C, 35°C, 40 °C, ανθεκτικότητα σε 10 και 150 µg δονακιοστατικού O/129, ανθεκτικότητα σε 10 µg αμπικιλίνης και οι δοκιμές του συστήματος API 20E που ήταν το ορθο-νίτρο-φαινυλο-βD-γαλακτοπυρανοζίδιο, η υδρόλυση της αργινίνης, η αποκαρβοξυλίωση της λυσίνης και της ορνιθίνης, η αφομοίωση των κιτρικών, η παραγωγή H₂S, η παραγωγή ουρεάσης, η απαμίνωση της τρυπτοφάνης, η παραγωγή ινδόλης και ακετοΐνης, υδρόλυση της ζελατίνης, η ζύμωση της γλυκόζης, μαννιτόλης, ινοσιτόλης, σορβιτόλης, ραμνόζης, σουκρόζης, μελιβιόζης, αμυγδαλίνης και αραβινόζης, ως πηγές άνθρακα.

Ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε διαφορετικές θερμοκρασίες

Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε για τις δοκιμές αυτές, ήταν το Tryptic Soy broth με 2% NaCl. Οι θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν ήταν 4 °C, 35 °C και 40°C για 7, 2 και 1-2 ημέρες.

Ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου

Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε για τις δοκιμές αυτές, ήταν το Tryptic Soy broth με 2% NaCl. Οι συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου που επιλέχθηκαν ήταν 0, 3, 6, 8 και 10%.

Χρήση του συστήματος API 20E (Biomerieux)

Η παρασκευή των ενοφθαλμισμάτων για το API 20E, γινόταν με την προσθήκη καθαρών ανεπτυγμένων αποικιών σε 5 ml διαλύματος φυσιολογικού ορού, σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Τα διαλύματα χρησιμοποιούνταν για τον ενοφθαλμισμό των κυψελίδων, όπως αναφέρεται αντίστοιχα από τον παρασκευαστή. Ο ενοφθαλμισμός των κυψελίδων των πλακιδίων καθώς και η

προσθήκη παραφινέλαιου γινόταν με την βοήθεια αποστειρωμένων σιφωνίων όγκου 1ml, υπό άσηπτες συνθήκες. Η επώαση των πλακιδίων γινόταν σε θερμοκρασία 25°C για 24-48 h. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γινότανε σύμφωνα με τις οδηγίες. Είναι γνωστό βέβαια ότι οι περισσότερες πληροφορίες που προέρχονται από την τράπεζα δεδομένων του συστήματος ταυτοποίησης μικροοργανισμών API20E βασίζονται σε αποτελέσματα που προέρχονται από τη μελέτη κλινικών ανθρωπίνων στελεχών. Για το λόγο η ταυτοποίηση μέσω της τράπεζας δεδομένων του συστήματος API 20E ελήφθη υπόψη μόνον μερικώς- κυρίως για την ταυτοποίηση ψευδομονάδων και *Shewanella putrefaciens*.

2.1.1.3. Αποτελέσματα

Στον Πίνακα 2.1.1.3.1. φαίνεται η απουσία του βακτηρίου *Listonella anguillarum* από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα και τον πρόνεφρο των ψαριών, στις τρεις διαδοχικές πειραματικές μολύνσεις, αλλά και των ψαριών της ομάδας των μαρτύρων (control).

Πίνακας 2.1.1.3.1. Απομόνωση βακτηρίου <i>Listonella anguillarum</i> από έντερο και πρόνεφρο λαβρακιών, 3 ημέρες μετά την πειραματική δοκιμασία μόλυνσης χωρίς πρόκληση καταπόνησης.						
Ομάδα	Δεξαμενή 1		Δεξαμενή 2		Δεξαμενή 3	
Πειραματική μόλυνση με 10^4 <i>L.anguillarum/ml</i> θαλασσινού νερού	Ψάρι 1	*	Ψάρι 1	*	Ψάρι 1	*
	Ψάρι 2	*	Ψάρι 2	*	Ψάρι 2	*
Πειραματική μόλυνση με 10^5 <i>L.anguillarum/ ml</i> θαλασσινού νερού	Ψάρι 1	*	Ψάρι 1	*	Ψάρι 1	*
	Ψάρι 2	*	Ψάρι 2	*	Ψάρι 2	*
Πειραματική μόλυνση με 10^6 <i>L.anguillarum / ml</i> θαλασσινού νερού	Ψάρι 1	*	Ψάρι 1	*	Ψάρι 1	*
	Ψάρι 2	*	Ψάρι 2	*	Ψάρι 2	*
Απουσία πειραματικής μόλυνσης (Μάρτυρας)	Ψάρι 1	*	Ψάρι 1	*	Ψάρι 1	*
	Ψάρι 2	*	Ψάρι 2	*	Ψάρι 2	*

* Δεν απομονώθηκε σε κανέναν από τους δύο ιστούς(έντερο και πρόνεφρο)

Παρατηρείται ότι και στις 3 φορές που έγιναν πειραματικές μολύνσεις με προσθήκη του βακτηριδίου, χωρίς καταπόνηση, το βακτήριο *Listonella anguillarum* δεν απομονώθηκε ούτε στο έντερο, ούτε στον πρόνεφρο των λαβρακιών που ελέγχθηκαν. Στον πίνακα 2.1.3.2. παρατηρούμε την παρουσία βακτηριού στο έντερο λαβρακιών, 3 ημέρες μετά την πειραματική δοκιμασία μόλυνσης, σε συνθήκες καταπόνησης και μη, και συγκεντρωτικά αποτελέσματα θνησιμότητας, 2 εβδομάδες μετά την πειραματική μόλυνση.

Πίνακας 2.1.1.3.2.						
Παρουσία βακτηρίου στο έντερο λαβρακιών, 3 ημέρες μετά την πειραματική δοκιμασία μόλυνσης σε συνθήκες καταπόνησης και μη, και συγκεντρωτικά αποτελέσματα θνησιμότητας 2 εβδομάδες μετά την πειραματική μόλυνση.						
	Παρουσία βακτηρίου στο έντερο					
	Μόλυνση χωρίς καταπόνηση			Μόλυνση με καταπόνηση		
	Δεξ.1	Δεξ.2	Δεξ.3	Δεξ.4	Δεξ.5	Δεξ.6
Ψάρι 1	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Παρουσία	Παρουσία	Παρουσία
Ψάρι 2	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Παρουσία	Μη ανιχνεύσιμη	Παρουσία
Ψάρι 3	Απουσία	Απουσία	Απουσία	Παρουσία	Παρουσία	Μη ανιχνεύσιμη
Θνησιμότητα μετά από 2 εβδομάδες						
	Μόλυνση χωρίς καταπόνηση			Μόλυνση με καταπόνηση		
	Δεξ.1	Δεξ.2	Δεξ.3	Δεξ.4	Δεξ.5	Δεξ.6
	0 από 15 ψάρια 0%*	0 από 15 ψάρια 0%*	0 από 15 ψάρια 0%*	8 νεκρά από σύνολο 15 53.3% **	7 νεκρά από σύνολο 15 46,66% **	7 νεκρά από σύνολο 15 46,66% **
	Μέση % θνησιμότητα: 48.87±3,83					

* στον πρόνεφρο και το έντερο τριών ψαριών από κάθε δεξαμενή, δεν απομονώθηκε το βακτήριο *Listonella anguillarum*

**στον πρόνεφρο και το έντερο όλων των ημιθανών/νεκρών ψαριών απομονώθηκε το βακτήριο *Listonella anguillarum*

Στην ομάδα των λαβρακιών που έχει υποστεί πειραματική μόλυνση και ταυτόχρονα καταπόνηση, το βακτήριο *Listonella anguillarum* απομονώνεται από το έντερο των νεκρών ψαριών σε ποσοστό 77.7% (7 στα 9 ψάρια) και προκαλεί θνησιμότητα σε ποσοστό περίπου 48.87±3,83%.

2.1.1.4. Συμπεράσματα

Αποικισμός του εντέρου των λαβρακιών καθώς και εμφάνιση νόσου από το, πειραματικά χορηγούμενο στο νερό, βακτήριο *Listonella anguillarum*, έγιναν μόνο μετά από καταπόνηση.

2.1.2. Πείραμα 2°.

Εντοπισμός του βακτηρίου στους ιστούς έντερο και πρόνεφρο, κατά την εμφάνιση συμπτωμάτων μετά από πειραματική μόλυνση λαβρακιών με *Listonella anguillarum*.

2.1.2.1. Σκοπός

Ο σκοπός αυτού του πειράματος ήταν να φανεί η παρουσία ή μη του βακτηρίου *Listonella anguillarum* στο έντερο και τον πρόνεφρο λαβρακιών, την ημέρα που εμφανίζονται τα πρώτα συμπτώματα δονακίωσης μετά από μία πειραματική μόλυνση από το βακτήριο *Listonella anguillarum*.

2.1.2.2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1.2.2.1. Ψάρια

Χρησιμοποιήθηκαν ζωντανά λαβράκια 1g ανεμβολίαστα. Τα ψάρια προήρθαν από τα ιχθυοτροφεία ΣΕΛΟΝΤΑ. Όλες οι τροφές ήταν εμπορικές (BIOMAP) με μέγεθος προσαρμοσμένο στο μέγεθος και το βάρος του ψαριού. Τα λαβράκια κρατήθηκαν σε δεξαμενές ανοικτής κυκλοφορίας θαλασσινού νερού μέχρι να φθάσουν σωματικό βάρος 5 g περίπου. Πριν την έναρξη μεταφορών, τα ψάρια έμεναν νηστικά για μία ημέρα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε δεξαμενές κλειστού τύπου, με ανακύκλωση σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο όπου παρέμειναν για 2 εβδομάδες για να προσαρμοσθούν στις νέες συνθήκες. Ελέγχθηκε η εντερική μικροβιακή χλωρίδα τους, με τυχαίο δείγμα 3 ψαριών από κάθε δεξαμενή και διαπιστώθηκε η απουσία του βακτηρίου *L. anguillarum* από το έντερο.

Καταπόνηση προκλήθηκε με τη μεταφορά των ψαριών από μία δεξαμενή σε άλλη (Barcellos et al., 2004). 45 λαβράκια, μεταφέρθηκαν με απόχλη σε αεριζόμενη δεξαμενή, με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό που περιείχε 10^6 CFU βακτηρίου *Listonella anguillarum*/ml, όπου παρέμειναν για 10 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε τρεις δεξαμενές των 25 L (15 ψάρια /δεξαμενή). Άλλα 45 υγιή λαβράκια μάρτυρες (control), υπέστησαν την ίδια διαδικασία του πειράματος, χωρίς όμως την προσθήκη βακτηρίου. Την τρίτη ημέρα παρουσιάσθηκαν εξωτερικές αλλοιώσεις στο 30% των μολυσμένων ψαριών. Όλα τα ψάρια του πειράματος θανατώθηκαν και ελήφθησαν δείγματα από τον πρόνεφρο και το έντερο ασυμπτωματικών και ημιθανών/νεκρών ψαριών για βακτηριολογικές εξετάσεις.

2.1.2.2.2. Κατασκευή αυτοσχέδιας πειραματικής μονάδας (challenge unit), πειραματικά προκαλούμενων μολύνσεων για ιχθύδια.

Για να μπορέσουν να γίνουν οι πειραματικές μολύνσεις με τα ιχθύδια, χρειάστηκε να διαμορφωθεί ένας εργαστηριακός χώρος και να κατασκευαστεί μία αυτοσχέδια μικρή πειραματική μονάδα, με 12 στρογγυλές πλαστικές δεξαμενές των 25 L η κάθε μία, οι οποίες ανά τρεις συνδέονταν, μέσω ανακύκλωσης, με μία δεξαμενή 100 L. Το νερό κυκλοφορούσε με τη βοήθεια αντλιών Rena Flow 1250 BF High power Water pump 1100L/h 1,80m for 250-550 L με ανακύκλωση μέσω χειροποίητων φίλτρων με ενεργό άνθρακα και υαλοβάμβακα, ειδικών για ενυδρεία. Οι τέσσερις δεξαμενές των 100 L συνδέονταν με την σειρά τους, μέσω ενός συστήματος σωληνώσεων, με μία άλλη κεντρική δεξαμενή, στην οποία διοχετεύονταν τα απόβλητά τους, τα οποία απολυμαίνονταν με χλώριο, πριν οδηγηθούν στην αποχέτευση. Το οξυγόνο παρέχόταν μέσω αεραντιών Rena Air 300 Air pump Aquarium RENA 200L/h for Aquarium 120-300 L και διανεμητών. Κάθε ημέρα γινόταν αντικατάσταση του 50% του θαλασσινού νερού της πειραματικής μονάδας με νέο ώστε τα επίπεδα αμμωνίας να διατηρούνται σε ανεκτά επίπεδα. Οι τιμές της αμμωνίας κυμαίνονταν από 0,3 -0,5 mg/L κατάς την διάρκεια της ημέρας.

Στις εικόνες 2.1.2.2.2.1α, 2.1.2.2.2.1β, 2.1.2.2.2.2 φαίνεται το αυτοσχέδιο σύστημα πειραματικής μόλυνσης των 12 δεξαμενών.



Εικόνες 2.1.2.2.2.1α και 2.1.2.2.2.1β.: 9 δεξαμενές πειραματικής μόλυνσης.



Εικόνα 2.1.2.2.2.2: Οι υπόλοιπες 3 δεξαμενές πειραματικής μόλυνσης (αρνητικοί μάρτυρες).

2.1.2.3. Αποτελέσματα

Στον πίνακα 2.2.3.1. εμφανίζονται τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών εξετάσεων για την ανίχνευση του βακτηρίου *L. anguillarum* στον πρόνεφρο και το έντερο των μολυσμένων λαβρακιών, 3 ημέρες μετά την μόλυνση.

Πίνακας 2.1.2.3.1. Απομόνωση του βακτηρίου <i>L. anguillarum</i> από τον πρόνεφρο και το έντερο των πειραματικά μολυσμένων λαβρακιών							
Ψάρια υποβληθέντα σε πειραματική μόλυνση							
Δεξαμενές	Αριθμός ψαριών	Νεκρά/Ημιθανή ψάρια	Απομόνωση η <i>L. anguillarum</i> από πρόνεφρο νεκρών/ ημιθανών ψαριών	Απομόνωση <i>L. anguillarum</i> από έντερο νεκρών/ημιθανών ψαριών	ασυμπτωματικά ψάρια	Απομόνωση η <i>L. anguillarum</i> από πρόνεφρο ασυμπτωματικών ψαριών	Απομόνωση <i>L. anguillarum</i> από έντερο ασυμπτωματικών ψαριών
Δεξ.1	15	5	Σε 5 ψάρια	Σε 5 ψάρια	10	Σε 0 ψάρια	Σε 10 ψάρια
Δεξ.2	15	6	Σε 6 ψάρια	Σε 6 ψάρια	9	Σε 0 ψάρια	Σε 9 ψάρια
Δεξ.3	15	5	Σε 5 ψάρια	Σε 5 ψάρια	10	Σε 0 ψάρια	Σε 10 ψάρια
Ψάρια μάρτυρες ανά δεξαμενή(χωρίς βακτήριο)							
Δεξαμενές	Αριθμός ψαριών	Νεκρά/ημιθανή ψάρια	Απομόνωση <i>L. anguillarum</i> από πρόνεφρο νεκρών/ ημιθανών ψαριών	Απομόνωση <i>L. anguillarum</i> από έντερο νεκρών/ημιθανών ψαριών			
Δεξ.4	15	1	όχι	όχι			
Δεξ.5	15	0	όχι	όχι			
Δεξ.6	15	0	όχι	όχι			

Παρατηρείται ότι μετά από την πειραματική μόλυνση με *L. anguillarum*, το βακτήριο εμφανίζεται στο έντερο όλων των ψαριών, είτε έχουν συμπτώματα νόσου είτε όχι. Δεν απομονώνεται όμως από τον πρόνεφρο των φαινομενικά υγιών (ασυμπτωματικών) ψαριών, που έχουν υποστεί πειραματική μόλυνση. Τρεις ημέρες μετά την πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *L. anguillarum*, περίπου το 30% των ψαριών έχει νοσήσει (από τα 45 έχουν νοσήσει 16) και σε αυτά τα νοσούντα ψάρια το υπεύθυνο βακτήριο απομονώνεται τόσο από τον πρόνεφρο όσο και από το έντερό τους.

2.1.2.4. Συμπεράσματα

Τρεις ημέρες μετά από μία πειραματική μόλυνση λαβρακιών, βάρους 7-8 g, με εμβάπτιση για 10 λεπτά της ώρας με συγκέντρωση βακτηρίου 10^6 CFU βακτηρίου *Listonella anguillarum*/ml, το 30% των ψαριών έχει νοσήσει. Το υπεύθυνο βακτήριο απομονώθηκε από το έντερο όλων των ψαριών που είχαν υποστεί μόλυνση, είτε παρουσίαζαν συμπτώματα είτε όχι και από τον πρόνεφρο μόνο όσων ψαριών νοσοούν. Δεν απομονώθηκε όμως από τον πρόνεφρο των φαινομενικά υγιών (ασυμπτωματικών) ψαριών που είχαν υποστεί πειραματική μόλυνση. Φαίνεται ότι μετά από την πειραματική μόλυνση των λαβρακιών με *L. anguillarum*, το έντερο αποικίζεται σε μεγάλο βαθμό.

Τα συμπτώματα όμως της δονακίωσης συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με την απομόνωση του υπεύθυνου βακτηρίου από τον πρόνεφρο.

2.1.3. Πείραμα 3^ο.

Πειραματική μόλυνση λαβρακιών με *Listonella anguillarum* και εντοπισμός του βακτηρίου στους ιστούς έντερο και πρόνεφρο, πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων.

2.1.3.1. Σκοπός

Ο σκοπός αυτού του πειράματος ήταν να δείξει την παρουσία ή μη του βακτηρίου στο έντερο και τον πρόνεφρο λαβρακιών, πριν από την εμφάνιση συμπτωμάτων, μετά από μία πειραματική μόλυνση από το βακτήριο *Listonella anguillarum* με εμβάπτιση.

2.1.3.2. Υλικά και μέθοδοι

Τα ψάρια ήταν ανεμβολίαστα. Πριν το πείραμα, εξετάσθηκε η ύπαρξη του βακτηρίου *Listonella anguillarum* στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών και

τον πρόνεφρο. Για το σκοπό αυτό, λήφθηκαν δείγματα 10 ψαριών από τον αρχικό πληθυσμό και εξετάσθηκαν μικροβιολογικά. 54 λαβράκια, μέσου βάρους 150 g, μεταφέρθηκαν με απόχλη (καταπόνηση) σε αεριζόμενη δεξαμενή με θαλασσινό νερό που περιείχε 10^6 cfu βακτηριδίου *L. anguillarum*/ml, όπου παρέμειναν για 20 λεπτά της ώρας, και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε τρεις δεξαμενές των 250 L (18 ψάρια /δεξαμενή) με παροχή οξυγόνου στην κάθε δεξαμενή και αλλαγή νερού 1 φορά την ημέρα. Η θερμοκρασία ήταν $17 \pm 1^\circ\text{C}$. Άλλα 54 υγιή λαβράκια μάρτυρες υπέστησαν την ίδια διαδικασία του πειράματος χωρίς όμως την προσθήκη βακτηρίου. Το βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική μόλυνση ήταν αυτό που απομονώθηκε από περιστατικό δονακίωσης. Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την μόλυνση και χωρίς να έχουν παρουσιασθεί εξωτερικές αλλοιώσεις στα μολυσμένα ψάρια, έγινε δειγματοληψία και ελήφθησαν δείγματα από τον πρόνεφρο και το έντερο των ψαριών για μικροβιολογικές εξετάσεις.

Για το έντερο ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε και στο πρώτο πείραμα. Στη συνέχεια τα ψάρια κρατήθηκαν για 2 εβδομάδες συνολικά από την ημέρα της μόλυνσης. Κάθε ημέρα γινόταν καταμέτρηση και μικροβιολογικές εξετάσεις εντέρου –πρόνεφρου στα ετοιμοθάνατα/νεκρά ψάρια. Μετά την μόλυνση δεν υπήρχε ανοικτό κύκλωμα κυκλοφορίας θαλασσινού νερού, αλλά το νερό ανανεωνόταν κατά 90% μία φορά την ημέρα. Στα απόβλητα από τις δεξαμενές με τα μολυσμένα ψάρια γινόταν χλωρίωση πριν την απόρριψη στην αποχέτευση. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις όπου γινόταν πειραματική μόλυνση εκτός της μονάδας πειραματικών μολύνσεων κλειστού κυκλώματος, που ήταν κατασκευασμένη μόνο για πειραματικές μολύνσεις ιχθυδίων.

2.1.3.3. Αποτελέσματα

Σε κανένα από τα 10 ψάρια του αρχικού πληθυσμού λαβρακιών δεν απομονώθηκε το βακτήριο *L. anguillarum* στο έντερο ή τον πρόνεφρο. Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την πειραματική μόλυνση, όλα τα ψάρια είναι ασυμπτωματικά. Η θνησιμότητα, λόγω της

πειραματικής μόλυνσης, ξεκίνησε 5 ημέρες μετά την μόλυνση. Στον πίνακα 2.2.3.1. φαίνεται η παρουσία βακτηρίου στο έντερο και τον πρόνεφρο λαβρακιών, 24 ώρες μετά την πειραματική δοκιμασία μόλυνσης με *L. anguillarum* καθώς και οι συνολικές θνησιμότητες 2 εβδομάδες μετά την πειραματική μόλυνση.

Πίνακας 2.1.3.3.1. Παρουσία βακτηρίου στο έντερο και τον πρόνεφρο λαβρακιών, 24 ώρες μετά την πειραματική δοκιμασία μόλυνσης με <i>L.anguillarum</i> . Συγκεντρωτικά αποτελέσματα θνησιμοτήτων 2 εβδομάδες μετά την πειραματική μόλυνση.									
	Δεξ.1 Αρνητ. μάρτυς	Δεξ.2 Αρνητ. μάρτυς	Δεξ.3 Αρνητ. μάρτυς	Δεξ.4 Μόλυνση		Δεξ.5 Μόλυνση		Δεξ.6 Μόλυνση	
				έντερο	Πρόνεφ.	έντερο	Πρόνεφ.	έντερο	Πρόνεφ.
Ψάρι 1	*	*	*	0	0	+	0	0	0
Ψάρι 2	*	*	*	+	0	0	0	+	0
Ψάρι 3	*	*	*	0	0	+	0	0	0
Συγκεντρωτικά αποτελέσματα θνησιμοτήτων μετά από 2 εβδομάδες.									
	Δεξαμενές αρνητικοί μάρτυρες			Δεξαμενές που μολύνθηκαν πειραματικά					
	Δεξ.1	Δεξ.2	Δεξ.3	Δεξ.4	Δεξ.5	Δεξ.6			
	1 από 15 ψάρια***	0 από 15ψάρια	0 από 15ψάρια	2 νεκρά/ημιθανή από σύνολο 15 ψαριών **	2 νεκρά/ημιθανή από σύνολο 15 ψαριών **	1 νεκρό από σύνολο 15 ψαριών **			
				13.3% θνησιμότητα	13.3% θνησιμότητα	6.6% Θνησιμότητα			
				Μέσος όρος θνησιμότητας 11,06%±3,8					

* Μη ανιχνεύσιμη και στα δύο όργανα

**στον πρόνεφρο και το έντερο όλων των ημιθανών/ νεκρών ψαριών της ομάδας που μολύνθηκε με τη *Listonella anguillarum* απομονώθηκε το βακτήριο.

*** Η μικροβιολογική εξέταση του εντέρου και του προνέφρου τους δεν έδειξε παρουσία *L. anguillarum*.

Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την πειραματική μόλυνση, όλα τα ψάρια, που έχουν μολυνθεί πειραματικά, είναι ασυμπτωματικά. Από τα 9 ψάρια στα οποία έχει γίνει δειγματοληψία, στα 4 ανιχνεύεται το βακτήριο *Listonella anguillarum* στο έντερο αλλά όχι στον πρόνεφρο. Πέντε ημέρες μετά την μόλυνση ξεκινά η θνησιμότητα στην ομάδα των πειραματικά μολυσμένων ψαριών. Από τα ημιθανή ψάρια, η *Listonella anguillarum* απομονώνεται τόσο από τον πρόνεφρο όσο και από το έντερο. Η συνολική θνησιμότητα ήταν 5 ψάρια στα 45 που είχαν μολυνθεί πειραματικά, δηλαδή 11,1%. Από τα 54 λαβράκια μάρτυρες, που υπέστησαν διαδικασία εμβάπτισης σε θαλασσινό νερό χωρίς βακτήριο, πέθανε ένα από άλλα αίτια (όχι από σηψαιμία λόγω προσβολής από το βακτήριο *Listonella anguillarum*).

2.1.3.4. Συμπεράσματα

24 ώρες μετά την πειραματική μόλυνση λαβρακιών με *L. anguillarum*, στις συγκεκριμένες συνθήκες πειραματικής μόλυνσης, δεν φαίνονται συμπτώματα νόσου, δεν υπάρχει θνησιμότητα, το έντερο αποικίζεται από το βακτήριο αλλά όχι ο πρόνεφρος.

Το υπεύθυνο βακτήριο απομονώθηκε από το έντερο στο 44,4% των ψαριών της δειγματοληψίας.

Η μέση τιμή θνησιμότητας λόγω της συγκεκριμένης πειραματικής προσβολής από το βακτήριο *L. anguillarum* ήταν 11%.

2.2. ΛΑΒΡΑΚΙ-Περιστατικά (φυσικές μολύνσεις 2.2.1-2.2.3.)

2.2.1. Περιστατικό 1

Απομόνωση του βακτηρίου *Listonella anguillarum* από πρόνεφρο και έντερο λαβρακιών κατά την διάρκεια περιστατικού δονακίωσης (φυσική μόλυνση) σε ιχθυομονάδα.

2.2.1.1. Σκοπός

Σκοπός της εξέτασης αυτής ήταν να διαπιστωθεί εάν κατά την διάρκεια δονακίωσης σε λαβράκια, που έχει προκληθεί στην φύση, παρατηρείται το φαινόμενο, όπως και στις πειραματικές μολύνσεις, ασυμπτωματικά ψάρια να έχουν το υπεύθυνο, για την δονακίωση, βακτήριο *L.anguillarum* στο έντερό τους.

2.2.1.2. Υλικά και μέθοδοι

Ασθενή, με αλλοιώσεις τυπικές της δονακίωσης, λαβράκια 100-120g, αλλά και φαινομενικά υγιή (χωρίς εξωτερικά συμπτώματα) λαβράκια από τον ίδιο κλωβό μιας ιχθυομονάδας, στάλθηκαν, εντός της ίδιας ημέρας, στο εργαστήριο για απομόνωση του υπεύθυνου βακτηρίου. Τα συμπτώματα είχαν ξεκινήσει επτά ημέρες πριν. Έγινε δειγματοληψία από τον πρόνεφρο και το έντερο των δύο ομάδων λαβρακιών, απομόνωση αποικιών και ταυτοποίησή τους με βιοχημικές και ανοσολογικές μεθόδους, όπως έχουν περιγραφεί προηγουμένως. Εξετάσθηκαν 15 νοσούντα λαβράκια και 15 φαινομενικά υγιή.

2.2.1.3. Αποτελέσματα

Στον Πίνακα 2.4.3.1 φαίνεται η παρουσία του βακτηριακού παθογόνου *Listonella anguillarum* στο έντερο και τον πρόνεφρο 15 νοσούντων, με συμπτώματα δονακίωσης, αλλά και 15 φαινομενικά υγιών λαβρακιών που συμβιών στον ίδια κλωβ, επτά ημέρες μετά την εμφάνιση συμπτωμάτων.

Πίνακας 2.2.1.3.1.

Παρουσία του βακτηριακού παθογόνου *Listonella anguillarum* στο έντερο και τον πρόνεφρο νοσούντων, με συμπτώματα δονακίωσης, αλλά και υγιών ασυμπτωματικών λαβρακιών .

Ασθενή λαβράκια		Φαινομενικά υγιή λαβράκια	
Πρόνεφρος	Έντερο	Πρόνεφρος	Έντερο
Παρουσία στο 100% των ψαριών	Παρουσία στο 100% των ψαριών	Απουσία στο 100% των ψαριών	Παρουσία στο 100% των ψαριών

Παρατηρούμε ότι κατά τη διάρκεια φυσικής μόλυνσης από το βακτήριο *Listonella anguillarum*, το βακτήριο απομονώνεται τόσο από το έντερο των φαινομενικά υγιών λαβρακιών όσο και από το έντερο και τον πρόνεφρο των νοσούντων ψαριών.

2.2.1.4. Συμπεράσματα

Κατά την διάρκεια φυσικής προσβολής από το βακτήριο *Listonella anguillarum*, το υπεύθυνο βακτήριο απομονώνεται από το έντερο ασυμπτωματικών λαβρακιών, όπως συμβαίνει και μετά από πειραματική μόλυνση.

2.2.2. Περιστατικό 2°.

Επίδραση του περιβάλλοντος και της καταπόνησης στην ποιοτική σύσταση της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας και την πρόκληση θνησιμότητας στα λαβράκια.

2.2.2.1. Σκοπός

Σκοπός του παρακολούθησης του περιστατικού αυτού ήταν α) να διαπιστωθεί εάν αλλάζει η ποιοτική σύσταση της βακτηριακής χλωρίδα του εντέρου των λαβρακιών, ανάλογα με το περιβάλλον τους, στις συνθήκες αυτές του περιστατικού, και β) πόσες ημέρες μετά από συγκεκριμένους χειρισμούς εκτεταμένης καταπόνησης, που

αφορούν συλλογή και μεταφορά λαβρακιών, μπορεί να παρατηρηθεί θνησιμότητα, που οφείλεται σε προσβολή από βακτηριακά είδη που προϋπάρχουν στην εντερική χλωρίδα.

2.2.2.2. Υλικά και μέθοδοι

2.2.2.2.1. Ψάρια

Τριακόσια ζωντανά υγιή λαβράκια μέσου βάρους 90 g, μεταφέρθηκαν υπό αναισθησία, προσεκτικά, από ιχθυομονάδα και τοποθετήθηκαν σε δεξαμενή ανοιχτής κυκλοφορίας θαλασσινού νερού με παροχή οξυγόνου. Ταυτόχρονα έγινε μικροβιολογικός έλεγχος της εντερικής χλωρίδας τους και του πρόνεφρου. Λήφθηκαν δείγματα εντέρου από 15 ψάρια. Τα λαβράκια τρέφονταν με την ίδια τροφή που τρέφονταν και την μονάδα. Έξι ημέρες μετά, έγινε επανέλεγχος της εντερικής χλωρίδας τους. Λήφθηκαν δείγματα εντέρου από άλλα 15 ψάρια. Από όλα τα ψάρια έγιναν μικροβιολογικές εξετάσεις όπως και προηγουμένως. Την επόμενη ημέρα της δειγματοληψίας, έγιναν χειρισμοί συλλογής με απόχη και μεταφορά τους, χωρίς αναισθησία, σε στρογγυλές δεξαμενές (60 ψάρια/ δεξαμενή 600 L). Ο χρόνος μεταξύ συλλογής και επανατοποθέτησης των ψαριών ήταν περίπου 20 λεπτά της ώρας ανά δεξαμενή. Τέσσερις ημέρες μετά τους χειρισμούς αυτούς, παρουσιάσθηκε θνησιμότητα και έγιναν δειγματοληψίες από τον πρόνεφρο ετοιμοθάνατων ψαριών, από 3 δεξαμενές στις οποίες παρουσιάσθηκε θνησιμότητα, και στη συνέχεια έγιναν μικροβιολογικές εξετάσεις.

2.2.2.3. Αποτελέσματα

Ο πρόνεφρος βρέθηκε αρνητικός για βακτήρια, σε όλα τα λαβράκια. Στον Πίνακα 2.2.2.3.1. παρουσιάζεται η ποιοτική ανάλυση της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας των λαβρακιών που μόλις έχουν φθάσει από την ιχθυομονάδα.

Πίνακας 2.2.2.3.1. Ανάλυση βακτηριακής χλωρίδας εντέρου σε τυχαίο δείγμα 15 λαβρακιών που μόλις έχουν αφιχθεί από ιχθυομονάδα. Βακτηριακά είδη απομονωμένα από το έντερο.

<i>Photobacterium damselae</i> subsp. <i>damselae</i>	<i>V.costicola</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
(5/15)Παρουσία του βακτηριδίου στο 30% των εξεταζομένων ψαριών	(9/15) Παρουσία του βακτηριδίου στο 60% των εξεταζομένων ψαριών	(5/15)Παρουσία του βακτηριδίου στο 30% των εξεταζομένων ψαριών	(8/15) Παρουσία του βακτηριδίου στο 53,3% των εξεταζομένων ψαριών

Στον Πίνακα 2.2.2.3.2. παρουσιάζεται η ποιοτική ανάλυση της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας των λαβρακιών, μετά από παραμονή 6 ημερών στις πειραματικές εγκαταστάσεις.

Πίνακας 2.2.2.3.2. Ανάλυση βακτηριακής χλωρίδας εντέρου σε τυχαίο δείγμα 15 λαβρακιών από την ίδια δεξαμενή που ελήφθησαν τα δείγματα του πίνακα 2.2.2.3.1., μετά από παραμονή 6 ημερών στις πειραματικές εγκαταστάσεις.

<i>Vibrio harveyi</i>	<i>V. costicola</i>	<i>V. splendidus</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
(8/15) Παρουσία του βακτηριδίου στο 53,3% των εξεταζομένων ψαριών	(5/15) Παρουσία του βακτηριδίου στο 30% των εξεταζομένων ψαριών	(4/15) Παρουσία του βακτηριδίου στο 25,6% των εξεταζομένων ψαριών	(4/15) Παρουσία του βακτηριδίου στο 25,6% των εξεταζομένων ψαριών

Μέσα σε 6 ημέρες η σύσταση της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας των ψαριών της ιχθυομονάδας άλλαξε εξαιτίας της αλλαγής του θαλάσσιου περιβάλλοντος. Το βακτήριο, *Vibrio harveyi*, που δεν υπήρχε στην εντερική

βακτηριακή χλωρίδα τους, εμφανίζεται περίπου στο 53% των ψαριών που εξετάσθηκαν.

Στον Πίνακα 2.2.2.3.3. φαίνεται η μικροβιολογική εξέταση του πρόνεφρου στα λαβράκια που έχουν παρουσιάσει συμπτώματα νόσου, 4 ημέρες μετά από οξεία καταπόνηση.

Πίνακας 2.2.2.3.3. Απομόνωση βακτηριακών στελεχών, που προϋπήρχαν στην εντερική χλωρίδα, από τον πρόνεφρο ημιθανών λαβρακιών, 4 ημέρες μετά από έντονο χειρισμό (συλλογή με απόχη και μεταφορά).		
Αριθμός ημιθανών/νεκρών ψαριών	<i>V.harveyi</i>	<i>V.splendidus</i>
Δεξ.1 4	(4/4) Παρουσία του βακτηρίου και στα 4 από τα 4 (100%)ψάρια που εξετάσθηκαν	(1/4) Παρουσία του βακτηρίου στο 1 από τα 4 (25%) ψάρια που εξετάσθηκαν
Δεξ.2 3	(3/3) Παρουσία του βακτηρίου και στα 3 από τα 3 (100%)ψάρια που εξετάσθηκαν	(0/3) Απουσία του βακτηρίου και από τα 3 ψάρια που εξετάσθηκαν
Δεξ.3 3	(3/3) Παρουσία του βακτηρίου και στα 3 από τα 3 (100%) ψάρια που εξετάσθηκαν	(1/3) Παρουσία του βακτηρίου στο 1 από τα 3 (33%) ψάρια που εξετάσθηκαν

Παρατηρείται ότι το βακτήριο *Vibrio harveyi*, που υπήρχε στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών και δεν δημιουργούσε θνησιμότητα, λόγω εκτεταμένων χειρισμών καταπόνησης που έγιναν, κυριαρχεί στον πρόνεφρο σε όλα τα ημιθανή/ νεκρά ψάρια. Επίσης το βακτήριο *V. splendidus* απομονώνεται και αυτό από τον πρόνεφρο με μικρότερη συχνότητα.

2.2.2.4. Συμπεράσματα

Η βακτηριακή χλωρίδα του εντέρου των λαβρακιών εξαρτάται από το περιβάλλον που διαβιούν. Έξη ημέρες μετά από αλλαγή του θαλασσίου περιβάλλοντος, η βακτηριακή χλωρίδα του εντέρου έχει ήδη αλλάξει.

Τέσσερις ημέρες μετά από χειρισμούς εκτεταμένης καταπόνησης, που αφορούσαν συλλογή και μεταφορά σε διαφορετικές δεξαμενές, παρατηρήθηκε θνησιμότητα, με ταυτόχρονη προσβολή του πρόνεφρου με βακτήρια που προϋπήρχαν στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα, χωρίς να δημιουργούν πρόβλημα.

2.2.3. Περιστατικό 3.

Παρακολούθηση διάρκειας δώδεκα εβδομάδων, της υγείας λαβρακιών με ταυτόχρονες μικροβιολογικές εξετάσεις πρόνεφρου και εντέρου σε πειραματικές δεξαμενές, κατά την διάρκεια χειρισμών μεταφοράς.

2.2.3.1. Σκοπός

Ο σκοπός αυτής της μικροβιολογικής παρακολούθησης ήταν να δείξει, σε πραγματικό όσο γίνεται χρόνο, τον ρόλο της καταπόνησης στην πρόκληση νοσημάτων και θνησιμότητας στα λαβράκια με παρακολούθηση της πορείας και του χρονικού μιας συνήθους μεταφοράς λαβρακιών, πρακτική που χρησιμοποιείται ευρέως στην υδατοκαλλιέργεια. Σε αυτή την παρακολούθηση γίνεται και επανάληψη της επίδρασης της οξείας καταπόνησης στη μικροβιακή χλωρίδα των λαβρακιών. Αφορά την συμπεριφορά κύριων παθογόνων αλλά και ευκαιριακών παθογόνων βακτηρίων.

2.2.3.2. Υλικά και μέθοδοι

Χίλια ζωντανά λαβράκια βάρους 70 g περίπου, ανεμβολίαστα, μεταφέρθηκαν από ιχθυομονάδα και τοποθετήθηκαν, μέσω ενός σωλήνα (διαδικασία που

προκάλεσε καταπόνηση αλλά και απώλεια λεπτιών), σε δύο μεγάλες τσιμεντένιες δεξαμενές, 18 m³ η κάθε μία, ανοιχτής κυκλοφορίας θαλασσινού νερού με παροχή οξυγόνου. Δεκαοκτώ ώρες μετά την άφιξή τους, λόγω της καταπόνησης των χειρισμών και της μεταφοράς, τα λαβράκια αυτά εμφάνισαν θνησιμότητα της τάξης του 1,5% σε μία ημέρα και εξωτερικές αλλοιώσεις (αιμορραγίες) τυπικές της δονακίωσης. Την τρίτη ημέρα από την μεταφορά τους, συνεχιζόμενων των θανάτων και των αλλοιώσεων με αυξανόμενο ρυθμό, έγινε δειγματοληψία από τον πρόνεφρο και το έντερο ημιθανών αλλά και ασυμπτωματικών ψαριών και από τις δύο δεξαμενές. Τα δείγματα καλλιεργήθηκαν σε TSA (Tryptic Soy Agar, Oxoid) με 2% NaCl, έγινε απομόνωση των αποικιών και ταυτοποίησή τους με βιοχημικές και ορολογικές μεθόδους (οροσυγκόληση Bionor). Εξετάσθηκαν 10 ημιθανή ψάρια και 10 φαινομενικά υγιή από κάθε δεξαμενή. Η θνησιμότητα συνεχίστηκε και σταμάτησε ένα μήνα μετά, οπότε τα ψάρια ανέκαμψαν. Δύο εβδομάδες μετά την αρχική μεταφορά των ψαριών, στην ιχθυομονάδα από την οποία είχαν αγορασθεί τα ψάρια και στον ίδιο κλωβό, παρουσιάστηκε αντίστοιχα θνησιμότητα λόγω δονακίωσης.

Οκτώ εβδομάδες περίπου μετά την εκδήλωση της νόσου και πριν από τη μεταφορά των ψαριών σε πειραματικές δεξαμενές εκτροφής, ελέγχθηκε η εντερική βακτηριακή χλωρίδα τους ώστε να διαπιστωθεί εάν υπήρχε ακόμα το βακτήριο *Listonella anguillarum* στο έντερό τους. Για το σκοπό αυτό λήφθηκαν δείγματα εντέρου και πρόνεφρου από 15 λαβράκια, τυχαία συλλεγμένα από τις δύο δεξαμενές, τα οποία υπεβλήθησαν σε μικροβιολογικές εξετάσεις. Τρεις ημέρες μετά την δειγματοληψία, έγινε διαλογή και τα ψάρια μεταφέρθηκαν σε μικρότερες δεξαμενές. Τέσσερις ημέρες μετά την μεταφορά αυτή, εμφανίσθηκε θνησιμότητα. Εξετάσθηκαν ο πρόνεφρος 5 ετοιμοθάνατων ψαριών, από κάθε μία από τέσσερις δεξαμενές στις οποίες εμφανίσθηκε θνησιμότητα και αλλοιώσεις. Λήφθηκαν δείγματα από τον πρόνεφρό τους και έγιναν μικροβιολογικές εξετάσεις. Είκοσι ημέρες μετά από αυτό το περιστατικό επαναλήφθηκε η εξέταση της εντερικής βακτηριακής

χλωρίδας. Λήφθηκαν δείγματα εντέρου από άλλες τρεις δεξαμενές (4 ψάρια ανά δεξαμενή) και έγιναν μικροβιολογικές εξετάσεις ως ανωτέρω.

2.2.3.3. Αποτελέσματα

Στον πίνακα 2.6.3.1. φαίνονται τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών εξετάσεων, ως προς την παρουσία του βακτηρίου *Listonella anguillarum* στον πρόνεφρο και το έντερο δέκα λαβρακίων με συμπτώματα δονακίωσης, από 2 δεξαμενές όπου υπήρχαν λαβράκια προσβεβλημένα (φυσική προσβολή) από *L. anguillarum*, δύο ημέρες μετά την εμφάνιση κρουσμάτων.

