

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ**  
**ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«Χρήση ανοσοενισχυτικών ουσιών στις ιχθυοκαλλιέργειες»**

**ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ANNA**

**ΒΟΛΟΣ 2009**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 7780/1  
Ημερ. Εισ.: 24-11-2009  
Δωρεά: Συγγραφέας  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΙΥΠ  
2009  
ΠΑΠ

- **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :**

- 1) **Παναγιωτάκη Παναγιώτα**, Μόνιμη Επίκουρος Καθηγήτρια (M.Sc, Ph.D.) του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Επιβλέπουσα***,
- 2) **Κλαουδάτος Σπυρίδων**, Καθηγητής (Δρ.) του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***,
- 3) **Γκολομάζου Ελένη**, Λέκτορας υπό Διορισμό του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***.

Στην οικογένεια μου  
καθώς και σε όσους  
φώτισαν το δρόμο της ζωής μου

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα Παναγιώτα Παναγιωτάκη για τις ουσιαστικές παρεμβάσεις της στην εργασία και για την βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το μέλος της εξεταστικής επιτροπής Καθηγητή κ. Σπυρίδων Κλαουδάτο, για τις γνώσεις που μου πρόσφερε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου σε θέματα εντατικής εκτροφής ευρύαλων ειδών ιχθύων, ιχθυογεννητικών σταθμών, νέων υποψήφιων προς εκτροφή ειδών, εκτροφής δεκάποδων καρκινοειδών, διθύρων μαλακίων και γαστεροπόδων.

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στο μέλος της εξεταστικής επιτροπής κα Ελένη Γκολομάζου για την προθυμία και την βοήθεια που μου προσέφερε για τη διεξαγωγή αυτής της εργασίας και για το ενδιαφέρον που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την απεριόριστη συμπαράσταση, την οικονομική τους υποστήριξη όλα τα χρόνια της φοίτησης μου, καθώς και την ενθάρρυνση που μου έδωσαν στις δύσκολες στιγμές.

## Περίληψη

Στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται η χρήση των ανοσοενισχυτικών στην εκτροφή των υδρόβιων οργανισμών για την πρόληψη των ασθενειών που φαίνεται να είναι μια ελπιδοφόρος νέα προσέγγιση αλλά ταυτόχρονα και μια επιτακτική ανάγκη.

Η αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών προς αυτά βακτηριακών στελεχών, με συνέπεια τη μειωμένη αποτελεσματικότητά τους. Έτσι, οι σύγχρονοι ερευνητές άρχισαν να μελετούν τις θεραπευτικές ιδιότητες ουσιών διαφορετικής φύσεως από αυτήν των κοινών μέχρι τώρα φαρμακευτικών ουσιών.

Τα φυσικά ανοσοενισχυτικά όπως οι βιταμίνες C, E και A, τα προβιοτικά, τα πρεβιοτικά και τα εκχυλίσματα βοτάνων ή φυκών, από την παρούσα βιβλιογραφική έρευνα, φαίνεται να είναι μελλοντικά ένα αισιόδοξο «εργαλείο» για τον κλάδο των υδατοκαλλιεργειών, καθώς συμβάλλουν στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και βοηθούν τους εκτρεφόμενους οργανισμούς με φυσικό τρόπο να προστατευθούν από διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

**Λέξεις κλειδιά:** πρόληψη, ανοσοενισχυτικά, ανοσοποιητικό σύστημα

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	10
1.1. Γενικά.....	10
1.2. Τα νοσήματα των υδρόβιων οργανισμών.....	11
1.3. Πρόληψη στις ιχθυοκαλλιέργειες.....	11
<b>2. Ο Ρόλος και η σημασία της ενίσχυσης του ανοσοποιητικού συστήματος</b> .....	12
2.1. Ανοσολογική αντίδραση και διατροφή.....	13
2.2. Ανοσολογική αντίδραση και «stress».....	15
2.3. Το ανοσοποιητικό σύστημα των υδρόβιων οργανισμών.....	16
2.4. Η εντερική μικροχλωρίδα και η ανοσολογική λειτουργία.....	19
<b>3. Τα διατροφφαρμακευτικά/τροφοφαρμακευτικά ή λειτουργικά τρόφιμα</b> ...20	
3.1. Χρήση ανοσοδιεγερτικών ουσιών – Ανοσοδιατροφή.....	23
3.2. Τα ανοσοενισχυτικά.....	23
3.3. Τα ανοσοενισχυτικά στις υδατοκαλλιέργειες.....	24
<b>4. Βιταμίνες</b> .....	25
4.1. Εισαγωγή.....	25
4.2. Προβλήματα κατά την έλλειψη βιταμινών στους ιχθύς.....	25
4.3. Η σημασία των βιταμινών στην διατροφή των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών.....	26
4.3.1. Η σημασία των βιταμινών στην υποκίνηση και ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος.....	33
4.4. Η Βιταμίνη C.....	35
4.4.1. Η βιταμίνη C στην εκτροφή υδρόβιων οργανισμών.....	38

4.4.2.	Η ανοσοενισχυτική δράση της βιταμίνης C.....	40
4.5.	Η βιταμίνη E.....	44
4.5.1.	Η βιταμίνη E στην εκτροφή υδρόβιων οργανισμών.....	47
4.5.2.	Ανοσοενισχυτική δράση της βιταμίνης E.....	49
4.5.3.	Η συνδυαστική δράση της Βιταμίνης E και του σεληνίου (SE)...	52
4.6.	Η συνδυαστική δράση των βιταμινών C (ασκορβικό οξύ) και E (α-τοκοφερόλη).....	53
4.7.	Η Βιταμίνη A.....	56
4.7.1.	Η βιταμίνη A στην εκτροφή των υδρόβιων οργανισμών.....	58
4.7.2.	Ανοσοενισχυτική δράση της βιταμίνης A.....	60
<b>5.</b>	<b>Τα προβιοτικά.....</b>	<b>61</b>
5.1.	Η Ιστορική αναδρομή των προβιοτικών.....	61
5.2.	Ο τρόπος δράσης των προβιοτικών.....	63
5.3.	Τα προβιοτικά για τους υδρόβιους οργανισμούς.....	64
5.4.	Η αξιολόγηση των δυνατοτήτων των υποψήφιων προβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες.....	66
5.5.	Ο ρόλος των προβιοτικών στο προνυμφικό στάδιο των υδρόβιων οργανισμών.....	67
5.6.	Τα προβιοτικά ως ανοσοενισχυτικά στους οστεϊχθύς.....	73
5.7.	Τα προβιοτικά στο υδρόβιο περιβάλλον των εκτρεφόμενων οργανισμών.....	78
<b>6.</b>	<b>Τα πρεβιοτικά.....</b>	<b>79</b>
6.1.	Τα πρεβιοτικά και η χρήση τους.....	79
6.2.	Η διαφορά των πρεβιοτικών από τα προβιοτικά.....	81
6.3.	Η δράση των πρεβιοτικών.....	82



6.3.1. Τα πρεβιοτικά του εμπορίου.....	86
6.4. Τα συμβιωτικά ή ευβιωτικά.....	86
6.5. Τα πρεβιοτικά ως ανοσοενισχυτικά στις υδατοκαλλιέργειες.....	87
6.6. Τα συμβιωτικά στις υδατοκαλλιέργειες.....	92
6.7. Η χρήση των πρεβιοτικών για αντίσταση στις βακτηριακές μολύνσεις του γαστρεντερικού συστήματος και το μέλλον τους.....	93
<b>7. Βότανα- Φυτά- Αιθέρια Έλαια.....</b>	<b>94</b>
7.1. Εισαγωγή.....	94
7.2. Χρήση βοτάνων και αιθέριων ελαίων στις υδατοκαλλιέργειες.....	96
7.3. Οι ευεργετικές ιδιότητες των φυκών στο ανοσοποιητικό σύστημα των υδρόβιων οργανισμών.....	98
7.4. Η συνδυαστική δράση των φυκών με τα βότανα.....	99
<b>8. Συζήτηση.....</b>	<b>100</b>
<b>9. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>101</b>
9.1. Ξένη βιβλιογραφία.....	101
9.2. Ελληνική βιβλιογραφία.....	120
<b>10. Abstract.....</b>	<b>120</b>

### **Ευρετήρια πινάκων, εικόνων και σχημάτων**

<b>Πίνακας 1.</b> Ταξινόμηση ασθενειών.....	11
<b>Πίνακας 2.</b> Διατροφολογικά και οι ανοσοενισχυτικές ουσίες .....	22
<b>Πίνακας 3.</b> Η δράση της βιταμίνη Α, τα ειδικά ή μη συμπτώματα ανεπάρκειας και υπερβιταμίνωσης της.....	59
<b>Εικόνα 1.</b> Συντακτικός τύπος των βιταμινών Α, C και Ε.....	34
<b>Εικόνα 2.</b> Α) Σκολίωση, Β) Λόρδωση και Γ) Διάβρωση στο ουραίο περύγιο στα ψάρια με διατροφή ανεπαρκή σε ασκορβικό οξύ.....	40
<b>Εικόνα 3.</b> Οι συντακτικοί τύποι των τεσσάρων μορφών της ρετινόλης.....	57

<b>Εικόνα 4.</b> Σχηματική απεικόνιση της δράσης των προβιοτικών στη μικροχλωρίδα του εντέρου. ....	72
<b>Εικόνα 5.</b> Βιοθεραπεία των λιμνών .....	79

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Γενικά

Οι υδατοκαλλιέργειες είναι ένας από τους γρηγορότερους και αυξανόμενους τομείς σε παραγωγή τροφής στον κόσμο. Εντούτοις, οι ασθένειες είναι ένας βασικός περιοριστικός παράγοντας στην αύξηση και γενικότερα στην εκτροφή πολλών ειδών στις σύγχρονες υδατοκαλλιέργειες. Πλέον, οι ασθένειες είναι υπεύθυνες για την παρεμπόδιση της οικονομικής και κυρίως κοινωνικοοικονομικής ανάπτυξης σε πολλές χώρες του κόσμου (Liao, 2005).

Επομένως, η διαχείριση της υγείας των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών, που έχει σκοπό την αποφυγή αλλά και την εξάλειψη ασθενειών, είναι αναμφισβήτητα ένας από τους βασικότερους «μοχλούς» στην επιτυχημένη διαχείριση μιας οικονομικά βιώσιμης μονάδας. Μια επιτυχής διαχείριση της υγείας των υδρόβιων οργανισμών αρχίζει με την πρόληψη της ασθένειας παρά με την θεραπεία (Siwicki *et al.*, 1994). Η πρόληψη των ασθενειών στους υδρόβιους οργανισμούς περιλαμβάνει την καλή διαχείριση των ψαριών, τη σωστή και ισορροπημένη διατροφή και την καλή ποιότητα του νερού.

Στις μέρες μας, γνωρίζοντας ότι οι υδρόβιοι οργανισμοί και γενικότερα οι υδροβιότοποι είναι ιδιαίτερα ευπαθείς, δημιουργήθηκε η ανάγκη για αποφυγή των αντιβιοτικών και όλων των χημικών φαρμάκων (Shao, 2001). Αυτό έχει βαρύνουσα σημασία ιδιαίτερα στις υδατοκαλλιέργειες, όπου οι φαρμακευτικές ουσίες μεταφέρονται σε όλη την τροφική αλυσίδα ενός οικοσυστήματος και επιφέρουν τόσο βραχυπρόθεσμα όσο και μακροπρόθεσμα προβλήματα. Η πρόταση του Ιπποκράτη: «το προλάβειν μείζον εστί του θεραπεύειν», υπογραμμίζει και τονίζει τον σκοπό αυτής της εργασίας.

## 1.2. Τα νοσήματα των υδρόβιων οργανισμών

Γενικώς, υπάρχουν δύο ευρείες κατηγορίες ασθενειών που έχουν αρνητικές επιπτώσεις στους υδρόβιους οργανισμούς, οι μολυσματικές και οι μη μολυσματικές ασθένειες (Πίνακας 1) (Francis-Floyd, 2003).

Οι μολυσματικές ασθένειες προκαλούνται από τους παθογόνους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο περιβάλλον ή μεταφέρονται από άλλους, υδρόβιους ή χερσαίους οργανισμούς. Είναι μεταδοτικές ασθένειες και πολλές φορές είναι απαραίτητη η χρήση κάποιας θεραπείας για να ελεγχθούν. Αντίθετα, οι μη μολυσματικές ασθένειες προκαλούνται από διατροφικά προβλήματα (ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών στη διατροφή), από το «stress» ή από γενετικές ανωμαλίες. Μια μολυσματική ασθένεια δεν μεταδίδεται και συνήθως δεν μπορεί να θεραπευτεί από τα υπάρχοντα κτηνιατρικά φάρμακα.

Πίνακας 1. Ταξινόμηση ασθενειών (Γκολομάζου, 2007):

<b>Μολυσματικές ασθένειες</b>	
1. Παρασιτικά νοσήματα	
A. Νοσήματα που οφείλονται σε εξωπαράσιτα	B. Νοσήματα που οφείλονται σε ενδοπαράσιτα
2. Βακτηριακά νοσήματα	
A. Νοσήματα που οφείλονται σε κατά Gram αρνητικά βακτήρια	B. Νοσήματα που οφείλονται σε κατά Gram Θετικά βακτήρια
3. Νοσήματα που οφείλονται σε ιούς	
4. Νοσήματα που οφείλονται σε μύκητες	
<b>Μη μολυσματικές ασθένειες</b>	
A. Λιπώδης Εκφύλιση του Ήπατος	
B. Χειμερινό Σύνδρομο	
Γ. Φυσαλιδώδης νόσος	
Δ. Νέκρωση των βραγχίων	

## 1.3. Πρόληψη στις ιχθυοκαλλιέργειες

Η πρόληψη είναι δυνατόν να είναι ειδική και μη ειδική. Η μη ειδική πρόληψη περιλαμβάνει μέτρα τα οποία αποσκοπούν στη βελτίωση της γενικής κατάστασης των εκτρεφόμενων ειδών είτε αυξάνοντας γενετικά την αντίσταση στις ασθένειες είτε

βελτιώνοντας τις συνθήκες διαχείρισης (Vadstein, 1997). Η μη ειδική πρόληψη πραγματοποιείται με:

1. Καλές συνθήκες εκτροφής όπως π.χ. αποφυγή υψηλών ιχθυοφορτίσεων, ανεπαρκούς ταΐσματος και απομακρύνσεις νεκρών ψαριών.
2. Βελτίωση ανοσοποιητικού συστήματος με χρήση ανοσοενισχυτικών όπου συμβάλουν στην καλή κατάσταση των υδρόβιων οργανισμών και κατ' επέκταση, στην ανθεκτικότητα απέναντι στις ασθένειες.
3. Γενετική ανθεκτικότητα.

Η ειδική πρόληψη επιτυγχάνεται κυρίως με τη χρήση εμβολιασμών (Γκολομάζου, 2007).

## **2. Ο ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα από τα σημαντικότερα συστήματα κάθε ζωντανού οργανισμού, που καθορίζει την υγεία του και γίνεται ευεργέτης της ευεξίας του στη ζωή. Η ακεραιότητα του ανοσοποιητικού συστήματος επηρεάζεται κυρίως από την ηλικία, τις ορμονικές δυσλειτουργίες, το «stress» και την εφαρμογή μιας μη ισορροπημένης διατροφής.

Το ανοσοποιητικό σύστημα βρίσκεται στην πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού ενάντια σε ανεπιθύμητους εισβολείς, όπως είναι διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί. Οι συγκεκριμένοι εισβολείς ποικίλουν από συνηθισμένους και ήπιους έως και εξαιρετικά σοβαρούς και απειλητικούς για την ζωή του οργανισμού. Το ανοσοποιητικό σύστημα προστατεύει έναν οργανισμό, από την εισβολή των ιών, βακτηρίων, παρασίτων, μικροβίων, τοξινών και από όλα τα είδη μικροοργανισμών (Davidson *et al.*, 1997).

Όταν αναφερόμαστε στο ανοσοποιητικό σύστημα πρέπει να συνειδητοποιήσουμε ότι είναι πραγματικά ένα δίκτυο, ένα πολύ καλά οργανωμένο σύστημα που στην πραγματικότητα αποτελείται από τα κύτταρα, τους ιστούς, τα όργανα και τις διαδικασίες που λειτουργούν μαζί, για να υπερασπίσουν τον οργανισμό ενάντια στις επιθέσεις από τους ξένους εισβολείς με σκοπό να τους κρατήσει έξω. Αλλά ακόμα και εάν κατορθώνουν να εισβάλουν, το καθήκον του ανοσοποιητικού συστήματος είναι να τους καταστρέψει (Sahoo & Mukherjee, 2003).

Όταν το ανοσοποιητικό σύστημα είναι αδύνατο, τότε ο ζωντανός οργανισμός γίνεται πιο ευάλωτος σε ασθένειες. Γι' αυτό όταν πεθαίνει το ψάρι καταρρέει το ανοσοποιητικό σύστημα, ξεκινά ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων στην επιφάνεια της επιδερμίδας του, στα βράγχια και στη συνέχεια στη σάρκα του, καθώς οι εσωτερικοί ιστοί ενός ζωντανού και υγιούς ψαριού είναι μικροβιολογικά στείροι.

## **2.1. Ανοσολογική αντίδραση και διατροφή**

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι πάντα πολυάσχολο και βρίσκεται σε επιφυλακή για τους παθογόνους οργανισμούς που προσπαθούν να βλάψουν τον οργανισμό κάθε ζώου. Πρόκειται για ένα εξαιρετικά σύνθετο σύστημα το οποίο βασίζεται σε ένα επιμελημένο δίκτυο επικοινωνίας. Τα εκατομμύρια των οργανωμένων κυττάρων συναντούν και ανταλλάσσουν τις πληροφορίες. Μόλις τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος «λάβουν» το συναγερμό, ενεργοποιούνται και αρχίζουν να εκκρίνουν ισχυρές χημικές ουσίες παρομοιάζοντας τη δραστηριότητα αυτή ως το «ξύπνημα» ενός στρατού και την αποστολή των στρατιωτών στα σημεία προβλήματος. Όσο γρηγορότερη είναι η αντιμετώπιση τόσο καλύτερα μπορούν να καταστρέψουν τους εισβολείς (Rodriguez & Moullac, 2000). Αυτός είναι ο λόγος που πρέπει να φροντίσουμε το ανοσοποιητικό σύστημα. Όσο υγιέστερο και ισχυρότερο είναι το ανοσοποιητικό σύστημά, τόσο πιο ικανός θα είναι και ο οργανισμός να

αντιμετωπίσει κάθε μικροοργανισμό, όπως ένα ψάρι που ζει ανάμεσα σε δισεκατομμύρια μικροοργανισμούς μέσα στον υδρόβιο κόσμο (Ellis, 1999).

Ο πρώτος και ίσως σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, είναι η ενεργειακή πρόσληψη διαμέσου της τροφής, ώστε να δημιουργηθούν αντισώματα, που θα δράσουν στην πρώτη γραμμή της μάχης όταν οι παθογόνοι οργανισμοί κάνουν την εισβολή τους. Τα άτομα που υποσιτίζονται, συνήθως παρουσιάζουν ασθενές ανοσοποιητικό σύστημα και είναι πιο ευάλωτα σε ασθένειες, με αποτέλεσμα το ανοσοποιητικό σύστημα να μπαίνει σε δεύτερη μοίρα και να λειτουργεί ελλειμματικά (Chinabut & Puttinaowarat, 2005).

Συνοψίζοντας, το ανοσοποιητικό σύστημά είναι η πρώτη και η τελευταία γραμμή άμυνας ενάντια στους εχθρούς κάθε ζωντανού οργανισμού. Η ενδυνάμωση «του εσωτερικού στρατού» κάθε οργανισμού είναι καταπέλτης για να κερδίσει τη μάχη της υγείας του, με το ανοσοποιητικό σύστημα να γίνεται το κάστρο του οργανισμού, που το προστατεύει από τους κινδύνους. Ισχύει ότι «το ισχυρό ανοσοποιητικό σύστημα είναι εξαιρετικά δύσκολο να αποσυντονιστεί», όμως «όταν αποσυντονιστεί είναι δύσκολο να γίνουν ακόμα και οι πιο μικρές επιδιορθώσεις».

Είναι σημαντικό να έχει ο κάθε οργανισμός ισχυρό ανοσοποιητικό σύστημα. Τα ανοσοκύτταρα για να λειτουργήσουν χρειάζονται ένα αμινοξύ που ονομάζεται γλουταμίνη. Η γλουταμίνη προέρχεται από τις πρωτεϊνούχες τροφές. Το κυριότερο αντίδοτο στις επιθέσεις που δέχεται το ανοσοποιητικό σύστημα δεν είναι άλλο από την ισορροπημένη διατροφή.

Η λέξη «ισορροπία» είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την έννοια των βιταμινών και τη λειτουργία τους στον ζώντα οργανισμό. Οι οργανικές αυτές ουσίες παρέχουν πολύτιμες υπηρεσίες, καθώς είναι απαραίτητες για την ομαλή διεξαγωγή του μεταβολισμού και την ισορροπημένη ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Επίσης,

βοηθούν στην ανάπτυξη του σώματος και της υγείας των ιστών, ενώ παράλληλα αυξάνουν την άμυνα του οργανισμού, π.χ. η βιταμίνη C είναι πολύ σημαντική για το ανοσοποιητικό σύστημα, διότι συντελεί στην αυξημένη παραγωγή λευκοκυττάρων και επαρκών επιπέδων ιντερφερόνης, μιας πρωτεΐνης με βασικό ρόλο την παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των ιών. Επίσης, βοηθάει στη διατήρηση της καλής κατάστασης των αιμοφόρων αγγείων και συντελεί στη γρηγορότερη αποκατάσταση της υγείας (Zapata *et al.*, 2006).

## **2.2. Ανοσολογική αντίδραση και «stress»**

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μελέτες διαφόρων επιστημόνων αναγνωρίζουν ότι το «stress» επιβαρύνει σημαντικά το ανοσοποιητικό σύστημα. Ο λόγος είναι ότι κατά την εκδήλωση του «stress» εκκρίνονται ορμόνες που επηρεάζουν αρνητικά τους μηχανισμούς και τα κύτταρα άμυνας του οργανισμού. Οποιαδήποτε κι αν είναι η πηγή του «stress», σωματική ή συναισθηματική, το σώμα αντιδρά με την παραγωγή αδρεναλίνης, μιας ορμόνης που προκαλεί έναν καταγισμό άλλων ορμονικών και νευρικών αντιδράσεων, οι οποίες εμφανίζονται σε όλο το σώμα του οργανισμού. Οι συνολικές επιπτώσεις του «stress» στις διατροφικές ανάγκες δεν είναι πλήρως κατανοητές αλλά είναι γνωστό ότι, υπό συνθήκες «stress», ο μεταβολισμός του οργανισμού μπορεί να βρεθεί υπό πίεση (Whyte, 2007).

Το «stress» επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημα μειώνοντας τη δυναμική της άμυνας του και αφήνοντας τον οργανισμό, ενδεχομένως, περισσότερο εκτεθειμένο σε ασθένειες. Για να δημιουργηθεί η αδρεναλίνη απαιτείται η βιταμίνη C. Όταν τα επίπεδα αδρεναλίνης είναι υψηλά κατά τη διάρκεια μεγάλων περιόδων «stress», απαιτείται περισσότερη βιταμίνη C. Έρευνες αποκαλύπτουν ότι η έλλειψη βιταμίνης C μειώνει τη δραστηριότητα των μακροφάγων (των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος), που κυριολεκτικά τρώνε τα εισβάλλοντα βακτήρια και τους ιούς.



### 2.3. Το ανοσοποιητικό σύστημα των υδρόβιων οργανισμών

Η κύρια λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η προστασία του υδρόβιου οργανισμού από τους παθογόνους οργανισμούς. Το ανοσοποιητικό σύστημα βρίσκεται διάσπαρτο στο σώμα και έχει ως αποστολή την προφύλαξη του οργανισμού από επιβλαβείς για την υγεία του ουσίες που μπαίνουν ή παράγονται σε αυτόν, είναι δηλαδή ένα καθαρά αμυντικό σύστημα. Το ανοσοποιητικό σύστημα των υδρόβιων οργανισμών παρουσιάζει σαφείς ομοιότητες με αυτό των θηλαστικών και φαίνεται ότι επηρεάζεται από πολλές περιβαλλοντικές, φυσιολογικές και ψυχολογικές παραμέτρους όπως είναι η θερμοκρασία, η φωτοπερίοδος, το «stress» κ.ά. (Bowden *et al.*, 2007).

Στους οστεϊχθύες περιλαμβάνει ανατομικά διακριτά όργανα, όπως ο σπλήνας και οι λεμφαδένες, κύτταρα του αίματος, όπως τα πολυμορφοπύρρηνα, τα λεμφοκύτταρα και τα μονοπύρρηνα, αλλά και κύτταρα διάσπαρτα στους ιστούς του σώματος, όπως τα μακροφάγα των ιστών (Köllner *et al.*, 2004). Το ανοσοποιητικό σύστημα των γαρίδων είναι σχεδόν ίδιο με των οστεϊχθύων με κάποιες μικρές παραλλαγές. Τα «συστατικά» της κυτταρικής ανοσίας είναι τα ενεργά φαγοκύτταρα που κυριολεκτικά «καταβροχθίζουν» κάθε ξένο μόριο που εισέρχεται στον οργανισμό (Supamattaya *et al.*, 2000, Vega *et al.*, 2006).

Η ανοσία διακρίνεται σε φυσική και επίκτητη. Η φυσική ανοσία δεν προϋποθέτει την προηγούμενη επαφή του οργανισμού με κάποιο παθογόνο. Είναι πάντοτε παρούσα και αποτελεί την πρώτη άμυνα του οργανισμού απέναντι στη δυνητική απειλή. Η επίκτητη ανοσία είναι μια εξειδικευμένη μορφή αντίδρασης που κατευθύνεται έναντι ενός συγκεκριμένου παθογόνου (Kitani *et al.*, 2007).

Οι προνύμφες των ψαριών θεωρείται ότι δεν έχουν τη δυνατότητα να αναπτύξουν τη συγκεκριμένη ανοσολογική απάντηση κατά τη διάρκεια των πρώτων

σταδίων της ανάπτυξης τους. Από αυτή την άποψη, οι υδρόβιοι οργανισμοί φέρουν παθητική ανοσία από τα μητρικά αντισώματα. Σε κάθε είδος φαίνεται να παίζει σημαντικότερο ρόλο το μέγεθος παρά η ηλικία στην ανοσολογική απάντηση των ιχθύων. Αντίθετα οι Hrubec *et al.* (2004) υποστηρίζουν ότι η λειτουργία της ανοσίας επηρεάζεται από την ηλικία του ζώου. Αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι τα ιχθύδια έχουν ανώριμο ανοσοποιητικό σύστημα καθώς τα λεμφοειδή όργανα δεν έχουν ακόμα δημιουργηθεί.

Η μη ειδική ανοσία είναι πιθανώς η σημαντικότερη υπεράσπιση ενάντια στους μικροοργανισμούς στο προνυμφικό στάδιο των υδρόβιων οργανισμών. Αν και η γνώση μας, στην έμφυτη ανοσία των υδρόβιων οργανισμών ολοένα και αυξάνεται, είναι σχετικά λίγο άγνωστη η λειτουργία του γενικού ανοσοποιητικού συστήματος στις υδρόβιες προνύμφες. Επιπλέον, φαίνεται ότι τα μικροβιακά προβλήματα στο προνυμφικό στάδιο οφείλονται πιθανότατα στα ευκαιριακά παθογόνα βακτήρια. Αυτό υπογραμμίζει τη σημασία της μη ειδικής ανοσίας για τις προνύμφες που εκτρέφονται στους εντατικούς ρυθμούς των εκκολαπτηρίων (Vadstein, 1997).

Για τον επιτυχή αποκλεισμό των «εισβολέων», τα ζώα χρησιμοποιούν πολλούς διαφορετικούς αμυντικούς μηχανισμούς, χρησιμοποιούν πολλαπλές γραμμές άμυνας, δηλαδή ένας μικροοργανισμός που πέτυχε να διαπεράσει την πρώτη γραμμή άμυνας, βρίσκεται στη συνέχεια αντιμέτωπος με ένα δεύτερο, μεγαλύτερο εμπόδιο κ.ο.κ. Την πρώτη και πιο εμφανή γραμμή άμυνας στην εισβολή αποτελούν οι φυσικοί φραγμοί (δέρμα και βλεννογόνοι). Οι φυσικοί φραγμοί συνιστούν τη μη ειδική ή έμφυτη ανοσία, η οποία προσδίδεται από ποικιλία μη ειδικών παραγόντων (μηχανικοί, γενετικοί, ορμονικοί κ.α.). Η έμφυτη ανοσία υπάρχει σε κάθε φυσιολογικό άτομο από γεννήσεώς του, γι' αυτό και είναι μη ειδική (Wang *et al.*, 2007). Πολλοί από τους παράγοντές της δρουν μαζί με άλλους ειδικούς

ανοσολογικούς παράγοντες, όπως τα αντισώματα και ειδικά κύτταρα, που στο σύνολό τους συνιστούν την επίκτητη ανοσία. Έτσι, το δέρμα αποτελεί ένα δραστικό φραγμό στους μικροοργανισμούς.

Ο ρόλος της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας είναι επίσης εξαιρετικά σημαντικός για την άμυνα του ξενιστή καθώς αποτρέπει αποτελεσματικά τον αποικισμό από παθογόνα μικρόβια (αντίσταση στον αποικισμό) (Kirkoudis *et al.*, 2002).

Η ενδογενής εντερική μικροχλωρίδα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της φυσιολογικής ιστολογικής δομής του εντέρου όπου διαταραχές της οδηγούν σε εντερική ατροφία και σε μείωση του πληθυσμού των λεμφοκυττάρων στο βλεννογόνο. Ο όρος «ενδογενής μικροχλωρίδα» αναφέρεται στο σύνηθες σύνθετο σύνολο του βακτηριακού πληθυσμού που αποικίζει στην εντερική περιοχή του ξενιστή. Δεν έχει όμως ακόμη διευκρινιστεί αν η μικροβιακή χλωρίδα στο έντερο των ψαριών είναι ενδογενής και σταθερή σε όλες τις ηλικίες των ψαριών ή αν επηρεάζεται από το περιβάλλον τους και την καθαρότητα των υδάτων (Song & Huang, 2000).

Συνήθως τα περισσότερα μικρόβια είναι παροδικά στα υδρόβια ζώα, σε αντίθεση με τη μικροχλωρίδα που υπάρχει στο γαστρεντερικό τμήμα του οργανισμού και καθώς οι υδρόβιοι οργανισμοί είναι ποικιλόθερμοι η αλλαγή στη θερμοκρασία μπορεί να είναι ένας από τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροχλωρίδα των ψαριών, ομοίως η αλατότητα και η ωσμωτική ρύθμιση (Panigrahi *et al.*, 2005). Το σημαντικότερο όμως είναι ότι η φυσιολογική εντερική μικροχλωρίδα μεταβάλλεται από τη λήψη αντιβιοτικών ευρέος φάσματος με συνέπεια να διαταράσσεται η λειτουργία του εντερικού φραγμού, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών επιφέρει δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία του υδρόβιου οργανισμού.

#### 2.4. Η εντερική μικροχλωρίδα και η ανοσολογική λειτουργία

Το έντερο έχει πάψει πλέον να θεωρείται μόνο ως ένα όργανο μεταφοράς, επεξεργασίας και απορρόφησης θρεπτικών συστατικών και έχει αναγνωριστεί ως ο σημαντικός ρόλος της μεταβολικής, ενδοκρινικής και ανοσολογικής του λειτουργίας.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο εντερικός βλεννογόνος αποτελεί μείζονα ανατομικό και λειτουργικό φραγμό. Η εντερική μικροχλωρίδα είναι ένα σημαντικό τμήμα του αμυντικού μηχανισμού του εντέρου. Σε περιπτώσεις φλεγμονής του εντέρου οι αλληλοεπιδράσεις ξενιστή-μικροοργανισμών διαταράσσονται και η φλεγμονή συνοδεύεται από διατάραξη της ισορροπίας της εντερικής μικροχλωρίδας, με αποτέλεσμα οι ενδογενείς μικροοργανισμοί του εντέρου να επάγουν σε ανοσο-απόκριση (Irianto & Austin, 2002).