Πίνακας 2.2.3.3.1.			
Παρουσία του βακτηριακού παθογόνου <i>Listonella anguillarum</i> στον πρόνεφρο και το έντερο δέκα ασθενών, με συμπτώματα δονακίωσης, λαβρακίων σε κάθε μία από τις δύο δεξαμενές, δύο ημέρες μετά την εμφάνιση κρουσμάτων.			
Δεξαμενή 1		Δεξαμενή 2	
Πρόνεφρος	Έντερο	Πρόνεφρος	Έντερο
Απομόνωση <i>Listonella anguillarum</i> και στα 10 λαβράκια Δεν απομονώθηκε άλλο βακτηρίδιο	Απομόνωση <i>Listonella anguillarum</i> και στα 10 λαβράκια, ως κυρίαρχο είδος	Απομόνωση <i>Listonella anguillarum</i> και στα 10 λαβράκια. Δεν απομονώθηκε άλλο βακτηρίδιο	Απομόνωση <i>Listonella anguillarum</i> και στα 10 λαβράκια, ως κυρίαρχο είδος

Παρατηρούμε ότι το βακτήριο *Listonella anguillarum* απομονώνεται, ως κυρίαρχο είδος, και από τον πρόνεφρο αλλά και από το έντερο όλων των νοσούντων, με συμπτώματα δονακίωσης, ψαριών.

Αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων του πίνακα 2.2.3.3.1.

Παρουσία του βακτηριακού παθογόνου *Listonella anguillarum*

Δεξαμενή 1			Δεξαμενή 2		
	Πρόνεφρος	Έντερο		Πρόνεφρος	Έντερο
Λαβράκι 1	+	+	Λαβράκι 1	-	-
Λαβράκι 2	-	+	Λαβράκι 2	-	+
Λαβράκι 3	-	+	Λαβράκι 3	-	+
Λαβράκι 4	-	+	Λαβράκι 4	-	+
Λαβράκι 5	-	+	Λαβράκι 5	-	+
Λαβράκι 6	-	+	Λαβράκι 6	-	+
Λαβράκι 7	-	+	Λαβράκι 7	-	+
Λαβράκι 8	-	+	Λαβράκι 8	-	+
Λαβράκι 9	-	-	Λαβράκι 9	-	+
Λαβράκι 10	-	-	Λαβράκι 10	-	+

Παρατηρούμε ότι, δύο ημέρες μετά την εμφάνιση συμπτωμάτων δονακίωσης, στο 80% των δειγμάτων εντέρου των φαινομενικά υγιών λαβρακιών που εξετάσθηκαν από τη δεξαμενή 1 και στο 90% των δειγμάτων εντέρου των φαινομενικά υγιών λαβρακιών που εξετάσθηκαν από τη δεξαμενή 2, το βακτήριο *Listonella anguillarum* απομονώνεται, ως κυρίαρχο είδος, από το έντερό τους και μόνο στο 10% των ψαριών της δεξαμενής 1, απομονώνεται από τον πρόνεφρό τους .

Στον πίνακα 2.2.3.3.2. φαίνονται τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών εξετάσεων ως προς την παρουσία του βακτηρίου *Listonella anguillarum* στον πρόνεφρο και το έντερο δέκα φαινομενικά υγιών λαβρακιών, από 2 δεξαμενές όπου υπάρχουν λαβράκια που νοσούν με συμπτώματα δονακίωσης, δύο ημέρες μετά την εμφάνιση κρουσμάτων.

Πίνακας 2.2.3.3.2. Παρουσία του βακτηριακού παθογόνου <i>Listonella anguillarum</i> στο έντερο και τον πρόνεφρο δέκα λαβρακιών (από κάθε μία από τις δύο δεξαμενές) φαινομενικά υγιών, που διαβιούν στις ίδιες δεξαμενές με λαβράκια νοσούντα από δονακίωση, δύο ημέρες μετά την εμφάνιση συμπτωμάτων δονακίωσης.			
Δεξαμενή 1		Δεξαμενή 2	
Πρόνεφρος	Έντερο	Πρόνεφρος	Έντερο
Απομόνωση <i>Listonella anguillarum</i> σε 1 από τα 10 εξετασμένα ψάρια. Δεν απομονώθηκε άλλο βακτήριο	Απομόνωση <i>Listonella anguillarum</i> σε 8 από τα 10 εξετασμένα ψάρια ως κυρίαρχο είδος	Απουσία <i>Listonella anguillarum</i>	Απομόνωση <i>Listonella anguillarum</i> ως κυρίαρχο είδος σε 9 από τα 10 εξετασμένα ψάρια

Παρατηρούμε ότι δύο ημέρες μετά την εμφάνιση συμπτωμάτων δονακίωσης, στο 85% των φαινομενικά υγιών ψαριών που εξετάσθηκαν, το βακτήριο *Listonella anguillarum* απομονώνεται, ως κυρίαρχο είδος, από το έντερό τους και μόνο στο 10% των ψαριών απομονώνεται από τον πρόνεφρό τους .

Στον πίνακα 2.2.3.3.3. που ακολουθεί, φαίνεται η ποιοτική σύσταση της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας δείγματος 15 λαβρακιών, 8 εβδομάδες μετά την έναρξη της δονακίωσης.

Πίνακας 2.2.3.3.3.

Ποιοτική ανάλυση εντερικής βακτηριακής χλωρίδας 15 λαβρακιών, 8 εβδομάδες μετά την έναρξη της δονακίωσης.

<i>Vibrio harveyi</i>	<i>V.costicola</i>	<i>Vibrio spp.</i>	<i>Listonella anguillarum</i>
Παρουσία στο 66,6% των λαβρακιών σαν κυρίαρχο είδος.	Παρουσία στο 33,3% των λαβρακιών	Παρουσία στο 33,3% των λαβρακιών	Απουσία

Το βακτήριο *Listonella anguillarum* δεν απομονώνεται πλέον από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα των λαβρακιών, 8 εβδομάδες μετά την έναρξη της δονακίωσης. Το βακτήριο *Vibrio harveyi* εμφανίζεται στο έντερο 66.6% των ψαριών που εξετάστηκαν. Στον πίνακα 2.2.3.3.4. φαίνονται τα αποτελέσματα της απομόνωσης βακτηρίων από τον πρόνεφρο ημιθανών λαβρακιών, 4 ημέρες μετά από χειρισμό διαλογής και μεταφοράς, δηλαδή μία εβδομάδα μετά από την ποιοτική ανάλυση εντερικής βακτηριακής χλωρίδας των λαβρακιών της ίδιας ομάδας.

Πίνακας 2.2.3.3.4.

Βακτήρια απομονωμένα από τον πρόνεφρο ημιθανών λαβρακιών, από 4 δεξαμενές, 4 ημέρες μετά από χειρισμό διαλογής και μεταφοράς (μια εβδομάδα μετά τα δεδομένα του πίνακα 2.5.3.3.).

	Λαβράκι 1	Λαβράκι 2	Λαβράκι 3	Λαβράκι 4	Λαβράκι 5
Δεξ.1	<i>V.harveyi</i>	<i>V.harveyi</i>	<i>V.harveyi</i> , <i>V.splendidus</i>	<i>V.harveyi</i>	<i>V.harveyi</i>
Δεξ.2	<i>V.harveyi</i>	<i>V.harveyi</i>	<i>V.harveyi</i>	<i>V.harveyi</i>	<i>V.harveyi</i>
Δεξ.3	<i>V.harveyi</i> ,	<i>V.harveyi</i>	<i>V.harveyi</i> <i>V.splendidus</i>	<i>V.harveyi</i> <i>V.splendidus</i>	<i>V.harveyi</i>
Δεξ.4	<i>V.harveyi</i> ,	<i>V.harveyi</i> , <i>Vibrio spp.</i>	<i>V.harveyi</i> ,	<i>V.harveyi</i>	<i>Vibrio spp.</i> , <i>Vibrio</i> <i>parahaemo</i> <i>lyticus</i>

Το βακτήριο *V.harveyi* έχει πιθανόν διαπεράσει τον εντερικό φραγμό και έχει μπει στην κυκλοφορία του αίματος, γι αυτό και απομονώνεται από τον πρόνεφρο όλων των ψαριών. Το βακτήριο *V.splendidus* απομονώνεται και αυτό από τον πρόνεφρο, μόνο στο 15% των ψαριών, εμφανίζεται πάντοτε μαζί με το *V.harveyi* που είναι κυρίαρχο. Είκοσι ημέρες μετά την εμφάνιση θνησιμότητας και αφού έχουν σταματήσει οι απώλειες, στον πίνακα 2.2.3.3.5. φαίνεται η νέα ποιοτική σύσταση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας των λαβρακιών στις 3 από τις 4 προηγούμενες δεξαμενές. Δηλαδή οι δεξαμενές 1, 2, 3, από τις οποίες έγινε η δειγματοληψία είναι οι ίδιες όπως και στον πίνακα 2.5.3.4. Ελέγχθηκαν 4 ψάρια/ δεξαμενή.

Πίνακας 2.2.3.3.5. Ποιοτική ανάλυση εντερικής βακτηριακής χλωρίδας 12 λαβρακιών, 20 ημέρες μετά τα δεδομένα του πίνακα 2.2.3.3.4.				
	Λαβράκι 1	Λαβράκι 2	Λαβράκι 3	Λαβράκι 4
Δεξ.1	<i>V.harveyi</i>	<i>V.harveyi</i> <i>Vibrio spp*</i>	<i>V.harveyi</i>	<i>V.harveyi</i> <i>Vibrio spp*</i>
Δεξ.2	<i>V.harveyi</i>	<i>V.harveyi</i> <i>Vibrio spp*</i>	<i>V.harveyi</i> , <i>Vibrio spp*</i>	<i>V.harveyi</i>
Δεξ.3	<i>V.harveyi</i> ,	<i>V.harveyi</i>	<i>V.harveyi</i> , <i>Vibrio spp*</i>	<i>V.harveyi</i>

* ίδιος βιοχημικός τύπος όπως και στον πίνακα 2.2.3.3.4.

Παρατηρούμε ότι το βακτήριο *Vibrio harveyi* εξακολουθεί και κυριαρχεί στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών.

2.2.3.4. Συμπεράσματα

Η *Listonella anguillarum* μπορεί να προσβάλλει (φυσικά) και να δημιουργήσει σηψαιμία στα λαβράκια 18 ώρες μετά από μία μετακίνηση, που τους έχει δημιουργήσει οξεία καταπύκνωση.

Σε ένα πληθυσμό λαβρακιών, που έχει υποστεί φυσική μόλυνση από το βακτήριο *L. anguillarum*, η εντερική μικροβιακή χλωρίδα της πλειονότητας των ασυμπτωματικών ψαριών αποικίζεται από το βακτήριο αυτό, χωρίς να νοσούν.

Ένα μήνα μετά την αρχική φυσική μόλυνση από την *L. anguillarum*, η θνησιμότητα έχει σταματήσει τελείως.

Οκτώ εβδομάδες μετά την αρχική φυσική μόλυνση από την *L. anguillarum*, το βακτήριο δεν απομονώνεται πλέον από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα του προσβεβλημένου πληθυσμού των λαβρακιών.

Βακτήρια, που προϋπάρχουν στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των λαβρακιών και δεν δημιουργούν προβλήματα, τέσσερις ημέρες μετά από χειρισμούς εκτεταμένης καταπύκνωσης που αφορούν συλλογή και μεταφορά, απομονώνονται,

από τον πρόνεφρο σε σηψαιμικές καταστάσεις όπου εμφανίζονται συμπτώματα δονακιώσεων και θνησιμότητα.

2.3. ΤΣΙΠΟΥΡΑ- Πειραματική καταπόνηση

2.3.1. Πείραμα 1^ο

Επίδραση της οξείας καταπόνησης και της αλλαγής δεξαμενής στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα της τσιπούρας.

2.3.1.1. Σκοπός

Σκοπός αυτού του πειράματος ήταν να δειχθεί η επίδραση της οξείας καταπόνησης, λόγω έντονων χειρισμών συλλογής και μεταφοράς, στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα της τσιπούρας και στην δημιουργία θνησιμότητας, όπου βακτήρια, προϋπάρχοντα στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα, απομονώνονται από όργανα που έχουν να κάνουν με την κυκλοφορία του αίματος όπως ο πρόνεφρος.

2.3.1.2. Υλικά και μέθοδοι

Έγινε ποιοτική εξέταση εντερικής βακτηριακής χλωρίδας σε 24 τσιπούρες, μέσου βάρους 95 g από 4 δεξαμενές (6 ψάρια ανά δεξαμενή) εκτροφής, που τρέφονταν με εμπορική τροφή δύο φορές την ημέρα. Οι συνθήκες οξυγόνου και ροής νερού ήταν οι ίδιες σε όλες τις δεξαμενές, δηλαδή 7-8 ppm O₂. Στη συνέχεια 10 τσιπούρες από κάθε δεξαμενή υπέστησαν πειραματικούς χειρισμούς έντονης καταπόνησης, δηλαδή συλλογής και παραμονής σε λεκάνη 10 λίτρων για 5 λεπτά, χωρίς οξυγόνο, και κατόπιν μεταφοράς σε νέες δεξαμενές ανοικτής κυκλοφορίας νερού με παροχή οξυγόνου 7-8 ppm. Η θερμοκρασία του πειράματος ήταν 25°C. Κάθε ημέρα γινόταν έλεγχος για ύπαρξη νεκρών.

2.3.1.3. Αποτελέσματα

Και στις τέσσερις δεξαμενές τα βακτήρια που απομονώθηκαν ήταν το *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* και *Vibrio alginolyticus*. Μετά τους χειρισμούς οξείας καταπόνησης, μία τσιπούρα μόνο πέθανε και η βακτηριολογική εξέταση έδειξε προσβολή από το ευκαιριακό παθογόνο περιστατικό *Vibrio harveyi*.

2.3.1.4. Συμπεράσματα

Οι συνθήκες πειραματικής οξείας καταπόνησης, στις οποίες υπεβλήθησαν οι τσιπούρες, δεν δημιούργησαν αξιόλογη θνησιμότητα και βακτηριακές μολύνσεις.

Η τσιπούρα είναι ανθεκτικότερη στην καταπόνηση από ότι το λαβράκι, όπως φάνηκε από προηγούμενα πειράματα οξείας καταπόνησης.

2.4. ΤΣΙΠΟΥΡΑ- Περιστατικό (φυσική μόλυνση)

2.4.1. Περιστατικό 1^ο.

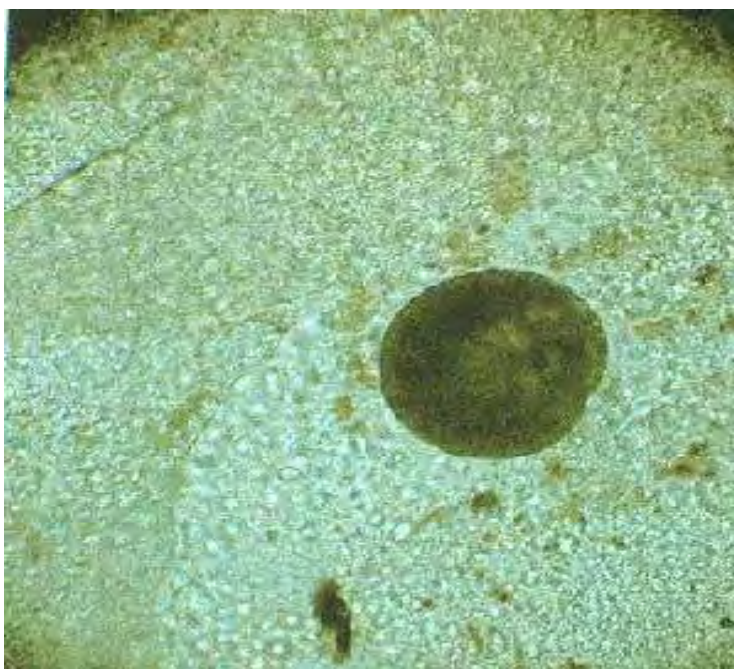
Επίδραση της φυσικής προσβολής, από το παράσιτο *Cryptocaryon irritans*, ως παράγοντας καταπόνησης στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα της τσιπούρας (*Sparus aurata*).

2.4.1.1. Σκοπός

Το περιστατικό αυτό περιγράφεται διότι δείχνει ότι βακτήρια, προϋπάρχοντα στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα υγιών ατόμων τσιπούρας, μετά από οξεία καταπόνηση, λόγω φυσικής προσβολής από το παράσιτο *Cryptocaryon irritans*, μπορούν να απομονώνονται και από τον πρόνεφρό τους.

2.4.1.2. Υλικά και μέθοδοι

Το περιστατικό αυτό συνέβη κατά την καλοκαιρινή περίοδο στις εγκαταστάσεις του ΕΛΚΕΘΕ. Η ποιοτική σύσταση της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας είχε ελεγχθεί, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενα πειράματα, σε 15 δείγματα τσιπούρας 100 g, από 5 δεξαμενές όγκου των 600 L, με ανοικτή κυκλοφορία θαλασσινού νερού με 7 ppm O₂, θερμοκρασία 26°C και αλατότητα 38 τοις χιλίοις. Δέκα μέρες μετά, άρχισε να εμφανίζεται θνησιμότητα σε όλες τις δεξαμενές και διαπιστώθηκε, ύστερα από παρασιτολογική μελέτη, η προσβολή από το βλεφαριδωτό παράσιτο *Cryptocaryon irritans*. Βακτηριολογικές εξετάσεις έγιναν σε όλες τις προσβεβλημένες τσιπούρες.



Εικόνα 2.4.1.2.1. Κύστη *Cryptocaryon irritans*.

2.4.1.3. Αποτελέσματα

Το βακτήριο *Vibrio harveyi*, που προϋπήρχε ως κυρίαρχο στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των ατόμων τσιπούρας, πριν την προσβολή τους από το παράσιτο

Cryptocaryon irritans, απομονώθηκε από όλες τις ημιθανείς/ νεκρές προσβεβλημένες τσιπούρες.

2.4.1.4. Συμπεράσματα

Μία έντονη προσβολή από το βλεφαριδωτό παράσιτο *Cryptocaryon irritans* ήταν σε θέση να προκαλέσει πιθανόν λόγω βακτηριακής μετανάστευσης δευτερογενή προσβολή από το ευκαιριακό παθογόνο *Vibrio harveyi*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

**Επίδραση παραγόντων χρόνιας
καταπόνησης (χαμηλού οξυγόνου και ροής
του νερού) στην εντερική μικροβιακή
χλωρίδα του εκτρεφόμενου λαβρακιού**

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκε η επίδραση παραγόντων χρόνιας καταπόνησης (χαμηλού οξυγόνου και ροής του νερού) στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα του εκτρεφόμενου λαβρακιού. Συγκεκριμένα έγιναν 3 πειράματα. Στο πρώτο πείραμα, που διήρκεσε 17 εβδομάδες, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων οξυγόνου στην ποιοτική σύσταση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας του λαβρακιού καθώς επίσης και η μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Στο δεύτερο πείραμα, που πραγματοποιήθηκε κατά την θερινή περίοδο, μελετήθηκε η, επί 8 εβδομάδες, επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων οξυγόνου στην ποιοτική και ποσοτική σύσταση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας του λαβρακιού καθώς και στην υγεία των ψαριών κάτω από συνθήκες οξείας καταπόνησής τους με ταυτόχρονη ή μη αλλαγή περιβάλλοντος (δεξαμενής). Στο τρίτο πείραμα, που έγινε κατά την εαρινή περίοδο, μελετήθηκε η, διάρκειας 3 μηνών, επίδραση διαφορετικών συνδυασμών ροής νερού και συγκέντρωσης οξυγόνου στην ποιοτική και ποσοτική σύσταση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας του λαβρακιού καθώς και στην υγεία του, κάτω από συνθήκες οξείας καταπόνησης.

3.1. Πείραμα 1^ο.

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων οξυγόνου στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα του λαβρακιού.

3.1.1. Σκοπός

Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν να διαπιστωθεί εάν οι διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου επιδρούν μακροπρόθεσμα στην ποιοτική σύσταση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας. Οι τεχνικές συνθήκες που εξετάστηκαν προσομοιάζουν με αυτές που συμβαίνουν μερικές φορές (από φυσικά αίτια ή διαχείριση) στην εντατική ιχθυοκαλλιέργεια.

3.1.2. Υλικά και μέθοδοι

Τριακόσια ενενήντα λαβράκια, αρχικού βάρους $78,9 \pm 3$ g τοποθετήθηκαν σε 8 πλαστικές κυλινδροκωνικές δεξαμενές 600 L (Εικόνα 3.1.2.1.) και χωρίστηκαν σε 3 ομάδες με 2 επαναλήψεις η κάθε μία. Οι δεξαμενές τροφοδοτούνταν με θαλασσινό νερό αλατότητας 38 ‰, με ροή νερού 250 L/h, θερμοκρασίας $26 \pm 1^\circ\text{C}$, ενώ επικρατούσε τεχνητή φωτοπερίοδος 10 ώρες φως, 14 ώρες σκοτάδι. Τα ψάρια αρχικά αφέθηκαν για δύο εβδομάδες μέσα στις δεξαμενές για να εγκλιματισθούν. Σε αυτήν την περίοδο η συγκέντρωση του οξυγόνου μέσα σε όλες τις δεξαμενές ήταν $7,5 \pm 0,2$ ppm. Μετά την περίοδο εγκλιματισμού η συγκέντρωση οξυγόνου σε κάθε ομάδα ορίστηκε ως εξής: Ομάδα 1: $3,6 \pm 0,2$ ppm (επίπεδα κορεσμού του νερού 55,4% υποξία), ομάδα 2: $4,7 \pm 0,2$ ppm (επίπεδα κορεσμού του νερού 72,3% υποξία), ομάδα 3: $8,2 \pm 0,2$ ppm (επίπεδα κορεσμού του νερού 126,1% ελαφριά υπεροξυγόνωση). Οι διαφορές στις επαναλήψεις ήταν σε όλη την διάρκεια του πειράματος $\pm 0,4$ ppm. Το οξυγόνο σε κάθε δεξαμενή διοχετευόταν απευθείας στη δεξαμενή με τη χρήση αερο-πετρών. Η σταθερότητα των συγκεντρώσεων οξυγόνου ελέγχονταν και ρυθμιζόταν μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή, συνδεδεμένου με ηλεκτρόδια, που βρίσκονταν μέσα στις δεξαμενές, ενώ δύο φορές εβδομαδιαίως ελεγχόταν με τη μέθοδο Winkler.

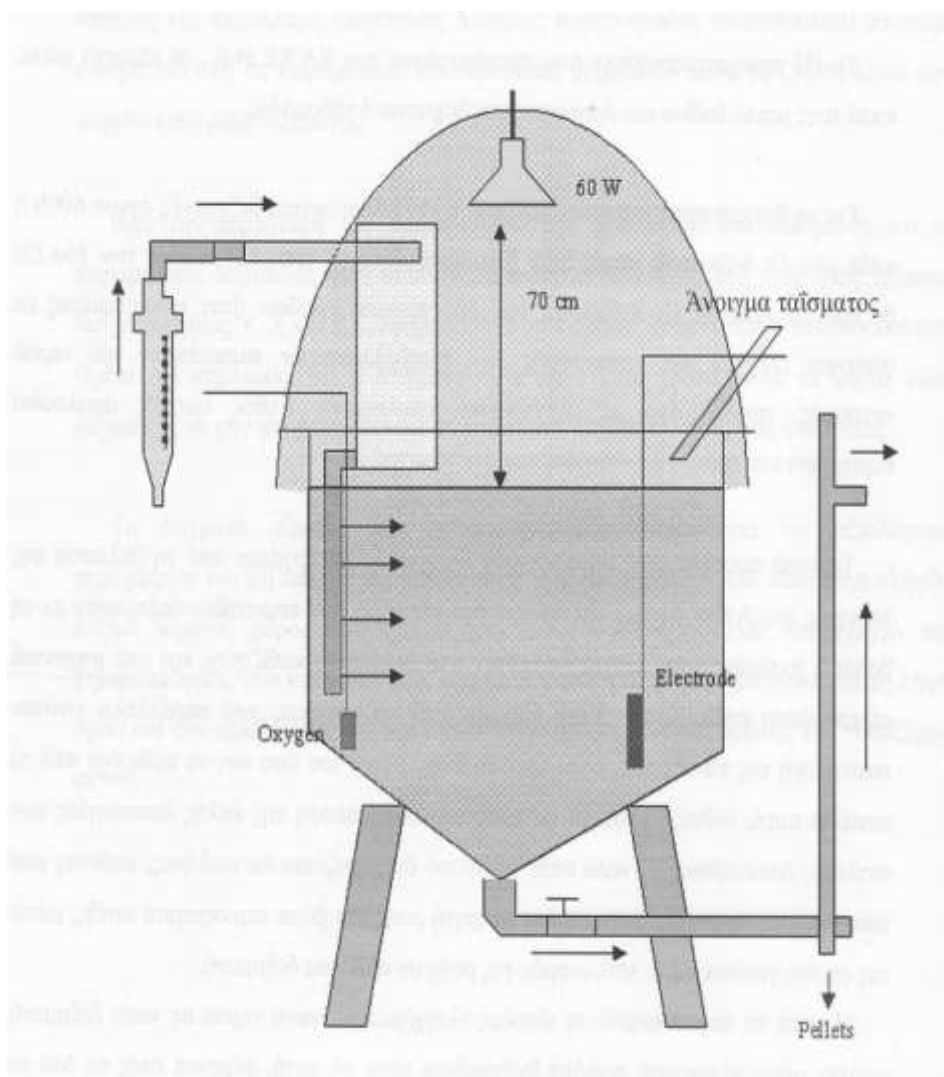
Τα ψάρια τρεφόταν με εμπορική τροφή Biomar Ecolife 64, 4,5 mm, δύο φορές ημερησίως, 8:30 πμ και 15:00 μμ. Κατά την διάρκεια όλου του πειραματισμού, που διήρκεσε δεκαεπτά εβδομάδες, έγιναν 3 δειγματοληψίες (12 ψάρια ανά ομάδα ήτοι 6 ψάρια από κάθε δεξαμενή σε κάθε δειγματοληψία), η πρώτη έγινε στις 6 εβδομάδες εκτροφής, η δεύτερη στις 9 και η τρίτη στις 17 εβδομάδες, 8 εβδομάδες μετά την περαιτέρω μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Η περαιτέρω μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου έγινε μετά τη δεύτερη δειγματοληψία (μετά τις 9 εβδομάδες) ως εξής: Ομάδα 1: $2,9 \pm 0,2$ ppm, Ομάδα 3: $6,7 \pm 0,2$ ppm.

Στην πρώτη δειγματοληψία λήφθηκαν δείγματα από όλες τις ομάδες. Στην δεύτερη και τρίτη δειγματοληψία λήφθηκαν δείγματα μόνο από τις ομάδες 1 και 3 που

αντιπροσώπευαν τις δύο ακραίες συγκεντρώσεις οξυγόνου, όπου και παρατηρήθηκαν αξιόλογες διαφορές, όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα της πρώτης δειγματοληψίας. Στις χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, παρατηρήθηκε μείωση του ειδικού ρυθμού αύξησης και της αξιοποίησης της τροφής, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην όρεξη και στη προσλαμβανόμενη τροφή ανά ημέρα.

Για τον έλεγχο της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1.2.4. Τα βακτηριακά στελέχη *Vibrio splendidus* και *Vibrio harveyi* ταυτοποιήθηκαν επιπλέον και με τεχνικές μοριακής βιολογίας (ανάλυση του 16S rDNA σε γενετικό αναλυτή τριχοειδούς ABI Prism, Applied Biosystems). Οι ταυτοποιήσεις έγιναν με βάση τα αποτελέσματα της αλληλούχισης και το πρόγραμμα της βιβλιοθήκης Blast.

Τα αποτελέσματα και από τις 3 δειγματοληψίες επεξεργάστηκαν στατιστικά με Multi ANOVA στο στατιστικό πρόγραμμα SPSS, με εξαρτημένες μεταβλητές όλα τα απομονωμένα βακτήρια και σταθερούς παράγοντες τον χρόνο δειγματοληψίας (time), τα επίπεδα οξυγόνου (treatment) και τις δεξαμενές (tank). Όλα τα δεδομένα της εμφάνισης του βακτηρίου *Vibrio harveyi* ελέγχθηκαν για ομοιογένεια διασποράς με την δοκιμή Levene. Στατιστικές διαφορές μεταξύ των 3 δειγματοληψιών καθορίστηκαν με την δοκιμή Tukey's.



Εικόνα 3.1.2.1 Σχηματική παράσταση δεξαμενής του πειράματος (Βάτσος Ι.).

3.1.3. Αποτελέσματα

Σε όλη την διάρκεια του πειράματος δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στη θνησιμότητα των λαβρακιών, μεταξύ των διαφόρων συγκεντρώσεων οξυγόνου. Στη χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, παρατηρήθηκε μείωση του ειδικού ρυθμού αύξησης και της αξιοποίησης της τροφής. Στις 6 εβδομάδες, δεν παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση στην ποιότητα και την ποσότητα της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας μεταξύ των διαφόρων συγκεντρώσεων οξυγόνου. Ένα από τα είδη των βακτηρίων που απαρτίζουν την εντερική βακτηριακή χλωρίδα των

λαβρακιών του πειράματος στην πρώτη δειγματοληψία στις 6 εβδομάδες, είναι το *Vibrio harveyi* (Πίνακας 3.1.3.1.).

Παρατηρείται αυξημένη συχνότητα εμφάνισης του βακτηρίου *Vibrio harveyi* στην εντερική χλωρίδα των ψαριών της χαμηλότερης συγκέντρωσης οξυγόνου με συχνότητα εμφάνισης 10 στα 12 ψάρια, ενώ στα ψάρια της ομάδας 3, δηλαδή της υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου, η συχνότητα εμφάνισης είναι μικρή (3 στα 12 ψάρια) και στη συγκέντρωση της ομάδας 2, η συχνότητα είναι ενδιάμεση (7 στα 12 ψάρια).

Επίσης ένα άλλο ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο χαμηλής λοιμογόνου δύναμης, το *Vibrio splendidus*, υπάρχει στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα με μεγαλύτερη συχνότητα στα ψάρια της υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου. Τελευταίο στη συχνότητα εμφάνισης είναι το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, με συχνότητα εμφάνισης 2 στα 12 ψάρια της ομάδας 1, 1 στα 12 ψάρια της ομάδας 2 και 5 στα 12 ψάρια της ομάδας 3 της υψηλ'ξης συγκέντρωσης οξυγόνου. Τα εν λόγω βακτηριακά είδη εμφανίζονται μόνα τους ή μαζί με τα άλλα είδη. Άλλα βακτηριακά στελέχη δεν απομονώθηκαν στο χρησιμοποιηθέν καλλιεργητικό υλικό. Η αερόβια βακτηριακή χλωρίδα των λαβρακιών την περίοδο αυτή δεν παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία, ως προς τα είδη.

Πίνακας 3.1.3.1. Συχνότητα εμφάνισης των βακτηριακών ειδών στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των λαβρακιών ανά δεξαμενή (στο σύνολο 6 ψαριών ανά δεξαμενή). Πρώτη δειγματοληψία (6 εβδομάδες).						
Είδη βακτηρίων	Συγκέντρωση οξυγόνου 1 3,6 ±0,2 ppm		Συγκέντρωση οξυγόνου 2 4,7 ±0,2 ppm		Συγκέντρωση οξυγόνου 3 8,2 ±0,2 ppm	
	Δεξ. Α	Δεξ. Β	Δεξ.Α	Δεξ.Β	Δεξ.Α	Δεξ. Β
<i>Vibrio harveyi</i>	83,3% (5/6)	83,3% (5/6)	66,6% (4/6)	50% (3/6)	16,6% (1/6)	33,3% (2/6)
<i>Vibrio splendidus</i>	83,3% (5/6)	33,3% (2/6)	33,3% (2/6)	50% (3/6)	66,6% (4/6)	83,3% (5/6)
<i>Ph.damselae</i> ssp. <i>damselae</i> .	16,6% (1/6)	16,6% (1/6)	0% (0/6)	16,6% (1/6)	33,3% (2/6)	50% (3/6)

Τα είδη των βακτηρίων που απαρτίζουν την εντερική χλωρίδα των λαβρακιών του πειράματος στις 9 εβδομάδες (Πίνακας 3.1.3.2), είναι το *Vibrio harveyi*, με συχνότητα εμφάνισης στη χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου μόνο, 5 στα 12 ψάρια, το *Vibrio splendidus* και το *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* με παρόμοια συχνότητα εμφάνισης και στις δύο συγκεντρώσεις οξυγόνου (Πίνακας 3.1.3.2α). Τα εν λόγω βακτηριακά είδη εμφανίζονται μόνα τους ή μαζί με τα άλλα είδη. Στη συγκέντρωση οξυγόνου 3, που είναι υψηλή, απουσιάζει το βακτήριο *V.harveyi* από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα. Στη συγκέντρωση οξυγόνου 1, που είναι χαμηλή, το *V.harveyi* εξακολουθεί να εμφανίζεται.

Πίνακας 3.1.3.2. Συχνότητα εμφάνισης των βακτηριακών ειδών στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των λαβρακιών (ανά ψάρι). Δεύτερη δειγματοληψία (9 εβδομάδες).

	Συγκέντρωση οξυγόνου 1 3,6 ±0,2 ppm		Συγκέντρωση οξυγόνου 3 8,2 ±0,2 ppm	
	Δεξαμενή Α	Δεξαμενή Β	Δεξαμενή Α	Δεξαμενή Β
Ψάρι 1	<i>Ph.damselae</i> .:97% <i>V.splendidus</i> .:3%	<i>V.harveyi</i>	<i>V.splendidus</i>	<i>V.splendidus</i> ,
Ψάρι 2	<i>V.splendidus</i>	<i>V.splendidus</i>	<i>Ph.damselae</i>	<i>V.splendidus</i> .: 50% <i>Ph.damselae</i> .:50%
Ψάρι 3	<i>V.splendidus</i>	<i>V.splendidus</i> :20% <i>V.harveyi</i> :80%	<i>V.splendidus</i>	<i>V.splendidus</i>
Ψάρι 4	<i>V.harveyi</i> :10% <i>V.splendidus</i> :90%	<i>Ph.damselae</i>	<i>V.splendidus</i> :50% <i>Ph.damselae</i> :50%	<i>V.splendidus</i> .: 50% <i>Ph.damselae</i> .:50%
Ψάρι 5	<i>Ph.damselae</i> .	<i>V.harveyi</i> :15% <i>V.splendidus</i> :85%	<i>V.splendidus</i>	<i>Ph.damselae</i>
Ψάρι 6	<i>V.harveyi</i> :50% <i>V.splendidus</i> : 50%	<i>V.splendidus</i>	<i>V.splendidus</i>	<i>V.splendidus</i>

Στον Πίνακα 3.1.3.2α φαίνονται τα αποτελέσματα της δεύτερης δειγματοληψίας με τη μορφή της συχνότητα εμφάνισης των βακτηριακών ειδών στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των λαβρακιών ανά δεξαμενή.

Πίνακας 3.1.3.2α. Συχνότητα εμφάνισης των βακτηριακών ειδών στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των λαβρακιών ανά δεξαμενή (στο σύνολο 6 ψαριών ανά δεξαμενή).				
Είδη βακτηρίων	Συγκέντρωση οξυγόνου 1 3,6 ±0,2 ppm		Συγκέντρωση οξυγόνου 3 8,2 ±0,2 ppm	
	Δεξ. Α	Δεξ. Β	Δεξ.Α	Δεξ. Β
<i>Vibrio harveyi</i>	33,3% (2/6)	50% (3/6)	0% (0/6)	0% (0/6)
<i>Vibrio splendidus</i>	83,3% (5/6)	66,6% (4/6)	83,3% (5/6)	83,3% (5/6)
<i>Ph.damselae</i> ssp. <i>damselae</i> .	33,3% (2/6)	16,6% (1/6)	33,3% (2/6)	50% (3/6)

Στην τρίτη δειγματοληψία τα είδη των βακτηρίων που απαρτίζουν την εντερική χλωρίδα των λαβρακιών του πειράματος στις 17 εβδομάδες, (8 εβδομάδες μετά την μείωση των συγκεντρώσεων του οξυγόνου), είναι το *Vibrio harveyi* με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στην συγκέντρωση οξυγόνου 1 (χαμηλό οξυγόνο) και το *Vibrio splendidus* (Πίνακας 3.1.3.3). Τα εν λόγω δύο βακτηριακά είδη εμφανίζονται μόνο τους ή μαζί.

Το βακτήριο *V. harveyi* επανεμφανίζεται στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα της υψηλής συγκέντρωσης του οξυγόνου, ύστερα από τη μείωση του οξυγόνου σε συγκέντρωση πολύ κοντά στην φυσιολογική (6,5mg/l). Και από τις δύο συγκεντρώσεις οξυγόνου απουσιάζει το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα λόγω της εποχής δειγματοληψίας. Παρατηρείται μείωση του αριθμού της αερόβιας εντερικής χλωρίδας στην κανονική συγκέντρωση οξυγόνου συγκριτικά με την χαμηλή.

Πίνακας 3.1.3.3. Ποιοτική και ποσοτική σύσταση βακτηριακής χλωρίδας του εντέρου λαβρακιών στις 17 εβδομάδες, οκτώ εβδομάδες μετά την μείωση των συγκεντρώσεων οξυγόνου (Οκτώβριος).

	Συγκέντρωση οξυγόνου 1 2,9 ±0,2 ppm		Συγκέντρωση οξυγόνου 3 6,7 ±0,2 ppm	
	Δεξαμενή Α	Δεξαμενή Β	Δεξαμενή Α	Δεξαμενή Β
Ψάρι 1	<i>V. harveyi</i>	<i>V.harveyi</i> 70% <i>V.splendidus</i> 30%	<i>V. splendidus</i>	<i>V. harveyi</i>
Ψάρι 2	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. splendidus</i>	<i>V splendidus</i>
Ψάρι 3	<i>V. harveyi</i>	<i>V.harveyi</i> 73% <i>V.splendidus</i> 27%	<i>V splendidus.</i>	<i>V splendidus</i>
Ψάρι 4	<i>V splendidus</i>	<i>V. Splendidus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. splendidus</i>
Ψάρι 5	<i>V.harveyi</i> 76% <i>V.splendidus</i> 24%	<i>V. harveyi</i>	<i>V.alginolyticus</i> 31% <i>V. splendidus</i> 69%	<i>V.splendidus</i> 85% <i>Pseudomonas sp.</i> 15%
Ψάρι 6	<i>V.harveyi</i> 79% <i>V.splendidus</i> 21%	<i>V. splendidus</i>	<i>V. splendidus</i>	<i>V. splendidus</i>
	Αριθμός αερόβιας εντερικής μικροχλωρίδας (CFU/ml εντερικού περιεχομένου)			
	Δεξαμενή Α	Δεξαμενή Β	Δεξαμενή Α	Δεξαμενή Β
Ψάρι 1	0,7.10 ⁴	0,6.10 ⁴	0,84.10 ²	1.10 ²
Ψάρι 2	0,6.10 ⁴	0,7.10 ⁴	1.10 ²	1,2.10 ²
Ψάρι 3	0,6.10 ⁴	0,6.10 ⁴	1,1.10 ²	0,9.10 ²
Ψάρι 4	0,5.10 ⁴	0,7.10 ⁴	1,26.10 ²	0,85.10 ²
Ψάρι 5	0,6.10 ⁴	0,7.10 ⁴	0,1.10 ²	0,95.10 ²
Ψάρι 6	0,6.10 ⁴	0,5.10 ⁴	0,9.10 ²	0,8.10 ²
Μέσος όρος	0,6.10 ⁴ ±0.063	0,63.10 ⁴ ±0.081	0,88.10 ² ±0.412	0,96.10 ² ±0.153

Στον Πίνακα 3.1.3.3α φαίνεται η συχνότητα εμφάνισης των βακτηριακών ειδών στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των λαβρακιών ανά δεξαμενή (στο σύνολο 6 ψαριών ανά δεξαμενή) στην τελευταία δειγματοληψία (17 εβδομάδες) .

Πίνακας 3.1.3.3α. Συχνότητα εμφάνισης των βακτηριδιακών ειδών στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των λαβρακιών ανά δεξαμενή (στο σύνολο 6 ψαριών ανά δεξαμενή).				
Είδη βακτηρίων	Συγκέντρωση οξυγόνου 1 2,9 ±0,2 ppm		Συγκέντρωση οξυγόνου 3 6,7 ±0,2 ppm	
	Δεξ. Α	Δεξ. Β	Δεξ.Α	Δεξ. Β
<i>Vibrio harveyi</i>	83,3% (5/6)	66,6% (4/6)	16,6% (1/6)	16,6% (1/6)
<i>Vibrio splendidus</i>	50% (3/6)	66,6% (4/6)	83,3% (5/6)	83,3% (5/6)
<i>Ph.damselae</i> ssp. <i>damselae</i> .	0% (0/6)	0% (0/6)	0% (0/6)	0% (0/6)

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία που αφορά και τις 3 δειγματοληψίες δείχνει ότι η επίδραση της συγκέντρωσης οξυγόνου επηρεάζει σημαντικά την εμφάνιση του βακτηρίου *Vibrio.harveyi*. Οι διαφορές στην εμφάνιση του βακτηρίου αυτού μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης δειγματοληψίας είναι στατιστικά σημαντικές. Ο παράγων χρόνος δηλαδή διαφοροποιεί την εμφάνιση του *V.harveyi* στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα. Ο παράγοντας δεξαμενή δεν έχει στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

3.1.4. Συμπεράσματα

Υπάρχει χρονική διαφοροποίηση στην παρουσία των βακτηριακών ειδών στην εντερική χλωρίδα του λαβρακιού. Το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* δεν υπάρχει στην τελευταία δειγματοληψία του Οκτωβρίου και στις δύο συγκεντρώσεις οξυγόνου. Παράλληλα εμφανίζεται σε ένα ψάρι ένα ψυχρόφιλο

βακτηρίδιο ή ψευδομονάδα. Άρα η θερμοκρασία παίζει ρόλο στην σύνθεση της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας.

Παρατηρείται μείωση του αριθμού της αερόβιας εντερικής χλωρίδας στην κανονική συγκέντρωση του οξυγόνου συγκριτικά με την χαμηλή συγκέντρωση στην τελευταία δειγματοληψία.

Ουσιαστικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ της χαμηλότερης και της υψηλότερης συγκέντρωσης οξυγόνου και στις τρεις δειγματοληψίες.