Υπάρχουν τρεις κύριες οδοί μέσω των οποίων το έντερο ενεργεί ως αμυντικό σύστημα. Η πρώτη είναι μέσω της εδρεύουσας μικροχλωρίδας, η οποία προστατεύει την περιοχή από την εισβολή των βακτηρίων. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν τον ανταγωνισμό για τα θρεπτικά συστατικά και για τις περιοχές-δέκτες στο τοίχωμα του εντέρου και τη δημιουργία ενός δυσμενούς περιβάλλοντος για τα παθογόνα. Κατά δεύτερον, τα κύτταρα του εντερικού τοιχώματος όχι μόνο απορροφούν τα θρεπτικά συστατικά, αλλά παρέχουν και ένα προστατευτικό φράγμα στην είσοδο επιβλαβών ουσιών. Τρίτον, το ανοσοποιητικό σύστημα του εντέρου αποτελείται από ειδικευμένα ανοσολογικά κύτταρα. Τα εντερικά βακτήρια επικοινωνούν με τα κύτταρα του γαστρεντερικού ανοσοποιητικού συστήματος και το ήπαρ (Arnesen *et al.*, 2002) για να συντονίσουν την ανοσολογική απάντηση στα αντιγόνα των τροφίμων και τους επιβλαβείς μικροοργανισμούς. Κατά συνέπεια, η εντερική μικροχλωρίδα είναι απαραίτητη για να λειτουργήσει ο προστατευτικός μηχανισμός στα βέλτιστα επίπεδα. Στην πραγματικότητα, το να μην υπάρχει η σωστή

ισορροπία των ευεργετικών βακτηρίων στο έντερο, έχει συνδεθεί με διάφορες παθήσεις.

Ο προστατευτικός ρόλος του γαστρεντερικού συστήματος συμπληρώνεται από το λεμφικό σύστημα του εντέρου και η ύπαρξη της εντερικής μικροχλωρίδας κρίνεται απαραίτητη για την ανοσολογική ενεργοποίηση του βλεννογόνου και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου, το επιθήλιο και το ανοσοποιητικό σύστημα του εντερικού βλεννογόνου διαμορφώνουν το λεγόμενο «γαστρεντερικό οικοσύστημα». Για την ολοκληρωμένη μορφολογική και λειτουργική ωρίμανση του πεπτικού συστήματος απαιτείται η παρουσία και των τριών αυτών παραγόντων. Τα συστήματα αυτά ασκούν τις ιδιαίτερες λειτουργίες τους, ενώ παράλληλα οι πολυάριθμες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα διαμορφώνουν μια σύνθετη κατάσταση ισορροπίας, η οποία καθορίζει την ανάπτυξη, τη μορφολογία και τη λειτουργία, τόσο των επιμέρους παραγόντων, όσο και του πεπτικού συστήματος συνολικά (Hansen & Olafsen, 1999).

Για να τροποποιήσουμε και να ενισχύσουμε την εντερική μικροχλωρίδα με στόχο να ωφελήσουμε την υγεία του οργανισμού, χρησιμοποιούμε συχνά τα αναοσοενισχυτικά (π.χ. προβιοτικά) όπου πολλές μελέτες έχουν παρουσιάσει ελπιδοφόρα αποτελέσματα (Kumar *et al.*, 2006).

### **3. ΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ/ΤΡΟΦΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ Η΄ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΑ**

Μία επαναστατική μέθοδος, στον τομέα της ιατρικής και της κτηνιατρικής είναι τα διατροφφαρμακευτικά. Κάθε συστατικό που θεωρείται μέρος ή τμήμα ενός τροφίμου με ενεργή ιατρική δράση, είτε προς την κατεύθυνση της πρόληψης και

διατήρηση της υγείας, είτε της αποθεραπείας, μπορεί να οριστεί ως διατροφφαρμακευτικό (πίνακας 2).

Ταυτόχρονα, βιοενεργά τρόφιμα ορίζονται ως τα τροποποιημένα τρόφιμα ή τα διατροφικά συστατικά τους, που προάγουν και συνεισφέρουν στην υγεία πέραν των παραδοσιακών συστατικών που περιέχουν.

Τα βιοενεργά συστατικά αποτελούν διαιτητικά συμπληρώματα, όπως τα φυτοχημικά, οι βιταμίνες και τα ιχνοστοιχεία, οι χημικές μορφές των μετάλλων, τα αντιοξειδωτικά, οι βοτανικές ουσίες, τα φλαβονοειδή, οι πολυσακχαρίτες, τα προβιοτικά, συγκεκριμένα εκχυλίσματα αρωματικών φυτών, τα πρεβιοτικά, τα ανοσοενισχυτικά κ.α. Η συνεισφορά τους έγκειται αποκλειστικά στην προαγωγή της υγείας.

Τα βιοτρόφιμα περιέχουν σταθερές συγκεντρώσεις βιοενεργών συστατικών που περιλαμβάνονται στα διατροφφαρμακευτικά και προέρχονται από φυσικά συστατικά όταν προστίθενται στις κλασικές τροφές και καταναλώνονται ως μέρος της φυσιολογικής δίαιτας, προσφέροντας παράλληλα ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του εκτρεφόμενου οργανισμού. Μπορεί να ελαττώσουν την εμφάνιση ασθενειών, να μειώσουν την ένταση των συμπτωμάτων ή να προάγουν την φυσική άμυνα του οργανισμού. Τα βιοενεργά τρόφιμα καταναλώνονται ως τρόφιμα και όχι ως φαρμακευτικές ουσίες και τα ευεργετικά τους αποτελέσματα επιδιώκονται στις φυσιολογικές δόσεις κατανάλωσης της τροφής (Siwicki *et al.*, 1994).

Σε μία νέα αντίληψη στη ζωική παραγωγή, η χρήση βιοενεργών συστατικών επιδρά στον μεταβολισμό του οργανισμού και στη λειτουργία των βασικών του συστημάτων, με τρόπο που να διασφαλίζει την υγεία με διατροφικά μέσα.

Πίνακας 2. Διατροφoφαρμακευτικά και οι ανοσοενισχυτικές ουσίες

Βιταμίνες	Φαινολικές ενώσεις	Πρωτεϊνικά στοιχεία (αμινοξέα)	Παράγωγα υδατανθρακών	Λιπαρά οξέα	Ιχνοστοιχεία	Μικρο-οργανισμοί
Καροτενοειδή	Κουμαρίνες	Αμινοξέα	Ολιγοσακχαρίτες	ω-3 PUFA	Ca	Προβιοτικά
Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C)	Ταννίνες	Καπρασινοειδή	N.S.P	ω-6 λιπαρά οξέα	Se	Ζύμες
Τοκοτριενόλες	Λιγνίνες	Ισοθειοκυανικά	Πρεβιοτικά	Σφιγγο λιπίδια	K	
Τοκοφερόλες	Ανθοκυανίνες	Ινδόλες			Cu	
Φολικό οξύ	Ισοφλαβόνες	Χολίνη			Zn	
	Φλαβόνες	Εκχύλισμα ζύμης				

Λειτουργίες και οφέλη των διατροφoφαρμακευτικών:

- μεταβάλουν προς όφελος των οξυγαλακτικών βακτηρίων την φυσιολογική εντερική χλωρίδα (ως προβιοτικά)
- αδρανοποιούν τις τοξίνες και τους μεταβολίτες των μυκήτων
- ελαττώνουν την παραγωγή κυτοκινών που επιδρούν δυσμενώς στην μετατρεψιμότητα της τροφής
- μειώνουν τον ρυθμό επικάθησης μικροβίων
- ελέγχουν την οξειδωση των συστατικών της τροφής και ενεργούν ως αντιοξειδωτικές ενώσεις
- αναπτύσσουν και υποβοηθούν την ανοσολογική ανταπόκριση
- αποδυναμώνουν τις επιδράσεις τους «stress» στον οργανισμό
- επιδρούν στο λιπιδιμικό προφίλ και
- επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων δια μέσου των ορμονών και των υποδοχέων τους (Wang *et al.*, 2005).

Η παρατήρηση του Ιπποκράτη ήδη από το 400 π.Χ.: «άσε την τροφή να γίνει το φάρμακό σου και φάρμακο να γίνει η τροφή σου», επαληθεύεται και είναι ιδιαίτερα επίκαιρη και χρήσιμη σε κάθε ζωντανό οργανισμό. Είναι τα διατροφολογικά είναι μία εν δυνάμει επανάσταση που επαναφέρει το δόγμα του Ιπποκράτη στην σύγχρονη κοινωνία. Το τελικό συμπέρασμα από τα παραπάνω στοιχεία είναι πως ενδεχομένως, τα διατροφολογικά έχουν θετικές επιδράσεις στην υγεία του ζωντανού οργανισμού, όμως η τεκμηρίωση αυτών των επιδράσεων πρέπει να προηγείται και στη συνέχεια τα προτερήματα των τροφίμων αυτών, να κοινοποιούνται στη διεθνή αγορά, για χρήση και κατανάλωση.

### **3.1. Χρήση ανοσοδιεγερτικών ουσιών - Ανοσοδιατροφή**

Η χρήση θρεπτικών συστατικών που επιδρούν στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι γνωστή ως διατροφική ανοσολογία ή ανοσοδιατροφή. Ορίζεται ως η τροποποίηση των λειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω στοιχείων που χορηγούνται με την τροφή σε συγκεντρώσεις υψηλότερες αυτών που φυσιολογικά υφίστανται στην διατροφή του. Η διατροφική ανοσολογία αποτελεί ένα πολύπλοκο επιστημονικό αντικείμενο που η επιτυχής κατάληξη του, θα σημαίνει την εκτροφή των υδρόβιων οργανισμών χωρίς την χρήση φαρμακευτικών ουσιών ή αντιβιοτικών (Skoufos *et al.*, 2007).

### **3.2. Τα ανοσοενισχυτικά**

Πρόκειται για ουσίες που χορηγούνται μαζί με τα αντιγόνα στα εμβόλια ή χώρια και οι οποίες, χωρίς να είναι ειδικές, ενισχύουν ή τροποποιούν την ανοσοαντίδραση του συγκεκριμένου αντιγόνου (Raa, 2000).

Είναι ουσίες που ενισχύουν σε μεγάλο βαθμό την ανταπόκριση του σώματος στα εμβόλια (Lorenzen, 1999) και είναι ουσιώδεις εάν επιζητείται να εδραιωθεί



μακράς διάρκειας ανοσολογική μνήμη σε διαλυτά αντιγόνα. Έτσι επιτυγχάνεται πιο δραστική χυμική ή κυτταρική ανοσία απ' ό,τι αν το αντιγόνο ήταν μόνο του.

Βρίσκουν εφαρμογή στην ενεργητική ανοσοποίηση με αδρανοποιημένα εμβόλια ή στις τροφές (Misra *et al.*, 2006). Συνήθως, τα ελεύθερα αντιγόνα απορροφώνται γρήγορα από τους γύρω ιστούς και καταστρέφονται από τα μακροφάγα, πολλές φορές πριν προλάβουν να διεγείρουν ανοσοαντίδραση. Η αποφυγή της ταχείας απορρόφησης βρέθηκε ότι επιτυγχάνεται με τη χρήση ουσιών που συμπεριφέρονται ως μακράς διάρκειας αποθήκες αντιγόνων (Anderson, 1992).

Τα ανοσοενισχυτικά δρουν κατά διαφόρους τρόπους. Τα στερεά ανοσοενισχυτικά προστατεύουν τα αντιγόνα από τη γρήγορη αποδόμηση και έτσι παρατείνουν τη δράση των αντιγόνων που περιέχουν (Thompson *et al.*, 1993).

### **3.3. Τα ανοσοενισχυτικά στις υδατοκαλλιέργειες**

Η χρήση των ανοσοενισχυτικών στην εκτροφή των υδρόβιων οργανισμών για την πρόληψη των ασθενειών είναι μια ελπιδοφόρος νέα ανάπτυξη αλλά ταυτόχρονα και μια επιτακτική ανάγκη. Η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών προς αυτά βακτηριακών στελεχών, με συνέπεια τη μειωμένη αποτελεσματικότητά τους. Έτσι, έχουν αρχίσει ήδη έρευνες που μελετούν τις θεραπευτικές ιδιότητες ουσιών διαφορετικής φύσεως από αυτήν των κοινών μέχρι τώρα φαρμάκων.

Γενικά, τα ανοσοενισχυτικά περιλαμβάνουν μια ομάδα βιολογικών και συνθετικών ενώσεων που ενισχύουν τους μη ειδικούς αμυντικούς μηχανισμούς στους υδρόβιους οργανισμούς (Siwicki *et al.*, 1994).

Τα πιο ευρέως χρησιμοποιημένα είναι τα εξής:

- Βιταμίνες
- Προβιοτικά

- Πρεβιοτικά
- Αιθέρια έλαια, εκχυλίσματα βοτάνων και φύκη

## **4. ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ**

### **4.1. Εισαγωγή**

Τα τελευταία χρόνια στις σύγχρονες υδατοκαλλιέργειες έχει παρατηρηθεί ότι η έλλειψη βιταμινών (αβιταμίνωση) έχει δημιουργήσει πολλαπλά και σύνθετα προβλήματα στην εκτροφή των υδρόβιων οργανισμών, όπως για παράδειγμα η νωχελικότητα στην κίνηση, η ανήσυχη πλευστότητα, η απώλεια όρεξης κατά την περίοδο σίτισης με αποτέλεσμα φαινόμενα ασιτίας και έντονου περιορισμού στην αύξηση του μεγέθους.

Επιπρόσθετα, η διάγνωση της έλλειψής των βιταμινών μπορεί να αποδειχτεί ιδιαίτερα δύσκολη, καθώς τα συμπτώματά της μπορεί να αποδοθούν σε άλλες ασθένειες ή ακόμη και να μην παρατηρηθούν προβλήματα που πολλές φορές είναι μη αντιστρέψιμα, υπογραμμίζοντας ταυτόχρονα τη σημασία και την ανάγκη της χορήγησης πολυβιταμινών για την προώθηση της άρτιας υγείας των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών (Qin *et al.*, 2001).

Θεωρήθηκε από τους σύγχρονους επιστήμονες-ιχθυολόγους αλλά και από τους εκτροφείς ότι η παραμέληση αυτών των προβλημάτων μπορεί να οδηγήσει σε ανεπανόρθωτες καταστροφές, που θα συμβάλουν σε ολοένα και μειωμένη αποδοτικότητα της μονάδας, καθιστώντας τη μη παραγωγική και ταυτόχρονα μη οικονομικά βιώσιμη αγορά.

### **4.2. Προβλήματα κατά την έλλειψη βιταμινών στους ιχθύς**

Η έλλειψη της βιταμίνης Α προκαλεί τραύματα στον οφθαλμό των σαλμοειδών, ενώ η έλλειψη της βιταμίνης Ε οδηγεί σε μυϊκή καταστροφή, όπου

μπορούμε να παρατηρήσουμε την αλλαγή των ινών και τον πολλαπλασιασμό του συνδετικού ιστού.

Στην ιριδιζούσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) η ανεπάρκεια της βιταμίνης B1 προκαλεί απώλεια ισορροπίας και η ανεπάρκεια της βιταμίνης B2 προκαλεί οφθαλμολογικά προβλήματα στην ομάδα των σαλμονοειδών. Η βιταμίνη B6 είναι απαραίτητη για τη σύνθεση των νευρικών κυττάρων και η ανεπάρκεια της επιφέρει νευρικές αναταραχές (ανώμαλη κολύμβηση ή έντονη νευρική περιστροφή). Η βιταμίνη B12 έχει την ίδια σχεδόν λειτουργία με το φολικό οξύ και είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Η βιταμίνη C λαμβάνει μέρος σε ένα μεγάλο αριθμό ενζυμικών αντιδράσεων (σύνθεση του κολλαγόνου και χόνδρων, σύνθεση της αδρεναλίνης- αντί «stress» επίδραση, στο σύστημα αναπαραγωγής κτλ.) και η έλλειψη της συνήθως προκαλεί παραμορφώσεις στους σπόνδυλους της σπονδυλικής στήλης (σκολίωση και λόρδωση) και ευθύνεται για τις σκελετικές ανωμαλίες (Sahoo *et al.*, 2003). Στο ευρωπαϊκό χέλι (*Anguilla anguilla*), η ανεπάρκεια τη βιταμίνης C προκαλεί αιμορραγίες στον εγκέφαλο (Francis-Floyd, 1992).

#### **4.3. Η σημασία των βιταμινών στην διατροφή των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών**

Η λέξη βιταμίνη προέρχεται από το λατινικό όρο «*vita*» που σημαίνει «ζωή». Η αξία των βιταμινών είναι τεράστια διότι αν και οι ίδιες δεν προσφέρουν ενέργεια στον οργανισμό είναι απαραίτητες για την αφομοίωση των τροφίμων, την ενδοκυτταρική θρέψη των ιστών και οργάνων του σώματος κάθε υδρόβιου οργανισμού. Οι βιταμίνες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και την κανονική λειτουργία του οργανισμού, καθώς και για την απορρόφηση των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων και των λιπών. Στις βιταμίνες ακόμη, στηρίζεται η σύνθεση των

ενζύμων και των ορμονών και γενικότερα, χωρίς την ύπαρξή τους οι περισσότερες βιοχημικές αντιδράσεις του οργανισμού ή θα ήταν αδύνατες ή θα υπολειπόμενες.

Οι βιταμίνες ανήκουν στις προσθετικές ομάδες, είναι οργανικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που λειτουργούν ως συστατικά συνενζύμων ή ενζύμων σε διάφορες χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον ζωικό οργανισμό. Είναι ουσίες αναγκαίες σε ελάχιστες ποσότητες, που προσλαμβάνονται κυρίως με τις τροφές και εμπλέκονται σε βασικές λειτουργίες του οργανισμού όπως η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός (Moe *et al.*, 2004).

Η έννοια της βιταμίνης διατυπώθηκε πρώτη φορά από τον Ολλανδό γιατρό Κρίστιαν Άικμαν, τιμημένο με βραβείο Νόμπελ (1896) που ανακάλυψε ότι η ασθένεια μπέρι-μπέρι (beri-beri) οφειλόταν στη χρήση ξεφλουδισμένου ρυζιού, ενώ με το πλήρες ρύζι δεν εμφανίζονταν. Παρουσίασε ένα πείραμα με εκχύλισμα πλήρους ρυζιού κατά της νόσου και η ιδιότητα αυτή αποδόθηκε σε μία αζωτούχο ένωση που ονομάστηκε βιταμίνη.

Οι βιταμίνες συμβολίστηκαν με γράμματα σύμφωνα με τη λειτουργία της κάθε μιας από αυτές (A, B, C, D κτλ.). Στη πορεία του χρόνου, τους δόθηκαν κατάλληλες επιστημονικές ονομασίες που είχαν να κάνουν με τη χημική τους δομή. Σήμερα είναι γνωστές με ένα γράμμα του λατινικού αλφαβήτου ή με την κοινή επιστημονική τους ονομασία. Ζωτικής σημασίας είναι το γεγονός ότι οι βιταμίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του οργανισμού και συμμετέχουν στην εκτέλεση και επιτέλεση αρκετών βασικών λειτουργιών. Ο οργανισμός δεν μπορεί να τις συνθέσει, τουλάχιστον στην ποσότητα που του είναι απαραίτητες. Όπως ειπώθηκε και παραπάνω είναι συστατικά των συνενζύμων που είναι απαραίτητα για να δράσουν τα ένζυμα και να συντελεσθούν οι μεταβολικές πορείες μέσα στον οργανισμό.

Οι βιταμίνες που είναι γνωστές σήμερα είναι 16, και χωρίζονται σε 2 κατηγορίες ανάλογα με το αν διαλύονται στο λίπος ή στο νερό. Διακρίνονται σε υδατοδιαλυτές (B (B1, B2, B5, B6, B12), C, P) και λιποδιαλυτές (A, D, E, K) η απορρόφηση των οποίων (λιποδιαλυτών) εξαρτάται από την απορρόφηση των λιπών.

Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες συμμετέχουν στη μεταφορά ενέργειας και στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων και των λιπών. Μερικές από τις λιποδιαλυτές βιταμίνες αποτελούν βασικό τμήμα των βιολογικών μεμβρανών και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της λειτουργικής ακεραιότητάς τους. Ορισμένες δρουν σε γενετικό επίπεδο και ελέγχουν τη σύνθεση ορισμένων ενζύμων. Η συγκεκριμένη κατηγορία βιταμινών περιέχει άνθρακα, υδρογόνο και οξυγόνο και διαφέρει από τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες. Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες έχουν την τάση να αποθηκεύονται στους ιστούς και ιδιαίτερα στο ήπαρ (Lall, 2002).

Γενικά οι βιταμίνες είναι καταλύτες και ενισχύουν την οργανική άμυνα, την αναπαραγωγή και την ισορροπία του νευρικού συστήματος. Επιγραμματικά αναφέρουμε κάποιες από τις λειτουργίες των κύριων βιταμινών:

#### A. Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες:

- i. Η βιταμίνη B1 (θειαμίνη) είναι μια αζωτούχος αλκοόλη που συμμετέχει ως συνένζυμο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Είναι απαραίτητη για τη σύνθεση της ουσίας «ακετυλοχολίνη», της οποίας η έλλειψη συνδέεται με νευρολογικές διαταραχές.
- ii. Η βιταμίνη B2 (ριβοφλαβίνη) συμμετέχει στις οξειδωτικές αντιδράσεις του κυττάρου. Βοηθά στην διαδικασία της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής. Επίσης, σπουδαίος είναι ο ρόλος της στη μετατροπή των τροφών σε ενέργεια.
- iii. Η βιταμίνη B5 (παντοθενικό οξύ) συμβάλλει στην ομαλή σωματική ανάπτυξη και στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος. Συμμετέχει στον

μεταβολισμό των λιπών, υδατανθράκων και πρωτεϊνών. Είναι ιδιαίτερα σημαντική για την άρτια λειτουργία των επινεφριδίων και απαραίτητη για την μετατροπή του λίπους σε ενέργεια. Παράγεται συνθετικά από τη μικροβιακή μικροχλωρίδα του εντέρου και βρίσκεται σε πολλές τροφές, για αυτό πήρε και την ονομασία της, από τη λέξη «πάντοθεν».

- iv. Η βιταμίνη B3 (νιασίνη ή νικοτιναμίδιο ή νικοτινικό οξύ) είναι απαραίτητη για την υγεία του δέρματος και του πεπτικού συστήματος. Αυξάνει την ενέργεια αξιοποιώντας κατάλληλα τις τροφές. Ενεργοποιεί σημαντικά το ασβέστιο και τον φώσφορο και είναι απαραίτητη για την ακεραιότητα των οστών. Βοηθά επίσης στην αφομοίωση και απορρόφηση της βιταμίνης A.
- v. Η βιταμίνη B4 (αδενίνη) πέρα από τη δράση της σαν βιταμίνη ευνοεί και το σχηματισμό των λευκοκυττάρων (κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος). Σήμερα δεν κατατάσσεται πλέον στις βιταμίνες.
- vi. Η βιταμίνη B6 (πυριδοξίνη) λειτουργεί ως φωσφορική πυριδοξάλη. Βρίσκεται σε 3 μορφές γνωστές με τις ονομασίες πυριδοξίνη, πυριδοξαμίνη και πυριδοξάλη. Αποτελεί συστατικό των συνενζύμων, τα οποία συμμετέχουν στο μεταβολισμό των αμινοξέων και υπεισέρχεται σε ορισμένες διαδικασίες μεταβολισμού των λιπών και των υδατανθράκων. Απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου, του νευρικού και του μυϊκού συστήματος. Επίσης, είναι απαραίτητη για τη δημιουργία αντισωμάτων και ερυθρών αιμοσφαιρίων (σχηματισμός αιμοσφαιρίνης).
- vii. Η βιταμίνη B12 (κοβαλαμίνη) συμμετέχει στη σύνθεση των πρωτεϊνών στον πυρήνα των κυττάρων, σχηματίζει και αναζωογονεί τα ερυθρά αιμοσφαίρια και διατηρεί υγιές το νευρικό σύστημα. Αυξάνει την ενεργητικότητα και μειώνει την ευαισθησία.

- viii. Η βιταμίνη B9 (φολικό οξύ) συμμετέχει στη διαδικασία της ωρίμανσης και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του DNA και RNA του οργανισμού και συμβάλλει στην υγεία του δέρματος. Συμμετέχει στον σχηματισμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων, στην νευρική και αναπαραγωγική διαδικασία.
- ix. Η βιοτίνη (βιταμίνη H) συντίθεται από την εντερική χλωρίδα και περιέχεται σε μεγάλη ποσότητα στη ζύμη, στα αβγά και στο γάλα της αγελάδας. Είναι συστατικό «κλειδί» για το μεταβολισμό των λιπιδίων αλλά και των αμινοξέων. Πρόκειται για κρυσταλλική αζωτούχο οργανική ένωση διαλυτή στο νερό και την αλκοόλη αλλά αδιάλυτη στους άλλους οργανικούς διαλύτες. Είναι από τις πιο παλιές γνωστές βιταμίνες η οποία απομονώθηκε στην αρχή σαν παράγοντας μικροβιακής αύξησης.
- x. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) συμμετέχει σε πολλά ενζυμικά συστήματα και είναι απόλυτα απαραίτητη για τον σχηματισμό αλλά και για την διατήρηση του κολλαγόνου. Ενδυναμώνει το ανοσοποιητικό σύστημα προλαμβάνοντας μολύνσεις από διάφορα παθογόνα ή ευκαιριακά παθογόνα βακτήρια και ιούς. Έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και αυξάνει την απορρόφηση του σιδήρου (Fe) (Kumari *et al.*, 2003). Επιδρά στη διατήρηση της σταθερότητας των αιμοφόρων αγγείων, στο μεταβολισμό των αμινοξέων και της απελευθέρωσης των διαφόρων ορμονών στα επινεφρίδια (FAO, 2007).

#### B. Λιποδιαλυτές βιταμίνες:

- i. Η βιταμίνη A (αξηροφθόλη ή αντιξηροφθαλμική) αποθηκεύεται στο συκώτι, στα νεφρά, στα επινεφρίδια και στο λίπος του σώματος. Προβιταμίνες της βιταμίνης A είναι οι καροτίνες α, β, γ και η κυπτοξανθίνη. Συμμετέχει στο σχηματισμό ουσιών που είναι απαραίτητες για την όραση. Βοηθά στην άρτια

λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, βοηθώντας τον οργανισμό να καταπολεμήσει μολύνσεις και βακτήρια συντελώντας ταυτόχρονα στην ανάπτυξη του οργανισμού. Επίσης είναι απαραίτητη για την παραγωγή ορισμένων ορμονών. Η βιταμίνη A<sub>1</sub> (ρετινόλη), η βιταμίνη A<sub>2</sub> (δεϋδρορετινόλη) και η αλδεϋδη της A<sub>2</sub> ή ρεριτίνη είναι μορφές της βιταμίνης A. Το β-καροτένιο είναι η προβιταμίνη της βιταμίνης A, που βοηθά στην προστασία των κυττάρων από τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου. Η έλλειψη της βιταμίνης A προκαλεί ατροφία των επιθηλιακών κυττάρων και προκαλεί επίσης αναστολή της ανάπτυξης των οστών, μειωμένη αντίσταση του οργανισμού στις λοιμώξεις και σοβαρές βλάβες στο οπτικό σύστημα. Επηρεάζει τον μεταβολισμό των λιπών και των απαραίτητων λιπαρών οξέων. Ακόμα, συντελεί στη καλή λειτουργία του πεπτικού, του αναπνευστικού και του απεκκριτικού συστήματος.

- ii. Η βιταμίνη E (τοκοφερόλη) έχει αντιοξειδωτική δράση που δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, εμποδίζοντας την οξείδωση και κατά συνέπεια τις εκφυλιστικές μορφές σε διάφορους ιστούς του οργανισμού. Είναι απαραίτητη για τη δημιουργία ερυθρών αιμοσφαιρίων, μειώνει την κόπωση και επιταχύνει την επούλωση τραυμάτων. Προστατεύει τα αγγεία και υποκινεί το ανοσοποιητικό σύστημα. Η βιταμίνη E προστατεύει τα ερυθρά αιμοσφαίρια από την πρόωρη ωρίμανση και θεωρείται απαραίτητο συστατικό για την «κυτταρική αναπνοή». Η έλλειψή της μπορεί να προκαλέσει την καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων και επηρεάζει το νευρικό και μυϊκό σύστημα (Saltei *et al.*, 1988). Επίσης είναι απαραίτητη κατά την περίοδο αναπαραγωγής, στην διατήρηση της ελαστικότητας των κυτταρικών



τοιχωμάτων των σπερματοζωαρίων, πράγμα που βοηθά στην κινητικότητα τους και εμποδίζει την συγκόλληση τους.

- iii. Η βιταμίνη K (ναφθοκινάνη ή κινόνη) βρίσκεται σε δύο μορφές: η K1 βρίσκεται κυρίως στα πράσινα λαχανικά και η K2 συντίθεται από την εντερική μικροχλωρίδα. Είναι σημαντική για τη σύνθεση ορισμένων πρωτεϊνών που βοηθούν στην πήξη του αίματος και στην ανάπτυξη των οστών. Σε περιπτώσεις έλλειψης της βιταμίνης K εκδηλώνονται αιμορραγίες σε διάφορα ενδοκοιλιακά όργανα, στον εγκέφαλο αλλά και σε άλλα όργανα, γεγονός για το οποίο χαρακτηρίζεται και ως «αντιαιμορραγική». Η ανεπάρκεια της βιταμίνης K μπορεί να παρατηρηθεί σε περιπτώσεις όπως η καταστροφή της εντερικής μικροχλωρίδας, που μπορεί να συμβεί έπειτα από παρατεταμένη χρήση αντιβιοτικών.
- iv. Βιταμίνη D (χοληκαλσιφερόλη) συμμετέχει στον μεταβολισμό του ασβεστίου και του φωσφόρου. Την βιταμίνη D την συναντάμε με τη μορφή της εργοκαλσιφερόλης (βιταμίνη D2) και τη μορφή της χολοκαλσιφερόλης, (βιταμίνη D3). Είναι υπεύθυνη για σκελετικές δυσμορφίες σε περίπτωση έλλειψης της από τον οργανισμό (Lovell, 1991).

Σε γενικές γραμμές, όσον αφορά στον ρόλο των βιταμινών στο μεταβολισμό, οι μεν υδατοδιαλυτές συνδέονται κατά το πλείστον με αντιδράσεις μεταφοράς ενέργειας, ενώ οι λιποδιαλυτές συμμετέχουν σε αντιδράσεις μεταβολισμού των δομικών συστατικών του οργανισμού. Η απορρόφηση των υδατοδιαλυτών βιταμινών γίνεται πολύ εύκολα, ενώ οι λιποδιαλυτές όπως και οι λιπαρές ύλες απαιτούν την παρουσία παγκρεατικής λιπάσης και χολικών αλάτων για την άμεση απορρόφηση τους.

Κατά συνέπεια για να απορροφηθούν οι λιποδιαλυτές πρέπει να εκκριθεί παγκρεατικό υγρό και χολή στο πεπτικό σύστημα, γεγονός που επιτυγχάνεται με τη λήψη κάποιας ποσότητας λίπους που διεγείρει την έκκριση των παραπάνω πεπτικών υγρών. Διαφορές υπάρχουν και στην αποθήκευση των δύο αυτών τάξεων των βιταμινών. Οι μεν υδατοδιαλυτές αποθηκεύονται σε μικρό ποσοστό σε όλους τους ιστούς, ενώ οι λιποδιαλυτές σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό, κυρίως στο λιπώδη ιστό και λιγότερο στο ήπαρ. Γι' αυτό και οι υπερβιταμινώσεις προκαλούνται συνήθως από λιποδιαλυτές βιταμίνες.

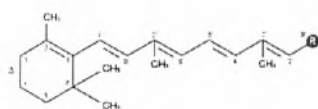
Τέλος, οι υδατοδιαλυτές και λιποδιαλυτές βιταμίνες διαφέρουν και ως προς την οδό απέκκρισής τους. Οι υδατοδιαλυτές, απεκκρίνονται κυρίως από τα ούρα και λιγότερο από τα κόπρανα, ενώ οι λιποδιαλυτές κυρίως από τα κόπρανα.

#### **4.3.1. Η σημασία των βιταμινών στην υποκίνηση και ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος**

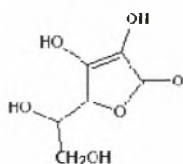
Φαίνεται ότι αυτή η μέθοδος πρόληψης ενάντια στις ασθένειες, παρέχοντας δηλαδή ενίσχυση της υγείας του οργανισμού με φυσικούς υπερασπιστές όπως είναι οι βιταμίνες, σηματοδοτεί μια νέα αρχή για την πρόληψη ασθενειών αποφεύγοντας την αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών. Θεωρήθηκε ότι αυτή η τόσο σημαντική και ιδιαίτερη «ποιοτική βοήθεια» των βιταμινών που εκτός από την άμεση αντιμετώπιση βακτηριακών και ιικών μολύνσεων, μπορεί να υποκινήσει άμεσα το ανοσοποιητικό σύστημα και να ενισχύσει τον οργανισμό ώστε να είναι σε θέση «μάχης» κάθε φορά που έρχεται αντιμέτωπος με κινδύνους αλλά και περιόδους έντονου «stress», όπως για παράδειγμα η χορήγηση της βιταμίνης C που προκαλεί την παραγωγή της ιντερφερόνης και βοηθά στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (Gapasin *et al.*, 1998).