Στην δεύτερη δειγματοληψία, στις 9 εβδομάδες, απουσιάζει το *Vibrio harveyi* από την χλωρίδα των ψαριών της συγκέντρωσης οξυγόνου 3 (υψηλό οξυγόνο). Η μείωση του οξυγόνου που ακολούθησε στις δύο ακραίες ομάδες των λαβρακιών είχε σαν αποτέλεσμα 1) να αυξηθεί η συχνότητα εμφάνισης του *V.harveyi* στην εντερική χλωρίδα τους στην χαμηλή συγκέντρωση του οξυγόνου και 2) να επανεμφανισθεί το βακτήριο αυτό, σε μικρό ποσοστό βέβαια, στη χλωρίδα των ψαριών της υψηλότερης συγκέντρωσης του οξυγόνου (η συγκέντρωση του οξυγόνου σε αυτήν την ομάδα ψαριών μειώθηκε από $8,2 \pm 0,2$ ppm σε $6,7 \pm 0,2$ ppm).

Φαίνεται ότι, σε συνθήκες ελαφριάς υπεροξυγόνωσης δεν ευνοείται ο αποικισμός της εντερικής χλωρίδας από το *Vibrio harveyi*.

3.2. Πείραμα 2°.

Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων οξυγόνου στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα και την υγεία των λαβρακιών κάτω από συνθήκες οξείας καταπόνησης με ταυτόχρονη ή μη αλλαγή περιβάλλοντος (δεξαμενής).

3.2.1. Σκοπός

Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν ναδειχθεί το εάν οι διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου, κατά την διάρκεια της εκτροφής, επηρεάζουν την υγεία των λαβρακιών κάτω από συνθήκες οξείας καταπόνησης, λόγω συλλογής και μεταφοράς. Επίσης να

διευκρινισθεί ταυτόχρονα και ο ρόλος της αλλαγής περιβάλλοντος στα λαβράκια, ως επιβαρυντικός παράγοντας καταπόνησης.

3.2.2. Υλικά και μέθοδοι

Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του ΕΛΚΕΘΕ σε κλειστό χώρο, καλοκαιρινούς μήνες. Χρησιμοποιήθηκαν λαβράκια, μέσου βάρους 110 g, τα οποία αρχικά εγκλιματίστηκαν σε χερσαίες δεξαμενές για 5 ημέρες και στην συνέχεια χωρίστηκαν σε 3 διαφορετικές ομάδες, ανάλογα με τις συγκεντρώσεις του οξυγόνου. Χρησιμοποιήθηκαν 6 κυλινδροκωνικές δεξαμενές 600 L η κάθε μία. Κάθε ομάδα είχε 2 επαναλήψεις.

Οι συγκεντρώσεις του οξυγόνου διαμορφώθηκαν ως εξής: 2,2 ppm, 3,5 ppm και 7 ppm. Οι πρώτες δύο συγκεντρώσεις του οξυγόνου ήταν υποξικές. Η τελευταία ήταν η κανονική συγκέντρωση.

Η ροή είχε διαμορφωθεί σε όλες τις συγκεντρώσεις ώστε να είναι 30 L/ kg/ h. Η ρύθμιση της ροής του νερού γινόταν χειροκίνητα για κάθε δεξαμενή χωριστά και ελεγχόταν πολλές φορές σε καθημερινή βάση. Το νερό παροχής των δεξαμενών αυτών προερχόταν από την θάλασσα της περιοχής του Αγίου Κοσμά μέσω αντλιών, αφού πρώτα καθαριζόταν με πέρασμα από δεξαμενές καθίζησης και μηχανικό φίλτρο. Κατόπιν διαχωριζόταν σε κανάλια, ενώ παράλληλα γινόταν καταγραφή της πίεσης, πριν από το διαχωρισμό όσο και σε κάθε ένα από τα κανάλια αυτά, ώστε να διασφαλίζεται η καλή λειτουργία των αντλιών. Στη συνέχεια το νερό κάθε καναλιού διαχωριζόταν σε σωλήνες, καθένας από τους οποίους έφερε βαθμονομημένο μετρητή ροής και βάνο περιορισμού αυτής, μέσω της οποίας γινόταν και ο καθορισμός της ροής σε κάθε δεξαμενή. Η είσοδος του όγκου του νερού σε κάθε δεξαμενή ήταν ελεγχόμενη μέσω πλαστικού σωλήνα βυθισμένου, μέσα σε αυτή, φέροντας οπές σε όλο το μήκος του. Η είσοδος του νερού δηλαδή γινότανε από περισσότερα του ενός σημεία σε όλο το βάθος της και μαζί με την ύπαρξη

αποχέτευσης στο κάτω μέρος της δεξαμενής, είχε ως αποτέλεσμα, να δημιουργείται εντός της δεξαμενής μια στροβιλώδης κίνηση του νερού, γεγονός που είχε καλή επίδραση στην οξυγόνωση του εισερχόμενου νερού.

Αρχικά σε κάθε μία από τις 6 πειραματικές δεξαμενές τοποθετήθηκαν 58 άτομα. Τα ψάρια εγκλιματίστηκαν σε αυτές για 5 ημέρες υπό συνθήκες ροής νερού και οξυγόνου παρόμοιες με αυτές της καθαρής θάλασσας, δηλαδή ροή νερού περίπου 30 L/Kg/h και συγκέντρωση οξυγόνου περίπου 7 mg/L. Αμέσως μετά εφαρμόστηκαν οι τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του οξυγόνου ενώ η ροή δεν άλλαξε. Η μεταφορά του οξυγόνου και η διοχέτευσή του στο νερό γινόταν μέσω πλαστικού σωληναρίου που είχε στην άκρη του ειδική πέτρα για την παροχή λεπτών φυσαλίδων. Το σωληνάριο είχε τοποθετηθεί αμέσως μετά το σωλήνα εισόδου του νερού στη δεξαμενή, προς την πλευρά των οπών, για την καλλίτερη οξυγόνωση του εισερχόμενου νερού. Οι δεξαμενές των δύο πρώτων ομάδων με τη μικρότερη συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (2,2 mg/L και 3,5 mg/L) ήταν συνδεδεμένες με σύστημα ελέγχου και καταγραφής των περιβαλλοντικών παραμέτρων του νερού εκτροφής. Χρησιμοποιήθηκαν 4 ηλεκτρόδια οξυγόνου της Dryden Aqua. Τα ηλεκτρόδια κατέγραφαν συνεχώς τη συγκέντρωση του διαλυμένου στο νερό οξυγόνου, αλλά είχαν και τη δυνατότητα να την ελέγχουν και να την διορθώνουν όταν ήταν απαραίτητο. Δηλαδή επιλεγόταν η επιθυμητή συγκέντρωση οξυγόνου στον υπολογιστή και εάν κατά την συνεχή καταγραφή της συγκέντρωσης του οξυγόνου στο νερό, διαπιστωνόταν από το πρόγραμμα πτώση κατά 0,1 mg/L, δινόταν εντολή μέσω του προγράμματος να ανοίξουν ηλεκτροβάνες οι οποίες αύξαναν την ροή του παρεχόμενου οξυγόνου μέχρι να επανέλθει η συγκέντρωση του οξυγόνου στα επίπεδα που είχαν ορισθεί. Η ποσότητα του οξυγόνου που αναμιγνυόταν με το νερό, ρυθμιζότανε αρχικά μέσω των 3 ρυθμιστών παροχής και στη συνέχεια διορθωνόταν, εάν υπήρχε ανάγκη. Τα ηλεκτρόδια ανταποκρίνονταν χωρίς καμία απόκλιση στις πραγματικές τιμές οξυγόνου. Καθαρίζονταν ανά εβδομάδα και οι τιμές τους ελεγχόταν συχνά με την μέθοδο Winkler. Παράλληλα υπήρχε δυνατότητα ρύθμισης της

ανταπόκρισής τους μέσω κατάλληλου λογισμικού. Επιπλέον, πολλές φορές ημερησίως, γινόταν μέτρηση της συγκέντρωσης του διαλυμένου στο νερού οξυγόνου σε όλες τις δεξαμενές, με τη χρήση φορητού οξυγονομέτρου φωταύγειας της Hach Company με αισθητήρα IntelliCAL™ μεγάλης ακρίβειας. Οι τιμές που έδιδε συνέπιπταν με αυτές που έδιδε η μέθοδος Winkler. Τα ηλεκτρόδια τοποθετήθηκαν στις δεξαμενές με τις μικρότερες συγκεντρώσεις οξυγόνου και όχι σε εκείνες με τις κανονικές συγκεντρώσεις διότι κρίθηκε αναγκαίο να δοθεί προσοχή και περισσότερος έλεγχος και ευαισθησία στις μικρές συγκεντρώσεις που ήταν κρίσιμες για την επιβίωση των ψαριών, λόγω και της δυνατότητας της αυτόματης διόρθωσης. Στις δύο δεξαμενές με συγκέντρωση οξυγόνου 7mg/L (κανονικό οξυγόνο), η ρύθμιση της παροχής γινότανε χειροκίνητα μέσω των 3 ρυθμιστών και η συγκέντρωση του οξυγόνου ελεγχόταν με το φορητό οξυγονόμετρο και με την μέθοδο Winkler.

Οι τιμές της αμμωνίας (NH₃) κυμαίνονταν, κατά την διάρκεια της ημέρας, από 0,5-0,8 mg/L για την ομάδα με οξυγόνο 2,2 ppm, 0,3-0,7 mg/L για την ομάδα του κανονικού οξυγόνου ενώ η ομάδα του οξυγόνου 3,5 ppm είχε τιμές ενδιάμεσες και κοντά στις τιμές της ομάδας οξυγόνου 2,2 ppm.

Μετρήσεις θερμοκρασίας του νερού πραγματοποιούνταν καθημερινά, σε κάθε μία από τις πειραματικές δεξαμενές. Η θερμοκρασία κυμάνθηκε κατά την διάρκεια του πειράματος μεταξύ 26°C και 28°C. Οι δεξαμενές ήταν σκεπασμένες στο επάνω μέρος τους με μία κατασκευή από πλαστικό, εντός της οποίας είχε τοποθετηθεί ειδική λάμπα για την εξασφάλιση συγκεκριμένης φωτοπεριόδου (10 ώρες φωτός) ελεγχόμενης ηλεκτρονικά, μέσω υπολογιστή (Φωτογραφίες 3.2.2.1, 3.2.2.2.). Το άναμμα και το σβήσιμο των λαμπών γινόταν σταδιακά με ρυθμό 10% ανά λεπτό, προσπάθεια προσομοίωσης με την ανατολή και τη δύση του ηλίου στη φύση.

Στο πλαστικό κάλυμμα κάθε δεξαμενής, είχε διατηρηθεί πολύ μικρό άνοιγμα, απαραίτητο για την προσεκτική και με αργές κινήσεις ρίψη τροφής και τον διακριτικό έλεγχο των ψαριών. Τα ψάρια ταΐζονταν έως τον κορεσμό, σε δύο γεύματα

ημερησίως, με κοινή τροφή του εμπορίου (ΑΣΤΡΕΑ, EX4 Special bass). Η διατροφική αξία της χορηγούμενης τροφής, βάσει των προδιαγραφών του σιτηρεσίου ήταν: 48% ολικές αζωτούχες, 18% ολικά λίπη, 9.5% τέφρα, 1,2% ινώδεις ύλες, 10% υγρασία και 1,5% ολικό φώσφορο. Μετά από ένα μήνα εκτροφής ή αύξηση του βάρους των λαβρακιών είχε διαμορφωθεί ως εξής: 2,2 ppm -17, 5%, 3,5 ppm- 27,3% και 7 ppm-39,3%. Οι μειώσεις της αύξησης των λαβρακιών στις δύο χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, συγκριτικά με το μάρτυρα, οφειλόταν στην μείωση της κατανάλωσης τροφής από τα ψάρια των υποξικών συνθηκών (Thetmeyer et al., 1999). Δηλαδή τα λαβράκια προσαρμόσθηκαν στις συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης του οξυγόνου μειώνοντας τον μεταβολισμό τους. Η εκτροφή διήρκεσε 8 εβδομάδες στο τέλος των οποίων έγινε πειραματική εφαρμογή έντονης καταπόνησης. Στον Πίνακα 3.2.2.1. φαίνονται τα βάρη των ψαριών κάθε δεξαμενής και ομάδας όπως έχουν διαμορφωθεί πριν από την πειραματική οξεία καταπόνηση.

Πίνακας 3.2.2.1

Χαμηλό οξυγόνο 2,2ppm		Χαμηλό οξυγόνο, 3,5 ppm		Κανονικό οξυγόνο, 7 ppm		Δεξαμενές Μέσο βάρος (g)
Δεξ2B*	Δεξ.4B	Δεξ. 1B*	Δεξ.3B	Δεξ4A*	Δεξ.1A	
154,95	162,91	173,79	175,39	218,61	194,82	

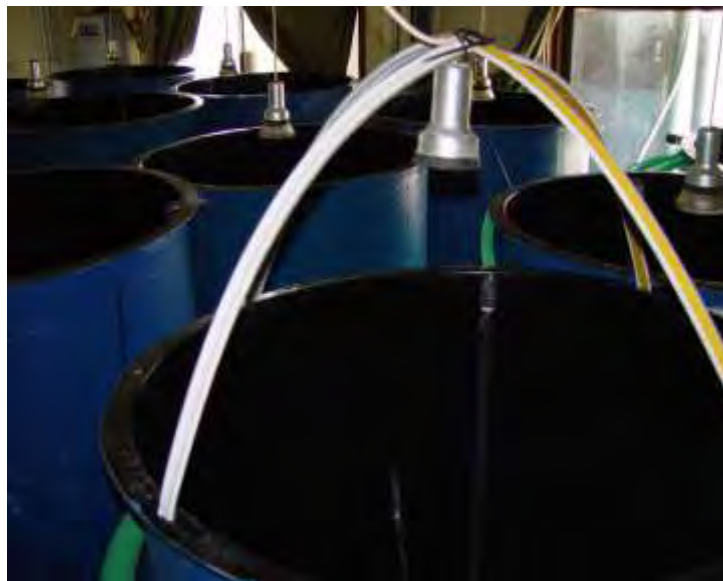
*Στις δεξαμενές που σημειώνονται με χρώμα έγινε καταπόνηση.

Λήφθηκαν 10 δείγματα εντέρου (5 από κάθε δεξαμενή) από τα λαβράκια κάθε μίας από τις δύο ακραίες ομάδες, της χαμηλότερης (2,2 ppm) και της κανονικής συγκέντρωσης του οξυγόνου και μελετήθηκε η ποιοτική και ποσοτική σύνθεση της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε ως εξής: Τα ψάρια συλλαμβάνονταν, αναισθητοποιούνταν σε νερό με φαινοξυαιθανόλη (1:1 σε αιθανόλη) συγκέντρωσης 0,8% και στη συνέχεια τους γίνονταν ευθανασία. Για τον έλεγχο της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, όπως

περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1.2.4. Η στατιστική επεξεργασία στα αποτελέσματα της συχνότητας εμφάνισης του *Vibrio harveyi* στην εντερική χλωρίδα έγινε με T test. Η στατιστική επεξεργασία, στα αποτελέσματα του ολικού αερόβιου βακτηριακού φορτίου στις 2 συγκεντρώσεις του οξυγόνου, έγινε με T test. Στη συνέχεια και αφού ο αριθμός των λαβρακιών ανά δεξαμενή ήταν 25, προκλήθηκε τεχνητά οξεία καταπόνηση σε μια δεξαμενή ανά ομάδα. Έγινε συλλογή με απόχη και μεταφορά των λαβρακιών σε μικρότερες δεξαμενές, παραμονή για πέντε λεπτά και στη συνέχεια επαναφορά των λαβρακιών 1) στις ίδιες δεξαμενές εκτροφής και 2) σε διαφορετικού τύπου δεξαμενές με κανονικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Η χρονική διάρκεια από τη συλλογή μέχρι την τοποθέτηση στις τελικές δεξαμενές ήταν περίπου 20 λεπτά της ώρας ανά δεξαμενή. Στις δεξαμενές με τα λαβράκια από την χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου 2,2 ppm με ταυτόχρονη αλλαγή δεξαμενής εμφανίστηκε θνησιμότητα μέσα σε λίγες ώρες από την καταπόνηση. Στις υπόλοιπες δεξαμενές, τρεις ημέρες μετά την καταπόνηση, εμφανίσθηκαν στα λαβράκια συμπτώματα τυπικά προσβολής από δονάκιο (πληγές στο σώμα, μικρές αιμορραγίες) και θνησιμότητες. Σε όλα τα ασθενή ψάρια γίνονταν μικροβιολογικές εξετάσεις για απομόνωση και ταυτοποίηση του υπεύθυνου παθογόνου. Παράλληλα υπήρχαν και δεξαμενές αρνητικών μαρτύρων, οι οποίοι δεν εξετάθηκαν σε χειρισμούς οξείας καταπόνησης. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της οξείας καταπόνησης με ταυτόχρονη αλλαγή περιβάλλοντος έγινε με το πρόγραμμα SPSS GLM univariate nested.



Εικόνα 3.2.2.1: Εξωτερικό μέρος δεξαμενών



Εικόνα 3.2.2.2: Εσωτερικό μέρος δεξαμενών

3.2.3. Αποτελέσματα

Οι χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου έγιναν ανεκτές από τα λαβράκια. Τα λαβράκια προσαρμόστηκαν στις χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Η συγκέντρωση της αμμωνίας ήταν μικρή σε όλες τις περιπτώσεις. Δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα κατά την διάρκεια της εκτροφής και πριν από την πειραματική πρόκληση καταπόνησης.

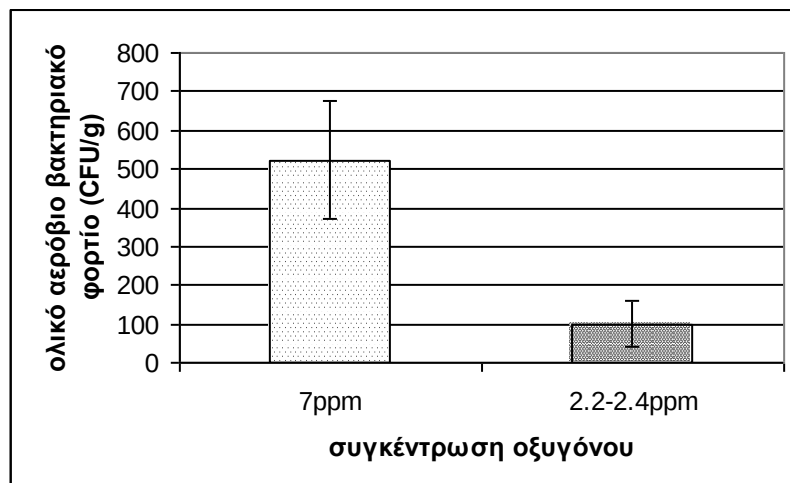
Στον πίνακα 3.2.3.1 παρουσιάζεται η ποιοτική ανάλυση της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας των λαβρακιών των δύο ομάδων του πειράματος πριν από την πειραματική εφαρμογή οξείας καταπόνησης. *Vibrio harveyi* και *Vibrio costicola* ήταν τα βακτηριακά είδη που βρέθηκαν στις δύο ομάδες. Παρατηρείται μια διαφοροποίηση στην εντερική μικροχλωρίδα των ψαριών μεταξύ των δυο ομάδων ως προς την συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων βακτηριακών ειδών. Τα λαβράκια του κανονικού οξυγόνου εμφανίζουν την μεγαλύτερη συχνότητα στο βακτηριακό παθογόνο *Vibrio harveyi*.

Στο σχήμα 3.2.3.1. φαίνεται το ολικό αερόβιο βακτηριακό φορτίο της εντερικής χλωρίδας στο χαμηλό (2,2 ppm) και το κανονικό επίπεδο οξυγόνου (7 ppm). Το μέσο ολικό αερόβιο βακτηριακό φορτίο εντερικής μικροβιακής χλωρίδας σε CFU ήταν $523,5 \pm 153,08$ για την κανονική συγκέντρωση του οξυγόνου και $99,8 \pm 58,60$ για την χαμηλή συγκέντρωση του οξυγόνου. Παρατηρούμε ότι στο κανονικό επίπεδο οξυγόνου το βακτηριακό φορτίο είναι μεγαλύτερο κατά τουλάχιστον 5 φορές από ότι στο χαμηλό. Η στατιστική επεξεργασία με T test έδειξε ότι οι διαφορές στο ολικό αερόβιο βακτηριακό φορτίο της εντερικής χλωρίδας, ανάμεσα στις δύο συγκεντρώσεις του οξυγόνου, ήταν στατιστικά σημαντικές, με επίπεδο σημαντικότητας $P < 0.05$. Μεταξύ των δεξαμενών της ίδιας συγκέντρωσης οξυγόνου δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στον πίνακα 3.2.3.2. παρουσιάζεται το ποσοστό της θνησιμότητας ανά ημέρα καθώς και συγκεντρωτική μετά την πειραματική εφαρμογή οξείας καταπόνησης συλλογής, χειρισμών και μεταφοράς στις 3 ομάδες. Στον πίνακα αυτό παρατηρούμε ότι στην περίπτωση χειρισμών όπου μετά την οξεία καταπόνηση η επαναφορά των λαβρακιών γίνεται στις αρχικές δεξαμενές, η μεγαλύτερη συχνότητα θνησιμότητας 26,6% παρουσιάζεται στην κανονική συγκέντρωση οξυγόνου και όχι στη χαμηλή όπως θα αναμενόταν. Στη χαμηλότερη μάλιστα συγκέντρωση οξυγόνου έχουμε μηδενική θνησιμότητα. Στην περίπτωση όμως, όπου μετά τους ίδιους ακριβώς χειρισμούς οξείας καταπόνησης, η μεταφορά των λαβρακιών γίνεται σε διαφορετικές από τις αρχικές δεξαμενές, η

μεγαλύτερη θνησιμότητα εμφανίζεται στα λαβράκια της χαμηλότερης συγκέντρωσης οξυγόνου. Σε όλες τις ομάδες παρουσιάστηκε μεγαλύτερη θνησιμότητα όταν τα λαβράκια άλλαξαν δεξαμενή. Τα λαβράκια που εκτράφηκαν στη συγκέντρωση οξυγόνου 3,5 ppm εμφάνισαν και στις δύο περιπτώσεις μέτρια θνησιμότητα. Στις δεξαμενές με τα λαβράκια που προέρχονται από το χαμηλό οξυγόνο 2,2 ppm και υπέστησαν και αλλαγή στη δεξαμενή εμφανίστηκε θνησιμότητα μέσα σε λίγες ώρες την ίδια ημέρα της καταπόνησης. Από τον πρόνεφρο αυτών των ψαριών, που πέθαναν σε λίγες ώρες, δεν απομονώθηκε κάποιο βακτήριο αλλά από τον πρόνεφρο όλων των νεκρών /ετοιμοθάνατων λαβρακιών που πέθαναν τις επόμενες ημέρες απομονώθηκε το βακτήριο *Vibrio harveyi*. Στη στατιστική επεξεργασία του πειράματος της μεταφοράς των καταπονημένων ψαριών σε διαφορετικές δεξαμενές από τις αρχικές της εκτροφής φάνηκε ότι η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι στατιστικά σημαντικός παράγοντας, $P=0,049$. Μεταξύ των χαμηλών συγκεντρώσεων (2,2 και 3,5 ppm) οξυγόνου υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για τη θνησιμότητα αλλά δεν συμβαίνει το ίδιο με την θνησιμότητα στην κανονική συγκέντρωση.

Πίνακας 3.2.3.1. Βακτηριακά είδη της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας λαβρακιών που εκτράφηκαν κάτω από δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου, πριν από την εφαρμογή οξείας καταπόνησης (10 ψάρια/συγκέντρωση οξυγόνου).		
Δεξαμενές	Συχνότητα βακτηριακών ειδών απομονωμένων από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα	
Χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, 2.2 ppm	<i>Vibrio harveyi</i> 40% της βακτηριακής χλωρίδας ± 0	<i>Vibrio costicola</i> 60% της βακτηριακής χλωρίδας ± 0
Κανονική συγκέντρωση οξυγόνου, 7 ppm	<i>Vibrio harveyi</i> 80% της βακτηριακής χλωρίδας ± 0	<i>Vibrio costicola</i> 20% της βακτηριακής χλωρίδας ± 0

Η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι στατιστικά σημαντικός παράγοντας για την συχνότητα του *Vibrio harveyi* στην εντερική χλωρίδα με $P=0,014$ και για το *Vibrio costicola* $P=0,041$.



Σχήμα 3.2.3.1. Ολικό αερόβιο βακτηριακό φορτίο εντερικής μικροβιακής χλωρίδας λαβρακιών που εκτράφηκαν κάτω από διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου. $P<0,05$.

Πίνακας 3.2.3.2. Λαβράκια ημιθανή/ νεκρά μετά από πειραματική οξεία καταπόνηση.									
	Συγκέντρωση οξυγόνου								
	Μεταφορά στις ίδιες δεξαμενές			Μεταφορά σε διαφορετικές δεξαμενές με κανονική συγκέντρωση οξυγόνου					
	Χαμηλή συγκέντρωση 2,2 ppm 15 ψάρια 2B	Χαμηλή συγκέντρωση 3,5 ppm 15 ψάρια 1B	Κανονική συγκέντρωση 7 ppm 15 ψάρια 4A	Χαμηλή συγκέντρωση 2,2 ppm 10 ψάρια (5+5)	Χαμηλή συγκέντρωση 3,5 ppm 10 ψάρια (5+5)	Κανονική συγκέντρωση 7 ppm 10 ψάρια (5+5)			
				Δεξ.1	Δεξ.2	Δεξ.1	Δεξ.2	Δεξ.1	Δεξ.2
Καταπόνηση	0	0	0	1	1	0	0	0	0
1 ^η ημέρα	0	0	0	1*	1*	0	0	0	0
2 ^η ημέρα	0	0	0	1*	1*	0	0	0	0
3 ^η ημέρα	0	1*	2*	0	1*	1*	1*	1*	1*
4 ^η ημέρα	0	1*	1*	0	0	0	0	1*	1*
5 ^η .14 ^η ημέρα	0	0	1*	0	0	0	0	0	0
% προσβολή	0	13,3	26,6	60	80	20	20	40	40
% Μέση προσβολή**	0	13,3	26,6	70±14 b Tukey		20±0 a Tukey		40±0 ab Tukey	

*Από αυτά τα λαβράκια απομονώθηκε από τον πρόνεφρο *Vibrio harveyi*

**Μέση τιμή και τυπική απόκλιση , P<0,05.

a, b: υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά

ab: δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά

Στην εικόνα 3.2.3.1. φαίνεται λαβράκι προσβεβλημένο από το βακτήριο *Vibrio harveyi*.



Εικόνα 3.2.2.1.: Λαβράκι προσβεβλημένο μετά από καταπόνηση με *Vibrio harveyi*

3.2.4. Συμπεράσματα

Υπάρχει διαφοροποίηση στην εμφάνιση των βακτηριακών ειδών της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας των λαβρακιών στις διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου.

Η αύξηση του ολικού αερόβιου βακτηριακού φορτίου της μικροβιακής χλωρίδας των ψαριών στην κανονική συγκέντρωση οξυγόνου κατά 5 τουλάχιστον φορές, συγκριτικά με αυτήν στη χαμηλή συγκέντρωση, κατά πάσα πιθανότητα προκλήθηκε από την υψηλότερη κατανάλωση τροφής.

Η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης (80%) του βακτηρίου *Vibrio harveyi* στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών του κανονικού οξυγόνου φαίνεται να παίζει ρόλο στο μεγαλύτερο ποσοστό βακτηριακής προσβολής (26,6%) μετά από οξεία καταπόνηση στην περίπτωση της επαναφοράς των ψαριών στις αρχικές δεξαμενές εκτροφής. Το μεγαλύτερο ποσοστό βακτηριακής προσβολής στην κανονική συγκέντρωση οξυγόνου οφείλεται πιθανόν στο μεγαλύτερο βάρος των ψαριών αυτής της ομάδας, που υπέστησαν προφανώς μεγαλύτερη καταπόνηση στη διάρκεια των χειρισμών λόγω μεγαλύτερης ιχθυοπυκνότητας στη μικρή δεξαμενή. Η μεγάλη ιχθυοπυκνότητα κατά τη διάρκεια χειρισμών προκαλεί μεγαλύτερες απώλειες.

Η περαιτέρω καταπόνηση, λόγω αλλαγής περιβάλλοντος (δεξαμενής), προκάλεσε άμεσους θανάτους στα ψάρια της χαμηλότερης συγκέντρωσης οξυγόνου και αύξηση της μέσης βακτηριακής προσβολής των λαβρακιών σε όλες τις συγκεντρώσεις του οξυγόνου συγκριτικά με αυτήν που παρατηρήθηκε στην καταπόνηση λόγω συλλογής και μεταφοράς χωρίς αλλαγή περιβάλλοντος.

Δεν παρατηρήθηκε βακτηριακή προσβολή στα ετοιμοθάνατα λαβράκια του χαμηλού οξυγόνου (2.2 ppm) λίγες ώρες μετά την οξεία καταπόνηση και την αλλαγή δεξαμενής.

Από τα ιστολογικά δείγματα, δεν ήταν καθαρό εάν η δομή του εντέρου είχε υποστεί βλάβη λόγω της οξείας καταπόνησης.

3.3. Πείραμα 3^ο

Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων οξυγόνου και ροής νερού στην εντερική μικροχλωρίδα του λαβρακιού και στην υγεία των ψαριών κάτω από συνθήκες οξείας καταπόνησης.

3.3.1. Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν να μελετηθεί η, διάρκειας 3 μηνών, επίδραση διαφορετικών συνδυασμών ροής νερού και συγκέντρωσης οξυγόνου στην ποιοτική και ποσοτική σύσταση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας του λαβρακιού καθώς και στην υγεία του, κάτω από συνθήκες οξείας καταπόνησης.

3.3.2. Υλικά και μέθοδοι

Συνθήκες

Οι τεχνητές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν προσομοιάζουν με αυτές που μπορεί να δημιουργηθούν στις ιχθυοκαλλιέργειες.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε κλειστό χώρο και διήρκεσε 3 μήνες, από το μήνα Μάρτιο έως το μήνα Μάιο. Χρησιμοποιήθηκαν λαβράκια τα οποία αρχικά εγκλιματίσθηκαν σε χερσαίες δεξαμενές για 1 εβδομάδα και μοιράσθηκαν σε 2 ομάδες από 3 κυλινδροκωνικές δεξαμενές όγκου 600 L για την κάθε ομάδα, όπως και στο προηγούμενο πείραμα. Κάθε ομάδα ήταν συνδεδεμένη με σύστημα καταγραφής των περιβαλλοντικών παραμέτρων του νερού εκτροφής, συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Οι δεξαμενές ήταν ίδιες με αυτές των προηγούμενων πειραμάτων 3.1 και 3.2. Στο πείραμα 3.2 οι περιβαλλοντικές παράμετροι ελέγχονταν εν μέρει από πρόγραμμα συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή, στο πείραμα 3.3. δεν ελέγχονταν (με την έννοια της διόρθωσης), αλλά μόνο καταγράφονταν από αυτό. Το νερό έφθανε στις πειραματικές δεξαμενές από τη θάλασσα με τρόπο ίδιο με εκείνο του πειράματος 3.2. (αντλίες, δεξαμενές καθίζησης, μηχανικά φίλτρα, διαχωρισμός σε κανάλια με παράλληλη καταγραφή της πίεσης και κατόπιν σε σωλήνες με βαθμονομημένα ροόμετρα για τον καθορισμό της ροής σε κάθε δεξαμενή, είσοδος σε αυτή από σωλήνα με σπές).

Το σύστημα καταγραφής περιελάμβανε, εκτός από τους μετρητές πίεσης που περιγράφηκαν στο πείραμα 3.2.(που βρίσκονταν πριν και μετά το διαχωρισμό του νερού σε κανάλια) και 2 ηλεκτρόδια οξυγόνου, της Dryden Aqua, καθένα από τα οποία ήταν τοποθετημένο σε μία δεξαμενή (ανά τριάδα δεξαμενών). Το κάθε ηλεκτρόδιο είχε κατάλληλο μήκος ώστε ήταν δυνατή η τοποθέτησή του σε οποιαδήποτε από τις 3 δεξαμενές της τριάδας. Τα ηλεκτρόδια αυτά κατέγραφαν συνεχώς τη συγκέντρωση του οξυγόνου, ενώ υπήρχε η δυνατότητα καθαρισμού τους αλλά και τυχόν διόρθωσης της ένδειξής τους μέσω κατάλληλου λογισμικού. Η παροχή νερού μοιραζόταν σε 2 κανάλια αλλά και η παροχή οξυγόνου, αρχικά, μοιραζόταν και αυτή σε 2 κανάλια. Η εν λόγω παροχή ρυθμιζόταν, σε πρώτο επίπεδο, για κάθε τριάδα δεξαμενών από έναν κοινό και για τις τρεις τους ρυθμιστή ροής. Ακολουθούσε ρύθμιση της παροχής κάθε καναλιού σε δεύτερο επίπεδο, για

κάθε μία από τις 3 δεξαμενές του χωριστά, από έναν δεύτερο ρυθμιστή ροής και σε τρίτο επίπεδο, πριν την τελική διοχέτευσή του στο νερό, από έναν τρίτο ρυθμιστή. Η μεταφορά του οξυγόνου και η διοχέτευση του στο νερό γινόταν με σωληνίσκο ίδιου τύπου με εκείνον του 3.2 που τοποθετούνταν και πάλι, αμέσως μετά το σωλήνα εισόδου του νερού στη δεξαμενή, προς την πλευρά των οπών, για την καλλίτερη οξυγόνωση του εισερχόμενου νερού. Η αρχική δυνατότητα ρύθμισης της παροχής οξυγόνου ανά τριάδα, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα, μέσω της χρήσης των άλλων δύο ρυθμιστών, μικρορύθμισης της παροχής σε κάθε μία από τις 3 δεξαμενές χωριστά, επέτρεπε την ευχερέστερη ρύθμιση της συγκέντρωσης του οξυγόνου κάθε δεξαμενής, ώστε να φθάνει στο επιθυμητό, ίδιο και για τις 3 δεξαμενές κάθε τριάδας, επίπεδο. Οι ενδείξεις των μετρητών πίεσης του νερού και αυτές των ηλεκτροδίων μέτρησης του οξυγόνου, πέρα από τη συνεχή καταγραφή τους, αποθηκεύονταν συναρτήσει του χρόνου, σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, με συχνότητα 30 λεπτών. Η ροή του νερού ρυθμιζόταν χειροκίνητα σε κάθε δεξαμενή χωριστά και ελεγχόταν καθημερινά πολλές φορές.

Επιπλέον, εκτός από τον συνεχή έλεγχο των ενδείξεων των 2 ηλεκτροδίων, πολλές φορές ημερησίως, γινόταν μέτρηση της συγκέντρωσης του οξυγόνου, σε όλες τις δεξαμενές, με την χρήση φορητού οξυγονομέτρου μεμβράνης, Oxi330i με αισθητήρα CellOx325 της WTN. Παράλληλα, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ταυτόχρονα με τις μετρήσεις αυτές, λαμβάνονταν δείγματα νερού από τις δεξαμενές και ελέγχονταν για τη συγκέντρωσή τους σε οξυγόνο με τη μέθοδο Winkler, η οποία δίνει πάντοτε αξιόπιστα αποτελέσματα. Έτσι, βάσει των αποτελεσμάτων αυτών γινόταν αφενός διόρθωση, μέσω λογισμικού, των ενδείξεων των ηλεκτροδίων και αφετέρου, έλεγχος των λαμβανομένων μετρήσεων του φορητού οξυγονομέτρου. Στο εσωτερικό κάθε δεξαμενής, από την αρχή του πειράματος είχαν προσαρμοσθεί θερμαντικά σώματα VTX300 VISITHERM 300W 220V, ανάλογα με την ροή του νερού, με τα οποία ρυθμιζόταν η επιθυμητή, εντός των δεξαμενών, θερμοκρασία. Καθημερινά, γινόταν έλεγχος της θερμοκρασίας των δεξαμενών, με ξεχωριστή

μέτρηση σε κάθε μία από αυτές. Η θερμοκρασία του νερού κυμαινόταν κατά τη διάρκεια της ημέρας μεταξύ 18,5-20°C. Οι δεξαμενές ήταν σκεπασμένες στο επάνω μέρος τους, με κατασκευή από πλαστικό, εντός της οποίας η ειδική λάμπα εξασφάλιζε συγκεκριμένη φωτοπερίοδο, 8 ωρών φωτός και 16 ωρών σκοταδιού, σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, μέσω ηλεκτρονικής ρύθμισης, με σταδιακό άναμμα και σβήσιμο των λαμπών. Σε όλη την διάρκεια του πειράματος εκτροφής είχε ληφθεί μέριμνα για την αποφυγή οποιασδήποτε ενόχλησης στα ψάρια. Η αυξομείωση στην συγκέντρωση της αμμωνίας, κατά την διάρκεια της ημέρας, κυμαινόταν από 0,6-0,8 mg/L για τις υποβαθμισμένες συνθήκες και από 0,4-0,6 mg/L για τις καλές συνθήκες. Οι τιμές των νιτρικών αλάτων κυμάνθηκαν από 6-13 $\mu\text{g-at N/L}$ για τις υποβαθμισμένες συνθήκες και από 2-5 $\mu\text{g-at N/L}$ για τις καλές συνθήκες. Γενικά, όσο πιο επιβαρυνμένες ήταν οι συνθήκες ροής νερού και συγκέντρωσης οξυγόνου στις δεξαμενές, τόσο μεγαλύτερες ήταν οι συγκεντρώσεις της αμμωνίας και των νιτρικών αλάτων.

Ψάρια και εκτροφή

Σε κάθε μία από τις 6 πειραματικές δεξαμενές τοποθετήθηκαν 50 λαβράκια, μέσου βάρους 185 g. Η ομάδα μάρτυρας είχε υψηλή ροή και κανονικό οξυγόνο ενώ η ομάδα ελέγχου είχε μικρή ροή και χαμηλό οξυγόνο σύμφωνα με τον Πίνακα 3.3.2.1

Πίνακας 3.3.2.1.: Συνθήκες ροής και συγκέντρωσης οξυγόνου στις πειραματικές δεξαμενές.						
Συνθήκες	Χαμηλή ροή χαμηλό οξυγόνο (Υποβαθμισμένες συνθήκες)			Καλές συνθήκες – (Μάρτυρας)		
Δεξαμενές	1Α	1Β	1Γ	2Α	2Β	2Γ
Ροή (L/kg/h)	16			30		
Ροή (L/h)	144			270		
O ₂ (mg/L)	3			7-9		

Πολλές φορές καθημερινά, όπως έχει ήδη αναφερθεί, γινόταν έλεγχος τόσο των ροών όσο και της συγκέντρωσης οξυγόνου και γίνονταν οι απαραίτητες μικροδιορθώσεις όπου χρειαζόνταν. Τα ψάρια ταΐζονταν έως τον κορεσμό, σε δύο γεύματα ημερησίως, με κοινή τροφή του εμπορίου (Biomar, Ecolife 64). Η διατροφική αξία της συγκεκριμένης σύνθεσης, βάσει των προδιαγραφών του σιτηρεσίου, διαμορφώνονταν ως εξής: 44% ολικές πρωτεΐνες, 20% ολικά λίπη, 3,5% κυτταρίνη, 8% τέφρα και 1,5% φώσφορο.

Κατά την τρίμηνη διάρκεια του πειράματος διενεργήθηκαν συνολικά 3 δειγματοληψίες, μία στο τέλος κάθε μήνα για τις ανάγκες πειραμάτων που δεν είναι αντικείμενο αυτής της διατριβής. Για τις ανάγκες αυτής της διατριβής πάρθηκαν δείγματα από την τρίτη δειγματοληψία, στο τέλος των 3 μηνών. Συγκεκριμένα συλλέχθηκαν δείγματα από 6 ψάρια ανά δεξαμενή. Τα ψάρια συλλέγονταν και αναισθητοποιούνταν σε νερό όπως στο πείραμα 3.2.

Ακολούθησε η ανάλυση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε και σε προηγούμενα πειράματα με την διαφορά ότι το περιεχόμενο του εντέρου μεταφέρθηκε με εξώθηση μόνο χωρίς απόξεση. Έτσι η εντερική μικροβιακή χλωρίδα αναφέρεται μόνο σε πληθυσμούς βακτηρίων προσωρινών (transient). Η στατιστική επεξεργασία, στα αποτελέσματα του ολικού αερόβιου βακτηριακού φορτίου στις 2 συνθήκες οξυγόνου – ροής καθώς και στην ποιοτική σύνθεση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας σε ορισμένα βακτηριακά είδη στις υποβαθμισμένες και στις καλές συνθήκες, έγινε με T test.

Στο τέλος του πειράματος, και αφού λαβράκια από τις 3 δεξαμενές κάθε ομάδας τοποθετήθηκαν σε 2 δεξαμενές ανά ομάδα (20 ψάρια ανά δεξαμενή), έγινε πειραματική οξεία καταπόνηση και στις 2 δεξαμενές κάθε ομάδας, με τη μορφή έντονου χειρισμού συλλογής και μεταφοράς σε μικρές δεξαμενές των 10 λίτρων για 5 λεπτά χωρίς αερισμό και ανανέωση νερού και κατόπιν επιστροφή στις αρχικές δεξαμενές. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε ομάδα μάρτυρας (με τα υπόλοιπα λαβράκια του πειράματος της εκτροφής, 2 δεξαμενές με 20 λαβράκια/ δεξαμενή) που δεν

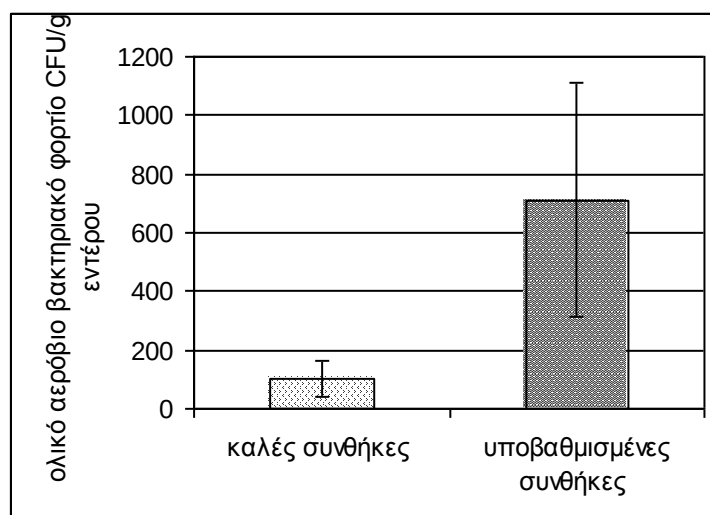
υπέστησαν οξεία καταπόνηση. Γινόταν έλεγχος για θνησιμότητα και μικροβιολογικές εξετάσεις στα νεκρά/ ημιθανή ψάρια κάθε ημέρα για 10 ημέρες σε όλες τις δεξαμενές. Πριν την οξεία καταπόνηση τα μέσα βάρη των ψαριών ανά δεξαμενή και ομάδα είχαν διαμορφωθεί όπως φαίνονται στον Πίνακα 3.3.2.2. Με T test έγινε και η στατιστική επεξεργασία στα αποτελέσματα της θνησιμότητας μετά από οξεία καταπόνηση.