Οι βιταμίνες επιδρούν στο ανοσοποιητικό σύστημα και προστατεύουν το νευρικό σύστημα. Μέχρι σήμερα οι καλύτερες ανοσοενισχυτικές και αντιοξειδωτικές ουσίες θεωρούνται οι βιταμίνες A (αξηροφθόλη ή αντιξηροφθαλμική), C (ασκορβικό οξύ) και E (τοκοφερόλη) όπου ασκούν αντιοξειδωτική δράση εξουδετερώνοντας τις επιθετικές ελεύθερες ρίζες, οι οποίες καταστρέφουν τη μεμβράνη των κυττάρων και το γενετικό υλικό (Εικόνα 1).

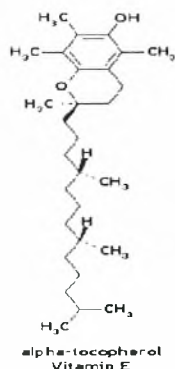
i. Η βιταμίνη A (αξηροφθόλη ή αντιξηροφθαλμική)



ii. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)



iii. Η βιταμίνη E (τοκοφερόλη)



Εικόνα 1. Συντακτικός τύπος των βιταμινών A, C και E.

Η βιταμίνη E (τοκοφερόλη) είναι το πιο αποτελεσματικό λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό γιατί καθαρίζει τα αγγεία και προστατεύει τα λιπαρά οξέα από την οξείδωση. Υποστηρίζεται από τη βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), η οποία αναζωογονεί τα εξασθενημένα μόρια της βιταμίνης E (τοκοφερόλη) δρα και κατά των ελευθέρων ριζών. Η καροτίνη B, πρόδρομος ουσία της βιταμίνης A, εξουδετερώνει επίσης τα

επιζήμια μόρια οξυγόνου. Ο δε συνδυασμός των τριών αυτών βιταμινών ενισχύει την αντιοξειδωτική τους δράση.

Καθώς η χορήγηση βιταμινών δίνεται από την διατροφή, η ενεργειακή πρόσληψη φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την ανοσολογική δραστηριότητα καθώς υποσιτισμένοι ιχθύς είναι πιο ευάλωτοι σε ασθένειες. Η συντήρηση και ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος απαιτεί σταθερή πρόσληψη όλων των απαραίτητων βιταμινών. Ουσιαστικός είναι και ο ρόλος των βιταμινών κατά την διάρκεια της έντονης κολυμβητικής δραστηριότητας των υδρόβιων οργανισμών, ώστε να αποφευχθεί η μειωμένη απόδοση και εξασθένηση, που έχει σαν αποτέλεσμα την δυσλειτουργία του οργανισμού τους. Επίσης αυξημένες ανάγκες βιταμινών υπάρχουν και σε καταστάσεις έντονου «stress» και μεταβατικών καταστάσεων (από προνύμφες σε ιχθύδια).

#### **4.4. Η Βιταμίνη C**

Η βιταμίνη C ανήκει στις υδατοδιαλυτές βιταμίνες και λαμβάνει μέρος στην διαδικασία του μεταβολισμού, κυρίως των ζωικών οργανισμών. Απομονώθηκε από τα επινεφρίδια το 1928, από τον Ούγγρο βιοχημικό νομπελίστα Άλμπερτ Ζεντ Γκιόργκι και αναγνωρίστηκε σαν παράγοντας θεραπείας του σκορβούτου, το 1932. Η ονομασία της, ασκορβικό οξύ προέρχεται από την έκφραση «αντισκορβουτική βιταμίνη», δηλαδή τη βιταμίνη που θεραπεύει και προλαβαίνει το σκορβούτο. Η έλλειψη της βιταμίνης C προκαλεί την ασθένεια του σκορβούτου, είναι δε γνωστή και σαν νόσος των ναυτικών, λόγω της κατανάλωσης μόνο κονσερβών ενώ ταυτόχρονα έλειπε εντελώς η κατανάλωση των φρούτων και λαχανικών. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι μια από τις σημαντικότερες βιταμίνες, ζωτικής σημασίας για κάθε ζωντανό οργανισμό (Lall, 2002).

Πολλά ψάρια είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στα επίπεδα της βιταμίνης C, επειδή δεν μπορούν να την συνθέσουν λόγω της απουσίας του ενζύμου L-gulanolactone οξειδάση που είναι αρμόδιο για τη σύνθεση της βιταμίνης C, *de novo*. Επομένως, η εξωγενής πηγή της βιταμίνης C είναι απαραίτητη στη διατροφή των εκτρεφόμενων ιχθύων (Ai *et al.*, 2006).

Η απουσία της προκαλεί χαμηλό ποσοστό αύξησης, σκελετικές παραμορφώσεις, εύθραυστα τριχοειδή αγγεία, αργή επούλωση τραυμάτων-πληγών και εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα (ευαισθησία στις βακτηριακές ασθένειες) σε διάφορα είδη ψαριών.

Η βιταμίνη C είναι ουσιαστική για το σχηματισμό του κολλαγόνου, στον μεταβολισμό της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης, την επούλωση πληγών, την αποτοξίνωση κάποιων ενώσεων καθώς επίσης και για διάφορες μεταβολικές λειτουργίες αντιοξειδωτικής σημασίας. Τα τελευταία χρόνια, έρευνες έχουν κατευθυνθεί προς την αναγνώριση και πλήρη κατανόηση του ρόλου της βιταμίνης C στο ανοσοποιητικό σύστημα και την ανθεκτικότητα στις ασθένειες των ψαριών (Waagbo *et al.*, 1993).

Έχει παρατηρηθεί ότι η υψηλή χορήγηση της βιταμίνης C αυξάνει την ανθεκτικότητα σε πολλά παθογόνα βακτήρια και ιούς στους υδρόβιους οργανισμούς. Οι μηχανισμοί της ανθεκτικότητας στις ασθένειες ποικίλλουν μεταξύ των ειδών. Η βιταμίνη C έχει αποδειχθεί ότι υποκινεί την αιμολυτική δραστηριότητα, συμβάλει στον πολλαπλασιασμό των ανοσολογικών κυττάρων, στη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, στην απελευθέρωση/έκκριση ανοσολογικών ουσιών και στην παραγωγή των αντισωμάτων. Εντούτοις, η ανοσοενίσχυση αυτή δεν είναι ανάλογη σε όλα τα είδη υδρόβιων οργανισμών.

Οι απαιτήσεις για την βιταμίνη C έχουν καθοριστεί για διάφορα είδη και οι συγκεντρώσεις ποικίλουν ανάλογα με τα είδη των υδρόβιων οργανισμών, το μέγεθος τους, τις διατροφικές τους συνήθειες (Ai *et al.*, 2006) και με τις συνθήκες εκτροφής τους (Ai *et al.*, 2004). Οι Fracalossi *et al.* (2001) παρατήρησαν ότι όλα τα άτομα ήταν ανίκανα να συνθέσουν το ασκορβικό οξύ και ότι η φυλογενετική κατάταξη ήταν καθοριστικός παράγοντας όσον αναφορά την απαίτησή τους σε ασκορβικό οξύ, καθώς και ότι τα θηλυκά άτομα αφομοίωναν καλύτερα την βιταμίνη C (Ortuño *et al.*, 1999).

Η βιταμίνη C έχει αποδειχθεί επίσης ότι συμβάλει στη μείωση του «stress» που δημιουργείται λόγω των αρνητικών περιβαλλοντικών συνθηκών εκτροφής π.χ. κακή ποιότητα του νερού, υψηλή συγκέντρωση αμμωνίας ή χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Τα ψάρια που τρέφονταν με χαμηλές συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέως είναι υπερ-ευαίσθητα σε αντίθεση με τα ψάρια που εκτρέφονται με υψηλά επίπεδα, πάνω από 300 mg/kg, βιταμίνης C και επηρεάζονται λιγότερο από ενδογενής (μεταβολισμός) ή εξωγενής (οργανοχλωρικών φυτοφαρμάκων) αντίξοες συνθήκες (Lall, 2002).

Οι Hardie *et al.* (1991) απέδειξαν ότι υψηλά επίπεδα ασκορβικού οξέως μείωσαν την επίδραση του φυσιολογικού «stress», βοήθησαν στην επούλωση των πληγών και μείωσαν την κορτιζόλη στο αίμα στον ατλαντικό σολομό (*Salmo salar* L.) ενισχύοντας το ανοσοποιητικό του σύστημα. Γενικά, έχει αποδειχθεί ότι τα υψηλά επίπεδα των υδατοδιαλυτών βιταμινών είναι αβλαβή στα ψάρια σε αντίθεση με τις λιποδιαλυτές βιταμίνες που συσσωρεύουν στο ήπαρ και προκαλούν προβλήματα (Waagbo *et al.*, 1993).

Επιπρόσθετα, η βιταμίνη C βοηθά στον σχηματισμό των οστών, στην ωρίμανση των ερυθροκυττάρων, στην προσρόφηση του σιδήρου και στη συντήρηση

της αιμογλοβίνης. Το ασκορβικό οξύ πρέπει να συμπεριλαμβάνεται άμεσα στη διατροφή των ψαριών για την διατήρηση της υγεία τους και την αντίσταση τους στις κοινές μολυσματικές ασθένειες (Navarre & Halver, 1989).

Φαίνεται όμως, ότι η βιταμίνη C είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και καταστρέφεται πολύ εύκολα όταν διατηρείται σε συνθήκες με υψηλή θερμοκρασία, οξυγόνο και φώς. Έχει παρατηρηθεί ότι περίπου το 75% της βιταμίνης C είχε καταστραφεί στην τροφή των γαρίδων, κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας της σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Shiau & Hsu, 1999).

#### **4.4.1. Η βιταμίνη C στην εκτροφή υδρόβιων οργανισμών**

Το ασκορβικό οξύ είναι μια ουσιαστική βιταμίνη που συμβάλλει στη αύξηση και φυσιολογική λειτουργία των ζωικών οργανισμών. Η ανάγκη για την πρόσληψη της έχει αποδειχθεί και για τις προνύμφες διαφόρων υδρόβιων οργανισμών τόσο των εσωτερικών υδάτων όσο και του θαλασσινού νερού, για την σωστή και ομαλή ανάπτυξη τους. Παρατηρήθηκε, ότι η βιταμίνη C στις προνύμφες των ιχθύων (Merchie *et al.*, 1996) μετά το στάδιο αποκοπής από τη ζωντανή τροφή τους, επιδρά στην αύξηση και ανάπτυξη τους, μειώνει τα ποσοστά θνησιμότητας (καθώς αυτός είναι και ο μεγαλύτερος φόβος των ιχθυογεννητικών σταθμών), υποκινεί και επιδρά θετικά στο ανοσοποιητικό σύστημα αυξάνοντας την ανθεκτικότητα των προνυμφών στις ασθένειες, συμμετέχει στον σχηματισμό του κολλαγόνου και του σιδήρου, αποκλίνει τα παθολογικά σημάδια ανεπάρκειας όπως είναι η καταστροφή του ουραίου πτερυγίου και οι διάφορες αλλοιώσεις των βραγχοκαλυμμάτων (Gouillou-Coustans *et al.*, 1998).

Κύριος στόχος της χορήγησης της βιταμίνης C στην διατροφή των πρώτων σταδίων της ζωής του ιχθυδίου, όπως και στην περίπτωση της προσθήκης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (EPA και DHA), είναι η βελτίωση της προνυμφικής

διατροφής ώστε να λυθούν μερικά από τα προβλήματα, όπως είναι τα μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας. Αν και είναι πολύ δύσκολο να ελεγχθεί η διατροφή των προνυμφών είναι γνωστό ότι η λαρβική ανάπτυξη εξαρτάται από τις καλές πρακτικές εκτροφής που εξασφαλίζονται με την υψηλή ποιότητα του νερού και την επαρκή χορήγηση των τροφών, κατά τη διάρκεια της ημέρας.

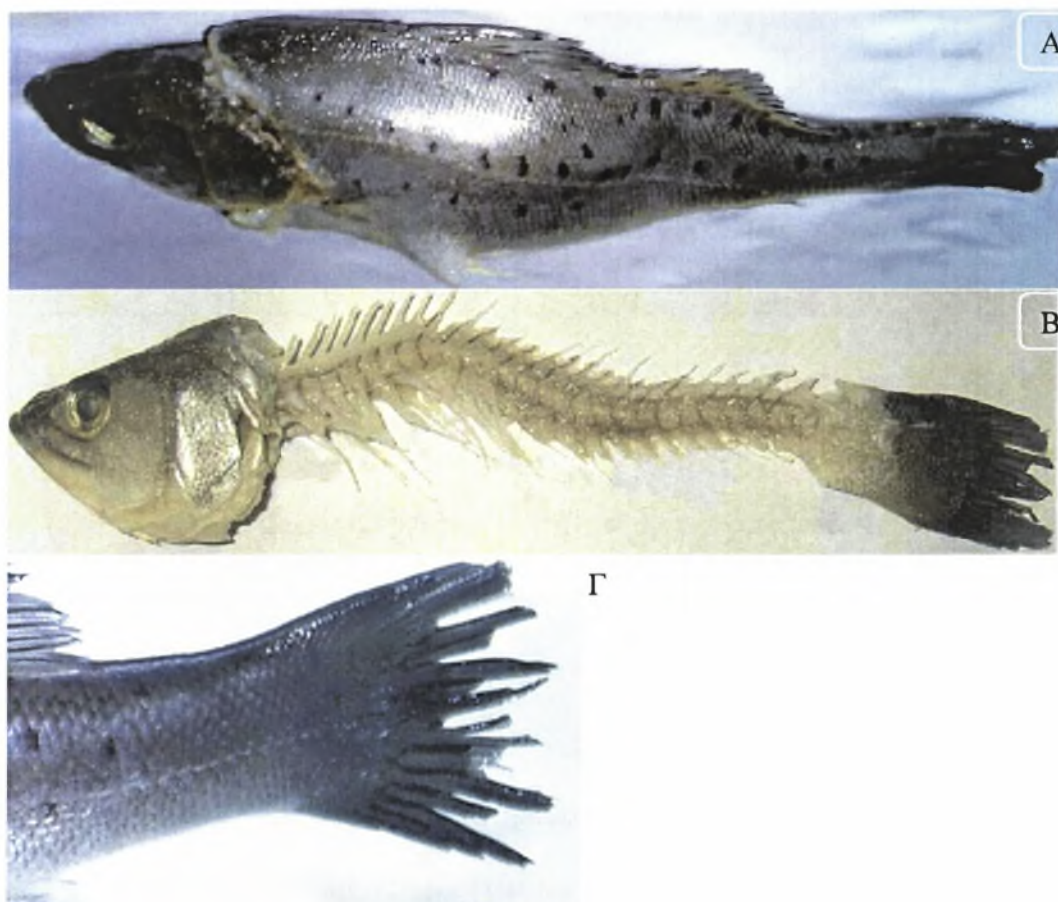
Η βιταμίνη C συμβάλει αποτελεσματικά στην ανάπτυξη των ψαριών. Τα ποσοστά της βιταμίνης C στους ιστούς και του κολλαγόνου στη σπονδυλική στήλη αυξάνονται σημαντικά με την ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης της βιταμίνης. Οι Al-Amoudi *et al.* (1992) αξιολόγησαν ότι οι συγκεντρώσεις των 100 και 200mg/kg αυξάνει την ανάπτυξη ενώ η έλλειψη της για 7 εβδομάδες μπορεί να οδηγήσει στον θάνατο (Wang *et al.*, 2003).

Η έλλειψη της βιταμίνης C προκαλεί συμπτώματα ανεπάρκειας, όπως μια σκουρόχρωμη κατακόρυφη ζώνη συνήθως μετά το ραχιαίο πτερύγιο, μια ανικανότητα στη κολύμβηση και αιμορραγίες στην επιδερμίδα πάνω από τη σπονδυλική στήλη (Wilson, 1973). Οι Qui *et al.* (2001) παρατήρησαν επίσης ότι η ανεπάρκεια σε ασκορβικό οξύ στη διατροφή των εκτρεφόμενων ιχθύων μπορεί να οδηγήσει και σε παραμορφώσεις, πετέχιες και υπερπλασία του σαγονιού, στοματικές αιμορραγίας, πληγές στο ουραίο πτερύγιο και εξοφθαλμία (Εικόνα 2).

Η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και προστασία που προσφέρει η βιταμίνη C στους ιστούς, επιβεβαιώνεται και από τον Adhm *et al.* (2000). Οι συγκεκριμένοι ερευνητές έδειξαν ότι η έλλειψη της βιταμίνης C στη διατροφή του γατόψαρου, *Clarias gariépinus*, προκαλεί εκφυλιστικές αλλαγές στην ιστολογία των βραγχίων, του ήπατος και του νεφρού, υπερτροφία, κιτρινωπές κηλίδες και σύμπτυξη των ηπατοκυττάρων στο ήπαρ, εμποδίζει την απορρόφηση του σιδήρου από το έντερο με αποτέλεσμα την εξασθετισμένη σύνθεση των ερυθροκυττάρων οδηγώντας σε



συμπτώματα αναιμίας (όπως αποδέχτηκε από τα χαμηλά επίπεδα των ερυθροκυττάρων, της αιμογλοβίνης και του αιματοκρίτη).