Πίνακας 3.3.2.2. Μέσο βάρος ψαριών και ροές στο πείραμα.

Υποβαθμισμένες συνθήκες οξυγόνου-ροής				Καλές συνθήκες οξυγόνου-ροής			
	Δεξ.1Α		Δεξ.1Β		Δεξ.2Α		Δεξ.2Β
Μέσο βάρος	210,66		223,57889		213,07818		222,44682
Ροές L/kg/h	16				30		

3.3.3. Αποτελέσματα

Τα λαβράκια προσαρμόστηκαν στις συνθήκες χαμηλής ροής- χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου (3mg/L) επί τρίμηνο χωρίς να εμφανιστούν θάνατοι. Το τελικό βάρος των ψαριών μεταξύ των δύο ομάδων δεν διαφοροποιήθηκε σημαντικά (Πίνακας 3.3.2.2.). Η συγκέντρωση αμμωνίας στο νερό εκτροφής ήταν σε ανεκτά επίπεδα. Ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές παρατηρήθηκαν στο βακτηριακό φορτίο της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας μεταξύ των δύο εξεταζόμενων ομάδων. Η ομάδα των λαβρακιών με τις υποβαθμισμένες συνθήκες ροής-οξυγόνου έδειξε υψηλότερες τιμές βακτηριακού φορτίου στο έντερο. Η μέση τιμή του βακτηριακού φορτίου σε αυτήν την ομάδα ήταν 712,5 CFU/g περιεχομένου και ιστού εντέρου ενώ το αντίστοιχο φορτίο στην ομάδα μάρτυρα με την υψηλή ροή και το κανονικό οξυγόνο ήταν 101,41 CFU/g εντερικού ιστού (Σχήμα 3.2.3.1). Οι τυπικές αποκλίσεις ήταν μεγάλες, 396,65 για την ομάδα με τις υποβαθμισμένες συνθήκες και 60,86 για την ομάδα με τις καλές συνθήκες. Οι διαφορές στο ολικό αερόβιο βακτηριακό αερόβιο φορτίο της εντερικής χλωρίδας ήταν στατιστικά σημαντικές ($P<0,05$).



Σχήμα 3.3.3.1. Ολικό αερόβιο βακτηριακό αερόβιο φορτίο προσωρινής (transient) εντερικής μικροβιακής χλωρίδας σε καλές συνθήκες ροής νερού-οξυγόνου και σε υποβαθμισμένες συνθήκες ροής νερού και οξυγόνου.

Η ποιοτική εικόνα της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας του λαβρακιού μεταξύ των δύο ομάδων ήταν ελαφρά διαφορετική (Πίνακες 3.3.3.2, 3.3.3.2.α). Και στις δύο ομάδες το γένος *Pseudomonas* κυριαρχεί λόγω της εποχής. Κάποια βακτηριακά είδη, όπως το *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* και το *Vibrio aestuarinus* εμφανίζονται στην ομάδα των λαβρακιών στις υποβαθμισμένες συνθήκες αλλά δεν ανιχνεύεται στην άλλη ομάδα με τις καλές συνθήκες. Το *Vibrio splendidus* εμφανίζεται μόνο στην ομάδα με τις καλές συνθήκες. Οι διαφορές που εμφανίζονται, μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών οξυγόνου και ροής νερού, στα 3 αυτά βακτηριακά είδη είναι στατιστικά σημαντικές για $P < 0,05$.

Ύστερα από χειρισμό οξείας καταπόνησης, 4 λαβράκια από τη δεξαμενή 1A (20%) και 3 (15%) από την 1B της ομάδας με τις υποβαθμισμένες συνθήκες (Πίνακας 3.3.3.2) πέθαναν μέσα στις πρώτες ώρες. Οι μικροβιολογικές εξετάσεις ήταν αρνητικές. Δεν εμφανίσθηκε θνησιμότητα στις δεξαμενές της ομάδας με τις καλές συνθήκες, όπως και στους αρνητικούς μάρτυρες. Οι παρατηρούμενες διαφορές στην θνησιμότητα είναι στατιστικά σημαντικές ($P < 0,05$).

Πίνακας 3.3.3.1. Προσωρινά (transient) βακτηριακά είδη της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας των λαβρακιών κάτω από υποβαθμισμένες και καλές συνθήκες ροής νερού-οξυγόνου.				
	Υποβαθμισμένες συνθήκες ροής νερού και οξυγόνου			
	Δεξαμενή 1Α	Δεξαμενή 1Β	Δεξαμενή 1Γ	
Βακτηριδιακά είδη	Αριθμός ψαριών στα οποία βρέθηκαν τα συγκεκριμένα βακτηριακά είδη (6 ψάρια /δεξαμενή)			Μέσος όρος± τυπική απόκλιση
<i>Pseudomonas</i> spp.	4	4	4	4±0
Gram θετικοί βάκιλλοι	3	1	2	2±1
<i>Vibrio</i> spp.	2	1	1	1,33±0,57
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0	1	1	0,66±0,57
<i>Vibrio aestuarius</i>	2	1	0	1±1
<i>Photobacterium damsela</i> ssp. <i>damsela</i>	1	0	2	1±1
	Καλές συνθήκες ροής νερού και οξυγόνου			
	Δεξαμενή 2Α	Δεξαμενή 2Β	Δεξαμενή 2Γ	
Βακτηριδιακά είδη	Αριθμός ψαριών στα οποία βρέθηκαν τα συγκεκριμένα βακτηριακά είδη (6 ψάρια /δεξαμενή)			Μέσος όρος± τυπική απόκλιση
<i>Pseudomonas</i> spp.	4	4	4	4±0
Gram θετικοί βάκιλλοι	2	0	0	0,66±1,15
<i>Vibrio</i> spp.	1	2	1	1,33±0,57
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	2	1	1,33±0,57
<i>Vibrio splendidus</i>	2	1	2	1,66±0,57
<i>Vibrio aestuarius</i>	0	0	0	0±0
<i>Photobacterium damsela</i> ssp. <i>damsela</i>	0	0	0	0±0

Πίνακας 3.3.3.1.α. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του Πίνακα 3.3.3.1.			
Υποβαθμισμένες συνθήκες ροής νερού και οξυγόνου		Καλές συνθήκες ροής νερού και οξυγόνου	
Βακτηριδιακά είδη	Μέσος όρος± τυπική απόκλιση	Βακτηριδιακά είδη	Μέσος όρος± τυπική απόκλιση
<i>Pseudomonas</i> spp.	4±0	<i>Pseudomonas</i> spp.	4±0
Gram θετικοί βάκιλλοι	2±1	Gram θετικοί βάκιλλοι	0,66±1,15
<i>Vibrio</i> spp.	1,33±0,57	<i>Vibrio</i> spp.	1,33±0,57
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0,66±0,57	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1,33±0,57
<i>Vibrio splendidus</i>	0±0	<i>Vibrio splendidus</i>	1,66±0,57
<i>Vibrio aestuarinus</i>	1±1	<i>Vibrio aestuarinus</i>	0±0
<i>Photobacterium damsela</i> ssp. <i>damsela</i>	1±1	<i>Photobacterium damsela</i> ssp. <i>damsela</i>	0±0

Πίνακας 3.3.3.2. Νεκρά λαβράκια ύστερα από οξεία καταπόνηση κάτω από υποβαθμισμένες και καλές συνθήκες ροής νερού-οξυγόνου.					
Υποβαθμισμένες συνθήκες ροής νερού και οξυγόνου (20 λαβράκια/ δεξαμενή)		Καλές συνθήκες ροής νερού και οξυγόνου (20 λαβράκια/ δεξαμενή)		Ομάδα μάρτυρας (20 λαβράκια/ δεξαμενή)	
Δεξαμενή 1A	Δεξαμενή 1B	Δεξαμενή 2A	Δεξαμενή 2B	Δεξαμενή 3A	Δεξαμενή 3B
4 (θνησιμότητα 20%)	3 (θνησιμότητα 15%)	0	0	0	0
Μέσος όρος + τυπική απόκλιση: 3,5±0,5		Μέσος όρος + τυπική απόκλιση: 0±0		Μέσος όρος + τυπική απόκλιση: 0±0	

3.3.4. Συμπεράσματα.

Το βακτηριακό φορτίο της προσωρινής εντερικής μικροβιακής χλωρίδας του λαβρακιού επηρεάζεται και αυξάνεται 7 φορές λόγω των υποβαθμισμένων συνθηκών

της ποιότητας του νερού συγκριτικά με το αντίστοιχο φορτίο σε καλές συνθήκες νερού.

Η ποιότητα της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας επηρεάζεται επίσης από την ποιότητα του νερού.

Εμφανίστηκε άμεση θνησιμότητα μόνο στα λαβράκια που εκτρέφονταν κάτω από υποβαθμισμένες συνθήκες νερού, όταν υπέστησαν ένα χειρισμό οξείας καταπόνησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

**Επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης
στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα και την
υγεία της
τσιπούρας και το λαβρακιού**

4.1. Τσιπούρα

4.1.1. Πείραμα 1^ο.

Επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης, ως ασφαλούς διατροφικού συμπληρώματος, στην αύξηση του βάρους της τσιπούρας και στην βακτηριακή σύνθεση της χλωρίδας του εντέρου .

4.1.1.1. Σκοπός

Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν η μελέτη της επίδρασης του αιθέριου ελαίου ρίγανης στην αύξηση του βάρους της τσιπούρας αφενός και στην σύνθεση της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας ιχθυδίων τσιπούρας, καθώς επίσης και διερεύνηση της ασφάλειας του συγκεκριμένου αιθέριου ελαίου για το συγκεκριμένο είδος ψαριού, στη συγκεκριμένη δόση.

4.1.1.2. Υλικά και μέθοδοι

Το πείραμα έγινε κατά την καλοκαιρινή περίοδο, σε δεξαμενές με ανοικτό σύστημα κυκλοφορίας θαλασσινού νερού. Οι δεξαμενές τροφοδοτούνταν με θαλασσινό νερό αλατότητας 37‰. και θερμοκρασίας 25°C. Το νερό της κάθε δεξαμενής οξυγονωνόταν συνεχώς με τη βοήθεια ειδικών εξαρτημάτων που διάχεαν τον αέρα. Χρησιμοποιήθηκαν 450 ιχθύδια τσιπούρας, ανεμβολίαστα, τα οποία προήρχοντο από ιχθυομονάδα, βάρους 0,8 g. Μετά από εγκλιματισμό των ιχθυδίων επί 3 ημέρες, τα ψάρια χωρίστηκαν σε 3 ομάδες των τριών δεξαμενών και μοιράσθηκαν ισόποσα (50 ανά δεξαμενή) σε 9 αεριζόμενες δεξαμενές των 25 L η καθεμία (Εικόνες 4.1.1.2.1α και 1β).

Η χορήγηση των πειραματικών τροφών ξεκίνησε, ως εξής: η ομάδα Α λάμβανε εμπορική τροφή με αιθέριο έλαιο ρίγανης σε αναλογία 10 ml kg⁻¹ εμπορικής τροφής, ενώ οι ομάδες Β και Γ λάμβαναν την ίδια εμπορική τροφή χωρίς αιθέριο έλαιο ρίγανης. Για τις ανάγκες του πειράματος αυτού χρησιμοποιήθηκε το αιθέριο έλαιο ρίγανης, καθαρότητας 100%, του είδους *Oreganum vulgare* της εταιρίας

MEDICUM. Το αιθέριο έλαιο αραιωνόταν σε ιχθυέλαιο και αναμιγνυόταν επαρκώς με την τροφή. Το ποσόν του ιχθυελαίου που προστίθετο στην τροφή ήταν 1%. Τα ψάρια μάρτυρες τρέφονταν με την ίδια τροφή στην οποία είχε προστεθεί η ίδια ποσότητα ιχθυελαίου χωρίς όμως το αιθέριο έλαιο. Οι τροφές με το αιθέριο έλαιο παρασκευάζονταν κάθε δύο ημέρες και δίδονταν στα ψάρια με το χέρι.

Η τροφή δινόταν σε δύο γεύματα ημερησίως, σε ποσοστό 4% του σωματικού βάρους των ιχθυιδίων. Στην αρχή του πειράματος ζυγίστηκαν όλα τα ιχθυύδια των ομάδων 1 και 2. Μετά την συμπλήρωση 5 εβδομάδων εκτροφής όλα τα ιχθυύδια ζυγίστηκαν και έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Το Statgraphics Plus 3 χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των μετρήσεων και οι μέσες τιμές των βαρών συγκρίθηκαν με ανάλυση διακύμανσης one way (ANOVA), αφού προηγήθηκαν δοκιμές ομογένειας. Η δοκιμή Newman-Keuls χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση ομάδων που μπορεί να είναι στατιστικά διαφορετικές, όπου όταν η τιμή $p < 0.05$ θεωρείται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά και όταν η τιμή $p > 0.05$ δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

Μετά από 35 ημέρες εκτροφής, και από τις τρεις ομάδες ελήφθησαν 3 ψάρια ανά δεξαμενή (9 ανά δίαιτα) και λήφθηκαν δείγματα ιστών για ιστολογικές εξετάσεις σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται από τους Roberts and Snail, 2001.

Εξετάστηκαν τουλάχιστον δυο ιστολογικές τομές ανά δείγμα σε οπτικό μικροσκόπιο OLYMPUS Vanox-T AH-2 με φακούς PLAN. Οι φωτογραφίες τραβήχθηκαν με την ψηφιακή κάμερα Infinity 1 OLYMPUS U-PMTVC και επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Image Pro Plus v3.0.1.

Για την μελέτη της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας, 40 ημέρες από την έναρξη της διατροφής με αιθέριο έλαιο, λήφθηκαν δείγματα από το έντερο 5 ψαριών ανά δεξαμενή, από τις δίαιτες με αιθέριο έλαιο ρίγανης και τη δίαιτα μάρτυρα με ιχθυέλαιο, χωρίς αιθέριο έλαιο ρίγανης. Ελέγχθηκαν συνολικά 30 ιχθυύδια, δεκαπέντε από κάθε δίαιτα. Το έντερο αφαιρέθηκε με άσηπτες διαδικασίες, πλύθηκε εξωτερικά με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό 70%, και στη συνέχεια ανοίχθηκε και αποξέθηκε

με την βοήθεια αποστειρωμένων εργαλείων Τα δείγματα αραιώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό TSA (Tryptic Soya Agar) με την προσθήκη 2% NaCl και σε TCBS άγαρ στους 22⁰ C για 48-120 ώρες . Από όλα τα τρυβλία ταξινομήθηκαν όλες οι αποικίες κατά ομάδες, καθαρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν με βιοχημικές διαδικασίες όπως περιγράφεται στο δεύτερο κεφάλαιο αυτής της διατριβής.

Δεξαμενές εκτροφής πειράματος με τσιπούρες

Στις εικόνες 4.1.1.2.1^α και 1β φαίνονται οι πειραματικές δεξαμενές εκτροφής ανοικτής κυκλοφορίας θαλασσινού νερού.



Εικόνα 4.1.1.2.1α. : Πειραματικές δεξαμενές εκτροφής ανοικτής κυκλοφορίας θαλασσινού νερού



Εικόνα 4.1.1.2.1β. : Πειραματική δεξαμενή εκτροφής 25 λίτρων σε μεγέθυνση

4.1.1.3. Αποτελέσματα

Επίδραση στην αύξηση.

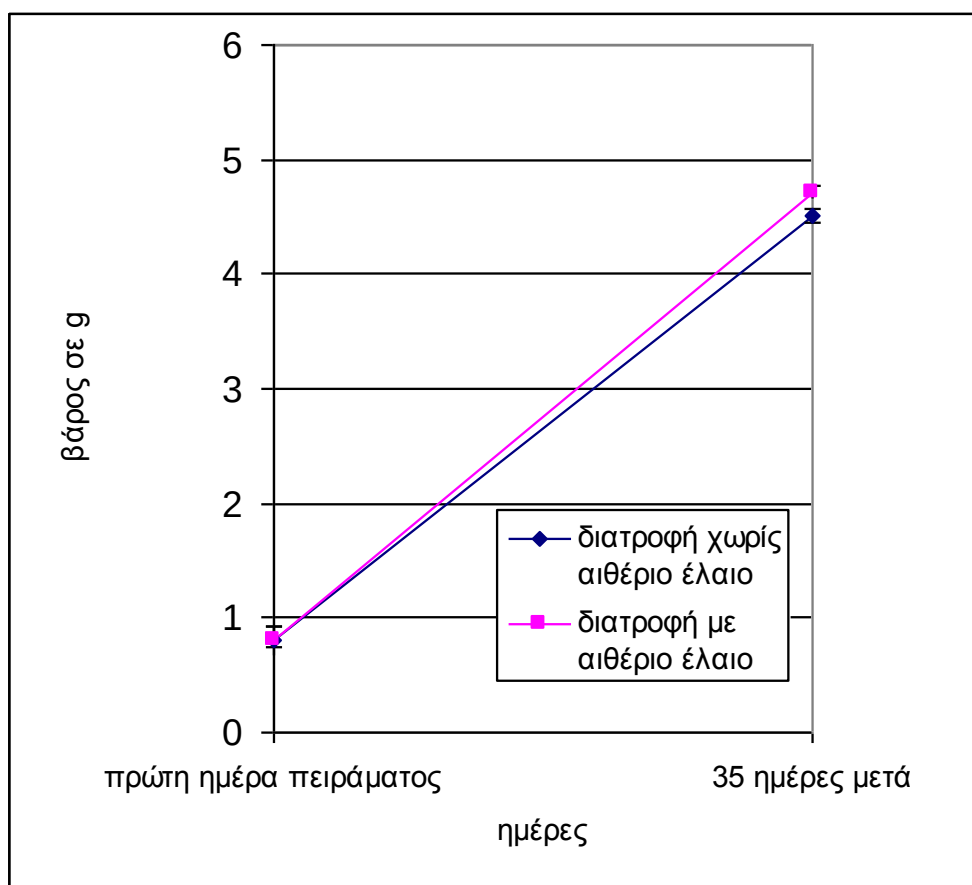
Μετά από εκτροφή 5 εβδομάδων μετρήθηκαν τα βάρη των ιχθυοδίων και από τις δύο ομάδες (διατροφή με αιθέριο έλαιο αραιωμένο σε ιχθυέλαιο και διατροφή χωρίς αιθέριο έλαιο αλλά με ιχθυέλαιο) και έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Στον Πίνακα 4.1.1.3.1. φαίνονται ο μέσος όρος βάρους των ψαριών (τσιπούρες) με ημερήσιο ποσοστό διατροφής 4% επί του βάρους τους, από 3 δεξαμενές με τροφή χωρίς αιθέριο έλαιο και 3 δεξαμενές με τροφή που περιέχει 1% αιθέριο έλαιο ρίγανης.

Πίνακας 4.1.1.3.1.

Μέσα βάρη τσιπούρας σε g που τράφηκε με τροφή χωρίς αιθέριο έλαιο ρίγανης και με τροφή που περιείχε 1% αιθέριο έλαιο ρίγανης.

	Διατροφή χωρίς αιθέριο έλαιο			Διατροφή με αιθέριο έλαιο		
Δεξαμενές	1	2	3	4	5	6
Μέσα βάρη ανά δεξαμενή μετά από 18 ημέρες εκτροφή	2,04	2,01	1,977	2,08	2,025	2,17
	2±0,03			2,09±0,07		
Μέσα βάρη ανά δεξαμενή μετά από 35 ημέρες εκτροφή	4,67	4,42	4,44	4,71	4,65	4,77
	4,51±0,13			4,71±0,06		

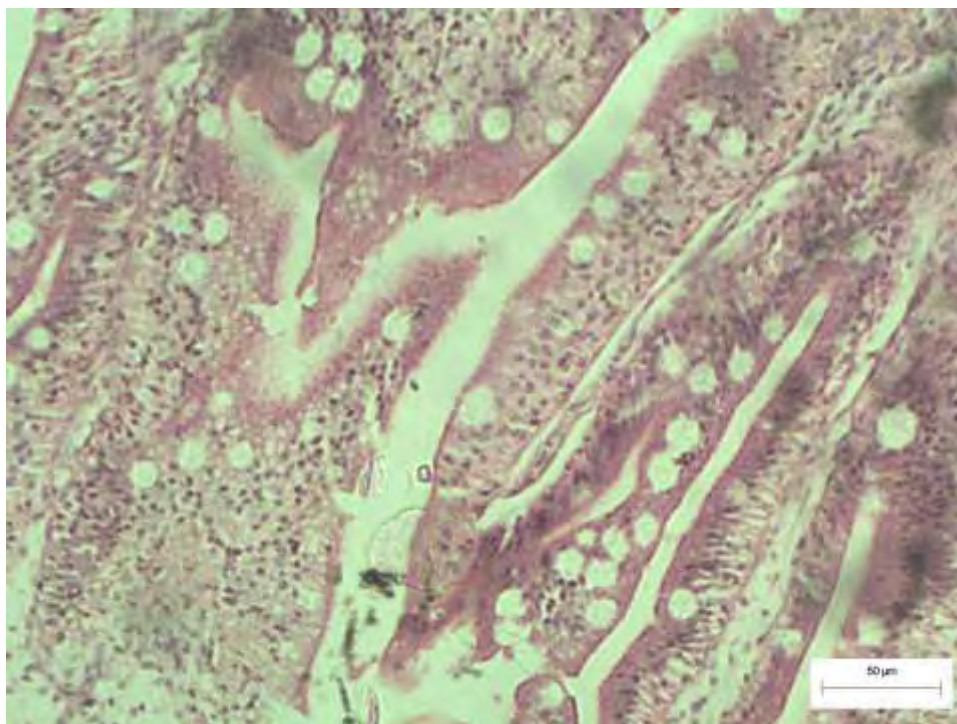
Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αύξηση του βάρους μεταξύ των δύο ομάδων. Στο σχήμα 4.1.1.3.1. φαίνεται το διάγραμμα αύξησης ιχθυδίων τσιπούρας, διάρκειας 35 ημερών, σε δύο ομάδες με και χωρίς χρήση αιθέριου ελαίου ρίγανης στην διατροφή.



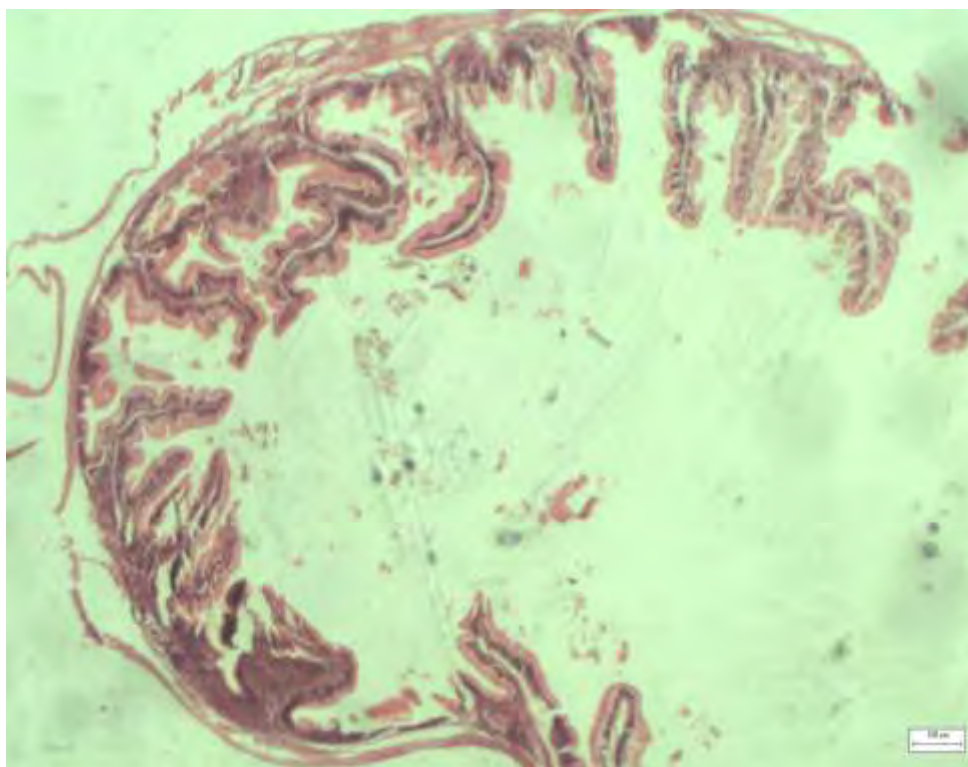
Σχήμα 4.1.1.3.1. : Διάγραμμα αύξησης του βάρους (σε g) ιχθυδίων τσιπούρας, για εκτροφή διάρκειας 35 ημερών, σε δύο ομάδες με και χωρίς χρήση αιθέριου ελαίου ρίγανης στην διατροφή.

Επίδραση στους ιστούς

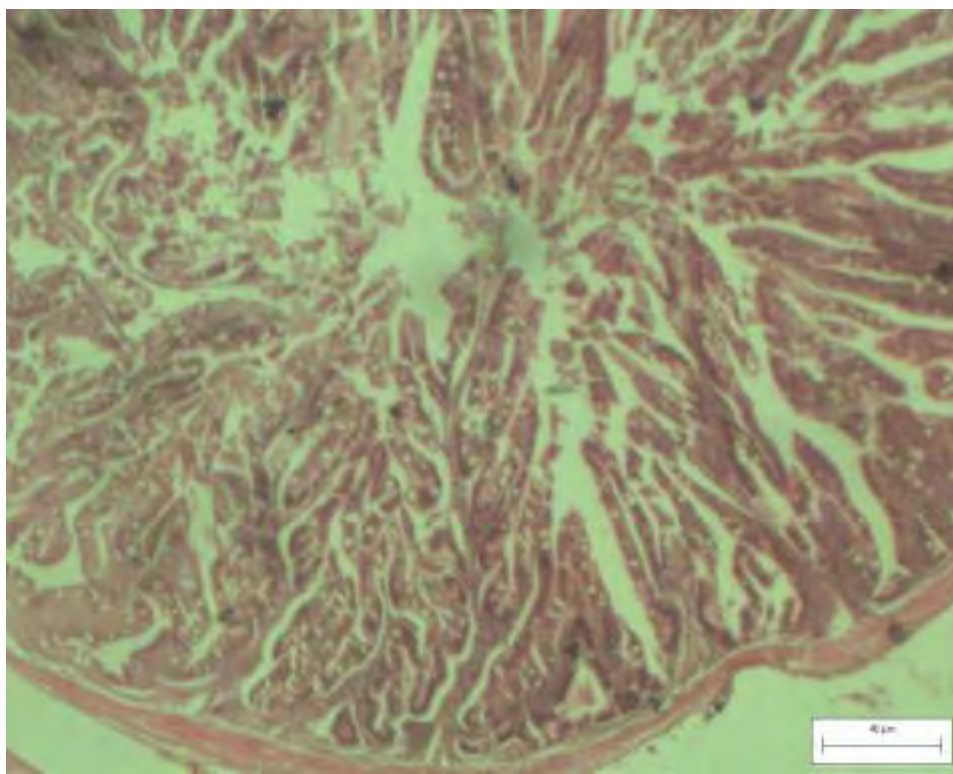
Μετά από εκτροφή 5 εβδομάδων έγιναν ιστολογικές εξετάσεις από τους ιστούς σε 3 ιχθύδια ανά δεξαμενή, από όλες τις δίαιτες. Μετά από μικροσκοπική παρατήρηση δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στους ιστούς μεταξύ των διαιτών. Επισυνάπτονται φωτογραφίες από ιστολογικές τομές (Εικόνες 4.1.1.3.1-4.1.1.3.6.).



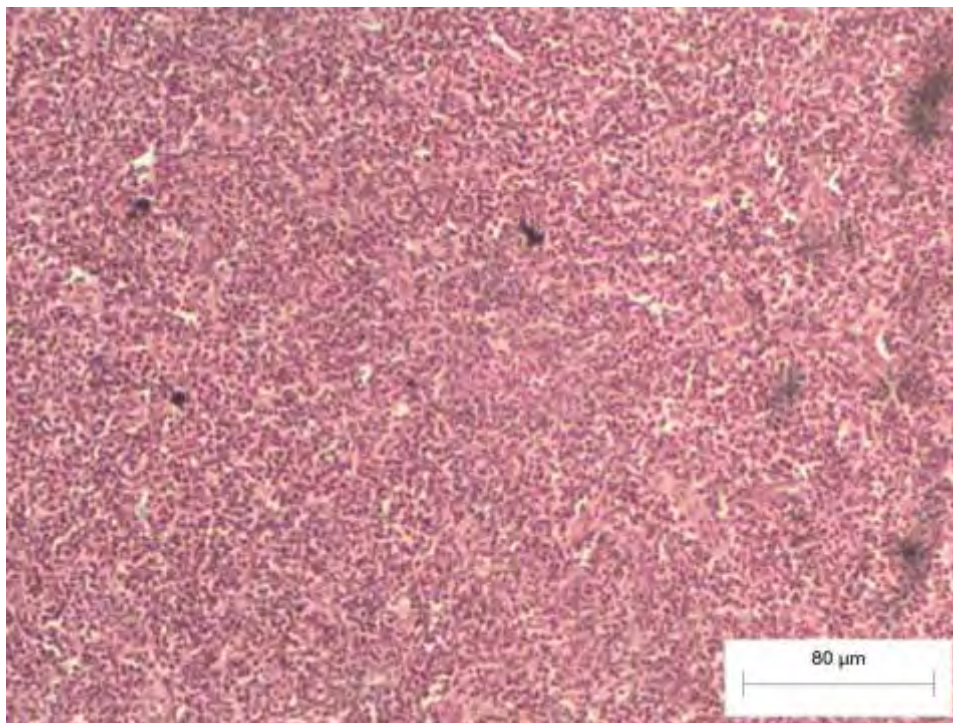
Εικόνα 4.1.1.3.1. Ιστολογική τομή εντέρου τσιπούρας μάρτυρα, H&E (μπάρα 50 μm).



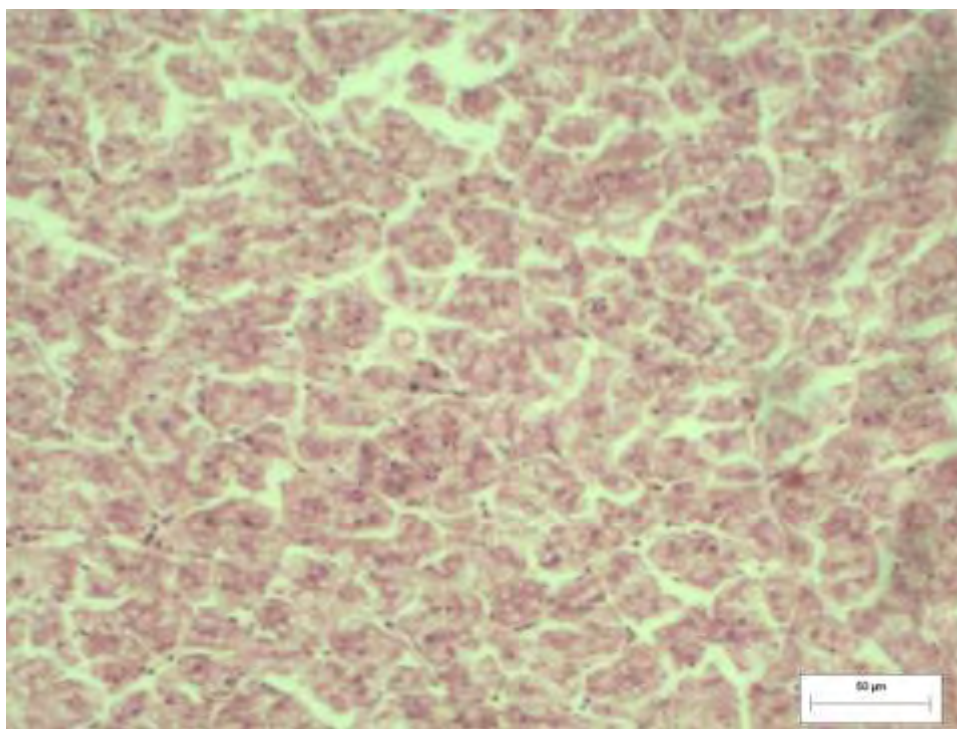
Εικόνα 4.1.1.3.2. Ιστολογική τομή εντέρου τσιπούρας μάρτυρα, H&E (μπάρα 100 μm).



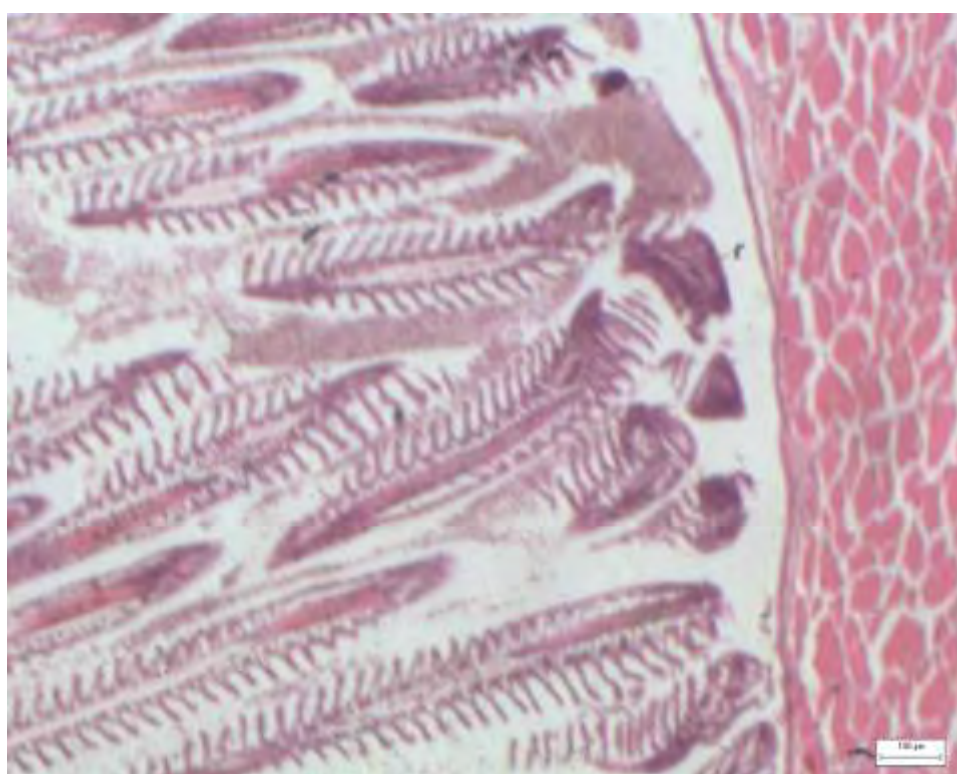
Εικόνα 4.1.1.3.3. Ιστολογική τομή εντέρου τσιπούρας με αιθέριο έλαιο ρίγανης στην τροφή, H&E (μπάρα 40 μm).



Εικόνα 4.1.1.3.4. Ιστολογική τομή σπλήνα τσιπούρας με αιθέριο έλαιο ρίγανης στην τροφή, H&E (μπάρα 80 μm).



Εικόνα 4.1.1.3.5. Ιστολογική τομή ήπατος τσιπούρας με αιθέριο έλαιο ρίγανης στην τροφή, H&E (μπάρα 50 μm).



Εικόνα 4.1.1.3.6. Ιστολογική τομή βραγχίων τσιπούρας με αιθέριο έλαιο ρίγανης στην τροφή, H&E (μπάρα 100 μm).

Επίδραση στην μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου.

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 4.1.1.3.2. η διατροφή των ιχθυδίων τσιπούρας με αιθέριο έλαιο ρίγανης ανέστειλε την ανάπτυξη του βακτηρίου *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* στην εντερική μικροβιακή τους χλωρίδα.

Πίνακας 4.1.1.3.2.						
Ποιοτική σύσταση βακτηριακής χλωρίδας του εντέρου ιχθυδίων τσιπούρας μέσου βάρους 8 g, που τράφηκαν επί 40 ημέρες με και χωρίς αιθέριο έλαιο ρίγανης.						
Διατροφή με αιθέριο έλαιο ρίγανη (ομάδα Α)				Διατροφή χωρίς αιθέριο έλαιο ρίγανης (ομάδα Β)		
	Δεξαμ. P1	Δεξαμ. P2	Δεξαμ. P3	Δεξαμ. Λ1	Δεξαμ. Λ2	Δεξαμ. Λ3
Βακτηριακά είδη	Αριθμός ψαριών στα οποία βρέθηκαν τα συγκεκριμένα είδη (5 ψάρια /δεξαμενή)					
<i>V.alginolyticus</i>	5	5	5	1	4	5
<i>V.vulnificus</i>	2	0	0	0	0	0
<i>V.harveyi</i>	0	2	0	0	0	0
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	0	0	0	5	4	2
<i>Vibrio splendidus</i> II	0	0	1	0	0	0

Το *Vibrio alginolyticus* είναι κυρίαρχο είδος της βακτηριακής χλωρίδας στις τσιπούρες αυτής της ηλικίας και της εποχής (καλοκαίρι) αφού βρέθηκε στο έντερο των 25 από τα 30 ιχθύδια και στις δύο δίαιτες. Το *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, ένα δυνητικά παθογόνο βακτήριο της τσιπούρας, ενώ είναι και αυτό κυρίαρχο είδος στο έντερό τους όταν στο διαιτολόγιό τους δεν περιέχεται το αιθέριο έλαιο της ρίγανης- ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 73,33% (σε 11 από τα 15 έντερα των ιχθυδίων αυτής της δίαιτας), απουσιάζει τελείως από το έντερο όλων των εξεταζόμενων ιχθυδίων που στην τροφή τους υπήρχε το αιθέριο έλαιο της ρίγανης.

4.1.1.4. Συμπεράσματα

Η χρήση 1% αιθέριου ελαίου ρίγανης, για 35 ημέρες, στη διατροφή ιχθυδίων τσιπούρας δεν επηρέασε την αύξησή τους και δεν προκάλεσε βλάβες στους ιστούς, φαίνεται δε ότι συνέβαλε στην εξάλειψη του *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα τους.

4.1.2. Πείραμα 2^ο. Η επίδραση του διαιτητικού συμπληρώματος αιθέριου ελαίου ρίγανης στην μείωση των ιστοπαθολογικών βλαβών που δημιουργούνται στο σπλήνα, μετά από πειραματική μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* στην εκτρεφόμενη τσιπούρα (*Sparus aurata* L.).

4.1.2.1. Σκοπός

Σκοπός αυτού του πειράματος ήταν η μελέτη της επίδρασης του αιθέριου ελαίου ρίγανης, όταν προστίθεται στην τροφή ιχθυδίων τσιπούρας, σε ποσοστό 1% για χρονικό διάστημα 67 ημερών (50 ημέρες πριν την μόλυνση και 17 ημέρες μετά την μόλυνση), στη μείωση των ιστοπαθολογικών βλαβών που προκαλούνται από την πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (προηγουμένως *Pasteurella piscicida*).

4.1.2.2. Υλικά και μέθοδοι

Το πείραμα αυτό είναι συνέχεια του προηγούμενου. Μετά τις 45 ημέρες εκτροφής, 90 ψάρια από κάθε ομάδα από όλες τις δεξαμενές (30 από κάθε δεξαμενή) μεταφέρθηκαν σε 9 δεξαμενές των 25 L της μονάδας πειραματικών μολύνσεων. Η μονάδα αυτή λειτουργεί με κλειστό σύστημα ανακύκλωσης θαλασσινού νερού. Στις 9 αυτές δεξαμενές τα ιχθύδια παρέμειναν για άλλες 5 ημέρες και η διατροφή τους συνεχίστηκε με τις αντίστοιχες τροφές του πειραματισμού του

προηγούμενου πειράματος. Μετά τις πέντε ημέρες (συνολικά 50 ημέρες από την αρχή της εκτροφής) και αφού τα ιχθύδια είχαν αυξήσει το μέσο ατομικό τους βάρος σε $7 \text{ g} \pm 0.6$, έγινε πειραματική μόλυνσή τους με το *P. damsela* subsp. *piscicida*. Επιλέχθηκε η διατροφή με το αιθέριο έλαιο ρίγανης να έχει διάρκεια 50 ημέρες, διότι σε άλλο πείραμα (τέλος χειμώνα -αρχές άνοιξης) με τσιπούρες (αρχικού μέσου βάρους $0,7 \text{ g}$) αλλά και λαβράκι, διατροφή 15 ημερών με αιθέριο έλαιο ρίγανης 1% και κατόπιν πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* είχε ως αποτέλεσμα να υπάρχουν μικρές διαφορές, της τάξης του 2,68%, στην θνησιμότητα της τσιπούρας και 7,8% στην θνησιμότητα του λαβρακιού μεταξύ της ομάδας που έλαβε αιθέριο έλαιο ρίγανης και της ομάδας που δεν είχε λάβει.

Η πειραματική μόλυνση έγινε -στην αυτοσχέδια μονάδα που περιγράφηκε στο δεύτερο κεφάλαιο-ως εξής: το νερό σε κάθε δεξαμενή μειώθηκε στα 10 L και σε αυτό των ομάδων Α και Β προστέθηκε εναιώρημα βακτηρίων. Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε απομονώθηκε από φυσικό περιστατικό, δηλαδή από τσιπούρα που παρουσίασε οξεία παστεριδίαση. Η καλλιέργεια του βακτηρίου είχε γίνει σε Tryptic Soy Agar (Oxoid) με προσθήκη 2% χλωριούχου νατρίου (Oxoid). Η τελική συγκέντρωση των βακτηρίων σε κάθε δεξαμενή κατά την λοιμογόνο μόλυνση ήταν 10^7 CFU ml^{-1} . Στο νερό της ομάδας Γ δεν προστέθηκαν βακτήρια. Τα ιχθύδια παρέμειναν σε αυτές τις συνθήκες για 30 λεπτά της ώρας και στην συνέχεια το νερό σε κάθε δεξαμενή ανανεώθηκε.