Εικόνα 2. Α) Σκολίωση, Β) Λόρδωση και Γ) Διάβρωση στο ουραίο πτερύγιο στα ψάρια με διατροφή ανεπαρκή σε ασκορβικό οξύ

#### 4.4.2. Η ανοσοενισχυτική δράση της βιταμίνης C

Η βιταμίνη C συνδέεται με τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς συντελεί στην αυξημένη παραγωγή των λευκών αιμοσφαιρίων (τα οποία έχουν μεγάλη κυτταροτοξική δραστηριότητα), της ιντερφερόνης και των αντισωμάτων. Το ανοσοποιητικό σύστημα διαδραματίζει κύριο ρόλο στην προστασία των υδρόβιων οργανισμών ενάντια σε μολυσματικές ασθένειες, οι οποίες επιφέρουν σημαντικές θνησιμότητες στην εκτροφή των ψαριών, αποκλίνοντας την υπερευαισθησία των οργανισμών στις ασθένειες.

Τα τελευταία 10 χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες για τη δραστηριότητα της βιταμίνης C *in vitro* και *in vivo* στα ψάρια για ανοσολογικούς σκοπούς προκειμένου να ενισχυθεί η ειδική και μη ανοσία και να ενισχυθεί η ανθεκτικότητα στις μολυσματικές ή μη ασθένειες (Cuesta *et al.*, 2002).

Το ασκορβικό οξύ έχει βρεθεί ότι ενισχύει σημαντικά το ανοσοποιητικό σύστημα της ιριδίζουσας πέστροφας και του ατλαντικού σολομού, πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων καθώς και των λεμφοκυττάρων, ενισχύοντας τη φυσική κυτταροτοξικότητα (Verlhac & Gabaudan, 1994). Οι πιθανοί μηχανισμοί τους οποίους επηρεάζει η προσθήκη του ασκορβικού οξέος, κατά την διάρκεια της παραγωγή των λεμφοκυττάρων ήταν η αναστολή της παραγωγής της κορτιζόλης ή της ισταμίνης (Hardie *et al.*, 1993).

Ο συνδυασμός της γλουκάνης με τη βιταμίνη C (ως ascorbate polyphosphate) σε μία υψηλή δόση των 4000 ppm, ενισχύει την ειδική και μη ανοσία της πέστροφας, καθώς προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας των μακροφάγων του συμπληρώματος και των επίπεδων της λυσοζύμης (Verlhac *et al.*, 1996).

Η χορήγηση βιταμίνης C προκαλεί παροδική αύξηση στην τσιπούρα και ανοσοδιέγερση της μη ειδικής ανοσίας ενεργοποιώντας τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και τη δραστηριότητα του συμπληρώματος (Ortuño *et al.*, 1999). Επίσης αυξάνει τη φυσική κυτταροτοξική δραστηριότητα των λευκών αιμοσφαιρίων στο νεφρό, ενώ ο συνδυασμός της βιταμίνης C και της βιταμίνης E ενισχύει τη δραστηριότητα της λυσοζύμης στον ορό του αίματος (Cuesta *et al.*, 2002, Esteban *et al.*, 2005, Chand *et al.*, 2006).

Το υψηλό επίπεδο της βιταμίνης C σε συνδυασμό με λακτοφερίνη βελτιώνουν τη χημεία του αίματος και τις ανοσοποιητικές παραμέτρους, αυξάνοντας τον αιματοκρίτη, την περιεκτικότητα σε αιμογλοβίνη τη συνολική πρωτεΐνη στον ορό, τη

λυσοζυμική δραστηριότητα στη βλέννα και στον ορό του αίματος στο μη ειδικό ανοσοποιητικό σύστημα του ιαπωνικού χελιού, *Anguilla japonica* (Ren *et al.*, 2005, 2007).

Η βιταμίνη C λειτουργεί ως ανοσοενισχυτικό στο καλκάνι, *Scophthalmus maximus* L. ενισχύοντας τα επίπεδα της λυσοζύμης στον ορό του αίματος και παρουσιάζοντας θετικό συσχετισμό ενώ άλλες παραμέτρους όπως η φαγοκυτταρική δραστηριότητα στο νεφρό και στο ήπαρ (Roberts *et al.*, 1995).

Τα ποσοστά ανάπτυξης και η δραστηριότητα της λυσοζύμης και του συμπληρώματος του ορού αυξάνονται με την ταυτόχρονη προσθήκη του ασκορβικού οξέος στη διατροφή του *Lateolabrax japonicus* (Ai *et al.*, 2004).

Επιπρόσθετα, το «stress» με τα υψηλά επίπεδα κορτιζόλης είναι ικανό να εμποδίσει την φαγοκυτταρική δραστηριότητα, τον πολλαπλασιασμό των λευκών αιμοσφαιρίων και των λεμφοκυττάρων στο ανοσοποιητικό σύστημα του ατλαντικού σολομού. Τα λευκά αιμοσφαίρια και η βακτηριοκτόνος δραστηριότητα μειώνονται από την κατάσταση του «stress» αλλά παραμένουν σταθερά στην περίπτωση που χορηγηθεί συμπληρωματικά η βιταμίνη C.

Η μορφή του AP (ascorbate-2-monophosphate) είναι καλή πηγή βιταμίνης C στη τροφή των ψαριών λόγω της μοριακής της σταθερότητάς κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσής της και η παραγωγή των αντισωμάτων ήταν σημαντικά υψηλότερη στα ψάρια που λαμβάνουν υψηλές δόσεις της βιταμίνης C σε μορφή ascorbate-2-monophosphate (AP) (Waagbø *et al.*, 1993).

Η βιταμίνη C έχει βρεθεί ότι προκαλεί ανθεκτικότητα στα ψάρια όταν μολυνθούν από παθογόνους οργανισμούς. Μεγάλες ποσότητες ασκορβικού οξέος προκαλούν ανθεκτικότητα της άγριας πέστροφας (*Salmo gairdneri*) από το παθογόνο *Vibro anguillarum*, μειώνοντας κατά πολύ τα ποσοστά θνησιμότητας και

υποκινώντας τη χυμική ανοσία. Η μεγαλύτερη παραγωγή αντισωμάτων ως αντίσταση στη βακτηριακή μόλυνση είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη δόση της βιταμίνης κατά 10-20 φορές μεγαλύτερη της κανονικής (Navarre & Halver, 1989).

Η βιταμίνη C προσφέρει ανθεκτικότητα (παραγωγή αντισωμάτων) από την ισχυρή βακτηριακή μόλυνση του παθογόνου *Vibrio vulnificus* και ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος στο *Epinephelus awoara* (Qui *et al.*, 2001). Επίσης, η χορήγηση βιταμίνης C ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα του *Pseudosciaena crocea* και προσφέρει ανθεκτικότητα στην μόλυνση από το *Vibrio harveyi* αυξάνοντας το ποσοστό ανάπτυξης και μειώνοντας τα ποσοστά θνησιμότητας (Ai *et al.*, 2006).

Η βιταμίνη C (ως ascorbate-2-polyphosphate) επηρεάζει θετικά τη κυτταρική και χυμώδη ανοσία της ιριδίζουσας πέστροφας, αυξάνοντας τη δραστηριότητα των μακροφάγων και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων μετά από προκληθείσα μόλυνση του *Yersinia ruckeri*, που προκαλεί τη νόσο της Ερυθροστοματίτιδας (Verlhac *et al.*, 1998).

Η συμπληρωματική χορήγηση βιταμίνης C με την τροφή βοηθά στην παραγωγή των αντισωμάτων του ατλαντικού σολομού ενάντια στο *Aeromonas salmonicida* (Thompson *et al.*, 1993) παρουσιάζοντας μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης, αυξάνοντας τη λυσοζυμική δραστηριότητα και τη μεγαλύτερη προσρόφηση του σιδήρου γεγονός που αποδεικνύει την ανθεκτικότητα που αποδίδει η βιταμίνη C στην ασθένεια (Hardie *et al.*, 1991, Waagbø *et al.*, 1993,).

Το ασκορβικό οξύ λειτουργεί ως ανοσοενισχυτικό στην εκτροφή του γατόψαρου (*Mystus gulio*), όταν προσβάλλεται από το βακτήριο *Aeromonas hydrophila* (Anbarasu & Chandran, 2001). Η χορήγηση ασκορβικού οξέος στη διατροφή του ινδικού κυπρίνου (*Labeo rohita*) ενεργοποίησε μηχανισμούς μη ειδικής

ανοσίας όπως τη δραστηριότητα τους συμπληρώματος και της λυσοζύμης, μετά από μόλυνση με το *Aeromonas hydrophila* και το *Edwardsiella tarda* (Misra *et al.*, 2007). Επίσης, η συμπληρωματική χορήγηση βιταμίνης C σε γατόψαρα (*Ictalurus punctatus*) που έχουν εκτεθεί στο παθογόνο *Edwardsiella ictaluri* προκαλεί αύξηση βάρους και μια μεγάλη μετατρεψιμότητα των τροφών (Li *et al.*, 1993). Μια συγκέντρωση των 50-100 mg βιταμίνης C/ kg (L-ascorbyl-2 polyphosphat) εμφανίζεται ως ικανοποιητική για τη σωστή ανάπτυξη και διατήρηση της υγείας (αντίσταση στο «stress» και ανθεκτικότητα στις ασθένειες) (Li *et al.*, 1998).

#### 4.5. Η βιταμίνη E

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η βιταμίνη E περιλαμβάνει τέσσερις μορφές τοκοφερόλης, από τις οποίες η α-τοκοφερόλη χρησιμοποιείται κατά κόρον και τέσσερις μορφές τοκοτριενόλης. Η βιταμίνη E υποκινεί και συμμετέχει στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος πριν και μετά την πιθανή μόλυνση από κάποιο παθογόνο μικροοργανισμό, παράγοντας αντισώματα και αυξάνοντας τα ποσοστά επιβίωσης των υδρόβιων οργανισμών (Huang & Huang, 2004).

Ιστορικά η βιταμίνη E (τοκοφερόλη) ανακαλύφθηκε το 1920 ως ουσία με λιποδιαλυτή δράση που απαιτούνταν για την παρεμπόδιση του εμβρυϊκού θανάτου. Αναγνωρίστηκε ο χημικός της τύπος την επόμενη δεκαετία και ονομάστηκε τοκοφερόλη από τις ελληνικές λέξεις «τόκος» (γέννηση) και το «φέρειν» (φέρω). Πρόκειται για ένα άκρως απαραίτητο θρεπτικό συστατικό για την καλή υγεία κάθε ζωντανού οργανισμού. Η χρησιμότητα της βιταμίνης E (τοκοφερόλη) για όλους τους τύπους κυττάρων είναι δεδομένη, αλλά έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει ιδιαίτερα τις μεμβράνες των κυττάρων του αίματος, του νευρικού συστήματος, των σκελετικών μυών αλλά και του οπτικού συστήματος από τις αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων

ριζών. Προς αυτήν την κατεύθυνση, η τοκοφερόλη συνεργάζεται και με άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες όπως το ασκορβικό οξύ (Frigg *et al.*, 1990).

Είναι μια ισχυρά αντιοξειδωτική ουσία που προστατεύει τα κύτταρα του σώματος από την οξειδωτική δράση των ελεύθερων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ισχυρές δραστικές ουσίες, οι οποίες είτε είναι προϊόντα του μεταβολισμού είτε προκύπτουν από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπου προσβάλλουν και κατά συνέπεια διασπούν τις κυτταρικές μεμβράνες, τις πρωτεΐνες του κυττάρου και το γενετικό τους υλικό (DNA).

Η βιταμίνη Ε είναι η πιο γνωστή βιταμίνη και αναφέρεται σε δύο οικογένειες βιολογικά ενεργών ουσιών, οι οποίες είναι οι τοκοφερόλες και οι λιγότερο βιολογικά ενεργές ουσίες με κορεσμένες πλευρικές αλυσίδες, οι τοκοτριενόλες. Και οι δύο μορφές, η φυσική και η συνθετική μορφή της α-τοκοφερόλης απορροφούνται αλλά όχι στον ίδιο βαθμό. Μόνο η μισή από την συνθετική της μορφή παραμένει στο πλάσμα ενώ η υπόλοιπη αποβάλλεται. Γι' αυτό, η φυσική της μορφή είναι δύο φορές περισσότερο δραστική από την αντίστοιχη συνθετική (Bruno, 1986).

Έρευνες σε πειραματόζωα δείχνουν ότι οι τοκοτριενόλες είναι οι πιο σημαντικές από τις τοκοφερόλες. Σε σχέση με την α-τοκοφερόλη έχουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση (40 με 60 φορές) και μειώνουν αισθητά τα επίπεδα της LDL (κακής χοληστερόλης) στο αίμα. Μελέτες που έχουν διεξαχθεί για τις ευεργετικές ιδιότητες της βιταμίνης Ε (τοκοφερόλη) έχουν αποδείξει θετικά στοιχεία πάνω στην υγεία του υδρόβιου οργανισμού, εντούτοις δεν έχουν εξαχθεί ολοκληρωμένα συμπεράσματα και πολλά παραμένουν ακόμη για να εξερευνηθούν και να απαντηθούν στο άμεσο μέλλον.

Μέχρι σήμερα αποδίδουν στην βιταμίνη Ε την ικανότητα να επιβραδύνει την οξείδωση της «κακής» χοληστερόλης-LDL, να εμποδίζει τη θρομβοκυττάρωση, να

προάγει το ανοσοποιητικό σύστημα και να ενδυναμώνει το νευρικό σύστημα του υδρόβιου οργανισμού. Η προσλαμβανόμενη ποσότητα της βιταμίνης εξαρτάται επίσης και από την περιεκτικότητα της διατροφής σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα καθώς οξειδώνονται εύκολα. Η μέση συνιστώμενη δοσολογία από τους επιστήμονες είναι 100 mg καθώς μεγαλύτερη ποσότητα αυτής, πιθανώς να προκαλέσει αιμολυτικές διαταραχές στα διάφορα εσωτερικά όργανα των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών (Stolen *et al.*, 2004). Από μελέτες που έχουν διεξαχθεί, προκύπτει ότι τόσο οι άνθρωποι όσο και τα ζώα της χέρσου και του νερού μπορούν να ανεχτούν αρκετά υψηλές δόσεις της βιταμίνης E, όμως η υπερδοσολογία της ταυτόχρονα ανταγωνίζεται την αξιοποίηση άλλων λιποδιαλυτών βιταμινών απαραίτητων για την υγεία του οργανισμού (όπως η βιταμίνη A) και μπορεί δε να προκαλέσει μη αναστρέψιμα προβλήματα (Lovell, 1991).

Γνωστό είναι επίσης και το γεγονός ότι η βιταμίνη E είναι απαραίτητη στην διαδικασία της αναπαραγωγής, καθώς τα ζώα που υποφέρουν από ανεπάρκεια της βιταμίνης E έχουν προβλήματα κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου. Η βιταμίνη E και άλλες αντιοξειδωτικές θρεπτικές ουσίες (βιταμίνη C, β-καροτίνη και το σελήνιο) απαιτούνται για τη βέλτιστη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος των υδρόβιων οργανισμών. Η βιταμίνη E, ως λιποδιαλυτό βιολογικό αντιοξειδωτικό, προστατεύει τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των κυττάρων, ενάντια στον οξειδωτικό εκφυλισμό των αρχικών αλυσιδωτών αντιδράσεων (Lall, 2002).

Η χρήση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μαζί με την βιταμίνη E έχουν έναν σπουδαίο θεραπευτικό ρόλο. Η χορήγηση των ωμέγα-3 (εικοσιπεντανοϊκού οξέος) και ω-6 λιπαρών οξέων (αραχιδονικό οξύ) στη διατροφή, έχει υψηλή σημασία στα βιοενεργά τρόφιμα. Οι πρόδρομες ουσίες των ω-6 και των ω-3 λιπαρών οξέων είναι το λινολεϊκό οξύ (LA, 18:2n-6) και το α-λινολενικό (ALA, 18:3n-3) και υπάρχει

η δυνατότητα προσθήκης τους στην διατροφή των ζώων. Το λινολεϊκό οξύ και το α-λινολενικό οξύ μετατρέπονται αντίστοιχα στους ενεργούς μεταβολίτες αραχιδονικό οξύ (20:4n-6), εικοσαπεντανοϊκό οξύ (DHA, 22:6n-3). Οι δύο αυτές κλάσεις των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων επιδεικνύουν μεταβολικά και λειτουργικά διαφορετικές φυσιολογικές δράσεις, αποτελώντας πρόδρομες ουσίες των προστανοειδών, ιδιαίτερα της προσταγλαδίνης ( $F_{2a}$ ). Το εικοσαπεντανοϊκό οξύ ανταγωνίζεται στο επίπεδο της κυκλοοξυγενάσης (COX) με το αραχιδονικό οξύ αναστέλλοντας τη σύνθεση προσταγλαδινών.