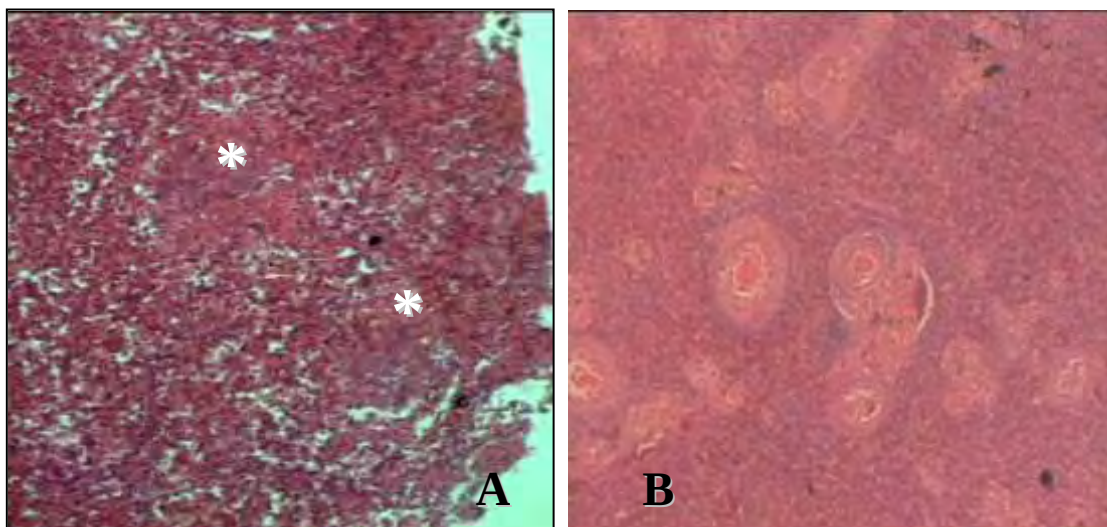
Δεκαεπτά ημέρες μετά την πειραματική μόλυνση, 15 ψάρια ανά δεξαμενή (45 ανά δίαιτα) υπέστησαν ευθανασία και συλλέχθηκαν δείγματα σπληνών για ιστολογικές εξετάσεις, όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο πείραμα. Τα αποτελέσματα επεξεργάσθηκαν στατιστικά με Independent-Samples T test στο στατιστικό πρόγραμμα SPSS.

4.1.2.3. Αποτελέσματα

Η πειραματική αυτή μόλυνση οδήγησε σε βλάβες στον σπλήνα των μολυσμένων ιχθυδίων τσιπούρας. Οι αλλοιώσεις αυτές χαρακτηρίζονταν κυρίως από σχηματισμό νεκρωτικών εστιών στο σπληνικό παρέγχυμα (Εικ. 4.1.2.3.1. Α). Στον Πίνακα 4.1.2.3.1. που ακολουθεί παρουσιάζονται τα ποσοστά των ψαριών σε κάθε δεξαμενή που εμφάνισαν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις.

Πίνακας 4.1.2.3.1.								
Ποσοστό ψαριών % με αλλοιώσεις στον σπλήνα σε δείγμα 15 ψαριών από κάθε δεξαμενή. *Σχηματισμός κοκκιωμάτων.								
Πειραματική μόλυνση με <i>P. damselae</i> subsp. <i>Piscicida</i>						Απουσία μόλυνσης		
Διατροφή με αιθέριο έλαιο ρίγανης (Ομάδα Α)			Διατροφή χωρίς αιθέριο έλαιο ρίγανης (Ομάδα Β)			Διατροφή χωρίς αιθέριο έλαιο ρίγανης (Ομάδα Γ)		
Δεξ. 1	Δεξ. 2	Δεξ. 3	Δεξ. 4	Δεξ. 5	Δεξ. 6	Δεξ. 7	Δεξ. 8	Δεξ. 9
40%	46,6%	46,6%	80%*	60%*	66,6%*	0%	0%	0%
44,4±3,81			68,86±10,19					

Στην ομάδα των ψαριών που διατράφηκαν με αιθέριο έλαιο ρίγανης (Ομάδα Α), ο μέσος αριθμός του ποσοστού % των ψαριών που εμφάνισαν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στο σπλήνα ήταν στατιστικά μικρότερος ($44,4 \pm 3,81$ SD) συγκριτικά με το μέσο αριθμό των ψαριών της ομάδας Β που δεν είχε διατραφεί με αυτό ($68,86 \pm 10,19$ SD). Επιπλέον, στην ομάδα Β παρατηρήθηκε και η εμφάνιση πολλαπλών κοκκιωμάτων (Εικ. 4.1.2.3.3. Β), χαρακτηριστικών της χρόνιας μορφής της νόσου. Οι διαφορές στον αριθμό των ψαριών που παρουσίασαν αλλοιώσεις μεταξύ των ψαριών των ομάδων που έλαβαν διαφορετικές δίαιτες ήταν στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0.05$.



Εικόνες 4.1.2.3.1. Α) Νεκρωτικές εστίες(*) σε σπλήνα τσιπούρας που είχε λάβει αιθέριο έλαιο ρίγανης, H&E. Β) Σχηματισμός πολλαπλών κοκκιωμάτων σε σπλήνα ψαριού που δεν είχε λάβει αιθέριο έλαιο ρίγανης, H&E.

4.1.2.4. Συμπεράσματα

Οι αλλοιώσεις που αναπτύχθηκαν από την πειραματική μόλυνση από το βακτήριο *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* ήταν νεκρωτικού χαρακτήρα και επιπλέον στις τσιπούρες που δεν είχαν λάβει το αιθέριο έλαιο παρατηρήθηκε και σχηματισμός κοκκιωμάτων.

Ο μικρότερος αριθμός ψαριών που παρουσίασαν αλλοιώσεις και καθυστέρηση εμφάνισης των κοκκιωμάτων δείχνουν τελικά ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης μπορεί να καθυστερήσει την ανάπτυξη της νόσου, δηλαδή της παστερέλλωσης.

4.1.3. Πείραμα 3^ο. Επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων αιθέριου ελαίου ρίγανης στην αύξηση του βάρους της τσιπούρας και στην αντοχή σε πειραματικά προκαλούμενη παστερέλλωση.

4.1.3.1. Σκοπός

Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν αφενός η μελέτη της επίδρασης της χορήγησης (στην τροφή) για δύο εβδομάδες δύο συγκεντρώσεων αιθέριου ελαίου ρίγανης (3% και 5%) στην αύξηση του βάρους ιχθυδίων τσιπούρας και αφετέρου η μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης 5% αιθέριου ελαίου ρίγανης στην αντοχή των ιχθυδίων σε πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* .

4.1.3.2. Υλικά και μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν 400 υγιείς τσιπούρες ανεμβολίαστες, βάρους $0,7 \pm 0,3$ g, οι οποίες μετά από μικρή περίοδο προσαρμογής τοποθετήθηκαν σε 12 στρογγυλές δεξαμενές 25 L (26-34 ιχθύδια ανά δεξαμενή) σε κλειστό σύστημα κυκλοφορίας θαλασσινού νερού με ανακύκλωση. Η θερμοκρασία του νερού στο σύστημα ήταν της τάξης 17° C. Η σίτιση γινόταν μέχρι κορεσμού. Η πρώτη και η δεύτερη ομάδα ελάμβανε εμπορική τροφή Βiomar με αιθέριο έλαιο ρίγανης αραιωμένο σε ιχθυέλαιο, σε ποσοστά επί της τροφής 3% και 5% αντίστοιχα, ενώ η τρίτη και η τέταρτη ομάδα ελάμβανε την ίδια εμπορική τροφή με ιχθυέλαιο χωρίς αιθέριο έλαιο ρίγανης. Το διαιτολόγιο αυτό χορηγήθηκε για 14 ημέρες. Ταυτόχρονα έγινε προσπάθεια να διατραφεί μία πρόσθετη δεξαμενή με τσιπούρες με τροφή που περιείχε 10% αιθέριο έλαιο ρίγανης.

Μετά το πέρας των 14 ημερών, τα ψάρια από τις διάφορες ομάδες ζυγίστηκαν (25 ψάρια/ ομάδα) για να διερευνηθεί εάν η διατροφή με αυξημένα ποσοστά αιθέριου ελαίου ρίγανης (3% και 5%) προκαλεί επίδραση στην αύξηση του βάρους τους. Έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα SPSS - One way Anova.

Λήφθηκαν δείγματα από όλες τις ομάδες ψαριών για ιστολογικές αναλύσεις. Ακολούθησε πειραματική μόλυνση της πρώτης (3% αιθέριο έλαιο ρίγανης), δεύτερης (5% αιθέριο έλαιο ρίγανης) και τρίτης ομάδας (χωρίς αιθέριο έλαιο) με εμβάπτιση σε

0,13.10⁸ CFU *Photobacterium damsela* subsp.*piscicida*/ml θαλασσινού νερού καθώς η τέταρτη ομάδα των ψαριών χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Χρησιμοποιήθηκε η συγκεκριμένη δόση του βακτηρίου διότι σε προηγούμενο πείραμα, με μεγαλύτερη συγκέντρωση του ίδιου βακτηρίου, προκλήθηκε καταπόνηση. Η θερμοκρασία ανέβηκε σταδιακά, με την βοήθεια αντιστάσεων στους 20±1° C και διατηρήθηκε σταθερή καθ' όλη την διάρκεια της μόλυνσης και μέχρι το τέλος του πειράματος. Σε καθημερινή βάση γινόταν καταμέτρηση των νεκρών και βακτηριολογικές εξετάσεις, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως. Έγινε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα SPSS – Independent-Samples T Test.

4.1.3.3. Αποτελέσματα

Η τροφή με 3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και πολύ περισσότερο η τροφή με 5% αιθέριο έλαιο ρίγανης είχαν χαμηλή δεκτικότητα από τα ιχθύδια τσιπούρας. Αυτό φαίνεται και από τα βάρη τους που είναι μικρότερα συγκριτικά με τα αντίστοιχα βάρη των ιχθυδίων τσιπούρας που λάμβαναν τροφή χωρίς αιθέρια έλαια. Η τροφή με το 10% αιθέριου ελαίου δεν γινόταν αποδεκτή από τα ιχθύδια τσιπούρας και έτσι η πειραματική διαδικασία με την ομάδα αυτή σταμάτησε.

Στον πίνακα 4.1.3.3.1. παρουσιάζονται τα βάρη 25 ιχθυδίων τσιπούρας από κάθε δίαιτα με αιθέρια έλαια ρίγανης (0%, 3% και 5%).

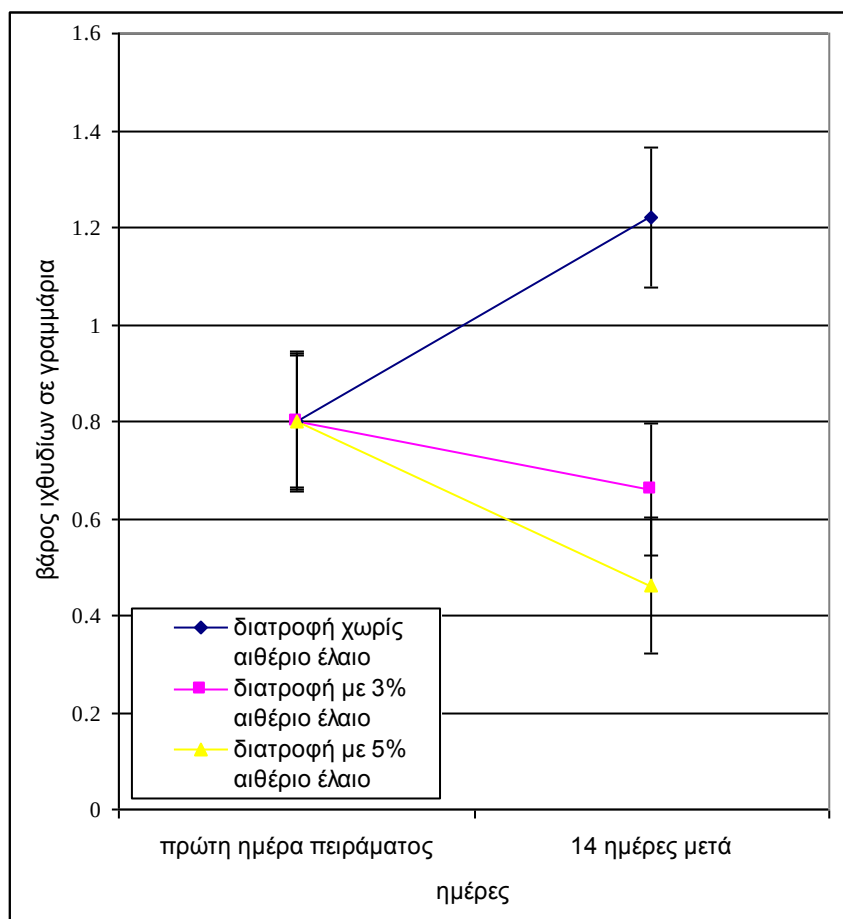
Πίνακας 4.1.3.3.1.

Μέσο βάρος ιχθυδίων τσιπούρας από κάθε δίαιτα, που είχαν τραφεί επί 14 ημέρες, με τροφή που περιείχε διαφορετικά ποσοστά αιθέριου ελαίου ρίγανης.

τροφή χωρίς αιθέριο έλαιο ρίγανης	τροφή που είχε 3% αιθέριο έλαιο ρίγανης	τροφή που είχε 5% αιθέριο έλαιο ρίγανης
Μέσο βάρος		
1,22 γραμμάρια ± 0,13a	0,66 γραμμάρια ± 0,15b	0,46 γραμμάρια ± 0,13c

a,b,c: οι διαφορές στατιστικά σημαντικές μεταξύ των ομάδων, Post Hoc Tukey, $P < 0.05$

Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαιτών με 0%, 3% και 5% αιθέριο έλαιο ρίγανης ως προς την αύξηση του βάρους. Οι δίαιτες με 3 και 5% αιθέριο έλαιο έχουν ως αποτέλεσμα μείωση στην αύξηση του βάρους των εκτρεφόμενων ιχθυδίων τσιπούρας, συγκριτικά με τη δίαιτα μάρτυρα. Αυτό δείχνεται και στο σχήμα 4.1.3.3.1.



Σχήμα 4.1.3.3.1. : Διάγραμμα αύξησης του βάρους ιχθυδίων τσιπούρας, διάρκειας 14 ημερών, σε τρεις ομάδες με χρήση αιθέριου ελαίου ρίγανης σε ποσοστό 0%, 3% και 5% στην τροφή.

Τα αποτελέσματα της πειραματικής μόλυνσης δείχνονται στον πίνακα 4.1.3.3.2

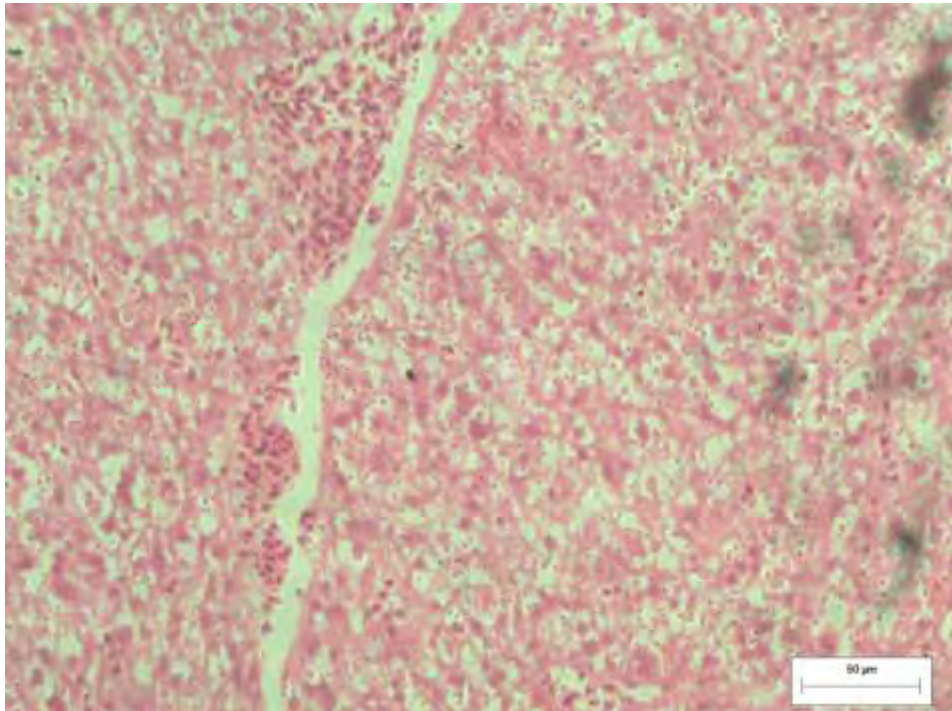
Πίνακας 4.1.3.3.2.

Αποτελέσματα πειραματικής μόλυνσης ιχθυδίων τσιπούρας με το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

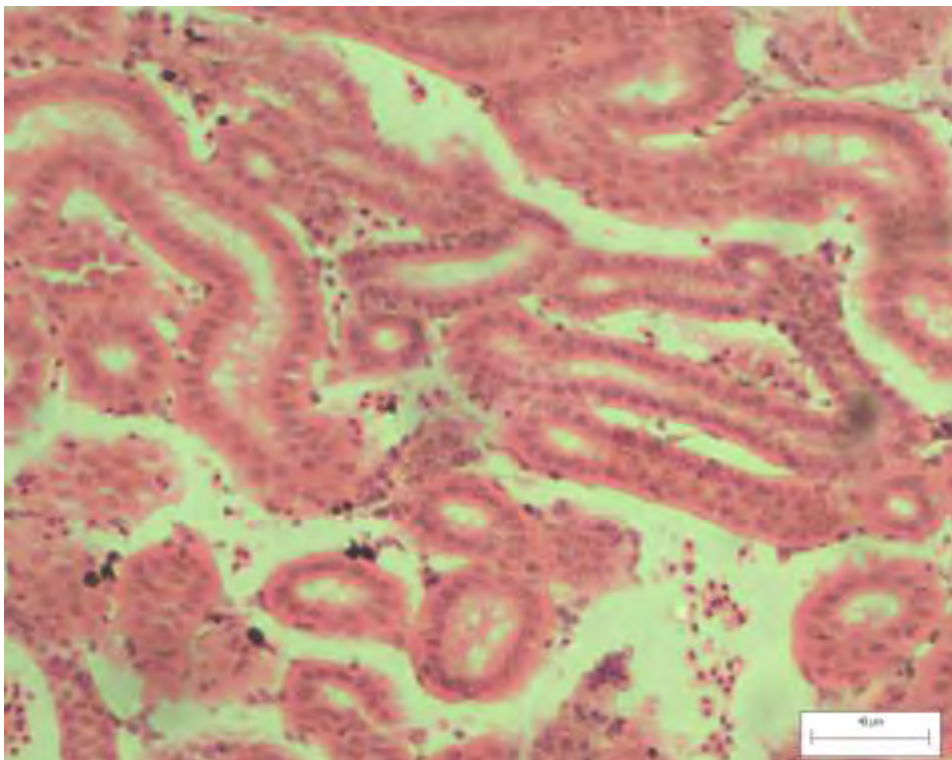
	Νεκρές/ημιθανείς τσιπούρες					
	Δίαιτα με 5% αιθέριο έλαιο ρίγανης			Δίαιτα χωρίς αιθέριο έλαιο ρίγανης		
Μέρες μετά την μόλυνση	Δεξ.1 (30 ψάρια)	Δεξ.2 (34 ψάρια)	Δεξ.3 (30 ψάρια)	Δεξ.4 (29 ψάρια)	Δεξ.5 (26 ψάρια)	Δεξ.6 (33 ψάρια)
3η	1	1	1	2	2	0
4η	7	7	8	10	17	11
5η	15	14	15	11	5	15
8η	6	7	5	2	1	7
9η	0	1	0	2	0	0
10η	0	0	0 2	0	1	0
11 ^η -15 ^η	0	0	0	0	0	0
Νεκρά σύνολο	29	30	29	27	26	33
Θνησιμότητα %	96,66	88,23	96,66	93,1	100	100
Μέση θνησιμότητα %	93,61±4,86a			97,72±3,98a		

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη θνησιμότητα ανάμεσα στις δυο ομάδες, $P>0,05$. Η χορήγηση του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε ποσοστό 5% επί της τροφής, για 14 ημέρες, διαφοροποιεί πολύ λίγο την επιβίωση, προκαλεί δε μείωση στην αύξηση του βάρους των ψαριών γιατί κάνει την τροφή μη ελκυστική, λόγω του μεγάλου ποσοστού αιθέριου ελαίου που περιέχει.

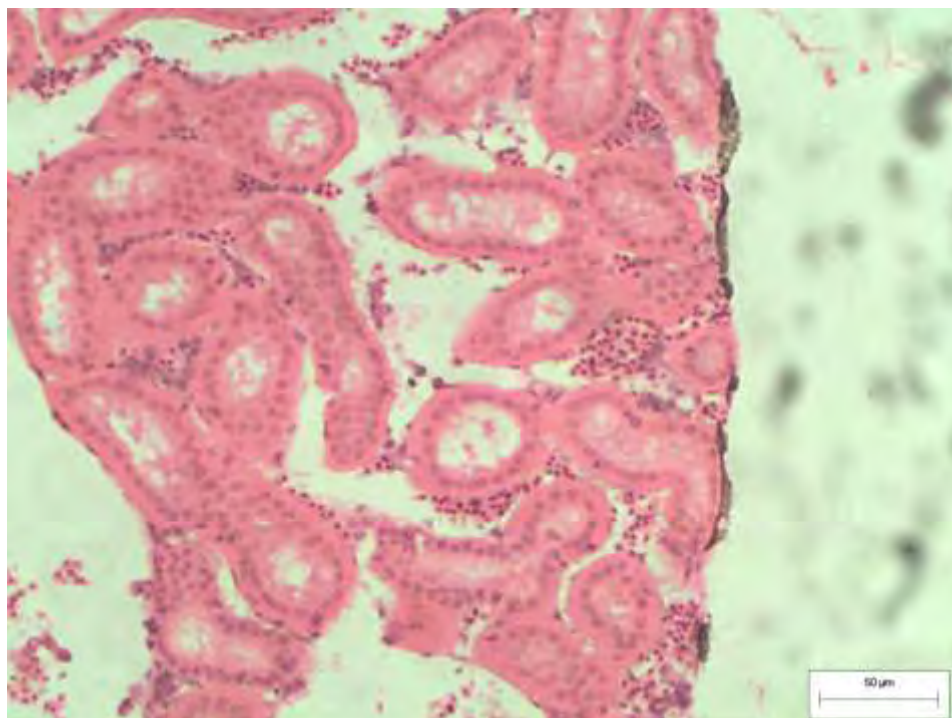
Δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικές βλάβες στους ιστούς των ιχθυδίων τσιπούρας που λάμβαναν τροφή με αιθέριο έλαιο ρίγανης σε ποσοστό 5% (Εικόνες 4.1.3.3.1-4.1.3.3.6.).



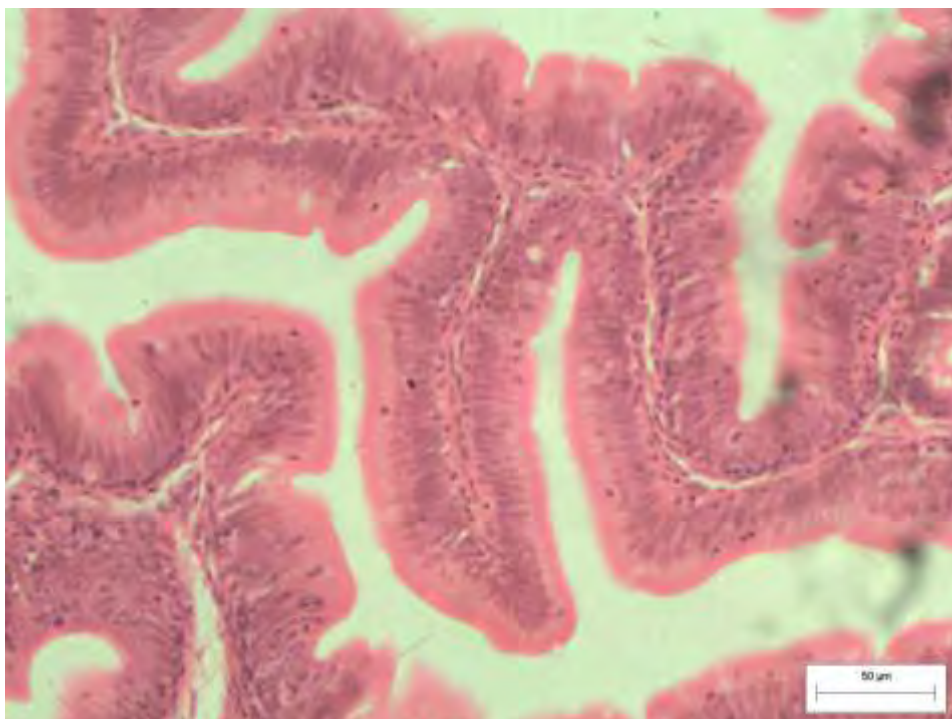
Εικόνα 4.1.3.3.1. Ιστολογική τομή ήπατος τσιπούρας με 5% αιθέριο έλαιο ρίγανης στην τροφή, H&E (μπάρα 50 μm).



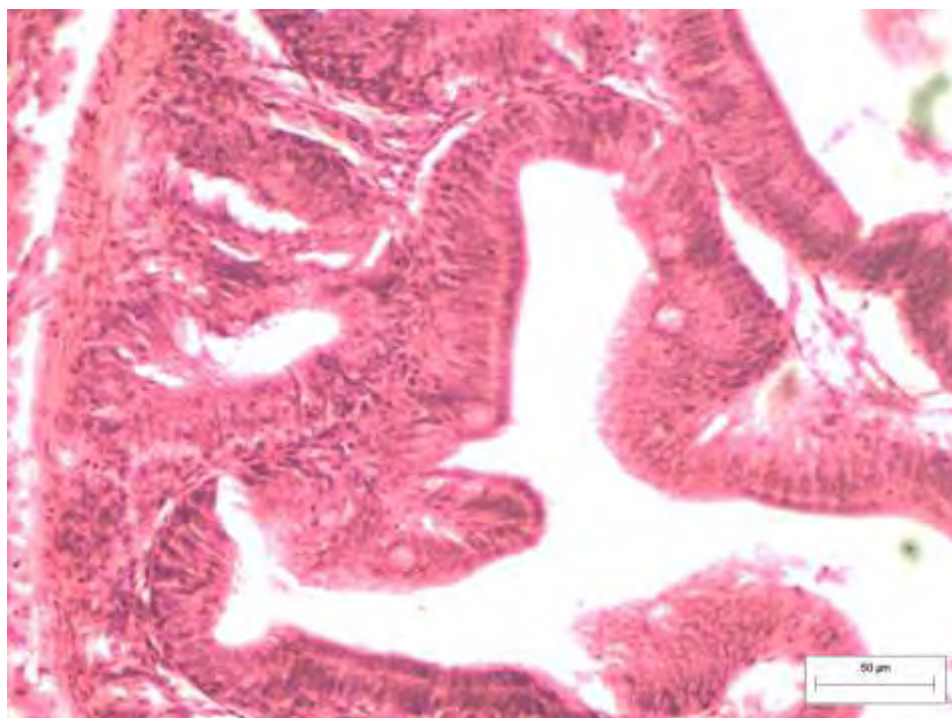
Εικόνα 4.1.3.3.2. Ιστολογική τομή νεφρού τσιπούρας με 5% αιθέριο έλαιο ρίγανης στην τροφή, H&E (μπάρα 40 μm).



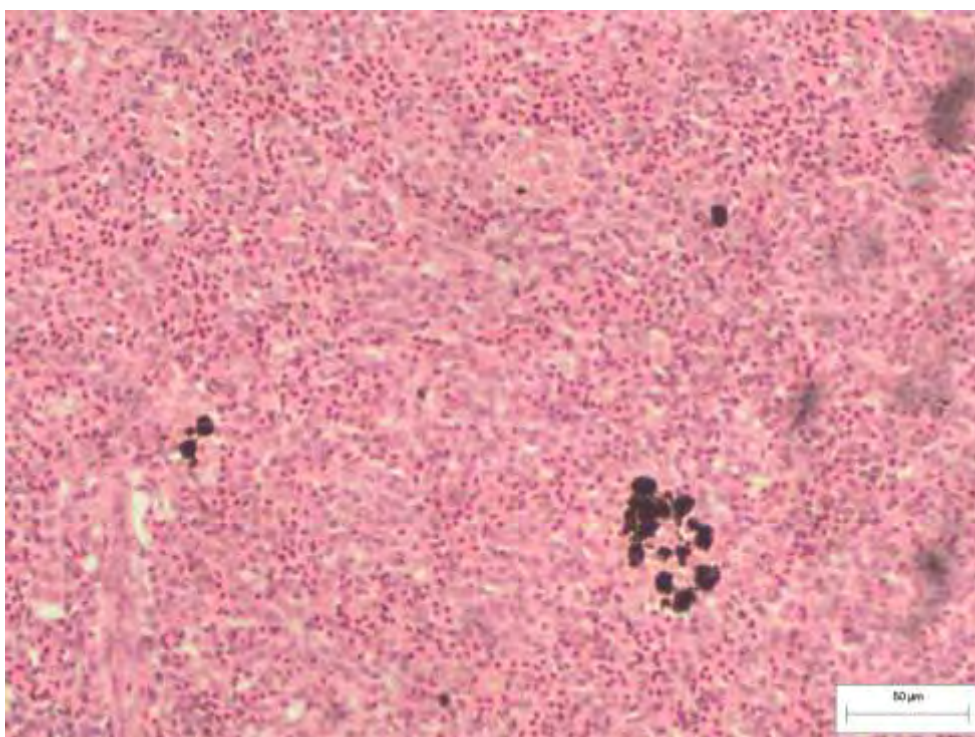
Εικόνα 4.1.3.3.3. Ιστολογική τομή από νεφρό τσιπούρας με 10% αιθέριο έλαιο ρίγανης στην τροφή, H&E (μπάρα 50 μm).



Εικόνα 4.1.3.3.4. Ιστολογική τομή εντέρου τσιπούρας με 5% αιθέριο έλαιο ρίγανης στην τροφή, H&E (μπάρα 50 μm).



Εικόνα 4.1.3.3.5. Ιστολογική τομή από έντερο τσιπούρας μάρτυρα, H&E (μπάρα 50 μm).



Εικόνα 4.1.3.3.6. Ιστολογική τομή από σπλήνα με 10% αιθέριο έλαιο ρίγανης στην τροφή, H&E (μπάρα 50 μm).

4.1.3.4. Συμπεράσματα

Η προσθήκη 3-5% αιθέριο έλαιο ρίγανης στην τροφή των ιχθυδίων τσιπούρας για 14 ημέρες, δεν ευνοεί την πρόσληψη τροφής, μειώνει την αύξηση του βάρους τους αλλά παρόλα αυτά δεν προκαλεί αλλοιώσεις στους ιστούς τους.

Η προσθήκη 5% αιθέριου ελαίου ρίγανης στην τροφή δεν διαφοροποιεί τα ποσοστά θνησιμότητας στην πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

4.1.4. Πείραμα 4^ο. Η επίδραση του OREGOSTIM (υδατικό διάλυμα αιθέριου ελαίου ρίγανης *Oregano vulgare hirtum*) ως διατροφικού συμπληρώματος στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου της τσιπούρας.

4.1.4.1. Σκοπός

Ο σκοπός του πειράματος αυτού ήταν να μελετηθεί η επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης, στην μορφή του εμπορικού σκευάσματος με το όνομα OREGOSTIM, που αντιστοιχούσε σε 7,5 ml αιθέριο έλαιο ρίγανης *Origanum vulgare hirtum*/κιλό τροφής στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου της τσιπούρας.

4.1.4.2. Υλικά και μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν 360 ιχθύδια τσιπούρας, με μέσο βάρος 1,6 g τα οποία μοιράσθηκαν τυχαία σε 2 ομάδες, με 3 δεξαμενές η κάθε μία. Η μία ομάδα λάμβανε εμπορική τροφή Biomar με προσθήκη ιχθυελαίου 1% και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Η άλλη ομάδα λάμβανε την ίδια εμπορική τροφή εμπλουτισμένη με το διατροφικό συμπλήρωμα Orego-Stim (ECOPHARM HELLAS) που χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε 7,5 ml αιθέριο έλαιο ρίγανης *Origanum vulgare*/κιλό τροφής με προσθήκη ιχθυελαίου 1%. Και αυτό το πείραμα διεξήχθη την

καλοκαιρινή περίοδο και διήρκεσε 40 ημέρες. Το Orego-Stim είναι υδατοδιαλυτό και περιέχει 5% αιθέριο έλαιο ρίγανης *Origanum vulgare hirtum*

Για τη μελέτη της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας, λήφθηκαν δείγματα από το έντερο 5 ψαριών ανά δεξαμενή, από όλες τις δίαιτες και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενα πειράματα. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS 11.0 Independent –Samples T test.

4.1.4.3. Αποτελέσματα

Στον Πίνακα 4.1.4.3.1. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας για την παρουσία του βακτηρίου *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*.

Πίνακας 4.1.4.3.1. Παρουσία <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> στην εντερική χλωρίδα των ιχθυδίων τσιπούρας (5 ψάρια /δεξαμενή).						
	Δεξαμενή OP1	Δεξαμενή OP2	Δεξαμενή OP3	Δεξαμενή M1	Δεξαμενή M2	Δεξαμενή M3
Ψάρι 1	-	-	-	+	+	+
Ψάρι 2	-	-	-	+	+	+
Ψάρι 3	-	-	-	-	+	+
Ψάρι 4	-	-	-	-	+	-
Ψάρι 5	-	-	-	-	-	-
%συχνότητα	0	0	0	40	80	60
% μέση συχνότητα	0			60±20		

+ : Παρουσία του βακτηρίου

- : Απουσία του βακτηρίου

Όπου OP1, OP2, OP3 δεξαμενές με αιθέριο έλαιο ρίγανης και M1, M2 ,M3 δεξαμενές μάρτυρες χωρίς αιθέριο έλαιο ρίγανης.

Παρατηρείται ότι από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών που είχαν στην τροφή τους αιθέριο έλαιο ρίγανης, δεν απομονώνεται το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, ενώ από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών που δεν είχαν στην τροφή τους το αιθέριο έλαιο, το βακτήριο έχει συχνότητα παρουσίας 60%. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές, $p < 0,05$. Δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικές βλάβες στα ψάρια που διατράφηκαν με τροφή που περιείχε αιθέριο έλαιο ρίγανης.

4.1.4.4. Συμπεράσματα

Από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα των ιχθυδίων τσιπούρας, που στη δίαιτά τους περιλαμβανόταν αιθέριο έλαιο ρίγανης, το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* απουσίαζε. Απομονώθηκε όμως από την εντερική χλωρίδα των ψαριών μαρτύρων σε ποσοστό 60%.

Το διατροφικό συμπλήρωμα Orego-Stim (5% αιθέριο έλαια ρίγανης), στις συνθήκες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε, δεν προκάλεσε ιστολογικές βλάβες στις τσιπούρες στις οποίες χορηγήθηκε.

4.2. ΛΑΒΡΑΚΙ

4.2.1. Πείραμα 1^ο.

Επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης, ως ασφαλούς διατροφικού συμπληρώματος, στην επιβίωση λαβρακιών μετά από πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *Listonella anguillarum*.

4.2.1.1. Σκοπός

Η μελέτη της επίδρασης της χορήγησης (στην τροφή), για 180 ημέρες, 1% αιθέριου ελαίου ρίγανης στην επιβίωση λαβρακιών, μετά από πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *Listonella anguillarum*.

4.2.1.2. Υλικά και μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν 132 υγιή ανεμβολίαστα λαβράκια, μέσου βάρους 30 g , τα οποία τοποθετήθηκαν σε 6 δεξαμενές (22 λαβράκια /δεξαμενή) των 100 L σε ανοικτό σύστημα κυκλοφορίας θαλασσινού νερού με παροχή οξυγόνου. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν άλλα 44 λαβράκια του ίδιου βάρους σε 2 δεξαμενές, ως μάρτυρες. Στις 3 δεξαμενές, τα λαβράκια τρέφονταν με εμπορική τροφή Biomar Ecolife στην οποία είχε προστεθεί 1% v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης επί της τροφής (ο τρόπος ενσωμάτωσης του αιθέριου ελαίου ρίγανης με την βοήθεια του ιχθυελαίου έχει περιγραφεί σε προηγούμενα πειράματα αυτού του κεφαλαίου). Στις άλλες τρεις δεξαμενές τα λαβράκια τρέφονταν με την ίδια εμπορική τροφή χωρίς αιθέριο έλαιο αλλά με ιχθυέλαιο. Τα λαβράκια τρέφονταν μέχρι κορεσμού. Η διατροφή των ψαριών με το συγκεκριμένο διαιτολόγιο ήταν διάρκειας 180 ημερών. Η θερμοκρασία στην αρχή του πειράματος ήταν 26°C. Στο τέλος του πειράματος, η θερμοκρασία ήταν 17°C και το μέσο βάρος των ψαριών ήταν 65 g.

Λήφθηκαν δείγματα ιστών για ιστολογικές εξετάσεις σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφηκαν σε προηγούμενα πειράματα.

Για την πειραματική μόλυνση, έγινε μεταφορά των ψαριών σε δεξαμενή 100 L και εμβάπτιση σε $1,0 \cdot 10^7$ CFU *Listonella anguillarum*. Επιλέχθηκε η συγκέντρωση βακτηρίου 10^7 διότι σε δοκιμές που έγιναν φάνηκε ότι ήταν κατάλληλη. Ο αριθμός των νεκρών ψαριών μετριόταν σε καθημερινή βάση. Σε όλα τα ημιθανή/ νεκρά λαβράκια έγιναν μικροβιολογικές εξετάσεις νεφρού, απομονώσεις και ταυτοποιήσεις των υπευθύνων βακτηρίων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το

πρόγραμμα Statgraphics Plus (Multiple Range tests για την επιβίωση και την θνησιμότητα που οφείλεται στην διατροφή.

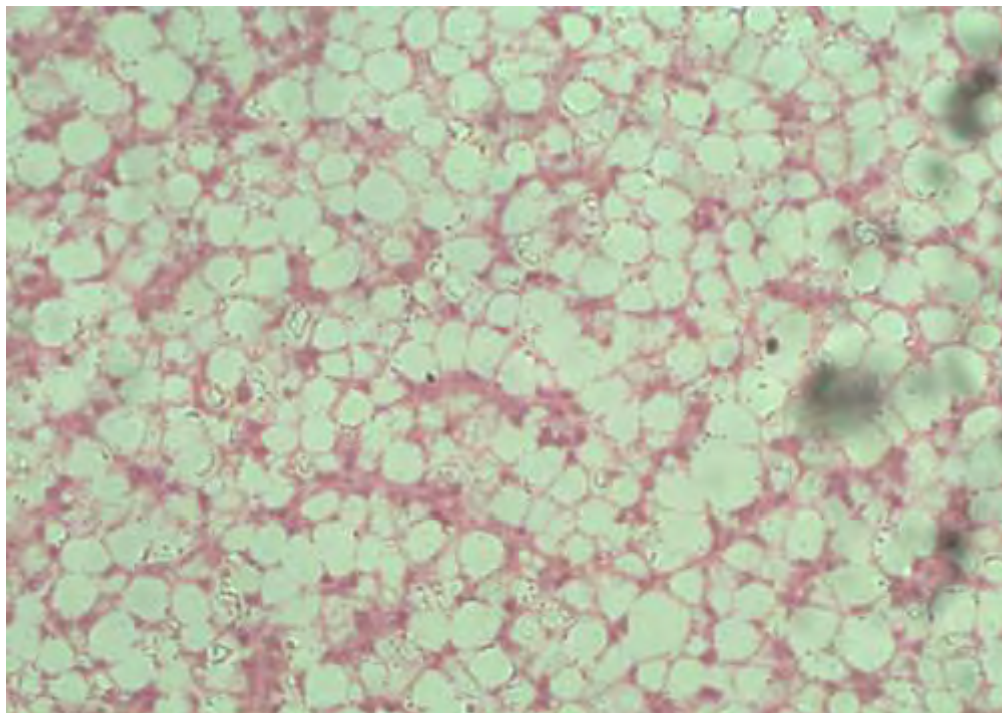
4.2.1.3. Αποτελέσματα

Στον πίνακα 4.2.1.3.1. φαίνονται τα αποτελέσματα από την πειραματική μόλυνση των δύο ομάδων.