Η μεταβολή της αναλογίας n-6/n-3 από 10-50:1 σε 2:1 έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην ανοσολογική λειτουργία του οργανισμού, στην ελάττωση των φλεγμονωδών αντιδράσεων και στην υπεροξείδωση των λιπών. Μειωμένη δοσολογία n-3 λιπαρών οξέων, ιδιαίτερα DHA, έχει ως αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και η ανεπάρκεια n-3 λιπαρών οξέων στην τροφή έχει άμεση επίπτωση στην ανάπτυξη και λειτουργία του οργανισμού (Skoufos *et al.*, 2007). Η δοσολογία της βιταμίνης E ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος, την ηλικία, την ιχθυοφόρτιση, τη θερμοκρασία και τη χημική σύσταση του νερού (Wilson *et al.*, 2008).

#### 4.5.1. Η βιταμίνη E στην εκτροφή υδρόβιων οργανισμών

Οι υψηλές δόσεις των λιπιδίων στη διατροφή των ιχθύων προκαλούν την υπεροξείδωση τους, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται αρνητικά η υγεία των ατόμων και να αλλοιώνεται η ποιότητα της σάρκας τους (γεύση και άρωμα). Η αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης E, σε συγκέντρωση 1500 mg/kg και με 30% ποσοστό λιπιδίων και όχι με 15%, μπορεί να επιβραδύνει το ποσοστό οξείδωσης και να μειώσει τις άσχημες επιπτώσεις στην ποιότητα της σάρκας της εκτρεφόμενης ιριδίζουσας πέστροφας (Chaiyapechara *et al.*, 2003).



Η απαίτηση της βιταμίνης E εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης των ψαριών, δηλαδή η δόση της βιταμίνης E εξαρτάται από το μέγεθος και το βάρος του σώματος του κάθε ατόμου. Η ελάχιστη απαίτηση για το ιχθύδιο του Ατλαντικού σολομού θεωρείται μεταξύ 30-60mg α-τοκοφερόλης  $\text{kg}^{-1}$ /ξηράς τροφής με 5,6% πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ενώ 60-120mg α-τοκοφερόλης  $\text{kg}^{-1}$ /ξηράς τροφής για ένα ενήλικο άτομο. Χαμηλή συγκέντρωση α-τοκοφερόλης προκαλεί συμπτώματα ανεπάρκειας που τελικά οδήγησαν σε μεγάλες θνησιμότητες (Hatnre & Lie, 1995).

Είναι γνωστό ότι διάφοροι παράγοντες στις υδατοκαλλιέργειες, προκαλούν «stress», διαδικασία που χαρακτηρίζεται από την έκκριση ορμονών (όπως είναι η κορτιζόλη και οι κατεχολαμίνες), με καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος και μεγάλη θνησιμότητα. Τα χαμηλά επίπεδα της βιταμίνης E είναι ικανά να μειώσουν την αντίσταση στο «stress», να αυξήσουν τη συγκέντρωση της κορτιζόλης στο πλάσμα, την καταστροφή της αιμογλοβίνης λόγω της ενδοκυτταρικής οξειδωσης, τη μεθαιμογλοβίνη και να δημιουργήσουν προβλήματα στη μεταφορά του οξυγόνου στο αίμα των προνυμφών της τσιπούρας. Κάτω από τον παράγοντα «stress» τα ψάρια με ανεπάρκεια στην βιταμίνη E παρουσιάζουν χαμηλή αύξηση και επιβίωση (Montero *et al.*, 2001).

Η έλλειψη της βιταμίνης E προκαλεί παθολογικές καταστάσεις, όπως ανορεξία, μυϊκή δυστροφία, εξόφθαλμο, χαμηλά ποσοστά αύξησης (Coweys *et al.*, 1984, Bai & Lee, 1998, Coweys *et al.*, 2008). Η ανεπάρκεια της βιταμίνης E φαίνεται ότι επηρεάζει την σωματική ανάπτυξη, την λειτουργία του ήπατος, του αιματοκρίτη και τα επίπεδα του αίματος και μπορεί να οδηγήσει σε υψηλά ποσοστά θνησιμότητας (Roem *et al.*, 1990, Pearce *et al.*, 2003).

Η ανεπάρκεια της βιταμίνης E στα άτομα της τσιπούρας έχει προκαλέσει πολλά παθολογικά προβλήματα όπως η χαμηλή σωματική ανάπτυξη και

δραστηριότητα, αναιμία, απώλεια επιθηλιακής χρώσης, εξόφθαλμος, νωχελικότητα στην κολύμβηση και ανορεξία (Ortuño *et al.*, 2001). Υψηλές τιμές της κορτιζόλης που παρατηρούνται σε ανεπαρκείς διατροφές n-3 HUFA (πολυακόρεστων λιπαρών οξέων) και α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E), προκαλούν στην τσιπούρα κατάσταση «stress», με ένα χαμηλό επίπεδο αιματοκρίτη και ερυθρών αιμοσφαιρίων, καταστέλλοντας το ανοσοποιητικό τους σύστημα. Η βιταμίνη E μαζί με τα ω-3 PUFA μπορούν να μειώσουν την επίδραση του «stress» (Montero *et al.*, 1998).

#### 4.5.2. Ανοσοενισχυτική δράση της βιταμίνης E

Η βιταμίνη E έχει μια ισχυρή αντιοξειδωτική δράση όπου ελέγχει την υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων. Επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσία των ψαριών δεδομένου ότι είναι συστατικό της μεμβράνης των κυττάρων.

Λίγες εργασίες έχουν δημοσιευθεί για την σχέση ανάμεσα στη βιταμίνη E και το ανοσοποιητικό σύστημα των προνυμφών. Η χορήγηση της βιταμίνης E προκαλεί αύξηση των λευκοκυττάρων και της λυσοζυμικής δραστηριότητας στο νεαρό στάδιο του *Epinephelus malabaricus*, μεγιστοποιώντας την ανοσολογική αντίδραση (Lin & Shiau, 2005) και ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος στο λαβράκι αυξάνοντας τη δραστηριότητα των φαγοκύτταρων και της λυσοζύμης (Obach *et al.*, 1993). Η βιταμίνη E φαίνεται επίσης να βοηθά τη φυσική κυτταροτοξική δραστηριότητα των λευκών αιμοσφαιρίων στο νεφρό της εκτρεφόμενης τσιπούρας (Cuesta *et al.*, 2001).

Υψηλά επίπεδα βιταμίνης E προκαλούν στη τσιπούρα υψηλές δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Tocher *et al.*, 2002). Φαίνεται, ότι η νεαρή τσιπούρα έχει ένα καλά ανεπτυγμένο και αποδοτικό σύστημα αμυντικών ενζύμων στο ήπαρ και τέτοιους μηχανισμούς όπως ένας τελεόστεος θαλάσσιος οργανισμός (Mourente *et al.*, 2002).

Η βιταμίνη Ε αυξάνει τη δραστηριότητα της λυσοζύμης, τον αριθμό των φαγοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων στο νεφρό, τα οποία είναι αρμόδια για την παραγωγή των αντισωμάτων ή της αιμοσφαιρίνης στην ιριδίζουσας πέστροφας. Η ατοκοφερόλη, στη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, προστατεύει τις μεμβράνες από τα ακόρεστα λιπίδια και συντελεί στη διατήρηση της σταθερότητας τους, ενάντια στην πιθανή οξειδωση τους. Επίσης φαίνεται ότι ο νεφρός, το κύριο όργανο της ανοσολογικής υπεράσπισης στους οστεϊχθύς, είναι αυτό στο οποίο τελικά θα διαδραματιστεί η έντονη δράση της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας της βιταμίνης Ε (Lygren *et al.*, 2000).

Αυξανόμενες δόσεις της βιταμίνης Ε αυξάνουν την περιεκτικότητα της στο πλάσμα του αίματος και στα λεμφοειδή όργανα (ήπαρ και νεφρό). Το επίπεδο της βιταμίνης Ε στους ιστούς και στο πλάσμα του αίματος επηρεάζεται από την παράλληλη χορήγηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αφού μεγάλες ποσότητες ν-3 HUFA οδηγούν σε χαμηλά ποσοστά της βιταμίνης Ε. Το συμπέρασμα αυτό δείχνει ότι η βιταμίνη Ε χρησιμοποιείται από τα άτομα της ιριδίζουσας πέστροφας για να προστατεύσει τους ιστούς της από την οξειδωση των λιπιδίων. Επίσης, χαμηλά επίπεδα της βιταμίνης Ε προκαλούν δυσλειτουργία των T και B-λεμφοκυττάρων και υπέρ-ευαισθησία στο παθογόνο μικροοργανισμό, *Yersinia ruckeri* (Puangkaew *et al.*, 2004).

Σημαντικός θεωρείται και ο ρόλος των φαγοκυττάρων του εντέρου κατά την χορήγηση της βιταμίνης Ε στην διατροφή της ιριδίζουσας πέστροφας, η οποία ενισχύει το ανοσοποιητικό της σύστημα, παρατηρώντας μια αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων στην γαστρεντερική περιοχή αυξάνοντας τη φαγοκυτταρική και λυσοζυμική δραστηριότητα στο έντερο και όχι στο νεφρικό σύστημα (Clerton *et al.*, 2001).

Η α-τοκοφερόλη υποκινεί τη χυμική και κυτταρική ανοσία διότι είναι το πρώτο συστατικό των μεμβρανών στα μιτοχόνδρια και της εξωτερικής μεμβράνης των ερυθρών κυττάρων. Αυξάνει τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα στον ατλαντικό σολομό μετά από έκθεσή του στο παθογόνο *A. salmonicida* αυξάνοντας τον αριθμό των αντισωμάτων, των μακροφάγων, των ερυθροκυττάρων και της λυσοζύμης και μειώνοντας τη θνησιμότητα (Hardie *et al.*, 1990).

Η χορήγηση της α-τοκοφερόλης στην καφέ πέστροφα προκαλεί αύξηση του αριθμού των αντισωμάτων, των T και B λεμφοκυττάρων με την έκκριση των λεμφοανασταλτικών ουσιών, των ερυθροκυττάρων και της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας των μακροφάγων, αλλά όχι της αιμοσφαιρίνης, παρουσιάζοντας μια βακτηριοκτόνο δράση όταν εκτίθεται στον παθογόνο *Yersinia ruckeri* (Blazer & Wolke, 1984).

Επίσης, ένα μέτριο επίπεδο των 1200 mg kg<sup>-1</sup> της βιταμίνης E στην εκτροφή της τσιπούρας είναι ικανό να υποκινήσει τη μη ειδική ανοσία, να αυξήσει το σωματικό βάρος και τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα των λευκών αιμοσφαιρίων του νεφρού, κατά την έκθεση τους στο παθογόνο *Listonella anguillarum* (Ortuño *et al.*, 2000). Ανοσολογική αντίδραση έχει παρατηρηθεί και μετά από την έκθεση λαβρακιού στο *Vibrio anguillarum*, αυξάνοντας την παραγωγή των αντισωμάτων ανεξάρτητα από τις συγκεντρώσεις της βιταμίνης E στη τροφή (Obach *et al.*, 1993).

Η βιταμίνη E προκαλεί ενεργοποίηση στο ανοσοποιητικό σύστημα του γατόψαρου για το *Edwardsiella ictaluri*, με αύξηση της δραστηριότητας των μακροφάγων (Wise *et al.*, 1993) και αυξάνοντας τη λυσοζυμική δραστηριότητα του *Paralichthys olivaceus* μολυσμένο με το παθογόνο *Edwardsiella tarda* (Wang *et al.*, 2006).

#### 4.5.3. Η συνδυαστική δράση της Βιταμίνης Ε και του σεληνίου (SE)

Πολλές έρευνες έχουν ασχοληθεί με την σχέση ανάμεσα στην α-τοκοφερόλη και το ιχνοστοιχείο σελήνιο (SE), με σκοπό την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος των υδρόβιων οργανισμών. Το σελήνιο έχει μια μακροχρόνια ιστορία και απέκτησε μια νέα φήμη το 1957, ως συμπλήρωμα του συστατικού γλουταθειϊκής περοξειδάσης (GSHPx). Το σελήνιο μαζί με τη βιταμίνη Ε υπερασπίζονται το κύτταρο ενάντια στους μεταβολίτες του οξυγόνου που παράγονται κατά τη διάρκεια βιολογικών διαδικασιών και προκαλούν ζημιές στις μεμβράνες των κυττάρων και παραμορφώσεις στον σκελετό. Η έλλειψη του σεληνίου προκαλεί την μείωση της δραστηριότητας της GSHPx που συνοδεύεται από κυτταρικές δυσλειτουργίες, συμπεριλαμβανομένου και των λειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος.

Γνωρίζοντας ότι τα Β και Τ-λεμφοκύτταρα είναι αρμόδια για την υπεράσπιση του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία αναπτύσσονται στα λεμφοειδή όργανα, οι Turner & Finch (1991) μελέτησαν τις συνέπειες της ανεπάρκειας του σεληνίου και της βιταμίνης Ε στους ζωικούς οργανισμούς και παρατήρησαν ασυνέχεια στην ανάπτυξη και δυσλειτουργία του θύμου αδένου.

Η μείωση των μακροφάγων κυττάρων από την ανεπάρκεια του SE και της βιταμίνης Ε μπορεί να οδηγήσει σε ανικανότητα αντιμετώπισης επικίνδυνων μυκήτων και παθογόνων βακτηρίων. Τα μακροφάγα αξίζουν ιδιαίτερης προσοχής όσον αφορά την ρυθμιστική τους λειτουργία. Λαμβάνοντας υπόψη την πολυπλοκότητα του ανοσοποιητικού συστήματος των ζωικών οργανισμών και ιδιαίτερα των υδρόβιων οργανισμών που ακόμα βρίσκονται υπό μελέτη, τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες βασίζονται σε *in vitro* αποτελέσματα (Kocabas & Gatlin, 1999). Οι εργαστηριακές δοκιμές πρέπει να εστιάσουν στη ενεργή ανοσολογική θέση του σεληνίου (SE) μέσα στο σώμα των οργανισμών, διότι οι μολύνσεις επιδρούν συνήθως στο αναπνευστικό

σύστημα, στη γαστρεντερική περιοχή, στους λεμφαδένες και στο ήπαρ. Εντούτοις λίγες έρευνες έχουν γίνει για την συνδυασμένη ενέργεια του σεληνίου και της βιταμίνης E στους υδρόβιους οργανισμούς (Turner & Finch, 1991).

Η βιταμίνη E μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της θνησιμότητας και αυξάνει το επίπεδο της α-τοκοφερόλης στο ήπαρ αποτρέποντας τη μυϊκή δυσμορφία και τις θνησιμότητες (Poston *et al.*, 1976). Η ενδοκυτταρική παραγωγή των μακροφάγων αυξάνεται στα άτομα του γατόψαρου (*I. punctatus*), μετά από χορήγηση των δύο θρεπτικών ουσιών (Wise *et al.*, 1993).

#### **4.6. Η συνδυαστική δράση των βιταμινών C (ασκορβικό οξύ) και E (α-τοκοφερόλη)**

Το θέμα της σωστής και ισορροπημένης διατροφής για την ορθή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, την ανθεκτικότητα στις διάφορες ασθένειες και γενικότερα τη διατήρηση της άριστης υγείας των υδρόβιων οργανισμών απασχόλησε τους επιστήμονες που στράφηκαν στην εξωγενή χορήγηση των απαραίτητων βιταμινών και κυρίως στην συνδυαστική δράση αυτών που μέχρι σήμερα ερευνάται και βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο. Οι έρευνες αυτές υπόσχονται ελπιδοφόρα αποτελέσματα όσον αφορά την πρόληψη των ασθενειών. Πρόσφατες δημοσιεύσεις αξιολογούν θετικά τα υψηλά επίπεδα των βιταμινών C και E στην διατροφή διαφόρων ειδών καθώς συμβάλλουν στην άμυνα των υδρόβιων οργανισμών (πρόληψη από μολυσματικές ή μη ασθένειες) βοηθώντας στην αποφυγή παθολογικών καταστάσεων που οδηγούν σε θνησιμότητες (Lall, 2002).