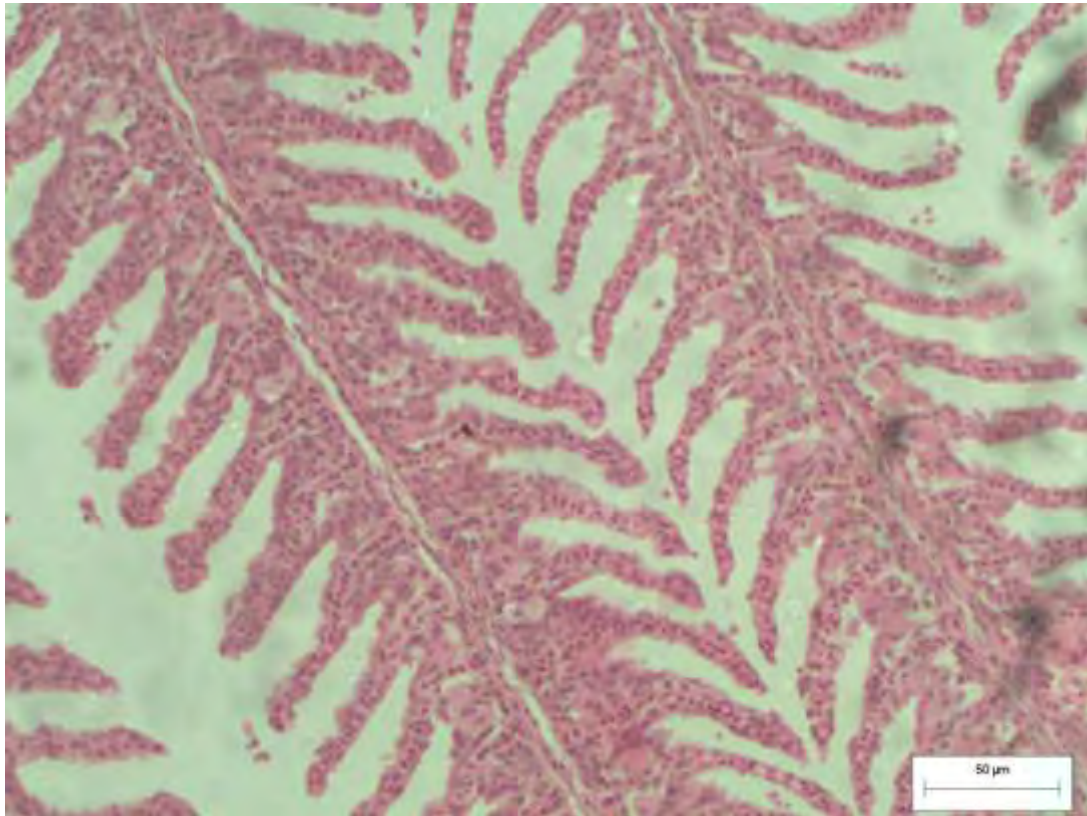
Πίνακας 4.2.1.3.1								
Νεκρά/ ημιθανή λαβράκια που είχαν τραφεί με και χωρίς 1% αιθέριο έλαιο μετά την πειραματική μόλυνση.								
	Αρνητικός μάρτυρας		Δίαιτα 180 ημερών χωρίς αιθέριο έλαιο ρίγανης (22 ψάρια / δεξαμενή)			Δίαιτα 180 ημερών με αιθέριο έλαιο ρίγανης (22 ψάρια / δεξαμενή)		
Ημέρες μετά τη μόλυνση	Δεξ. 01	Δεξ.02	Δεξ. 1	Δεξ.2	Δεξ.3	Δεξ.4	Δεξ.5	Δεξ.6
1 ^η -2 ^η	0	0	0	0	0	0	0	0
3 ^η	0	0	4	3	4	0	0	0
4 ^η	0	0	3	4	3	0	0	0
5 ^η	0	0	3	3	2	1	0	1
6 ^η	0	0	2	1	2	0	0	0
7 ^η	0	0	0	0	0	0	0	0
8 ^η -12 ^η	0	0	0	0	0	0	0	0
Νεκρά σύνολο	0	0	12	11	11	1	0	1
Επιβίωσαντα	22	22	10	11	11	21	22	21
Θνησιμότητα%	0	0	54,54	50	50	4,54	0	4,54
Μέση θνησιμότητα%	0		51,51±2,62a			3,02%±2,62b		

Η στατιστική επεξεργασία που έγινε αφορά τα ποσοστά επιβίωσης και τα ποσοστά θνησιμότητας, όπου παρατηρείται μεταξύ των δύο ομάδων στατιστικά σημαντική διαφορά. Σε όλα τα νεκρά λαβράκια έγινε μικροβιολογική εξέταση που έδειξε παρουσία του βακτηρίου *Listonella anguillarum* στον πρόνεφρο και άλλα

όργανα, όπως σπλήνα και ήπαρ. Παρατηρήθηκε ότι η ομάδα των λαβρακιών που έχουν διατραφεί με αιθέριο έλαιο παρουσίασε θνησιμότητα περίπου 3%, ενώ η αντίστοιχη ομάδα που διατράφηκε χωρίς αιθέριο έλαιο παρουσίασε θνησιμότητα περίπου 51% επί του συνόλου των υφισταμένων την πειραματική μόλυνση ψαριών. Παρατηρείται διαφορά δηλαδή 48% που είναι σημαντική. Επίσης δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικές βλάβες στα λαβράκια που λάμβαναν 1% αιθέριο έλαιο ρίγανης στην τροφή τους, όπως φαίνεται στις ενδεικτικές εικόνες 4.2.1.3.1. -2. Η εκτροφή των ψαριών για 180 ημέρες καλύπτει καλοκαιρινή και φθινοπωρινή εποχή, που το ανοσολογικό σύστημα των ψαριών βρίσκεται σε καλή κατάσταση.



Εικόνα 4.2.1.3.1. Ιστολογική εικόνα ήπατος από λαβράκι που λάμβανε αιθέριο έλαιο ρίγανης στη τροφή του για 180 ημέρες, H&E.



Εικόνα 4.2.1.3.2. Ιστολογική εικόνα βραγχίων από λαβράκι που λάμβανε αιθέριο έλαιο ρίγανης στην τροφή του για 180 ημέρες, H&E (μπάρα 50 μm).

4.2.1.4. Συμπεράσματα

Η χρήση 1% αιθέριου ελαίου ρίγανης στην τροφή λαβρακιών για 180 ημέρες (θερινή και φθινοπωρινή περίοδος) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της θνησιμότητας που προκλήθηκε από την πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *Listonella anguillarum* κατά 48% συγκριτικά με τα λαβράκια μάρτυρες.

4.2.2. Πείραμα 2^ο Μελέτη της επίδρασης της χορήγησης αιθέριου ελαίου ρίγανης στην τροφή, με τη μορφή του σκευάσματος Orego-Stim, κατά τη χειμερινή περίοδο, στην επιβίωση του λαβρακιού μετά από πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *Listonella anguillarum*.

4.2.2.1. Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν να μελετηθεί εάν η χορήγηση του αιθέριου ελαίου ρίγανης, με τη μορφή του σκευάσματος Orego-Stim (5% αιθέριο έλαιο ρίγανης), επιδρά θετικά και κατά τη χειμερινή περίοδο, στην επιβίωση των λαβρακιών μετά από πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *Listonella anguillarum*.

4.2.2.2. Υλικά και μέθοδοι

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 96 λαβράκια μέσου βάρους 33,69 g. Για την μεταφορά τους χρησιμοποιήθηκε ως αναισθητικό αιθέριο έλαιο γαρύφαλλου (*Eugenia caryophyllata*), σε συγκέντρωση 50 μl αιθέριο έλαιο (διαλυμένο σε 500 μl αιθανόλη 95%) /L θαλασσινού νερού.

Τα λαβράκια (αλλά και οι τσιπούρες) αναισθητοποιούνται μέσα σε 30 δευτερόλεπτα. Εάν προσθέσουμε, στη δεξαμενή με το αναισθητικό, οξυγόνο μπορούν τα ψάρια να κρατηθούν ναρκωμένα για μεγάλα χρονικά διαστήματα (ώρες). Αφού τα ψάρια μεταφερθούν στις δεξαμενές με παροχή οξυγόνου και ανοικτό κύκλωμα κυκλοφορίας θαλασσινού νερού ανανήπτουν σε λίγα λεπτά (2-5).

Τα 96 λαβράκια μοιράσθηκαν τυχαία σε 2 ομάδες με 2 δεξαμενές των 19 ψαριών η κάθε μία και τοποθετήθηκαν σε δεξαμενές των 150 L με ανοικτό σύστημα κυκλοφορίας θαλασσινού νερού. Παράλληλα υπήρχε και ομάδα αρνητικός μάρτυρας 20 ψαριών που δεν υπέστη πειραματική μόλυνση με *Listonella anguillarum* αλλά μόνο την διαδικασία της μόλυνσης, χωρίς το βακτήριο. Ο αρνητικός μάρτυρας και οι 2 δεξαμενές (των 19 ψαριών) λάμβανε εμπορική τροφή Biomar και οι άλλες 2 δεξαμενές (των 19 ψαριών) λάμβαναν τροφή Biomar στην οποία είχε προστεθεί αιθέριο έλαιο ρίγανης με την μορφή του σκευάσματος Orego-Stim .

Η εκτροφή αυτή με το συγκεκριμένο διαιτολόγιο έγινε από τον Νοέμβριο έως αρχές Μαρτίου και διήρκεσε 120 ημέρες. Η ποσότητα του αιθέριου ελαίου που είχε προστεθεί στην εμπορική τροφή Biomar ήταν αντίστοιχη με 0,45 ml αιθέριο έλαιο/100g τροφής. Στην τροφή(σε όλα τα διαιτολόγια) είχε προστεθεί και 1%

ιχθυέλαιο για τη βελτίωση της γεύσης. Η τροφή με το αιθέριο έλαιο παρασκευαζόταν κάθε δύο ημέρες και παρέμενε σε πλαστικά δοχεία με καπάκι. Η θερμοκρασία στην αρχή ήταν 19°C και στη συνέχεια καθώς η θερμοκρασία του νερού μειωνόταν τοποθετήθηκαν στις δεξαμενές αντιστάσεις θερμοστάτες, ειδικές για ενυδρεία, που κρατούσαν την θερμοκρασία στα επίπεδα 17,5⁰-18⁰C. Η παροχή οξυγόνου ήταν σταθερή στα 8 ppm O₂ και ελεγχόταν καθημερινά δύο φορές. Τα λαβράκια ταΐζονταν δύο φορές την ημέρα μέχρι κορεσμού.

Στο τέλος της εκτροφής των ψαριών έγινε πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *Listonella anguillarum* σε συγκέντρωση 2,85.10⁶ CFU/ml θαλασσινού νερού για 16 λεπτά. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS 11.0 Independent –Samples T test.

4.2.2.3. Αποτελέσματα

Στον Πίνακα 4.2.2.3.1. φαίνονται τα αποτελέσματα της πειραματικής μόλυνσης όπου παρατηρούμε ότι υπάρχει διαφορά στη θνησιμότητα 13,16% μεταξύ των 2 ομάδων που είναι στατιστικά σημαντική.

Πίνακας 4.2.2.3.1.

Θνησιμότητα λόγω πειραματικής μόλυνσης στην ομάδα με το Orego-Stim και στην ομάδα μάρτυρα, χωρίς Orego-Stim.

	Με Orego-Stim		Χωρίς Orego-Stim	
Ημέρες μετά την μόλυνση	Δεξ. 1 (19 ψάρια)	Δεξ. 2 (19 ψάρια)	Δεξ. 1 (19 ψάρια)	Δεξ. 2 (19 ψάρια)
4 ^η	6	7	8	10
5 ^η	5	4	4	5
6 ^η	3	3	3	3
7 ^η	1	1	2	0
8 ^η	1	1	1	1
9 ^η -15 ^η	0	0	0	0
Σύνολο νεκρών	16/19	16/19	18/19	19/19
% θνησιμότητα	84,21	84,21	94,74	100
% μέση θνησιμότητα	84,21±0		97,37±3,7	
Διαφορά στη θνησιμότητα:13,16%, P=0,038<0,05				

Διεξήχθη παρόμοιο πείραμα διάρκειας 90 ημερών, με 125 λαβράκια με αρχικό μέσο βάρος 24 γραμμάρια, από Σεπτέμβριο έως Δεκέμβριο, με δόση αιθέριου ελαίου ρίγανης 1 ml ανά 100 g τροφής Biomar με προσθήκη 1% ιχθυελαίου για αραίωση του αιθέριου ελαίου. Παράλληλα, υπήρχε και θετικός και αρνητικός μάρτυρας για την πειραματική μόλυνση που τρέφονταν με την ίδια εμπορική τροφή χωρίς αιθέριο έλαιο αλλά με ιχθυέλαιο. Οι θερμοκρασίες ξεκίνησαν από 26,5⁰C και έφθασαν μέχρι 17,5⁰C (με την βοήθεια αντιστάσεων ειδικών για ενυδρεία από το τέλος του Νοεμβρίου και μετά). Σε πειραματική μόλυνση με *L.anguilarum* 6 δεξαμενών λαβρακιών (3 ανά

ομάδα), η διαφορά στην θνησιμότητα μεταξύ των 2 ομάδων ήταν της τάξης του 14% υπέρ της ομάδας με το αιθέριο έλαιο.

4.2.2.4. Συμπεράσματα

Η χρήση του διαιτητικού συμπληρώματος Orego-Stim με τελική συγκέντρωση αιθέριου ελαίου ρίγανης 0,45 ml/100 g τροφής, για 120 ημέρες με χαμηλές θερμοκρασίες περιόρισε τις θνησιμότητες κατά 13,16%.

Στα πειράματα που έγιναν και σε περιόδους με χαμηλές θερμοκρασίες, το αιθέριο έλαιο ρίγανης αύξησε την επιβίωση του λαβρακιού κατά την πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *L. anguillarum*. Οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

**Επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε
μικτές προσβολές από βακτήρια και
παράσιτα (ψείρες και κωπήποδα) στο
λαβράκι**

5.1 Πείραμα 1^ο. Επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε μικτές μολύνσεις από το ισόποδο παράσιτο *Ceratomyxa oestroides* και το πειραματικά χορηγούμενο, μέσω εμφάνισης, βακτήριο *Listonella(Vibrio) anguillarum*.

5.1.1. Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της επίδρασης της χορήγησης (στην τροφή), για 100 ημέρες, 1% αιθέριου ελαίου ρίγανης στην επιβίωση λαβρακιών μετά από πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *Listonella anguillarum*, όταν συνυπάρχει ταυτόχρονα φυσική προσβολή από το ισόποδο παράσιτο *Ceratomyxa oestroides*.

5.1.2. Υλικά και μέθοδοι

Το πείραμα διεξήχθη κατά τη χειμερινή και ανοιξιάτικη περίοδο. Χρησιμοποιήθηκαν 180 υγιή λαβράκια μέσου βάρους 150 g, που είχαν προσβληθεί φυσικά με το ισόποδο παράσιτο *Ceratomyxa oestroides* (Εικόνα 5.1.1), τα οποία χωρίστηκαν τυχαία σε 2 ομάδες από 3 δεξαμενές 600 L η κάθε μία (30 λαβράκια /δεξαμενή) σε ανοικτό σύστημα κυκλοφορίας θαλασσινού νερού με παροχή οξυγόνου. Στις 3 δεξαμενές, τα λαβράκια τρέφονταν με εμπορική τροφή Biomar που είχε 1% v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης αραιωμένο σε ιχθυέλαιο ενώ στις 3 άλλες δεξαμενές τα λαβράκια τρέφονταν με την ίδια τροφή χωρίς το αιθέριο έλαιο. Το ποσό του ολικού λίπους της τροφής ήταν 18%, μειωμένο κατά 1-2% από τη συνήθη τροφή, λόγω του ιχθυελαίου που χρησιμοποιείτο στην προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης στην τροφή. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν άλλα 50 λαβράκια του ίδιου βάρους σε 2 δεξαμενές, ως μάρτυρες, που τρέφονταν με την ίδια εμπορική τροφή με την προσθήκη του ιχθυελαίου κατά 1% όπως και στην ομάδα ελέγχου. Τα λαβράκια τρέφονταν μέχρι κορεσμού. Η εκτροφή με τα συγκεκριμένα διαιτολόγια είχε διάρκεια 100 ημέρες. Επιλέχθηκε η διάρκεια του πειράματος να είναι τελικά 100 ημέρες διότι στις 40 ημέρες είχε προηγηθεί μικρό πείραμα με λαβράκια από τον ίδιο πληθυσμό

και πειραματική μόλυνση, με μεταφορά των ψαριών σε δεξαμενή 100L και εμφύππηση σε $1,0 \cdot 10^7$ CFU *Listonella anguillarum* για 20 λεπτά, η οποία δεν έδειξε διαφορά στην επιβίωση των λαβρακιών στις δύο ομάδες. Η θερμοκρασία καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος ήταν $18 \pm 1^\circ\text{C}$ με τη βοήθεια αντιστάσεων ειδικών για ενυδρεία.

Λήφθηκαν δείγματα ιστών για ιστολογικές εξετάσεις σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφηκαν σε προηγούμενα πειράματα. Έγινε πειραματική μόλυνση με μεταφορά των ψαριών σε δεξαμενές 100 L και εμφύππηση σε $0,6 \cdot 10^7$ CFU *Listonella anguillarum*/ml θαλασσινού νερού για 20 λεπτά. Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για τη μόλυνση είχε απομονωθεί από περιστατικό δονακίωσης. Δεκαπέντε ημέρες μετά την πειραματική μόλυνση, και αφού η θνησιμότητα είχε σταματήσει, υπολογίσθηκε η επιβίωση των λαβρακιών και στις δύο ομάδες. Σε όλα τα ημιθανή και νεκρά λαβράκια, έγιναν μικροβιολογικές εξετάσεις πρόνεφρου, απομόνωση και ταυτοποίηση του υπεύθυνου βακτηρίου. Στο νεκρά λαβράκια μετρήθηκαν τα παράσιτα. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS 11.0 Independent-Samples T test.



Εικόνα 5.1.1. *Ceratothoa oestroides*

5.1.3. Αποτελέσματα

Η τροφή με τα αιθέρια έλαια ήταν ευπρόσδεκτη από τα λαβράκια. Γενικά τα λαβράκια που λάμβαναν την τροφή με το αιθέριο έλαιο έδειχναν να βρίσκονται σε καλύτερη κατάσταση, συγκριτικά με τα λαβράκια που δεν το λάμβαναν. Όσον αφορά τα λαβράκια, αρνητικούς μάρτυρες, που υπέστησαν την ίδια διαδικασία με τα

λαβράκια που μολύνονταν πειραματικά αλλά χωρίς να προστίθεται βακτήριο, εμφανίστηκαν σποραδικοί θάνατοι, της τάξης 0-1 ψαριών ανά δεξαμενή, που αποδόθηκαν σε μη ειδικά αίτια. Από κανένα αρνητικό μάρτυρα δεν απομονώθηκε *Listonella anguillarum*.

Στον Πίνακα 5.1.3.1. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την επιβίωση λαβρακιών, που έχουν διατραφεί με τροφή που περιείχε 0 και 1% αιθέριο έλαιο ρίγανης, ύστερα από πειραματική μόλυνση με *L.anguillarum*.

Πίνακας 5.1.3.1.						
Επιβίωση λαβρακιών, που έχουν διατραφεί με τροφή που περιείχε 0 και 1% αιθέριο έλαιο ρίγανης, ύστερα από πειραματική μόλυνση με <i>L.anguillarum</i>.						
	Νεκρά/ημιθανή λαβράκια μετά από την πειραματική μόλυνση					
	Δίαιτα χωρίς αιθέριο έλαιο ρίγανης			Δίαιτα με αιθέριο έλαιο ρίγανης		
Ημέρες μετά την μόλυνση	Δεξ.1	Δεξ.2	Δεξ.3	Δεξ.4	Δεξ.5	Δεξ.6
1 ^η ημέρα	0	0	0	0	0	0
	Απουσία διάθεσης για λήψη τροφής					
2 ^η ημέρα	2	1	2	1	0	0
	Απουσία διάθεσης για λήψη τροφής					
3 ^η ημέρα	9	9	10	3	4	4
	Απουσία διάθεσης για λήψη τροφής					
4 ^η ημέρα	13	12	11	5	5	4
	Απουσία διάθεσης για λήψη τροφής					
5 ^η ημέρα	2	4	3	2	5	3
	Απουσία διάθεσης για λήψη τροφής					
6 ^η ημέρα	0	1	1	1	2	1
	Απουσία διάθεσης για λήψη τροφής			Κανονική πρόσληψη τροφής		
7 ^η -9 ^η ημέρα	0 νεκρά	0 νεκρά	0 νεκρά	0 νεκρά	0 νεκρά	1 νεκρά

	Απουσία διάθεσης για λήψη τροφής			Κανονική πρόσληψη τροφής		
14 ^η ημέρα	0 νεκρά	0 νεκρά	0 νεκρά	0 νεκρά	0 νεκρά	0 νεκρά
	Το 50% των λαβρακιών έχουν διάθεση για λήψη τροφής			Κανονική πρόσληψη τροφής		
15 ^η ημέρα	0 νεκρά	0 νεκρά	0 νεκρά	0 νεκρά	0 νεκρά	0 νεκρά
	Το 50% των λαβρακιών έχουν διάθεση για λήψη τροφής			Κανονική πρόσληψη τροφής		
Νεκρά σύνολο	26	27	27	15	18	16
Επιβιώσαντα	4	3	3	15	12	14
Θνησιμότητα %	86,6	90	90	50	60	53,3
Μέση %θνησιμότητα	88,86±1,96			54,43±5,09		

Παρατηρείται μία διαφορά στη θνησιμότητα μεταξύ των δύο ομάδων λαβρακιών που είναι της τάξης του 34,43%. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική $P=0,000<0,05$. Η ομάδα των λαβρακιών που ελάμβανε αιθέρια έλαια με την τροφή παρουσίασε μικρότερη θνησιμότητα, μετά από πειραματική μόλυνση, συγκριτικά με τα λαβράκια μάρτυρες.

Το πείραμα αυτό των 100 ημερών καλύπτει χειμερινή και ανοιξιάτικη περίοδο. Επίσης παρατηρούμε ότι η ομάδα των λαβρακιών, που στην τροφή τους υπήρχε αιθέριο έλαιο, ανέκαμψε πιο γρήγορα, συγκεκριμένα επανήρθε η διάθεσή τους για λήψη τροφής γρηγορότερα, συγκριτικά με την ομάδα που στην τροφή δεν υπήρχε αιθέριο έλαιο.

5.1.4. Συμπεράσματα

Η διατροφή λαβρακιών για 100 ημέρες (χειμερινή και ανοιξιάτικη περίοδος) με 1% αιθέριο έλαιο ρίγανης είχε σαν αποτέλεσμα αφενός τη μείωση της θνησιμότητας που προκλήθηκε από την πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *Listonella anguillarum*

κατά 34,43% συγκριτικά με τα λαβράκια μάρτυρες και αφετέρου την ταχύτερη επάνοδο της διάθεσης για πρόσληψη τροφής.

5.2. Πείραμα 2^ο.

Μελέτη της θεραπευτικής δράσης του αιθέριου ελαίου ρίγανης, με τη μορφή του σκευάσματος Orego-Stim, σε μικτή φυσική προσβολή από το κωπήποδο παράσιτο *Lernathropus sp.* και το ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο *Vibrio harveyi*.

5.2.1. Σκοπός

Σκοπός του πειράματος ήταν να μελετηθεί η θεραπευτική δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης, με τη μορφή του σκευάσματος Orego-Stim, σε μικτή φυσική προσβολή από το κωπήποδο παράσιτο *Lernathropus sp.* και το ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο *Vibrio harveyi*.

5.2.2. Υλικά και μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν 120 λαβράκια, μέσου βάρους 19 g, που είχαν προσβληθεί φυσικά από το κωπήποδο *Lernathropus kroyeri* (Van Beneden, 1851) και το ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο *Vibrio harveyi*. Τα λαβράκια χωρίστηκαν τυχαία σε 3 ομάδες Α, Β και Γ με δύο επαναλήψεις η κάθε μία (20 λαβράκια /δεξαμενή). Το πείραμα διεξήχθη φθινοπωρινή περίοδο και διήρκεσε 45 ημέρες. Η θερμοκρασία κυμάνθηκε μεταξύ 20,5-22⁰C, η αλατότητα ήταν 38‰ και το οξυγόνο ήταν 7-7,5 ppm. Η μία ομάδα (Γ) έλαβε εμπορική τροφή Biomar με 1% ιχθέλαιο και χρησίμευσε ως μάρτυρας ενώ οι άλλες δύο (Α και Β) τράφηκαν με την ίδια εμπορική τροφή στην οποία είχε προστεθεί αιθέριο έλαιο ρίγανης αραιωμένο σε ιχθυέλαιο. Το αιθέριο έλαιο ρίγανης ήταν στη μορφή υγρού με το γνωστό εμπορικό όνομα Orego- Stim (Ecopharma Hellas, SA, Greece) που περιέχει 5% αιθέριο έλαιο ρίγανης. Το θεραπευτικό σχήμα σχεδιάστηκε ως ακολούθως: για διάστημα 10 ημερών οι δύο

ομάδες τράφηκαν με τροφή που περιείχε 0,9 ml αιθέριο έλαιο ρίγανης /100 g τροφής. Στο τέλος των 10 ημερών η δοσολογία του αιθέριου ελαίου ρίγανης μειώθηκε στα 0,45 ml αιθέριο έλαιο /100 g τροφής για τη μία ομάδα(A) και 0,25 ml αιθέριο έλαιο /100 g τροφής για την άλλη (B) για 35 ακόμη ημέρες.

Στο τέλος του πειράματος και αφού οι θάνατοι είχαν σταματήσει σε όλες τις ομάδες, υπολογίστηκε η μέση θνησιμότητα. Η προσβολή των λαβρακιών από το κωπήποδο παράσιτο *Lernathropus kroyeri* (Εικόνες 5.2.1α και 5.2.1β) διαπιστώθηκε με εξέταση νωπού ξέσματος βραγχίων σε στερεοσκόπιο και μικροσκόπιο OLYMPUS. Λόγω της προσβολής τα βράγχια ήταν αναιμικά. Η προσβολή των λαβρακιών από το παθογόνο *Vibrio harveyi* διαπιστώθηκε με απομόνωση του βακτηρίου από τον πρόνεφρο όλων των ετοιμοθάντων/ νεκρών λαβρακιών, με τις ίδιες μεθόδους που έχουν περιγραφεί στα προηγούμενα πειράματα. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS 11.0 One-way ANOVA.



Εικόνες 5.2.2.1α και 5.2.2.1β: *Lernathropus kroyeri*

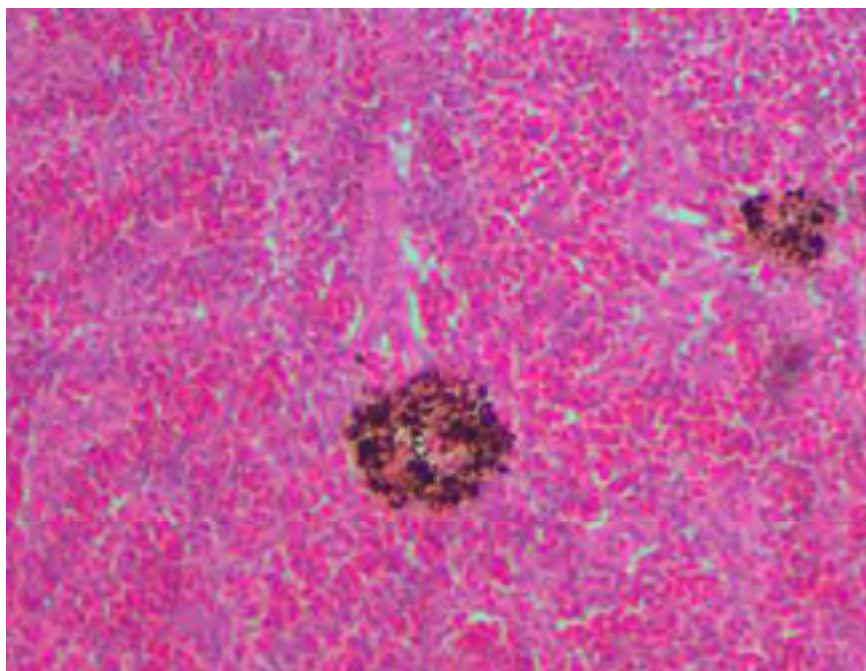
5.2.3. Αποτελέσματα

Στον Πίνακα 5.2.3.1. παρουσιάζεται η θνησιμότητα στις ομάδες του πειράματος. Παρατηρείται ότι η χρήση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης μείωσε τη μέση θνησιμότητα κατά 45% και 35% στις δύο ομάδες. Η ομάδα με την μεγαλύτερη μείωση στη μέση θνησιμότητα ήταν η ομάδα που έλαβε την μεγαλύτερη δόση 0,45 ml αιθέριου ελαίου ρίγανης /100 g τροφής. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι υπάρχει

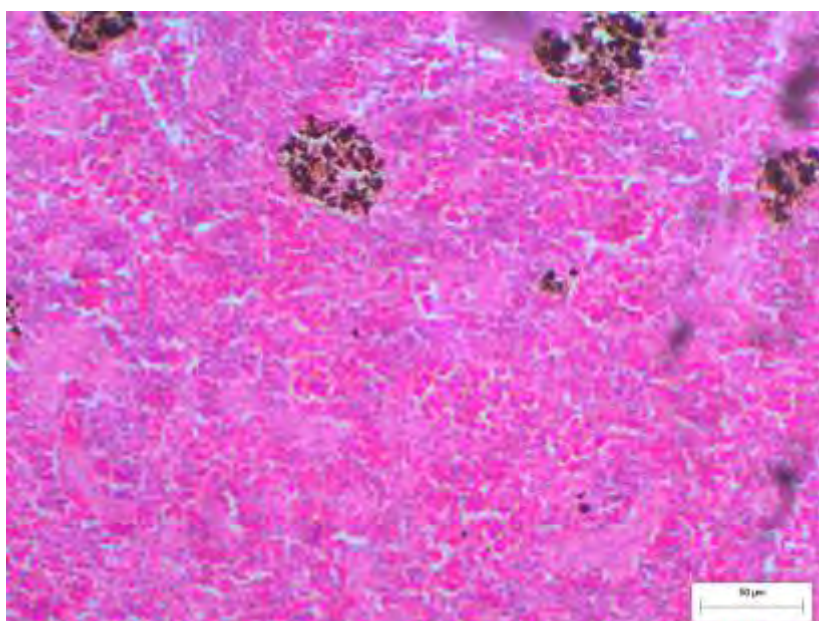
στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της δίαιτας χωρίς αιθέριο έλαιο ρίγανης και των διαιτών με αιθέριο έλαιο ρίγανης. ($P=0,014 < 0,05$).

Πίνακας 5.2.3.1.						
Θνησιμότητα λαβρακιών λόγω μικτής προσβολής						
	Ομάδα Α 0,9 ml/100 g 0,45 ml/100 g		Ομάδα Β 0,9 ml/100 g 0,25ml/100 g		Ομάδα Γ (μάρτυρας)	
	Δεξ.Α1	Δεξ.Α2	Δεξ.Β1	Δεξ.Β2	Δεξ.Γ1	Δεξ.Γ2
Αρχικός πληθυσμός λαβρακιών	20	20	20	20	20	20
Σύνολο νεκρών	1	0	2	3	11	8
% θνησιμότητα	5	0	10	15	55	40
Μέση % θνησιμότητα	2,5±3,53a		12,5±3,53a		47,5±10,6b	

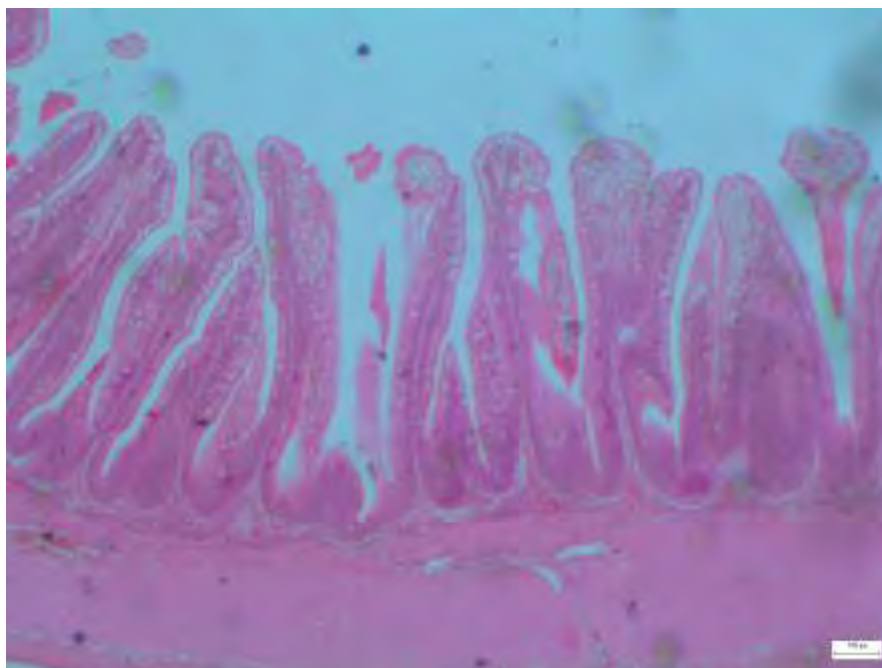
Στο τέλος του πειράματος έγιναν παρασιτολογικοί έλεγχοι βραγχίων σε όλες τις δεξαμενές και τις ομάδες όπου διαπιστώθηκε μείωση της προσβολής του παρασίτου στις δεξαμενές μάρτυρες, απουσία παρασίτου στις δεξαμενές της ομάδας Α (μεγαλύτερη δόση) και ελάχιστη παρουσία στις δεξαμενές Β (μικρότερη δόση αιθέριου ελαίου). Ενδεικτικές ιστολογικές τομές φαίνονται στις εικόνες 5.2.3.1-5.2.3.4. Δεν παρατηρούνται βλάβες στους ιστούς των λαβρακιών που έχουν λάβει τροφή με αιθέριο έλαιο.



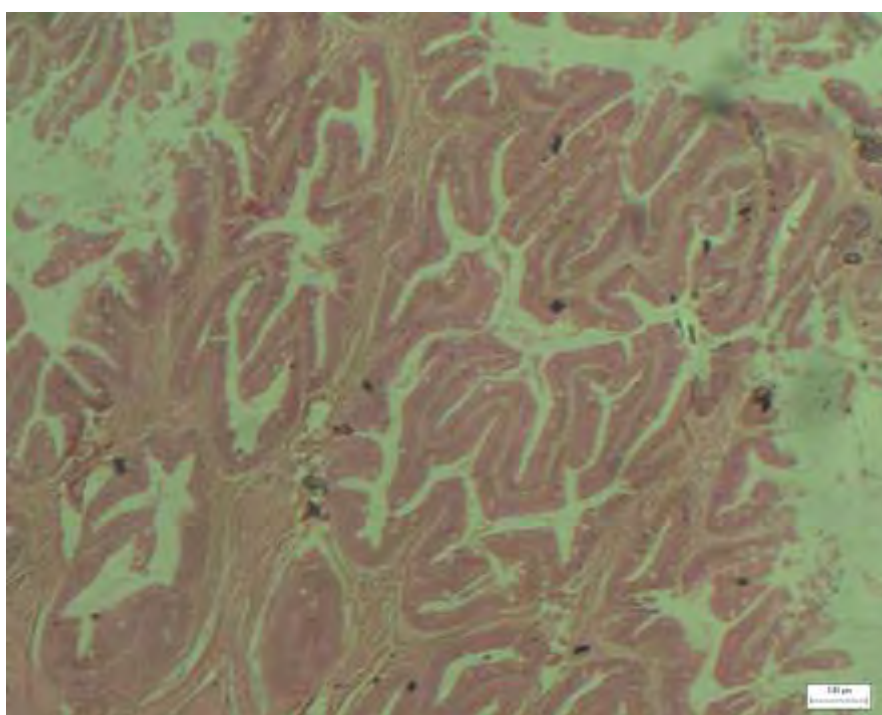
Εικόνα 5.2.3.1. Ιστολογική τομή σπλήνα λαβρακιού που έχει διατραφεί για 100 ημέρες με 1% αιθέριο έλαιο ρίγανης, H&E.



Εικόνα 5.2.3.2. Ιστολογική τομή σπλήνα λαβρακιού μάρτυρα, H&E, (μπάρα 50 μm).



Εικόνα 5.2.3.3. Ιστολογική τομή βραγχίων λαβρακιού που έχει διατραφεί για 100 ημέρες με 1% αιθέριο έλαιο ρίγανης, H&E, (μπάρα 100 μm).



Εικόνα 5.2.3.4. Ιστολογική τομή εντέρου λαβρακιού που έχει διατραφεί για 100 ημέρες με 1% αιθέριο έλαιο ρίγανης, H&E, (μπάρα 100 μm).

5.2.4. Συμπεράσματα

Η χρήση αιθέριου ελαίου ρίγανης, σε συγκέντρωση 0,25-0,9 ml/ 100g τροφής, σε λαβράκια που είχαν υποστεί μικτή φυσική προσβολή, από το κωπήποδο παράσιτο *Lernathropus kroyeri* και το ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο *Vibrio harveyi*, έχει ένα σημαντικό αντιπαρασιτικό-αντιβακτηριακό αποτέλεσμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

Συζήτηση

Το βακτήριο *Listonella anguillarum* είναι κύριο παθογόνο για τα λαβράκια στην Ελλάδα και προξενεί πολλές απώλειες στις ιχθυομονάδες. Στο πρώτο πείραμα του δευτέρου κεφαλαίου (Οξεία καταπόνηση), παρατηρείται ότι το βακτήριο *Listonella anguillarum* δεν εγκαθίσταται στο έντερο των λαβρακιών μετά από πειραματική μόλυνση με εμβάπτιση, χωρίς καταπόνηση, ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις βακτηρίου της τάξης του 10^7 CFU βακτηρίου/ml θαλασσινού νερού. Φαίνεται ότι η χημειοταξία, από μόνη της, στο χρονικό διάστημα των 30-35 λεπτών της ώρας που διαρκεί η εμβάπτιση, χωρίς καταπόνηση δεν είναι αρκετή. Μόνο στις δεξαμενές όπου τα λαβράκια καταπονήθηκαν, το βακτήριο *Listonella anguillarum* εγκαταστάθηκε στο έντερο αλλά και εισήλθε και στην κυκλοφορία του αίματος, προκαλώντας σηψαιμία.

Στο δεύτερο κεφάλαιο επίσης φάνηκε ότι όταν εμφανίστηκαν τα συμπτώματα 3 ημέρες μετά από μία πειραματική μόλυνση με *L. anguillarum* - το βακτήριο αυτό απομονώθηκε από το έντερο όλων των ψαριών που είχαν υποστεί μόλυνση, είτε παρουσίαζαν συμπτώματα είτε όχι. Δεν απομονώθηκε όμως από τον πρόνεφρο των φαινομενικά υγιών (ασυμπτωματικών) ψαριών που είχαν υποστεί πειραματική μόλυνση. Τρεις ημέρες μετά την πειραματική μόλυνση, το 30% των ψαριών έχει ασθενήσει και στα ασθενή αυτά ψάρια το υπεύθυνο βακτήριο απομονώνεται τόσο από τον πρόνεφρό τους όσο και από το έντερό τους.

Ο πρόνεφρος θεωρείται το κατ' εξοχήν όργανο δειγματοληψίας, όταν χρειάζεται να διαπιστωθεί η παρουσία ή απουσία βακτηριακού νοσήματος σε ψάρι. Όταν ένα ψάρι εμφανίσει τα συμπτώματα της νόσου που οφείλεται στο βακτήριο *L. anguillarum*, το βακτήριο αυτό απομονώνεται και από τον πρόνεφρο και από το έντερο.

Η χημειοταξική κινητικότητα έχειδειχθεί ότι είναι απαραίτητη για την μολυσματικότητα του *Listonella anguillarum*. Το *L. anguillarum* έλκεται προς τους βλεννογόνους του εντέρου των ψαριών με μεγαλύτερη χημειοταξική απόκριση. Ο

βλεννογόνο του εντέρου επηρεάζεται λιγότερο από την θερμοκρασία συγκριτικά με τους βλεννογόνους του δέρματος και των βραγχίων (Bordas et al., 1998).

Κάτω από συνθήκες καταπόνησης, ο χρόνος εμφάνισης ασθένειας από τη στιγμή που το παθογόνο έχει εγκατασταθεί στο έντερο, εξαρτάται από την ηλικία του ψαριού, την ανοσοποιητική του κατάσταση, την ένταση της καταπόνησης, τη θερμοκρασία και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες καθώς και τη συγκέντρωση και την λοιμογόνο ικανότητα του βακτηρίου. Στην πειραματική μόλυνση λαβρακιών, βάρους 5-8 g, με εμβάπτιση στο νερό και συγκέντρωση βακτηριδίου 10^6 , τα συμπτώματα της δονακίωσης εμφανίζονται 3 ημέρες μετά, την μόλυνση. Σε άλλη περίπτωση πειραματικής μόλυνσης, λαβρακιού 3 g, με εμβάπτιση σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις *L. anguillarum*, τα συμπτώματα της δονακίωσης εμφανίζονται σε λιγότερο από 18 ώρες και τα ποσοστά θνησιμότητας είναι μεγαλύτερα (προσωπικά πειράματα) .

Ένας από τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζει την εντερική μικροβιακή χλωρίδα είναι η μικροβιολογική ποιότητα του υδάτινου μικροπεριβάλλοντος. Στην περίπτωση των ψαριών υδατοκαλλιέργειας, αυτό είναι σημαντικό λόγω της υψηλής ιχθυοπυκνότητας που ευνοεί την διασπορά των βακτηρίων από το ένα ψάρι στο άλλο, μέσω του νερού.

Σε ένα από τα πειράματα που έγινε καλοκαιρινή περίοδο, φάνηκε ότι η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου των λαβρακιών αλλάζει ανάλογα με το περιβάλλον. Ενώ στην εντερική μικροχλωρίδα των λαβρακιών, που μόλις είχαν μεταφερθεί από τη μονάδα, εμφανίζονταν κυρίως τα βακτήρια *V. costicola* και ψευδομονάδες αλλά και τα βακτήρια *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* και *Aeromonas sobria*, έξι ημέρες μετά τη μεταφορά των ψαριών στις πειραματικές εγκαταστάσεις, με συνέπεια την αλλαγή του θαλάσσιου περιβάλλοντός τους, η σύσταση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας των ψαριών της ιχθυομονάδας φαίνεται να αλλάζει. Η αερομονάδα έχει εξαφανισθεί, και δύο νέα βακτήρια, το *Vibrio harveyi* και το *Vibrio splendidus*, που δεν υπήρχαν πριν, εμφανίζονται, το μεν πρώτο στο 53,20% των

ψαριών που εξετάστηκαν, το δε δεύτερο στο 36,6% των ψαριών. Τέσσερις ημέρες μετά από συγκεκριμένους χειρισμούς οξείας καταπόνησης, παρατηρούνται θνησιμότητες και τα βακτήρια που απομονώνονται από τον πρόνεφρο είναι το *Vibrio harveyi* και το *Vibrio splendidus*. Από το σύνολο των ημιθανών ψαριών, απομονώνεται το βακτήριο *Vibrio harveyi* ενώ το *Vibrio splendidus* απομονώνεται από το 20% των ψαριών. Τα δύο αυτά βακτήρια, που υπήρχαν στη χλωρίδα του εντέρου, φαίνεται ότι πιθανόν διαπέρασαν το φραγμό του εντέρου και προκάλεσαν σηψαιμία, υπόθεση που βασίζεται και στα αποτελέσματα των πειραμάτων πειράματα των Jutfelt et al., 2006, που συμφωνούν με την υπόθεση αυτή.

Το βακτήριο *Vibrio harveyi* φαίνεται ότι είναι ένα από τα κυρίαρχα είδη της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας και είναι από τα πρώτα βακτήρια που απομονώνονται σε παθολογικές καταστάσεις που δημιουργούνται λόγω οξείας καταπόνησης στη διάρκεια του καλοκαιριού και στις αρχές φθινοπώρου τα τελευταία χρόνια. Η κυριαρχία ενός δυνητικά παθογόνου βακτηρίου στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των λαβρακιών φαίνεται ότι εγκυμονεί κινδύνους εμφάνισης νοσημάτων, όταν πρόκειται να γίνουν χειρισμοί που προκαλούν καταπόνηση (συλλογή, διαλογή, εμβολιασμός, μεταφορές).

Κατά την διάρκεια της, επί 12 εβδομάδες, παρακολούθησης της υγείας λαβρακιών, μπορούμε να υποθέσουμε κατ' αρχάς ότι το βακτήριο *Listonella anguillarum* υπήρχε στα νερά της ιχθυομονάδας και εισήλθε στο έντερο, το δέρμα και τα βράγχια κάποιων ψαριών, ίσως και λόγω χημειοταξίας. Αυτό συνέβη όταν ήταν ακόμα στην μονάδα, πριν την μεταφορά, οπότε υπήρχαν μερικά λαβράκια, φαινομενικά υγιή, φορείς του βακτηρίου. Στο γεγονός αυτό συνηγορεί η εμφάνιση δονακίωσης και στη μονάδα. Επίσης τα αποτελέσματα των πειραματικών μολύνσεων, που αναφέρθηκαν παραπάνω, δείχνουν ότι είναι δυνατόν να υπήρχε παρουσία του βακτηρίου *L.anguillarum* στο έντερο λαβρακιών, που ήταν φαινομενικά υγιή. Η διαφορά έγκειται στο χρόνος εμφάνισης. Στην περίπτωση της μονάδας, από όπου αγοράσθηκαν τα λαβράκια, τα ψάρια εμφάνισαν τη δονακίωση

δύο εβδομάδες μετά την ημέρα της συλλογής. Πιθανόν να συνέβη και κάποιο άλλο γεγονός κατά τη διάρκεια αυτών των δύο εβδομάδων ή αυτός καθαυτός ο χειρισμός, της συλλογής στον κλωβό, να ήταν αρκετός να προκαλέσει καταπόνηση και προσβολή των λαβρακιών από το βακτήριο *L.anguillarum*, αν και στα πειράματα η επίδραση της καταπόνησης φαίνεται πιο γρήγορα. Δηλαδή, ο χρόνος των 2 εβδομάδων από τη συλλογή των ψαριών μέχρι την εμφάνιση της δονακίωσης στη μονάδα φαίνεται μεγάλος, αν και μερικές φορές τα αποτελέσματα της καταπόνησης δεν είναι άμεσα εμφανή. Σύμφωνα με τους Stoskopf, 1993 και Noga, 2000, εξάρσεις ασθενειών μπορούν να λάβουν χώρα 2-14 ημέρες μετά από ένα έντονο γεγονός καταπόνησης και έτσι μπορεί να εξηγηθεί το περιστατικό της εμφάνισης της δονακίωσης στη μονάδα 14 ημέρες μετά την καταπόνηση.

Στην περίπτωση των λαβρακιών που μεταφέρθηκαν στις πειραματικές εγκαταστάσεις, έχουμε ταχύτατη εμφάνιση συμπτωμάτων δονακίωσης, μέσα σε 18 ώρες από την μεταφορά, διότι εκτός από την καταπόνηση της συλλογής, της μεταφοράς και της αλλαγής περιβάλλοντος, τα ψάρια υπέστησαν και τραυματισμό του βλεννογόνου, που κάνουν αφενός την καταπόνηση πιο έντονη, αφετέρου δημιουργούν πύλες εισόδου βακτηρίων. Αυτό συμφωνεί και με τα αποτελέσματα των Svendsen και Bogwald, 1997, που δείχνουν ότι ο βλεννογόνος του σολομού του Ατλαντικού αποτελεί ένα σοβαρό εμπόδιο για το βακτήριο *L.anguillarum*.

Στην περίπτωση όλων των δειγμάτων ψαριών στις πειραματικές εγκαταστάσεις που έχουν παρουσιάσει συμπτώματα δονακίωσης, σε ποσοστό 1,5% την τρίτη ημέρα από την έναρξη των συμπτωμάτων, παρατηρείται ότι το βακτήριο *Listonella anguillarum* απομονώνεται ως κυρίαρχο είδος και από τον πρόνεφρο αλλά και από το έντερό τους.

Κάποια λαβράκια, σε ποσοστό 10% των φαινομενικά υγιών, από τον πληθυσμό που έχει παρουσιάσει συμπτώματα δονακίωσης, αποδεικνύεται, μέσω της καλλιέργειας, ότι φέρουν το βακτήριο, εκτός από το έντερο, και στον πρόνεφρό τους. Αυτό σημαίνει ότι το βακτήριο έχει μπει στην κυκλοφορία του αίματός τους και είναι

θέμα ωρών να εμφανίσουν και συμπτώματα. Ίσως να υπάρχει ένα χρονικό στάδιο στην εξέλιξη της νόσου, όπου το βακτήριο μόλις έχει εισβάλλει στην κυκλοφορία του αίματος του ψαριού και τα συμπτώματα δεν έχουν προλάβει να εμφανιστούν. Επίσης κάποια λαβράκια υγιά δεν φέρουν το βακτήριο στο έντερό τους, ενώ βρίσκονται στο ίδιο περιβάλλον με τα ασθενή, πιθανόν γιατί δεν έχουν προλάβει να μολυνθούν ή διότι υπεισέρχονται άλλοι παράγοντες που εμποδίζουν τον αποικισμό.

Οκτώ εβδομάδες μετά την έναρξη της δονακίωσης, το βακτήριο *L. anguillarum* έχει εξαφανιστεί από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα των λαβρακιών και ένα άλλο βακτήριο το *Vibrio harveyi* εμφανίζεται να κυριαρχεί στο έντερο σε ποσοστό 66,6% των ψαριών που εξετάστηκαν. Τέσσερις ημέρες μετά από χειρισμό συλλογής, διαλογής και μεταφοράς σε άλλες δεξαμενές εμφανίζεται πάλι θνησιμότητα. Η μικροβιολογική εξέταση έδειξε πάλι το βακτήριο *Vibrio harveyi* να υπάρχει στην κυκλοφορία του αίματος, γι αυτό και απομονώνεται από τον πρόνεφρο όλων των ψαριών. Το *V.harveyi* εξακολουθεί και κυριαρχεί στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα των ψαριών 20 ημέρες μετά την εμφάνιση θανάτων.

Η βακτηριακή μετανάστευση από το έντερο είναι μια σύνθετη διαδικασία όπου η ενδογενής εντερική μικροβιακή χλωρίδα μεταναστεύει (Finlay and Falkow, 1997) και είναι ένα σπουδαίο φαινόμενο στην παθογένεση των ευκαιριακών λοιμώξεων από τα ενδογενή εντερικά βακτήρια.

Κατά την μικροβιολογική εξέταση πρόνεφρου και εντέρου κατά την διάρκεια περιστατικού δονακίωσης σε άλλη ιχθυομονάδα, επτά ημέρες μετά την εμφάνιση κρουσμάτων, παρατηρείται για δεύτερη φορά το φαινόμενο ασυμπτωματικά λαβράκια να έχουν το υπεύθυνο για την δονακίωση βακτήριο *L.anguillarum* στο έντερό τους και όχι στον πρόνεφρο, ενώ τα ασθενή να έχουν το βακτήριο και στα δύο όργανα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με αυτά της εργασίας των Grisez et al, 1997, όπου αναφέρεται ότι όταν το βακτήριο *Listonella anguillarum* κυριαρχεί στο έντερο των λαρβών λαβρακιού, μπορεί να συμβούν περιστατικά δονακίωσης.

Στην πειραματική μόλυνση με τα μικρά λαβράκια, ο μικροοργανισμός εγκαταστάθηκε στο έντερο και στον πρόνεφρο γιατί δημιουργήθηκε καταπόνηση κατά τη διάρκεια των μεταφορών, από τις δεξαμενές διαβίωσης των ψαριών στη δεξαμενή μόλυνσης και από τη δεξαμενή μόλυνσης ξανά στις δεξαμενές διαβίωσης. Τα αποτελέσματα τόσο των πειραματικών μολύνσεων αλλά και των φυσικών μολύνσεων υποδεικνύουν ότι το έντερο μπορεί να είναι η πρωτογενής εντόπιση της *L.anguillarum* στο λαβράκι στις μολύνσεις που συνοδεύονται από καταπόνηση και ότι μπορεί να συμβαίνει επίσης και αποικισμός του βλεννογόνου του δέρματος, των πτερυγίων και των βραγχίων. Το ίδιο παρατηρήθηκε με την *Aeromonas salmonicida* στο σολομό του Ατλαντικού (Hiney et al, 1994). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τις εργασίες των Ranson, 1978, Ransom et al., 1984 όπου έχειδειχθεί ότι η μόλυνση ενός ψαριού ξενιστή με *L. anguillarum* ξεκινά με τον αποικισμό της οπίσθιας γαστρεντερικής οδού και του απευθυσμένου, διότι το *L.anguillarum* απομονώθηκε από αυτές τις θέσεις κατά την διάρκεια έναρξης της μόλυνσης στους σολομούς. Οι Horne και Baxendale, 1983, έδειξαν ότι τα βακτηριακά κύτταρα του *V.anguillarum* προσκολλώνται στο έντερο της πέστροφας. Σε μια εργασία από τους Olsson et al., 1996, δείχνεται ότι η γαστρεντερική οδός είναι η καλλίτερη θύρα εισόδου κατά την μόλυνση με *V.anguillarum* στο καλκάνι. Αφού αποικίσουν τα βακτηριακά κύτταρα του *V.anguillarum* τη γαστρεντερική οδό των ψαριών, διαπερνούν το επιθήλιο και προκαλούν μια συστηματική μόλυνση (Bordas et al., 1998).

Η εμφάνιση δονακίωσης οφειλόμενης στο βακτήριο *Listonella anguillarum* είναι γνωστό ότι σχετίζεται με την καταπόνηση (Boggs et al, 2002). Στις πειραματικές αυτές μολύνσεις με εμβάπτιση -και για το χρονικό διάστημα που διαρκεί η επαφή των λαβρακιών με το βακτήριο *L. anguillarum*-, φαίνεται ότι είναι ουσιώδης παράγοντας η καταπόνηση της συλλογής για την πρόκληση μόλυνσης.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η καταπόνηση της συλλογής και μεταφοράς μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση νοσημάτων στα

ψάρια, είτε γιατί δίνει την ευκαιρία σε βακτήρια κύρια παθογόνα, που υπάρχουν στο θαλασσινό νερό, να εισβάλλουν στο έντερο και από το έντερο στην κυκλοφορία του αίματος, όπως είναι η περίπτωση με το *L.anguillarum*, είτε γιατί επιτρέπει σε κυρίαρχα βακτηρίδια της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας, ευκαιριακά παθογόνα, όπως είναι η περίπτωση του *V.harveyi*, να μεταναστεύσουν και να εισβάλλουν στην κυκλοφορία του αίματος, δημιουργώντας νοσήματα.

Ο χρόνος εμφάνισης των νοσημάτων εξαρτάται από την ένταση της καταπόνησης και τα είδη των βακτηρίων που κυριαρχούν στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα. Στην περίπτωση με το βακτήριο *V.harveyi*, φάνηκε σε δύο πειράματα, να μεσολαβούν 4 ημέρες από την πρόκληση καταπόνησης μέχρι την εμφάνιση θνησιμότητας. Η παρουσία βακτηρίων, δυνητικά παθογόνων, που είναι κυρίαρχα στο έντερο, αποτελεί δείκτη επικινδυνότητας για εμφάνιση νοσημάτων, όταν πρόκειται να ακολουθήσουν χειρισμοί που προκαλούν καταπόνηση στα ψάρια. Επειδή στην εντατική υδατοκαλλιέργεια είναι αδύνατον να αποφύγουμε τέτοιους χειρισμούς, η εξέταση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας μπορεί να μας δώσει στοιχεία χρήσιμα για την εκτέλεση ή αναβολή τέτοιων χειρισμών ή ακόμα για την έγκαιρη και σωστή προετοιμασία σε περιπτώσεις εξάρσεων νοσημάτων.

Στο πρώτο πείραμα του τρίτου κεφαλαίου υπάρχει χρόνια καταπόνηση λόγω υποξίας. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική θνησιμότητα λόγω υποξίας. Η χαμηλότερη συγκέντρωση οξυγόνου $2,9 \pm 0,2$ ppm ήταν ανεκτή από τα ψάρια. Κάποια μικρή θνησιμότητα που παρατηρήθηκε, ήταν τυχαία μεταξύ των δεξαμενών και στις δύο ακραίες συγκεντρώσεις οξυγόνου. Τα ψάρια παρουσιάζουν μια τάση προσαρμογής. Φαίνεται όμως ότι, σε συνθήκες υποξίας και ίσως όχι μόνον, ευνοείται ο αποικισμός της εντερικής χλωρίδας από δυνητικά παθογόνα βακτηριακά είδη, όπως το *Vibrio harveyi*. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με το γεγονός ότι το βακτήριο αυτό αναπτύσσεται στο θαλασσινό νερό καλύτερα όταν η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου βρίσκεται στα όρια από 0,5-7,8 mg/L, όπως αναφέρουν οι Phianphak et al, 2005. Η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου είναι βέλτιστη για την

σύνθεση της λουσιφεράσης σε κάποια βακτήρια μεταξύ των οποίων και για το *V.harveyi* (Nealson et al., 1977b).

Ο μηχανισμός του αποικισμού του εντέρου των ψαριών από το βακτήριο *V.harveyi* δεν έχει μελετηθεί. Πιθανόν να παίζει ρόλο η ιδιότητα του συστήματος ενδοβακτηριδιακής επικοινωνίας (quorum sensing) να ενεργοποιεί γονίδια υπεύθυνα για τον αποικισμό του εντέρου. Το ίδιο συμβαίνει και σε άλλα βακτήρια (*V.cholerae*, EHEC *E.coli*) που διαθέτουν τέτοια συστήματα ενδοεπικοινωνίας (Sperandio et al., 2003). Στο πείραμα αυτό έχουμε στην ομάδα μάρτυρα ελαφρά υπεροξυγόνωση 126,1% η οποία δεν δημιούργησε προβλήματα στα ψάρια. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με μελέτες που έχουν ήδη δείξει ότι υπεροξυγόνωση μέχρι 150% δεν επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημα και την αύξηση του λαβρακιού (Saroglia et al., 1995; Scapigliati et al., 1999; Cecchini and Caputo, 2003). Στην βιβλιογραφία επίσης αναφέρεται ότι μακράς διάρκειας υποξία (3,2 mg/l O₂) δεν επηρεάζει τις φυσιολογικές παραμέτρους, μεταξύ των οποίων και την κορτιζόλη (Pichavant et al., 2001).

Στην περίπτωση της πειραματικής πρόκλησης οξείας καταπόνησης σε λαβράκια που διαβιούν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυγόνου, φαίνεται ότι στη χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου δεν προκλήθηκε αύξηση αλλά μείωση στο ολικό αερόβιο μικροβιακό φορτίο της εντερικής χλωρίδας των λαβρακιών συγκριτικά με την κανονική συγκέντρωση οξυγόνου. Αυτό φαίνεται ότι συμβαίνει λόγω του χαμηλότερου βάρους που έχουν τα λαβράκια αυτής της ομάδας που εκτράφηκαν στις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου συγκριτικά με των άλλων ομάδων. Μείωση της αύξησης του λαβρακιού με το επίπεδο του διαλυμένου οξυγόνου έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (Pichavant, et al. 2001; Thetmeyer et al. 1999). Στη συγκεκριμένη περίπτωση το ολικό αερόβιο βακτηριακό φορτίο είναι πέντε φορές μικρότερο από το αντίστοιχο στην κανονική συγκέντρωση οξυγόνου. Το μεγαλύτερο ποσοστό βακτηριακής προσβολής στην κανονική συγκέντρωση οξυγόνου οφείλεται πιθανόν στο μεγαλύτερο βάρος των ψαριών αυτής της ομάδας, που υπέστησαν

προφανώς μεγαλύτερη καταπόνηση στη διάρκεια των χειρισμών, λόγω μεγαλύτερου συνωστισμού στην μικρή δεξαμενή. Εδώ αναδεικνύεται ο σημαντικός ρόλος της ιχθυοπυκνότητας που είναι σημαντικότερος από την εκτροφή σε χαμηλό οξυγόνο, όπως αποδεικνύεται από την θνησιμότητα που παρατηρείται μετά από έντονη καταπόνηση σε αυτό το πείραμα. Η επίδραση της μεγαλύτερης ιχθυοπυκνότητας άλλωστε από μόνη της προκαλεί μεγαλύτερη αντίδραση καταπόνησης στην τιλάπια *Oreochromis niloticus* (L.) (Barcellos et al., 1999).

Επίσης ένας άλλος παράγοντας καταπόνησης φαίνεται ότι είναι η αλλαγή περιβάλλοντος, η οποία όταν συνδυάσθηκε με την καταπόνηση των χειρισμών αύξησε τις θνησιμότητες στη μεσαία και την κανονική συγκέντρωση οξυγόνου και προκάλεσε μεγάλη θνησιμότητα και στη χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου. Άλλωστε και στα προηγούμενα πειράματα στο κεφάλαιο 2, η ταυτόχρονη πρόκληση καταπόνησης σε συνδυασμό με την αλλαγή περιβάλλοντος (από τη μονάδα στο εργαστήριο ή από τις τσιμεντένιες δεξαμενές σε άλλες) είχαν σαν αποτέλεσμα θνησιμότητα από προσβολή βακτηρίων που προϋπήρχαν φυσιολογικά στο έντερο. Τα συγκεκριμένο βακτηριακό είδος *Vibrio harveyi*, κάτω από συνθήκες οξείας καταπόνησης, έχει την δυνατότητα να εισβάλλει στην κυκλοφορία του αίματος και να προκαλεί θνησιμότητα, όπως δείχθηκε στο δεύτερο κεφάλαιο της διατριβής αυτής.

Στο πείραμα των διαφορετικών συγκεντρώσεων οξυγόνου και ροής βλέπουμε ότι το βακτηριακό φορτίο του εντέρου των λαβρακιών επηρεάζεται από την χαμηλή ποιότητα του νερού εκτροφής και αυξάνεται όταν η ποιότητα του νερού, από άποψη συνδυασμού οξυγόνου και ροής, είναι υποβαθμισμένη. Οι παρατηρούμενοι άμεσοι θάνατοι, κάτω από πειραματικές συνθήκες καταπόνησης, πιθανόν να οφείλονται στη μείωση της ανοχής των λαβρακιών στην οξεία καταπόνηση όταν η ποιότητα του νερού είναι υποβαθμισμένη. Ένας άλλος λόγος των άμεσων θανάτων πιθανόν να είναι η απώλεια ιόντων, λόγω της σοβαρής καταπόνησης όπως αναφέρουν οι McDonald and Milligan, 1997. Τα ευρήματα δείχνουν επίσης ότι κάποια είδη χρόνιας καταπόνησης μπορεί να μειώνουν την ικανότητα των ψαριών να αντεπεξέρθουν σε

επιπρόσθετους παράγοντες καταπόνησης σύμφωνα με τους Barton et al., 1987. Αυτό ισχύει και για το πείραμα 3.2, όπου κι εκεί παρατηρούνται άμεσοι θάνατοι στα λαβράκια που διαβιούν στη χαμηλότερη συγκέντρωση οξυγόνου.

Στο πείραμα 3.3, που διήρκεσε 3 μήνες, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην αύξηση του βάρους των ψαριών μεταξύ των δύο ομάδων. Αντίθετα, στο πείραμα 3.2, που κράτησε 8 εβδομάδες, μετά από εκτροφή ενός μήνα στις συνθήκες χαμηλών συγκεντρώσεων οξυγόνου, παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στην αύξηση του βάρους των λαβρακιών, Εδώ παίζει ρόλο και η θερμοκρασία που ήταν χαμηλότερη (ανοιξιάτικη περίοδος) στο πείραμα 3.3 με αποτέλεσμα να είναι μειωμένη και η κατανάλωση τροφής και στις δύο ομάδες. Το αερόβιο βακτηριακό φορτίο της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας των λαβρακιών, στο πείραμα 3.3, της ομάδας που εκτράφηκε με υποβαθμισμένη ποιότητα νερού (ταυτόχρονα χαμηλές συγκεντρώσεις ροής και οξυγόνου) αυξήθηκε συγκριτικά με τους μάρτυρες. Αντίθετα, στο πείραμα 3.2, το αερόβιο βακτηριακό φορτίο της εντερικής βακτηριακής χλωρίδας μειώθηκε, συγκριτικά με τους μάρτυρες, σε συνθήκες εκτροφής με ιδιαίτερα χαμηλό οξυγόνο 2,2 ppm O₂ και αυτό συνέβη γιατί η πρόσληψη τροφής ήταν μειωμένη συγκριτικά με το μάρτυρα. Εάν ο παράγοντας βιομάζα ήταν σταθερός σε όλες τις ομάδες, κατά την οξεία καταπόνηση, στο πείραμα 3.2, θα μπορούσαμε να μελετήσουμε το ρόλο της μειωμένης συγκέντρωσης οξυγόνου στην οξεία καταπόνηση. Το πιθανότερο αποτέλεσμα θα ήταν να μην υπάρχουν διαφοροποιήσεις.

Αρκετοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει το αιθέριο έλαιο της ρίγανης για θεραπευτικούς λόγους στην εκτροφή ζώων. Οι Giannenas et al., 2003, έδειξαν σε πείραμα διάρκειας 42 ημερών, ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης είχε δράση εναντίον του παρασίτου *Eimeria tenella*, όταν είχε προστεθεί στην τροφή των ορνιθίων, σε αναλογία 300 mg αιθέριου ελαίου ρίγανης /kg τροφής . Οι Athanassopoulou et al., 2004, χρησιμοποίησαν ημερήσια δόση 12 ml διαλύματος αιθέριου ελαίου ρίγανης 5%, ανά 5 Kg σωματικού βάρους σε μυτάκια (*Puntazzo puntazzo*) 20 γραμμαρίων

για 70 ημέρες (δηλαδή 120 μl αιθέριου ελαίου ρίγανης ανά κιλό σωματικού βάρους) και μείωσαν την θνησιμότητα από την προσβολή μυξοσποριδίων παρασίτων από 10% (στους μάρτυρες) σε 3 %. Οι Preuss et al., 2005, έδειξαν ότι η επί 30 ημέρες χρήση 4 μl αιθέριου ελαίου ρίγανης /15-20 g σωματικού βάρους, δηλαδή 200 μl /Kg σωματικού βάρους, στην διατροφή ποντικών μείωσε την θνησιμότητά τους κατά 50%, συγκριτικά με τους ποντικούς μάρτυρες, όταν μολύνθηκαν πειραματικά με *Staphylococcus aureus*. Στην παρούσα διατριβή το ποσοστό 1% του αιθέριου ελαίου που χρησιμοποιήσαμε στο πείραμα με τα λαβράκια των 150 γραμμαρίων αντιστοιχεί σε δόση περίπου 100 μl -150 μl / Kg σωματικού βάρους, ενώ για τα λαβράκια των 30 γραμμαρίων η δόση υπολογίστηκε στα 150 μl -200 μl / Κιλό σωματικού βάρους. Η προσθήκη 3- 5% αιθέριο έλαιο ρίγανης στην τροφή των ιχθυδίων τσιπούρας δεν ευνόησε την πρόσληψη τροφής, μείωσε την αύξησή τους αλλά παρόλα αυτά δεν προκάλεσε αλλοιώσεις στους ιστούς τους.

Η προσθήκη 5% αιθέριου ελαίου ρίγανης, για 14 ημέρες στην τροφή, διαφοροποίησε πολύ λίγο τα ποσοστά θνησιμότητας στην πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Άρα η μέγιστη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου ρίγανης που μπορούμε να δοθεί στην τροφή δεν μπορεί να υπερβαίνει το 1%, διότι δημιουργείται πρόβλημα στην αύξηση των ψαριών. Αυτό συμβαίνει διότι η αυξημένη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου ρίγανης στην τροφή την καθιστά ανεπιθύμητη στα ψάρια. Για το λόγο αυτό είναι αναγκαία και η προσθήκη ιχθυελαίου 1-2% (με αντίστοιχη μείωση στο λίπος της τροφής) η οποία πέρα από ότι δίνει την δυνατότητα ανάμιξης του αιθέριου ελαίου με την τροφή, βελτιώνει την γεύση ακόμα και όταν η συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου είναι 1%. Επίσης από τα πειράματα του πέμπτου κεφαλαίου φαίνεται ότι για να εξασφαλίζεται η αντιπαρασιτική δράση, η συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου ρίγανης στην τροφή πρέπει να είναι της τάξης του 0,9-1%. Βέβαια το αιθέριο έλαιο ρίγανης δεν είναι πανάκεια για όλα τα παράσιτα, αλλά για τα συγκεκριμένα που αναφέρθηκαν είναι μια λύση που δεν επιβαρύνει το περιβάλλον ούτε τα ψάρια με τοξικές ουσίες. Εκείνο που

φαίνεται είναι ότι απαιτείται ένα χρονικό διάστημα χορήγησης του αιθέριου ελαίου στο λαβράκι (μεγαλύτερο από 40 ημέρες) για να υπάρξει διαφορά στα ποσοστά επιβίωσης, λόγω της μόλυνσης από το βακτήριο *Listonella anguillarum*. Αυτό φαίνεται και σε πειράματα άλλων ερευνητών (Zheng et al., 2009) όπου χρειάστηκε η χρήση του για τουλάχιστον 8 εβδομάδες για να μειωθεί η θνησιμότητα των ψαριών στην πειραματική προσβολή από το βακτήριο *Aeromonas hydrophila*. Πιθανόν αυτό να έχει να κάνει με την ενίσχυση του ανοσολογικού συστήματος, λειτουργία που απαιτεί χρόνο. Βέβαια στο πείραμα με τη μικτή μόλυνση από το κωπήποδο *Lernathropus kroyeri* και το *Vibrio harveyi* χρειάστηκαν 45 ημέρες για τη θεραπεία, αλλά αυτό πιθανόν να έγινε γιατί εξαλείφθηκε σε αυτό το χρονικό διάστημα το παράσιτο που ήταν και το πρωτογενές αίτιο. Το βακτήριο *Vibrio harveyi* ήταν ευκαιριακό.

Στην τσιπούρα, χορήγηση αιθέριου ελαίου ρίγανης για 40 ημέρες ήταν αρκετές για να εξαλείψουν το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* από την εντερική χλωρίδα και 67 ημέρες (50 ημέρες πριν την μόλυνση και 17 ημέρες μετά την μόλυνση), ήταν αρκετές για να υπάρξει καθυστέρηση στην εξέλιξη της νόσου της παστερέλλωσης.

Η χρήση του αιθέριου ελαίου ρίγανης, κατά την καλοκαιρινή περίοδο, έδωσε καλύτερα αποτελέσματα στην επιβίωση του λαβρακιού από τη πειραματική μόλυνση με το βακτήριο *Listonella anguillarum*. Αυτό πιθανόν να συμβαίνει διότι το καλοκαίρι που οι θερμοκρασίες είναι μεγαλύτερες, το ανοσοποιητικό σύστημα του λαβρακιού ανταποκρίνεται καλύτερα.

Η βακτηριακή σύσταση του εντέρου των λαρβών επηρεάζεται από τα βακτήρια του περιβάλλοντος και της τροφής. Στα νεαρά και ενήλικα θαλασσινά ψάρια, η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου κυριαρχείται από δονάκια (Newman et al., 1972; Muroga et al., 1987). Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με αυτήν την εργασία.

Κατά την διάρκεια των 17 ημερών μετά την πειραματική μόλυνση των ψαριών με το βακτηρίδιο *P. damsela* subsp. *piscicida* σημειώθηκε ένας μόνο θάνατος στην ομάδα που δεν είχε αιθέριο έλαιο ρίγανης στο διαιτολόγιό της. Ο λόγος ήταν ότι η ηλικία ευαισθησίας στο βακτήριο για τα ιχθύδια τσιπούρας είχε παρέλθει.

Ο αιμοποιητικός ιστός είναι μία πολύ συνήθης θέση βακτηριακού αποικισμού. Οι οργανισμοί που προκαλούν χρόνια κοκκιώματα σχηματίζουν χαρακτηριστικές αλλοιώσεις στο σπλήνα που περιλαμβάνουν ένα κέντρο μελανομακροφάγων στα πρώιμα στάδια αλλά αργότερα το κέντρο μπορεί να υποστεί νέκρωση και οι μεγάλες λευκές νεκρωμένες μάζες, περιβαλλόμενες από ινοβλαστικό στρώμα, δημιουργούν γενικευμένη ίνωση στον αιμοποιητικό ιστό.

Η χρήση αιθέριου ελαίου 1% στη διατροφή των ιχθυδίων τσιπούρας, ενώ δεν επηρέασε την παρουσία του βακτηρίου *Vibrio alginolyticus* στο έντερό τους, φαίνεται ότι συνέβαλε στην εξάλειψη του *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* από το έντερό τους. Το βακτήριο αυτό βρίσκεται πολύ συχνά στο έντερο της τσιπούρας όσο και του λαβρακιού. Η παρουσία του στο έντερο δεν είναι ο μόνος παράγοντας για την εμφάνιση νοσήματος. Οι καταστάσεις καταπόνησης (περιβαλλοντικές συνθήκες, χειρισμοί, κακή διαχείριση) και η κατάσταση του ανοσολογικού συστήματος είναι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την εμφάνιση νοσημάτων. Ανάλογα πειράματά μας με το λαβράκι δεν είχαν ως αποτέλεσμα την εξάλειψη του βακτηρίου *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα. Υπάρχει μια επιλεκτική εξάλειψη από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα της τσιπούρας. Σε άλλο πείραμα, μετά από έλεγχο της εντερικής μικροχλωρίδας τσιπούρας, μέσου βάρους 100 g, διαπιστώθηκε η απουσία του αναφερόμενου βακτηρίου στην αρχή. Έγινε πειραματικός αποικισμός της εντερικής μικροχλωρίδας σε δύο ομάδες τσιπούρας (2 δεξαμενές κάθε ομάδα) με το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, που προερχόταν από έντερο λαβρακιού. Η μία ομάδα τρεφόταν με εμπορική τροφή με ιχθυέλαιο και η άλλη με εμπορική τροφή με ιχθυέλαιο και 1% αιθέριο έλαιο ρίγανης. Ο τεχνητός αποικισμός που έγινε με

μεταφορά των ψαριών σε δεξαμενή με το βακτήριο και στη συνέχεια επαναφορά στις αρχικές δεξαμενές, ήταν επιτυχής σε όλες τις δεξαμενές και τις ομάδες και διαπιστώθηκε με εξέταση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας. Πενήντα πέντε ημέρες μετά τον αποικισμό, στην εξέταση της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* υπήρχε σε όλες τις τσιπούρες. Σε αυτή την περίπτωση, το αιθέριο έλαιο της ρίγανης δεν εξάλειψε το πειραματικά εισερχόμενο βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα της τσιπούρας. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι το να προσπαθεί κανείς να μιμηθεί την φύση δεν είναι εύκολο. Η αποτυχία εξάλειψης του, πειραματικά εισερχόμενου, βακτηρίου από το αιθέριο έλαιο πιθανόν να οφείλεται στο ότι ήταν πειραματικός και όχι φυσικός αποικισμός ή στο γεγονός ότι το βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε για τον αποικισμό δεν είχε μεγάλη λοιμογόνο δύναμη (προερχόταν από έντερο λαβρακιού).

Ένα πλεονέκτημα των αιθέριων ελαίων ως προς τα αντιβιοτικά μπορεί να είναι ότι τα βακτηρίδια δεν αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στα αιθέρια έλαια (Hitokoto et al., 1980). Επιπρόσθετα κάποια αιθέρια έλαια, όπως της ρίγανης, ενισχύουν την ανοσολογική λειτουργία. Τα κύρια συστατικά της ρίγανης με αντιβακτηριακές ιδιότητες είναι δύο φαινόλες (καρβακρόλη και θυμόλη). Οι φαινόλες είναι αντισηπτικές ουσίες. Η ρίγανη και το θυμάρι (το οποίο περιέχει θυμόλη) χρησιμοποιήθηκαν για χιλιετίες σαν αποτελεσματικά φυτοθεραπευτικά.

Στη διάρκεια αυτής της διατριβής δεν εξαντλήθηκε το θέμα των ιδιοτήτων του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, ως προς την χρήση του στην ιχθυοκαλλιέργεια. Φαίνεται όμως ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης κάνει τα ψάρια της ιχθυοκαλλιέργειας υγιέστερα, χωρίς να τα επιβαρύνει. Επίσης η προσθήκη 1% αιθέριου ελαίου ρίγανης δεν αλλάζει την γεύση τους (δοκιμή ψαριών από καταναλωτές).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

Βιβλιογραφία

- Allen, D.A., Austin, B. and Colwell, R.R., 1983. Numerical Taxonomy of bacterial isolates associated with fresh water fishery. *Journal of General Microbiology* 129: 2043-2062.
- Alsina, M. and Blanch, A.R., 1994a. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 79-85.
- Alsina, M. and Blanch, A.R., 1994b. Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 719-721.
- Alvarez, J.D, Austin, B., Alvarez, A.M. and Reyes, M., 1998. *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. *Journal of Fish Diseases* 21: 313–316.
- Amaro, C., Biosca, E.G., Esteve, C., Fouz, B., Toranzo, A.E., 1992. Comparative study of phenotyping and virulence properties in *Vibrio vulnificus* biotype 1 and 2 obtained from a European eel farm experiencing mortalities. *Diseases of Aquatic Organisms* 13: 29-35.
- Amaro, C. and Biosca, E.G., 1996. *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1454-1457.
- Αναπτυξιακή Εταιρία Δυτικής Μακεδονίας, 2000. Μελέτη σκοπιμότητας και επιχειρησιακό σχέδιο για τη σύσταση και λειτουργία επιχείρησης αρωματικών φυτών, Κοζάνη.
- Anderson, D.P., 1990. Immunological indicators: Effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks. *American Fishery Science Society Symposium* 8: 38-50.
- Angulo, L., Lopez, J.E., Vicente, J.A. and Saborido, A.M., 1994. Haemorrhagic areas in the mouth of farmed turbot *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 17: 163–169.

- Arias, C.R, Verdonck, L., Swings, J., Garay, E., Aznar, R., 1997. Intraspecific differentiation of *Vibrio vulnificus* biotypes by amplified fragment length polymorphism and ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2600-66.
- Arias, C.R., Macian, M.C., Aznar, R., Garay, E., Pujalte, M.J. 1999. Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from seawater and shellfish of the Western Mediterranean coast. *Journal of Applied Microbiology* 86: 125-134.
- Athanassopoulou, F., Prapas, A. and Rodger, H., 1999. Diseases of *Puntazzo puntazzo* Cuvier in marine aquaculture systems in Greece. *Journal of Fish Diseases* 22: 215-218.
- Athanassopoulou, F., Karagouni E., Dotsika E., Ragias V., Tavla, J., Christofilogiannis, P., Vatsos I., 2004a. Efficacy and toxicity of orally administrated anticoccidial drugs for innovative treatments of *Myxobolus* sp. infection in *Puntazzo puntazzo*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62: 217-226.
- Athanassopoulou, F., Karagouni, E., Dotsika E., Ragias V., Tavla, J., Christofilogiannis P., 2004b. Efficacy and toxicity of orally administrated anti-coccidial drugs for innovative treatments of *Polysporoplasma sparis* (Sitja-Bobadilla & Alvarez-Pellitero 1885) infection in *Sparus aurata* L. *Journal of Applied Ichthyology* 20 (5): 345-354.
- Austin, B. and Al-Zahrani, A.M.J., 1988. The effect of anti microbial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* 33: 1–14.
- Austin, B. and Austin, D.A., 1993. Vibriosis. Bacterial Fish Pathogens and Disease in Farmed and Wild Fish. Chapter 13, Ellis Harwood Ltd., England, pp. 263-287.
- Austin, B., Austin, D.A., Blanch, A.R., Cerda, M., Grimont, F., Grimont, P.-A.D., Jofre, J., Koblavi, S., Larsen, J.L., Pedersen, K., Tiainen, T., Verdonck, L., Swings,

- J., 1997. A comparison of methods for the typing of fish-pathogenic *Vibrio* spp. *Systematic and Applied Microbiology* 20: 89–101.
- Austin, B. and Austin, D.A., 1999. Bacterial Fish Pathogens. *In* “ Diseases in Farmed and Wild fish” (2nd edn), pp 61–67. Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK.
- Austin, B. and Zhang, X.-H., 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. The Society for Applied Microbiology, *Letters in Applied Microbiology* 43: 119–124.
- Austin, B. and Austin, D.A., 2007. Bacterial Fish Pathogens “Diseases of Farmed and Wild Fish” (4th edition) Springer - Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK.
- Aznar R, Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1993. Ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Vibrio vulnificus* biotypes. *Systematic and Applied Microbiology* 16: 303-9.
- Bakhrouf, A., Ben Ouada, H., Oueslati, R., 1995. Sea bass *Dicentrarchus labrax* vibriosis treatment in a pisciculture area, in Monastir, Tunisia. *Marine Life* 5(2): 47-54.
- Bakopoulos, V., Peric, Z., Rodger, H., Adams, A., Richards, R.H., 1997. First report of fish pasteurellosis from Malta. *Journal of Aquatic Animal Health* 9: 26–33.
- Balebona, M.C, Andreu, M.J, Bordas, A., Zorilla, I., Moringo, M., Borrego, J.J., 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultered gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 64(11): 4269–4275.
- Barcellos, L.J.G., Nicolaiewsky, S., Souza, S.M.G., Lulhier, F., 1999. The effects of stoking density and social interaction on the acute stress response and body weight in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) previously exposed to chronic stress. *Aquaculture Research* 29 (11–12): 887– 892.
- Barcellos, L.G., Kreutz, L.C., de Souza, C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R. M., Cericato, L., Soso, A.B., Fagundes, M., Conrad, J., Lacerda, L.d.A., Terra, S., 2004. Haematological changes in jundia (*Rhamdia quelen* Quoy and

- Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture* 237(1-4): 229-236.
- Barton B.A., Schreck, C.B. and Barton, L.D., 1987. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms* 2:173–185.
- Benediktsdóttir E., Helgason, S. and Sigurjonsdottir, H., 1998. *Vibrio* spp. Isolated from salmonids with shallow skin lesions and reared at low temperature. *Journal of Fish Diseases*, 21: 19–28.
- Berg, R.D., 1995. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends in Microbiology* 3, 149-154.
- Bisharat, N., Agmon, V., Finkesten, R., Raz, R., Ben-Dror, G., Lerner, L., Soboh, S., Colodner, R., Cameron, D. N., Wyksytra, D.L., Swerdlow, D. L., Farmer, J.J., 1999: Clinical, epidemiological and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. *Lancet* 354: 1421-1424.
- Blake, P. A., Weaver, R. E., Hollis, D. G., 1980: Diseases of human (other than cholera) caused by vibrios. *Annual Review of Microbiology* 34: 341-367.
- Blanch, A.R. and Jofre, J.T., 1992. Isolation of *Vibrio anguillarum* serotype 01 involved in a vibriosis outbreak in golden grey mullet (*Mugil auratus*) in delta de l' Ebre (Catalonia, Spain). *Bollettino Societa Italiana di Patologia Ittica* 9: 17-23.
- Boggs, C., Coffman, S., Dotson, J., Harris, J., Holbrook, C., Kennely, J., McLean, E., Perkinson, Simms, K., Skelton, A., Stamper, J., 2002. Short-term effect of bath vaccination upon growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) held in a recirculating aquaculture system. Proceedings of the 4th International

- Conference on Recirculating Aquaculture, Roanoke, VA (USA), 18-21 Jul 2002.
- Bolinches, J., Toranzo, A. E., Silva, A., Barja, J. L., 1986. Vibriosis as the main causative factor of heavy mortalities in the oyster culture industry in Northwestern Spain. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists*. 6: 1.
- Bonaveri, G. F., 1761. Quoted in Drouin de Bouville. R. de (1907) Les maladies des poissons d'eau douce rip Europe. *Annales de la science agronomique* 1: 120-250.
- Bordas, M.A., Balebona, M.C., Rodriguez-Maroto, J.M., Borrego, J.J., Morinigo, M.A., 1998. Chemotaxis of pathogenic *Vibrio* strains towards mucus surfaces of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology* vol. 64, no. 4: 153-1575.
- Botsoglou, N.A, Govaris, A, Botsoglou, E.N, Grigoropoulou, S.H. and Papageorgiou, G., 2003. Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and alpha-tocopheryl acetate supplementation in long-term frozen stored turkey meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(10):2930-6.
- Bowser, P.R., Rosemar, R. and Reiner, C.R., 1981. A preliminary report of vibriosis in cultured American lobster, *Homarus americanus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37: 80–85.
- Burke, J. and Rodgers, L., 1981. Identification of pathogenic bacteria associated with the occurrence of “red spot» in sea mullet, *Mugil cephalus* L., in the south-eastern Queensland. *Journal of Fish Diseases*, 4(2): 153-159.
- Burt, S.A., Vlieland, R., Haagsman, H.P., Veldhuizen, E.J.A., 2005. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. *Journal of Food Protection* 68: 919–926.
- Cahill, M.M., 1990. Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecology* 19: 21– 41.

- Cai, J., Li, J., Thompson, K.D., Li, C. and Han, H., 2007. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from diseased post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Journal of Basic Microbiology* 47: 84–86.
- Campbell, A.C., Buswel, J.A., 1983. The intestinal microflora of farmed Dover sole (*Solea solea*) at different stages of fish development. *Journal of Applied Bacteriology* 55: 215-223.
- Canestrini, G., 1893. La malattia dominante delle anguille. *Atti Istituto delle Scienze* 7: 809-817.
- Carli, A., Pane, L., Casareto, L., Bertone, S. and Pruzzo, C., 1993. Occurrence of *Vibrio alginolyticus* in Ligurian coast rock pools (Tyrrhenian Sea, Italy) and its association with the copepod *Tigriopus fulvtils* (Fisher 1860). *Applied and Environmental Microbiology* 59:1960-1962.
- Cecchini, S., Caputo, A.R., 2003. Acid-base balance in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in relation to water oxygen concentration. *Aquaculture Research* 34:1069-1073.
- Chair, M., Dehasque, M., Van Poucke, S., Nelis, H., Sorgeloos P. and Leenheer, de A.P., 1994. An oral challenge for turbot with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture International* 2: 270–272.
- Charai, M., Mosaddak, M., 1996. Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. *Journal of Essential Oil Research* 8: 312–318.
- Colorni A., Paperna, I. and Gordin, H., 1981. Bacterial infections in gilt sea-bream *Sparus aurata* cultured at Eilat. *Aquaculture*, 23: 257 - 267.
- Colorni, A; Diamant, A., 1992. Pathology in mariculture: Specific problems and research in Israel. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* 44(4): 140-141.

- Colwell, R.R and Grimes, D.J., 1984. Diseases of marine organisms. In: "*Helgolander Meeresuntersuchungen*. pp.265-287. Hamburg, 37, no. 1-4.
- Conte, F.S., 1992. Evaluation of a freshwater site for aquaculture potential. Publication WRAC no. 92-101. Western Regional Aquaculture Center, USA, p. 35.
- Conte, F.S., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science* 86 : 205-223.
- Cosentino, S., Tuberose, C.I.G., Pisano, B., Satta, M. and Mascia, V., 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of sardinian thymus essential oils, *Letters in Applied Microbiology* 29: 130–135.
- Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K. and Bøgvold, J. 1997. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases* 20: 241–273.
- Dalsgaard, A, Frimodt-Muller, N., Bruun, B., Hoi, L., Larsen, J.L., 1996. Clinical manifestation and molecular epidemiology of *Vibrio vulnificus* infections in Denmark. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15: 227-32.
- Diamant, A., Colorni, A., Ucko, M., 2004. Monitoring program of mortality and disease in wild fish populations in the Gulf of Eilat, northern Red Sea. Report, IET Project No. 22.
- Diggles, B.K., Carson, J., Hine, P.M., Hickman, R.W. and Tait, M.J., 2000. *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbot *Colistium nudipinnis* and brill *C. guntheri* in New Zealand. *Aquaculture*, vol. 183, no. 1: 1-12.
- Dikow R.B. 2010. Systematic relationships within the Vibrionaceae (Bacteria: Gammaproteobacteria): steps toward a phylogenetic taxonomy. *Cladistics*, 26:1-20.

- DoBell C., 1932. AntonVon Leewenhoek and Big'LittleAnimals'. Harcourt Brace and Company, NewYork, NY, USA.
- Dorman, H.J., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied. Microbiology* 88: 308–316.
- Eckburg, P.B., Bik. E.M., Bernstein, C.N., Purdom E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gil, S.R., Nelson, K.E. and Relman D.A., 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308:1635-1638.
- Egidius, E., 1987. Vibriosis: pathogenicity and pathology. A review. *Aquaculture* 67: 15-28.
- Esteve, C., Amaro, C., Biosca, E.G. and Garay E., 1995. Biochemical and toxigenic properties of *Vibrio furnissii* isolated from a European eel farm. *Aquaculture* 132: 81-90.
- Euzéby, J.P., 2008. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *International Journal of Sysematic Bacteriology* 47: 590-592.
- FAO, 2009. The State of World Fisheries and Aquaculture 2008. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e.pdf>.
- FAO/AQUAMEDA 2008. [http://www.infosa.org.na/downloads/Services/Globefish%20Seafood%20Highlights%202009_2nd%20quarter%20\(2\).pdf](http://www.infosa.org.na/downloads/Services/Globefish%20Seafood%20Highlights%202009_2nd%20quarter%20(2).pdf).
- Finlay, B.B., Falkow, S., 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 136-188.
- Finegold, S.M., Suher, V.L. and Mathisen, G.E., 1983. Normal indigenous intestinal flora. In: *Human Intestinal Microflora in Health and Disease* (ed. by D.J.Hentgens), pp. 3–31. Academic press, New York, NY, USA.
- Finlay, B.B., Falkow, S., 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 136-188.
- FISHSTAT & FEAP 2008. <http://www.feap.info/FileLibrary%5C11%5CProductionreport2008.pdf>.

- Force, M., Sparks, WS, Ronzio, RA., 2000. Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of oregano in vivo. *Phytotherapy Research* 14:213–4.
- Fouz, B., Larsen, J.L. and Toranzo, A.E., 1991. *Vibrio damsela* as a pathogenic agent causing mortality in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *European Association of Fish Pathology* 11:80–81.
- Fouz, B., Larsen, J.L., Nielsen, B., Barja, J.L. and Toranzo, A.E., 1992. Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* 12:155–166.
- Fouz, B., Toranzo, A.E., Milan, M., Amaro, C., 2000. Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Journal of Applied Microbiology* 88(3): 531-5.
- Francis-Floyd, R., 2002. *Aeromonas* infections. Fisheries and Aquatic Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida (Document FA14).
- Fujioka, R. S., Greco, S. B., Cates, M. B., Schroeder, J. P., 1988. *Vibrio damsela* from wounds in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 4: 1-8.
- Gatesoupe, F.J, Lambert, C., Nicolas, J.L., 1999. Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Journal of Applied Microbiology* 87(5):757-63.
- Gatesoupe, F.J. and Lesel, R., 1998. An environmental approach to intestinal microflora in fish. *Cahiers d'Etudes et de Recherches Francophones Agricultures (France)* 7: 29–35.
- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J.L., Gauthier, M., Christen, R., 1995. Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium*

- damselfish* subsp. *piscicida* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 139-44.
- Gay, M., Renault, T., Pons, A.-M. and Le Roux, F., 2004. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: Taxonomy and host alterations. *Diseases of aquatic organism* 62: 65–74.
- Giannenas, I., 2003. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Archiv für Tierernährung* 57(2):99-106.
- Gislason, G., Olsen, R.E. and Ringø, E., 1996. Comparative effects of dietary Na⁺-lactate on Arctic char, *Salvelinus alpinus* L., and Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Research* 27: 429–435.
- Govaris, A., Botsoglou, N., Papageorgiou, G. and Ambrosiadis I., 2004. Dietary versus post-mortem use of oregano oil and/or α -tocopherol in turkeys to inhibit development of lipid oxidation in meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 55(2):115-23.
- Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., Chatzopoulou, P.S., 2010. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology* 137(2-3):175-80.
- Grimes, D. J., Colwell, R. R., Stemmler, J., Hada, H., Maneval, D., Hetrick, F. M., May, E. B., Jones, R. T. and Stoskopf, M., 1984a. *Vibrio* species as agents of elasmobranch disease. *Helgolander Meeresuntersuchungen* 37:309–315.
- Grimes, D. J., Stemmler, J., Hada, H., May, E. B., Maneval, D., Hetrick, F. M., Jones, R. T., Stoskopf, M. and Colwell, R. R., 1984b. *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. *Microbial Ecology* 10:271–282.
- Grisez, L., Chair, M., Sorgelos, P. and Ollivier, F., 1996. Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after

- oral challenge through live feed. *Diseases of Aquatic Organisms* 26: 181-187.
- Grisez, L., Reyniers, J., Verdonck, L., Swings, J., Ollevier, F., 1997. Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. *Aquaculture* 155: 387-399.
- Hamid, A., Sakata, T. and Kakimoto, D., 1979. Microflora in the alimentary tract of gray mullet-Estimation of enzymic activities of the intestinal bacteria. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries* 45: 99-106.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86: 985–990.
- Hastein, T. and Smith, J.E., 1977. A study of *Vibrio angillarum* from farmed and wild fish using principal components analysis. *Journal of Fish Biology* 11(2): 69-75.
- Hedrick, R. P., El-Matbouli, M. , Adkison M. A., and MacConnell, E., 1998. Whirling disease: Re-emergence among wild trout. *Immunological Reviews* 162:365–376.
- Horne, M.T. and Baxendale, A., 1983. The adhesion of *Vibrio anguillarum* to host tissues and its role in pathogenesis. *Journal of Fish Diseases* 5, 343–345.
- Hughes, G.M., 1981. Effects of low oxygen and pollution on the respiratory systems of fish. In: Pickering, A.D., Editor, , 1981. *Stress and Fish*, Academic Press, New York, pp. 121–146.
- Hiney, M.P., Kilmartin, J.J., Smith, P.R. 1994. Detection of *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon with asymptomatic furunculosis infections. *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 19, no. 3:161-167.
- Hispano, C., Nebra, Y. and Blanch, A.R.,1997. Isolation of *Vibrio harveyi* from an ocular lesion in the short sunfish (*Mola mola*). *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists* 17: 104-107.

- Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S. and Kurata, H., 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 39 (4): 818–822.
- Horne, M.T. and Baxendale, A., 1983. The adhesion of *Vibrio anguillarum* to host tissues and its role in pathogenesis. *Journal of Fish Diseases* 5, 343–345.
- Hofe, B., 1904. *Handbuch der Fischkrankheiteng.* Allgemeine Fischereizeitung, München .
- Hoff, K.A., 1989. Survival of *V.anguillarum* and *V.salmonicida* at different salinities. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1775-1786.
- Horne, M.T. and Baxendale, A., 1983. The adhesion of *Vibrio anguillarum* to host tissues and its role in pathogenesis. *Journal of Fish Diseases* 6(5):461-471.
- Horsley, R.W., 1973. The bacterial flora of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in relation to its environment. *Journal of Applied Bacteriology* 36: 377–386.
- Horsley, R.W. 1977. A review of bacterial flora of teleosts and elasmobranches, including methods for its analysis. *Journal of Fish Biology* 10: 529–553.
- ICAP 2007 Θαλάσσιες Ιχθυοκαλλιέργειες – Κλαδική Μελέτη.
- Ingram, G.A. 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection - A review. *Journal of Fish Biology* 16: 23-60.
- Jensen, S., Samuelsen, O.B., Andersen K., Torkildsen L, Lambert, C., Choquet, G., Paillard, C., Bergh, Ø., 2003. Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. *Diseases of Aquatic Organisms* 53: 25–31.
- Jöborn, A., Olsson, J.C., Westerdahl, A., Conway P.L. and Kjelleberg, S. 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *Journal of Fish Diseases* 20: 383–392.

- Jutfelt, F., Olsen, R.E., Glette J., Ringø E. and Sundell, K., 2006. Translocation of viable *Aeromonas salmonicida* across the intestine of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Journal of Fish Diseases* 29: 255–262
- Kandhasamy, M. and Arunachalam, K.D., 2008. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in marine water, sediments and marine invertebrates collected from Rameswaram island, Tamil Nadu, India. *Current Research in Bacteriology* 1: 35-41.
- Kanno, T., Nakai, T. and Muroga, K., 1989. Mode of transmission of vibriosis among ayu *Plecoglossus altivelis*. *Journal of Aquatic Animal Health* 1, 2–6.
- Karagouni, E., Athanassopoulou, F., Lytra, A., Komis, C., Dotsika, E., 2005. Antiparasitic and immunomodulatory effect of innovative treatments against *Myxobolus* sp. infection in *Diplodus puntazzo*. *Veterinary Parasitology* 134:215-228.
- Knight-Madden, J.M., Barto, M., Gandreti, N., Nicholson, A.M., 2005. *Photobacterium damsela* bacteremia in a child with sickle-cell disease. *Pediatric Infectious Disease Journal* 24(7): 654-655.
- Κυρκούδης Ι., 2006. Συμβολή στη μελέτη της μικροβιακής χλωρίδας και ιδιαίτερα των *Vibrio* spp. σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς τσιπούρας και λαβρακιού στην Ελλάδα. Διδακτορική διατριβή: 95-109.
- Kusuda, R. and Yamaoka, M., 1972. Etiological studies of bacterial pseudotuberculosis in cultured yellowtail with *Pasteurella piscicida* as the causative agent. On the morphological and biochemical properties. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 38, 1325—1332.
- Kvitt, H., Ucko, M., Colorni, A., Batargias, C., Zlotkin, A., Knibb, W., 2002. *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*: detection by direct amplification of 16S rRNA gene sequences and genotypic variation as determined by amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Diseases of Aquatic Organisms* 48(3): 187-95.

- Lake, R., Hudson, A. and Cressey, P., 2003. Risk profile: *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. New Zealand Food Safety Authority, report of Public Health Services Providers.
- Lambert, R.J.W., Skandamis P., Coote, P.J. and Nychas, G-J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 453-62.
- Larsen, M.H., Larsen J.L, Olsen J.E. 2001. Chemotaxis of *Vibrio anguillarum* to fish mucus: Role of the origin of the fish mucus, the fish species and the serogroup of the pathogen. *FEMS Microbiology Ecology* 38, no. 1: 77-80.
- Lattaoui, N. and Tantaoui-Elaraki, A., 1994. Individual and combined antibacterial activity of the main components of three thyme essential oils. *Rivista Italiana EPPOS*, 13: 13-19.
- Lee, K.K., 1995. Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabaricus*, Bloch et Schneider, *Microbial Pathogenesis*. 19: 39–48.
- Lesel, R., 1981. Microflora bacterienne de tractus digest if. In: *Nutrition Des Poissons* (ed. by M.Fontaine), pp. 89–100. NRS, Paris, France.
- Λίγγα, Κ., 1999. *Φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά της Ελλάδας*. Αθήνα.
- Liston, J., 1957. The occurrence and distribution of bacterial types on flatfish. *Journal of General Microbiology* 16: 205-216.
- Locatelli, L., Pavoletti, E., Moroni, P., Cabra, S., Gilli, P., Prearo, D., Prearo M., 2003. Main bacterial pathologies found in national and imported aquarium fish. *Bolletino di Societa Italiana di Patologia Ittica* 15(36): 42.
- Lodemel, J.B., Mayhew,T.M., Myklebust, R., Olsen, R.E., Espeid, S., and Ringo, E. 2001. Effect of three dietary oils on disease susceptibility in Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) during cohabitant challenge with *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida*. *Aquaculture Research* 32:935-945.

- Love, M.; Tcehken, D.; Hose, J.E.; Fermer III, J.J.; Hickman, F.W.; Fanning, G.R., 1981: *Vibrio damsela*. a marine bacterium causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science* 214: 1139-1140.
- MacDonald, N.L., Stark, J.R. and Austin B., 1986. Bacterial flora associated in gastrointestinal tract of Dover Sole (*Solea solea*) with special emphasis on the possible role of bacteria in nutrition of the host. *FEMS Microbiology Letters* 35: 107–111.
- Magariños, B., Romalde, J.L, Bandin, I, Fouz, B.. Toranzo, A.E., 1992a. Phenotypic, antigenic and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* isolated from fish. *Applied Environmental Microbiology* 58: 3316-3322.
- Magariños, B., Santos, Y., Romalde, J.L, Rivas, C., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1992b. Pathogenic activities of the live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *Journal of General Microbiology* 138: 2491-8.
- Magariños, B., Romalde, J.L., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1994. Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in sea water and sediment. *Applied Environmental Microbiology* 60: 180-6.
- Magariños, B., Noya, M. Romalde, J.L., Pérez, G. and Toranzo, A.E., 1994a. Influence of fish size and vaccine formulation on the protection of gilthead seabream against *Pasteurella piscicida*. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 14:120–122.
- Magariños, B., Toranzo, A.E, Romalde, J.L., 1996. Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annual Review of Fish Diseases* 6: 41-64.
- Magariños, B., Couso, N., Noya, M., Merino, P., Toranzo, A.E., Lamas, J., 2001. Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 195(1-2): 17-21.
- Makemson, J. C, Hermosa, Jr, G. V. 1999. Luminous bacteria cultured from fish guts in the Gulf of Oman. *Luminescence* 14: 161-168.

- Marco-Noales, E., Milan, M., Fouz, B., Sanjuan E., Amaro, C., 2001. Transmission to Eels, Portals of Entry, Putative Reservoirs of *Vibrio vulnificus* Serovar E (Biotype 2). *Applied Environmental Microbiology* 67(10): 4717-25.
- Maxson, R.T., Dunlap, J.P., Tryka, F., Jackson, R.J., Smith, S.D., 1994. The role of the mucus gel layer in intestinal bacterial translocation. *Journal of Surgical Research* 57: 682-686.
- Mazeaud, M.M., Mazeaud, F. and Donaldson, E.H. 1977. Stress resulting from handling in fish: primary and secondary effects. *Transactions of the American Fisheries Society* 106:201-212.
- Mazeaud, M.M. and Mazeaud F., 1981. Adrenergic responses to stress in fish. In: A.D. Pickering, Editor, *Stress in Fish*, Academic Press, London pp. 49–75.
- McDonald, D.G. and Milligan, C.L., 1997: Ionic, osmotic and acidbase regulation in stress. In: Fish stress and health in aquaculture. G.K. Iwama, A.D. Pickering, J.P. Sumpter and C.B. Schreck (Eds). Seminar Series 62, Cambridge. University Press, UK, pp. 119–144.
- McGimpsey, J., Douglas, M., van Klink, J., Beauregard, D., 1994. Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. In New Zealand. *Flavour Fragrance. J.* 9: 347–352.
- Mims, C.A., Dimmock, N.J., Nash, A., Stephen, J., 1995. Mims Pathogenesis of Infectious Disease, 4th ed. Academic Press, London. 414 pp.
- Ministry of Health New Zealand, 2001. *Vibrio parahaemolyticus*.
- Moberg, G.P., 1985. Biological response to stress: key to assessment of animal well-being? In: Moberg, G.P. (Ed.), *Animal Stress*. American Physiology Society, Bethesda, MD, USA, pp. 27–49.
- Moberg, G.P., 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: Moberg, G.P., Mench, J.A. (Eds.), *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. CABI Publishing, CAB International, Oxon and New York, pp. 1–21.

- Montes, M., Farto, R., Pérez, M.,J., Armada, S.P., Nieto, T.P., 2006. Genotypic diversity of *Vibrio* isolates associated with turbot (*Scophthalmus maximus*) culture. *Research in Microbiology* 157(5):487-95.
- Muroga, K., Yamanoi, H., Hironaka, Y., Yamamoto, S., Tatani, M., Jo, Y. and Takahashi, H., 1984. Detection of *Vibrio anguillarum* from wild fingerlings of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 50: 591-596.
- Muroga, K., De La Cruz, M. C., 1987. Fate and location of *Vibrio anguillarum* in tissues of artificially infected ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Fish Pathology* 22: 99-103.
- Myhr E, Larsen J.L, Lillehaug A., Gudding R., Heum M. and Haastein T., 1991. Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(9): 2750-2757.
- Nayak, S.K., 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41: 1553-1573.
- Nealson K.H., Hastings J.W., 1977b. Low oxygen is optimal for luciferase synthesis in some bacteria: Ecological implications. *Archives of Microbiology* 112:9-16.
- Neumann, A., Benenson, W., Hubster, E., Nguyen, N.T. and Le, T.V., 1972. *Vibrio parahaemolyticus* in the Republic of Vietnam. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 21: 464-466.
- Newman, J.T., Cosenza B.J. and Buck, J.D., 1972. Aerobic microflora of the Bluefish (*Pomatomus saltatrix*) intestine, *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 29: 333–336.
- Noga, E.J. "Fish Disease: Diagnosis and Treatment. » Ames, I.A.: Iowa State University Press, 2000.
- Noguerola, I. And Blanch, A.R., 2008. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. *Journal of Applied Microbiology* 105: 75–185.

- Nychas, G.-J.E., 1996. Natural antimicrobial from plants. In: Gould, G.W. *New methods of food preservation*. London: CRC Press. Pp.235-258.
- Oliver, J.D., 2005. Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. *Epidemiology and Infection* 133: 383-391.
- Olsen, J.E. and Larsen, J.L., 1993. Ribotypes and plasmid contents of *Vibrio anguillarum* strains in relation to serovar. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3863–3870.
- Olsen, R.E., Sundell, K., Hansen, T., Hemre G-I., Myklebust, R., Mayhew T.M. and Ringo E. 2002. Acute stress alters the intestine lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: An electron microscopical study. *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 211-221.
- Olsen, R.E., Sundell, K., Myklebust, R and Ringo, E., 2005. Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (W). *Aquaculture* 250:480-495.
- Olsson, C. 1995. Bacteria with inhibitory activity and *Vibrio anguillarum* in fish intestinal tract. Fil. Dr. thesis. Gothenburg Univ., Sweden. ISBN 91-628-1850-3. 141 pp.
- Olsson, J.C., Jöborn, A., Westerdahl, A., Blomberg, L., Kjelleberg, S. and Conway, P.L., 1996. Is the turbot, *Scophthalmus maximus* L., intestine a port of entry for the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Journal of Fish Diseases*. 19: 225–234.
- Olsson, J.C., Joeborn A., Westerdahl A., Blomberg L., Kjelleberg S., Conway P. L. 1998. Survival, persistence and proliferation of *Vibrio anguillarum* in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*(L.), intestine and faeces. *Journal of Fish Diseases* 21, no. 1: 1-9.
- Olsson, J.C., Joborn, A., Westerdahl, A., Blomberg, L., Kjelleberg S. and Conway P.L. 1996. Is the turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine a portal of entry for the fish pathogen *Vibrio anguillarum*? *Journal of Fish Diseases* 19:225-234.

- Osorio, C.R., Collins, M.D., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Romalde, J.L., 1999. 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2942– 2946.
- Osorio, C.R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. and Barja, J.L., 2000. Multiplex PCR assay for *ureC* and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. *Diseases of Aquatic Organisms* 40: 177–183.
- Osorio, C.R., Toranzo, A.E., 2002. DNA-based diagnosis in seafarming. In: Fingerman M, Nagabhushanam R (eds). *Recent advances in marine biotechnology series*, Vol 7: Seafood safety and human health. Science Publishers, Enfield, NH, pp. 253–310.
- O'Tool, R., Lundberg, S., Fredriksson, S., Jansson, A., Nilson, B., Wolf-Watz, H., 1999. The Chemotactic Response of *Vibrio anguillarum* to Fish Intestinal Mucus is mediated by a Multiple Combination of Mucus Components. *Journal of Bacteriology* 181, no.14: 4308-4317.
- Otte, E., 1963. Die heutigen Ansichten über die Ätiologie der "Infektiosen Bauchwassersucht" der Karpfen. *Wiener -Tierärztliche Wschr.* 11 : 996-1004.
- Paniagua, E., Paramá, A., Iglesias, R., Sanmartín, M. L. and Leiro, J, 2001. Effects of bacteria on the growth of an amoeba infecting the gills of turbot. *Diseases of Aquatic Organisms* 45: 73-76.
- Παπαναγιώτου Ε., Παπανικολάου Κ., Ζαμανίδης, Σ., 2001. Η καλλιέργεια των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στην Ελλάδα, *Γεωργία-Κτηνοτροφία*, 1: 36-42, Αθήνα.

- Papageorgiou G, Botsoglou N, Govaris A, Giannenas I, Iliadis S, and Botsoglou E., 2003. Effect of dietary oregano oil and α -tocopheryl acetate supplementation on iron-induced lipid oxidation of turkey breast, thigh, liver and heart tissues. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 87(9-10):324-335.
- Paperna I. Review of diseases affecting cultured *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*, In: Barnabé G, Billard R (eds). *L' aquaculture du bar et des sparidés*. INRA Publisher, Paris, France; 1984; 465-482.
- Pedersen, K., Ceschia, G. and Larsen, J.L., 1994. Ribotypes of *Vibrio anguillarum* 01 from Italy and Greece. *Current Microbiology* Vol. 28 : 97-99 .
- Pedersen, K., Dalsgaard, I. and Larsen, J.L., 1997a. *Vibrio damsela* associated with disease in fish in Denmark. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3711–3715.
- Pedersen, K., Grisez, L., Ria van Houdt, Tiainen T., Ollevier F. and Larsen J.L., 1999. Extended Serotyping Scheme for *Vibrio anguillarum* with the Definition and Characterization of Seven Provisional O-Serogroups. *Current Microbiology* 38: 183-189.
- Peters, G., 1982. The effect of stress on the stomach of European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Biology* 21: 497-512.
- Peters, G., Faisal, M., Lang, T. and Ahmed, I. 1988. Stress caused by social interaction and its effect on susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Diseases of Aquatic Organisms* 4: 83-89.
- Phianphak, W., Rengpipat, S., Rukpranporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W., Sithigorngul, P., 2005. Production of monoclonal antibodies for detection of *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms* 63:161-168.
- Pichavant, K., Person-Le Ruyet, J., Le Bayon, N., Sévère, A., Le Roux, A., Boeuf, G., 2001. Comparative effects of long-term hypoxia on growth, feeding and

- oxygen consumption in juvenile turbot and European sea bass. *Journal of Fish Biology* 59: 875-883.
- Pickering, A.D., 1987. "Stress Responses and Disease Resistance in Farmed Fish." In *Aqua Nor 87, Conference 3: Fish Diseases – a Threat to the International Fish Farming Industry*, pp. 35-49. Norske Fiskeoppdretters Forening, Trondheim.
- Pickering, A.D. and Pottinger, T.G., 1987b. "Crowding causes Prolonged Leucopenia in Salmonid Fish, Despite Interrenal Acclimation. *Journal of Fish Biology*, 32: 701-712,
- Prabhu, R., Anup, R. and Balasubramanian, K.A. 2000. Surgical stress induces phospholipids degradation in the intestinal brush border membrane. *Journal of Surgical Research* 94:178-184.
- Preuss, H., Echard B., Dadgar A., Talpur, N., Manohar, V., Enig, M., Bagchi D., Ingram, C., 2005. Effects of Essential Oils and Monolaurin on *Staphylococcus aureus*: *In Vitro* and *In Vivo* Studies. In: *Toxicology Mechanisms and Methods*, Taylor & Francis (Eds), Volume 15, No 4, pp. 279 – 285.
- Proestos, C., Chorianopoulos, Komaitis, M. and Nychas G-J. E., 2005. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1190-1195.
- Pujalte, M.J., Sitjà-Bobadilla, A., Macian, M.C., Belloch, C., Alvarez-Pellitero, P., Perez-Sanchez, J., Uruburu, F., Garay, E. 2003. Virulence and molecular typing of *Vibrio harveyi* strains isolated from cultured dentex, gilthead sea bream and European sea bass. *Systematic and Applied Microbiology* 26, no. 2: 284-292.
- Pujalte, M.J., Sitjà-Bobadilla, A., Álvarez-Pellitero, P. and Garay, E., 2003a. Carriage of potentially fish-pathogenic bacteria in *Sparus aurata* cultured in Mediterranean fish farms. *Diseases of Aquatic Organisms* 54: 119-126.

- Ramesh, A., Loganathan, B.G., Venugopalan, V. K. 1990. Ecological dynamics of marine luminous bacteria. *Journal of Basic Microbiology* 30: 689-703.
- Ransom, D. P. 1978. Bacteriologic, immunologic and pathologic studies of *Vibrio* sp. pathogenic to salmonids. Ph.D. thesis. Oregon State University, Corvallis.
- Ransom, D.P., Lannan, C. N., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L., 1984. Comparison of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific salmon. *Journal of Fish Diseases* 7: 107-115.
- Rhayour, K., Bouchikhi, T., Tantaoui Elaraki, A., Sendide, K. and Remmal, A., 2003. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Essential Oil Research* 15: 286–292.
- Richards, R.H. and Roberts, R.J., 1979. Bactériologie des téléostéens. In: *Pathologie du poisson*, Roberts R.J. (éd.), Maloine, Paris, 1979, pp.184-204.
- Ringø, E., Strøm, E., Tabachek, J.-A., 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research* 26: 773– 789.
- Ringo, E., Olsen, R.E., Overli, O. and Lovik, F. 1997. Effect of dominance hierarchy on aerobic microbiota associated with the epithelial mucosa of subordinate and dominant individuals of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L). *Canadian Journal of Microbiology* 39:1169-1173.
- Ringo E. and Gatesoupe F.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish. A review. *Aquaculture* 160:177-203.
- Ringo, E., Lodemel, J.B., Myklebust, R., Kaino, T., Mayhew, T.M. and Olsen, R.E., 2001. Epithelium-associated bacteria in the gastrointestinal tract of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). An electron microscopical study. *Journal of Applied Microbiology* 90: 294-300.
- Ringo, E., Olsen, R.E., Mayhew, T.M. and Myklebust, R., 2003. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture* 227: 395–415.

- Ringo, E., Myklebust, R., Mayhew, T.M. and Olsen, R.E., 2007. Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture* 268: 251-264.
- Roberts, R.J., Snail, D.A., 2001. Laboratory methods. In: Roberts R.J. (ed) *Fish Pathology*. W.B. Saunders, UK, pp. 380-412.
- Roberts, R.J. and Horne, M.T., 1978. Bacterial meningitis in farmed rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson affected with chronic pancreatic necrosis. *Journal of Fish Diseases* 1:157-164.
- Robertson, P.A.W., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P., Austin, B., 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiont for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 185: 235–243.
- Romalde, J.L., Magarinos, B., Nunez, S., Barja, J.L. and Toranzo, A.E., 1996. Host range susceptibility of *Enterococcus* sp. strains isolated from diseased turbot: possible routes of infection. *Applied and Environmental Microbiology* 62:607–611
- Romalde, J.L., Magariños, B., Lores, .F, Toranzo, A.E., 1999. Assessment of a magnetic bead-EIA based kit for rapid diagnosis of fish pasteurellosis. *Journal of Microbiological Methods* 38: 147-54.
- Rose, A.S., Ellis. A.E. and Munro, A.L.S. 1989. The activity by different routes of exposure and shredding rates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *Journal of Fish Diseases* 12: 73-578.
- Saeed, M.O., 1995. Association of *Vibrio harveyi* with *salmonicida* in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., held in sea water. mortalities in cultured marine fish in Kuwait. *Aquaculture* 13: 21-29.
- Sakai, D.K., 1979. Invasive route of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Scientific Reports of the Hokkaido Fish Hatchery* 34: 1-6.

- Sakata, T., 1990. Microflora in the digestive tract of fish and shell fish. In: *Microbiology in Poikilotherms* (ed. by R.Lessel), pp. 171–176. Elsevier, Amsterdam. The Netherlands.
- Salzer, U.J., 1977. The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings—a critical review. *CRC Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 9: 345–373.
- Santos, Y., Toranzo, A.E., Barja, J.I., Nieto, T.P. and Villa, T.G., 1988. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. *Infection and Immunity* 56(12):, 3285-3293.
- Santos, Y., Pazos, F., Bandin, I. and Toranzo, A.E., 1995. Analysis of antigens present in the extracellular products and cell surface of *Vibrio anguillarum* serotypes 01, 02, and 03 . *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2493-2498.
- Santos J., Benjamin, M., Yang, P.C., Prior, T. and Perdue, M.H. 2000. Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells. *American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology* 278: G847-854.
- Σαρλής, Γ., 1994. *Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά*, Αθήνα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Saroglia, M., Cecchini, S., Terova, G., Caricato, G., De Stradis, A, 1998a. Studio su alcuni meccanismi di adattamento del pesce eurialino alle condizioni di iperossigenazione, in relazione all'ottimizzazione zootecnica: primi risultati. *Biologia Marina Mediterranea* 5:1688-1698.
- Saunders, P.R., Kosecka, U., McKay, D.M. and Purdue, M.H. 1994. Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology* 30: G794-G799.

- Scapigliati, G., Scalia, D., Marras, A., Meloni, S., Mazzini, M., 1999. Immunoglobulin levels in the teleost sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) in relation to age, season, and water oxygenation. *Aquaculture* 174:207-212.
- Sengupta, A. and Sharma, R.K. 1993. Acute heat stress in growing rats: Effect on small intestinal morphometry and in vivo absorption. *Journal of Thermal Biology* 18:145-151.
- Shewan, J.M., Hobbs, G. and Hodgeiss, W., 1960. The *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. *Journal of Applied Bacteriology* 23:463-468.
- Shewan, J.M. 1971. The microbiology of fish and fishery products. A progress report. *Journal of Applied Bacteriology* 34: 299.
- Schreck, C.B., Li, H.W., 1991. Performance capacity of fish: stress and water quality. In: Brune, D.E., Tomasso, J.R. (Eds.), *Aquaculture and Water Quality. Advances in World Aquaculture*, vol. 3. Pub. World Aquaculture Society, pp. 21–29.
- Sekirov, I. and Finlay, B.B., 2009. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *Journal of Physiology* 587: 4159-4167.
- Simon, J.E., 1990. *Essential oils and culinary herbs*, Portland, Timber Press.
- Sitjà-Bobadilla, A., Pujalte, M.J., Macián, M.C., Pascual, J., Alvarez-Pellitero, P. and Garay, E., 2006. Interactions between bacteria and *Cryptosporidium molnari* in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under farm and laboratory conditions. *Veterinary Parasitology* 142: 248–259.
- Skandamis, P. and Nychas, G-J, E., 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physicochemical attributes of mince meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology* 91: 1011-1022.
- Slack, G., 1997. Salton sea sickness. *California Wild, the magazine of the California Academy of Sciences* 50: 1.

- Snieszko, S.F, Bullock, G.L, Hollis, E, Boone, J.G., 1964. *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *Journal of Bacteriology* 88:1814-5.
- Snieszko, S.F. 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases in fish. *Journal of Fish Biology* 6:197-208.
- Sokovic M., Tzakou, O., Pitarokili, D. Couladis, M., 2002. Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece. *Nahrung* 46:317–20.
- Sorensen U.B.S. & Larsen J.L., 1986. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 51: 593-597.
- Sperandio, V., Torres, A.G, Jarvis, B., Nataro, J.P. and Kaper, B., 2003. Bacteria-host communication: The language of hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (15): 8951-8956.
- Stevens, C.E., 1988. In: *Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Stoskopf, M.K., 1993. "Fish Medicine." W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- Suychiro, Y., 1942. A study on the digestive system and feeding habits of fish. *Japanese Journal of Zoology* 10: 1-301.
- Svendsen, Y.S. and Bogwald, J. 1997. Influence of artificial wound and non-intact mucus layer on mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following a bath challenge with *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology* 7: 317-325.
- Szakolczai, J. 1997. Histological changes induced by environmental stress in common carp. Japanese coloured carp, European eel, and African catfish. *Acta Veterinaria Hungarica* 45:1-10.
- Tajima, K., Ezura, Y., Kirnura, T., 1985. Studies on the taxonomy and serology of causative organisms of fish vibriosis. *Fish Pathology* 20: 131-142.

- Tamayo, F.G., Valders, L.I.T., Lopez, N.M. and Alfonso, L.B. 1996. Bacterial translocation and wating in stressed mice. *Archives of Medical Research* 27: 115-121.
- Tannock, G.W., 1983. Effect of dietary and environmental stress on the gastrointestinal microbiota. In: *Human Intestinal Microflora in Health and Disease* (ed. By D.J. Hentges), pp. 517-539. Academic Press. New York.
- Tannock, G.W. and Savage D.C., 1974. Influence of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. *Infection and Immunity* 9: 591-598.
- Tantillo, G.M., Fontanarosa, M., Di Pinto, A. and Musti, M., 2004. Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Letters in Applied Microbiology* 39: 117-126.
- Thetmeyer, H., Waller, U., Black, K. D., Inselmann, S. and Rosenthal, H., 1999. Growth of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under hypoxic and oscillating oxygen conditions. *Aquaculture* 174, 355-367.
- Tiainen, T., Pedersen, K. and Larsen J.L., 1997. *Vibrio anguillarum* serogroup 03 and *V. anguillarum*-like serogroup 03 cross-reactive species-comparison and characterization *Journal of Applied Microbiology* 82: 211- 218.
- Tison, D.L, Nishibuchi, M., Greenwood, J.D., Seidler, R.J., 1982. *Vibrio vulnificus* Biogroup 2: New Biogroup Pathogenic for Eels. *Applied and Environmental Microbiology* 44(3): 640-646.
- Tison, D.L. and Seidler, R.J., 1983. *Vibrio aestuarianus*: a new species from estuarine waters and shellfish. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33: 699-702.

- Thomson, R., Macpherson, H.L., Riaza, A., Birkbeck, T.H., 2005. *Vibrio splendidus* biotype 1 as a cause of mortalities in hatchery-reared larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Applied Microbiology* 99(2):243-50.
- Toranzo, A.E., Barja J.L. and Devesa S., 1985. First isolation of *Vibrio anguillarum* biotype 1 causing an epizootic in reared turbot (*Scophthalmus maximus* L.) in Galicia (NW Spain). *Investigacion Pesquera (BARC)* 49(1): 61-66.
- Toranzo, A.E, Barreiro, S., Casal, J.F, Figueras, A., Magarinos, B., Barja, J.L., 1991. Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture* 99:1-15.
- Toranzo, A.E., Santos, Y., Barja, J.L., 1997. In: Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J., Brown, F. (Eds.), *Fish Vaccinology*, Dev. Biol. Stand., Karger, Basel, p. 93.
- Toranzo, A.E., Magariños, B. and Romalde, J.L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246: 37– 61.
- Trüper, H.G, De'Clari, L., 1997. Taxonomic note: necessary correction of epithets formed as substantives (nouns) “in apposition”. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 908-909.
- Trust, T.S . and Sparrow, R.A.H., 1974. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. *Canadian Journal of Microbiology* 11: 1219-1228.
- Tsigarida, E., Skandamis, P. and Nychas, G-J.E., 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. *Journal of Applied Microbiology* 89: 901-909.
- Τσιγαρίδα, Ε.- Α., 2008. Διερεύνηση των προοπτικών καλλιέργειας ρίγανης και παραλαβής ριγανέλαιου μέσω συμβολαιακής παραγωγής. Πτυχιακή μελέτη. Τμήμα Οικιακής Οικονομίας και Οικολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

- Ultee, A., Kets, E. P. W. and Smid, J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4606–4610.
- Vatsos I., A. Colorni, G. Bovo, F. Athanassopoulou and M. Yiagnisis, Mediterranean region., 2007. In: R. Raynard, T. Wahli, I. Vatsos and S. Mortensen, Editors, *Review of Disease Interactions and Pathogen Exchange Between Farmed and Wild Finfish and Shellfish in Europe* (2007), pp. 248–312 DIP-net, Work Package 1., 450 pp.
- Veenstra, J., Rietra, P.J.G.M, Coster, J.M, Stoutenbeek, C.P, Ter Laak, E.A., Haenen, O.L.M., De Gier, H.H.W., Dirks-Go, S., 1993. Human *Vibrio vulnificus* infections and environmental isolates in the Netherlands. *Aquaculture and Fisheries Management* 24(1): 119-122.
- Villamil, L., Figueras, A., Toranzo, A.E., Planas, M. and Novoa, B.. 2003. Isolation of a highly pathogenic *Vibrio pelagius* strain associated with mass mortalities of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) larvae. *Journal of Fish Diseases*, vol. 26, no. 5: 293-303.
- Vera, P., Navas, J.L. and Fouz, B., 1991. First isolation of *Vibrio damsela* from seabream (*Sparus aurata*). Bulletin of European Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. *Epidemiology and Infection* 133, 383-391.
- Vigneulle, M., Baudin Lauracin, F., 1991. Uptake of *Vibrio anguillarum* bacterin in the posterior intestine of rainbow trout *Oncorhyncus mykiss*, sea bass *Dicentrarchus labrax* and turbot *Scophthalmus maximus* after oral administration or anal intubation. *Diseases of Aquatic Organisms*.11:85–92.
- Vigneulle, M., Breuil, G., Ceschia, G. and Blanch, A., 1993. Vaccination trials of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against two sero-types of *Vibrio anguillarum*. p. 66. Abstract from European Association of Fish Pathology, Sixth International

- Conference '*Diseases of Fish and Shellfish*', Brest, France, 510 September 1993.
- Walter, B.M., Bilkei G., 2004. Immunostimulatory effect of dietary oregano etheric oils on lymphocytes from growth-retarded, low-weight growing-finishing pigs and productivity. *Tijdschr Diergeneeskde* 129(6):178-181.
- Ward, N.L., Steven, B., Penn, K., Methe, B.A. and Detrich, W.H. III, 2009. Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species. *Extremophiles* 13:679-685.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77: 591-625.
- Westerdahl, A., Olsson, J., Kjelleberg, S., Conway, P.L. 1991. Isolation and characterisation of turbot (*Scophthalmus maximus*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2223-2228.
- Woo, N.Y.S., Ling, J.L.M. and Lo, K.M., 1995. Pathogenic *Vibrio* spp. in the sea bream, *Sparus sarba*. *Journal of Sun Yat-sen University* (Supplement), 3: 192–193.
- Wu, H. B. and Pan, J. P., 1997. Studies on the pathogenic bacteria of the vibriosis of *Seriola dumerili* in marine cage culture. *Journal of Fisheries China* 21, 171–174.
- Yamane, K., Asato, J., Kawade, N., Takahashi, H., Kimra, B., Arakawa, Y., 2004. Two cases of fatal necrotizing fascitis caused by *Photobacterium damsela* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 42(3): 1370-1372.
- Yasunaga, N., Hatai, K. and Tsukahara, J., 1983. *Pasteurella piscicida* from an epizootic of cultured red sea bream. *Fish Pathology* 18 : 107–110.
- Yiagnisis, M., Christofilogiannis, P., Rigos, G., Koutsodimou, M., Andriopoulou, A., Anastasopoulou, G., Nengas, I. and M. Alexis., 1999. Review of bacterial isolates in Greek mariculture during the period of 1995-1998. Abstract book p-

060. 9th International Conference EAFP "Diseases of Fish and Shellfish", 19-24 September 1999, Rhodos, Hellas.
- Yiagnisis, M., Vatsos, I.N., Kyriakou, C. and Alexis, M., 2007. First report of *Listonella anguillarum* isolation from diseased big scale sand smelt, *Atherina boyeri* Risso 1810, in Limnos, Greece. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologist* (27)2:61-69.
- Yiagnisis, M., Alexis, M.N., Bitchava, K., Govaris A. and Athanassopoulou, F., 2009. Effect of dietary oregano essential oil supplementation on combined infections by pathogenic bacteria-parasites (sealice and copepods) in European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Book of Abstracts* p.139., 14th EAFP International Conference, Prague, Czech Republic.
- Yiagnisis, M., Solomakos, N., Bitchava, K., Alexis, M.N. and Athanassopoulou, F., 2011. *Vibrio alginolyticus*, *V.parahaemolyticus*, *V.vulnificus* and *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* isolated from marine fish in Greece. *Journal of Applied Ichthyology* accepted.
- Yiagnisis, M. & Athanassopoulou F., 2011. Bacteria isolated from diseased wild and farmed marine fish in Greece In: "Fish Farms", ISBN 978-953-307-663-8 (in press).
- Zheng W, Wang, S.Y., 2001. Antitioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2001, 49:5165-5170.
- Zheng Z.L., Tan, J.Y.W., Liu, H.Y., Zhou, X.H., Xiang, X., Wang K.Y., 2009. Evaluaton of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance agaist *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus unctatus*). *Aquaculture*, 292 (3-4): 214-218.
- Zhu, C.H., He, J. G., and Huang, Z.J., 2000. Identification and pathogenicity of pathogen of *E.awoara* and *Epinephalus fario* ulceration disease. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (Supplement), 39: 278–282.