Η βιταμίνη C έχει αποδειχθεί ότι βοηθά τη δραστηριότητα του συμπληρώματος, των αντισωμάτων, των λευκοκυττάρων και σε πολλές άλλες άνοσες λειτουργίες των σπονδυλωτών. Η βιταμίνη E έχει ουσιαστική δράση για τους υδρόβιους οργανισμούς καθώς είναι αντιοξειδωτική ουσία και προστατεύει τα

ακόρεστα λιπαρά οξέα από την οξειδωση (τα ψάρια τείνουν να περιέχουν υψηλό ποσοστό ακόρεστων λιπαρών οξέων στις μεμβράνες των κυττάρων τους για να διατηρήσουν τη ρευστότητα των μεμβρανών του σώματος σε χαμηλές θερμοκρασίες). Η βιταμίνη Ε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα ενισχύοντας τα φαγοκύτταρα, τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και τη παραγωγή των αντισωμάτων. Επιπλέον, συνεργάζεται με τη βιταμίνη C ώστε να διατηρήσει τη δραστηριότητα των υπεροξειδασών (Mulero *et al.*, 1998). Ωστόσο, το κόστος των βιταμινών και η σωστή εφαρμογή τους παρουσιάζονται ως εμπόδιο στις υδατοκαλλιέργειες και χρειάζονται παραπάνω αξιολόγηση (Lall, 2002).

Η χρήση των ανοσοενισχυτικών συμβάλει στην ενίσχυση των αμυντικών μηχανισμών και στη προστασία από διάφορες ασθένειες. Ο συνδυασμός των υψηλών συγκεντρώσεων των βιταμινών C και E επηρεάζει θετικά το ανοσοποιητικό σύστημα (Montero *et al.*, 1999), εντούτοις πρέπει να υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ των παραπάνω βιταμινών (Menezes *et al.*, 2006).

Η παρουσία των δύο βιταμινών C και E στη διατροφή των υδρόβιων οργανισμών έχει προταθεί κυρίως για να εξουδετερώσει την ευαισθησία της ανεπάρκειας της βιταμίνης C καθώς είχε βρεθεί ότι μια διατροφή χωρίς βιταμίνη C έχει προκαλέσει στο γατόψαρο το αίσθημα της ανορεξίας και χαμηλή μετατρεψιμότητα της τροφής ανεξάρτητα από τη προσθήκη της βιταμίνης E. Ενώ αντίθετα, σημάδια ανεπάρκειας της βιταμίνης E δεν παρατηρήθηκαν όταν στη διατροφή υπήρχε η βιταμίνη C αν και υπήρχε μια μικρή υπεροξειδωση των λιπιδίων (Sealey & Gatlin, 2002).

Η συνδυαστική δράση της βιταμίνης C και E στη τσιπούρα σε κατάσταση «stress» ενισχύει τη φυσική αιμολυτική δραστηριότητα του συμπληρώματος και τη λειτουργία των λευκών αιμοσφαιρίων του κεντρικού νεφρού (Ortuño *et al.*, 2003).

Παράλληλα ο συνδυασμός E και C μειώνει τα επίπεδα κορτιζόλης στο πλάσμα καθώς η προσθήκη τους απέτρεψε τη μετατροπή των ακόρεστων λιπαρών οξέων σε εστέρες χοληστερόλης, τα οποία είναι συστατικά της κορτιζόλης (Montero *et al.*, 1999).

Η φαγοκυτταρική λειτουργία, όπως έχει ειπωθεί και παραπάνω επηρεάζεται από διάφορες συγκεκριμένες θρεπτικές ουσίες όπως είναι η πρωτεΐνη, τα λιπίδια, οι βιταμίνες και τα ανόργανα άλατα και υπερασπίζεται τη μη ειδική ανοσία (η οποία είναι εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία και επηρεάζει ιδιαίτερα τα ψάρια του κρύου νερού). Η προσθήκη των βιταμινών C και E προκαλεί αύξηση της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας των λευκοκυττάρων στο νεφρό και του αριθμού τους, στην εκτρεφόμενη τσιπούρα μολυσμένη με το βακτήριο *Vibrio anguillarum* (*Listonella anguillarum*) (Mulero *et al.*, 1998).

Η υψηλή συγκέντρωση της α-τοκοφερόλης στη διατροφή προσφέρει μια καλή αντιοξειδωτική δράση (προστασία ενάντια στην οξειδωτική ζημία των ιστών ενισχύοντας την αντίσταση των μεμβρανών των ερυθροκυττάρων και των λευκοκυττάρων) ενώ το ασκορβικό οξύ παίζει καταλυτικό ρόλο στη βελτίωση της άνοσης λειτουργίας. Επίσης, υπάρχει μια συνεργατική επίδραση ανάμεσα στους συντελεστές των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των ανοσολογικών παραγόντων κατόπιν συμπληρωματικής προσθήκης των βιταμινών C και E (Menezes *et al.*, 2006).

Τη συνεργατική δράση των δύο βιταμινών C και E για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος έχουν επιβεβαιώσει και οι Azad *et al.* (2007) καθώς βρήκαν ότι τα υψηλά ποσοστά των βιταμινών C και E ενισχύουν την ειδική ή μη ανοσία των νεαρών ψαριών του είδους *Chanos chanos* με τη παραγωγή των αντισωμάτων, μετά την μόλυνση από το παθογόνο *Vibrio vulnificus*, ενώ η πολύ υψηλή ποσότητα της βιταμίνης E δε βοήθησε στην ανοσία, λόγω του χαμηλού πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων.



Η επίδραση του συνδυασμού της α-τοκοφερόλης του ασκορβικού οξέως και της β-glucans ενισχύουν την έμφυτη ανοσία του λαβρακιού καθώς ενεργοποιούν τη δραστηριότητα της λυσοζύμης και του συμπληρώματος (Bagni *et al.*, 2000) ενώ προκαλεί και αύξηση της δραστηριότητας του συμπληρώματος, των αιμοπεταλίων στο είδος *Notemigonus crysoleucas* (Chen *et al.*, 2004).

Η ισχυρή δράση του συνδυασμού ασκορβικού οξέος και α-τοκοφερόλης προκαλεί βελτίωση της ζωτικότητας κατά την εκτροφή του *Pagrus major* και του *Acanthopagrus schlegeli*. Η δράση του ασκορβικού οξέος συμβάλλει στον μεταβολισμό των λιπιδίων (λιπόλυση-διάλυση λίπους) στα ενδοπεριτοναϊκά στρώματα του σώματος και του ήπατος, καθώς επιτάχυνε την απορρόφηση της βιταμίνης Ε (περιορισμός της υπεροξειδωσης των λιπιδίων) και συμβάλλει στην αποφυγή της υποβάθμισης της και στα δύο είδη (Ji *et al.*, 2003).

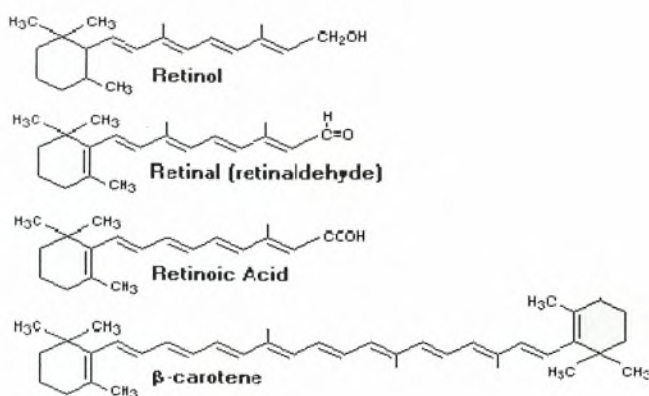
#### **4.7. Η Βιταμίνη Α**

Ο Casimir Funk, βιοχημικός επιστήμονας από την Πολωνία, ανακάλυψε σχεδόν εκατό χρόνια πριν τη βιταμίνη Α και την ονόμασε με το γράμμα «Α» διότι ήταν η πρώτη βιταμίνη που ανακαλύφθηκε. Η ύπαρξη της βιταμίνης αυτής αναγνωρίστηκε το 1913 και η χημική της φύση καθορίστηκε το 1933. Η βιταμίνη Α είναι ο γενικός όρος που χρησιμοποιείται για να περιγραφούν οι ενώσεις που επιδεικνύουν την βιολογική δράση της ρετινόλης. Η βιταμίνη Α είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη και τα δύο βασικά συστατικά της στις τροφές είναι η ρετινόλη και τα καροτενοειδή (Εικόνα 3) τα οποία βρίσκονται σε αφθονία στα ψάρια, στα αβγά των ψαριών, στο μουρουνέλαιο, στο βούτυρο, στο γάλα και στο ήπαρ διαφόρων ζώων. Η ρετινόλη δε βρίσκεται αυτούσια στα φυτά αλλά πολλά λαχανικά και φρούτα περιέχουν διάφορα συστατικά και χρωστικές που μετατρέπονται σε βιταμίνη Α στον οργανισμό. Μία καλή πηγή βιταμίνης Α είναι το β-καροτένιο ή προβιταμίνη Α που

βρίσκεται άφθονη στο καρότο. Η βιταμίνη Α καταστρέφεται όταν βρεθεί σε φως, όταν εκτεθεί στον ατμοσφαιρικό αέρα ή σε υψηλές θερμοκρασίες.

Η βιταμίνη Α είναι απαραίτητη για την φυσιολογική λειτουργία του αμφιβληστροειδούς και ιδιαίτερος για την προσαρμογή της όρασης στο σκοτάδι, για τη διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του επιθηλιακού ιστού και του ανοσοποιητικού συστήματος, για την κυτταρική διαφοροποίηση και διαίρεση και για την ανάπτυξη των οστών. Επίσης, η βιταμίνη Α συμπράττει σε βιοχημικές αντιδράσεις και απορροφάται εύκολα από το τμήμα του εντέρου μέσω ενός φορέα-μεσολαβητή.

Για την απορρόφηση της απαιτείται η παρουσία γαστρικών υγρών, χολικών αλάτων, παγκρεατικής και εντερικής λιπάσης, καθώς και πρωτεϊνικών και διαιτητικών λιπών. Το ήπαρ περιέχει τουλάχιστον το 90% της αποθηκευμένης βιταμίνης Α στο σώμα και υπάρχουν ενδείξεις ότι συμμετέχει στην παθογένεια των ηπατικών νόσων. Εντούτοις, μικρές ποσότητες είναι αποθηκευμένες και στο νεφρό. Η βιταμίνη Α αποβάλλεται στην χολή και στα ούρα (ως μεταβολίτες).



Εικόνα 3. Οι συντακτικοί τύποι των τεσσάρων μορφών της ρετινόλης

#### 4.7.1. Η βιταμίνη Α στην εκτροφή των υδρόβιων οργανισμών

Η βιταμίνη Α συμμετέχει στον κυτταρικό μεταβολισμό, λειτουργεί ως ενζυμικός ενεργοποιητής και διαδραματίζει βασικό ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων. Τα χαμηλά επίπεδα της βιταμίνης Α μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την ανοσολογική λειτουργία του υδρόβιου οργανισμού και πολλές φορές παρατηρούνται παθολογικά σημάδια ανεπάρκειας (Πίνακας 3) στον υδρόβιο οργανισμό όπως τραυματισμοί και παθολογικά προβλήματα του οφθαλμού (αμφίπλευρος ή μονόφθαλμος εξόφθαλμος). Αναμφισβήτητα η ανάγκη της βιταμίνης Α, για κάθε υδρόβιο οργανισμό, είναι ξεχωριστή και για τον λόγο αυτό έχουν γίνει πολλές προσπάθειες από ερευνητές, ώστε να καθοριστεί το επίπεδο της συγκέντρωσης της βιταμίνης Α για κάθε είδος ώστε να εξασφαλιστεί και η ανθεκτικότητά τους στις ασθένειες που μπορεί να προκύψουν κατά την εκτροφή τους (Lall, 2002).

Τα ψάρια δεν μπορούν να συνθέσουν τη βιταμίνη Α (*de novo*) από μόνα τους. Λαμβάνουν την βιταμίνη Α είτε άμεσα, με την προσθήκη της στη τροφή τους, είτε έμμεσα μέσω του μεταβολισμού των πρόδρομων ουσιών της (καροτίνες α, β, γ). Η ασταξανθίνη, μια χρωστική, δίνει το χαρακτηριστικό ρόδινο χρωματισμό στη σάρκα των σολομοειδών και χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στα σιτηρέσια καθώς προσελκύει τους καταναλωτές. Δεν έχει βρεθεί ότι η ασταξανθίνη παρέχει ανοσία, αλλά έχει αντικαρκινικό και αντιοξειδωτικό χαρακτήρα παρομοιάζοντας την ως «πρόδρομο ουσία της βιταμίνης Ε» (Thompson *et al.*, 1995). Η αποθήκευση της βιταμίνης Α (με μορφή εστέρα) γίνεται από το ήπαρ και η απορρόφηση της από το έντερο (Thompson *et al.*, 1994).

Πίνακας 3. Η δράση της βιταμίνης Α, τα ειδικά ή μη συμπτώματα ανεπάρκειας και υπερβιταμίνωσης της

Βιταμίνη Α Δράση/ λειτουργία	Μη ειδικά συμπτώματα ανεπάρκειας	Είδος ψαριού	Ειδικά συμπτώματα ανεπάρκειας	Είδος ψαριού	Υπέρ-βιταμίνωση Α
Πρωτεϊνικός μεταβολισμός των κυττάρων κυρίως στο δέρμα. Συμβάλει στον σχηματισμό του βλεννογόνου του οφθαλμού	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αργή ανάπτυξη</li> <li>• Ανορεξία ή έλλειψη όρεξης</li> <li>• Εξόφθαλμος</li> <li>• Ανώμαλος χρωματισμός ή σκούρος χρωματισμός</li> <li>• Ναυσιμός</li> <li>• Νευρικά συμπτώματα</li> <li>• Θνησιμότητα</li> <li>• Σκελετικές δυσμορφίες</li> <li>• Τύφλωση</li> <li>• Μειωμένη έκκριση βλέννας</li> <li>• Αιμορραγίες στους οφθαλμούς στα πτερόγια και το δέρμα</li> </ul>	Πέστροφα και σολομός	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μικρή αύξηση</li> <li>• Εξόφθαλμος</li> <li>• Μετατόπιση του φακού στον οφθαλμό</li> <li>• Μετακίνηση του κερατοειδούς στον χιτώνα</li> <li>• Αμφιβληστροειδής</li> <li>• Εκφυλισμός,</li> <li>• Αμφιβληστροειδοπάθεια</li> <li>• Οίδημα</li> <li>• Ασκίτη (η συσσώρευση υγρού μέσα στην κοιλιακή κοιλότητα)</li> <li>• Καταρράκτης</li> </ul>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Παραμόρφωση σπονδύλων
		Γατόψαρο καναλιών	Εξοφθαλμία και οίδημα	<i>Morone chrysops</i> x <i>M.saxatilis</i>	Διαταραχή της εντερικής λειτουργίας
		Κοινός κυπρίνος	Εξοφθαλμία και αιμορραγίες στα πτερόγια και το δέρμα		
		Κόκκινη τσιπούρα	-		
		Ιαπωνικό χέλι	-		

Η χορήγηση της βιταμίνης Α δίνεται κατά τη διάρκεια της σπονδυλικής μορφογένεσης μέσω της αρτέμιας, η οποία απορροφά γρήγορα τις διάφορες μορφές της βιταμίνης Α. Το ρετινολικό οξύ είναι το κυριότερο προϊόν κατά τον μεταβολισμό της βιταμίνης Α μέσα στην αρτέμια (άρα η βιταμίνη Α μεταβολίζεται μέσα στην αρτέμια ή τα τροχόζωα). Ένα ασφαλές επίπεδο της βιταμίνης Α είναι λιγότερο από 50IUVA g<sup>-1</sup> *Artemia*, ενώ ένα υπερβολικό επίπεδο θεωρείται περισσότερο από 400IUVA g<sup>-1</sup> *Artemia nauplii* και προκαλεί σκελετικές παραμορφώσεις (λόρδωση, κύρτωση και σκολίωση). Το ρετινολικό οξύ γίνεται ιδιαίτερα τοξικό όταν βρίσκεται σε μεγάλα ποσοστά, καθώς βρίσκονταν σε ποσοστό 96,5% στο κυκλοφορικό σύστημα, 42% στη γαστρεντερική περιοχή και 2,1% στον ιστό (Takeuchi *et al.*, 1998).

#### **4.7.2. Ανοσοενισχυτική δράση της βιταμίνης Α**

Τα δενδριτικά κύτταρα, τα οποία ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα, είναι κύτταρα ειδικά για την ανίχνευση των μικροβίων, ειδοποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα δενδριτικά κύτταρα δρουν σαν μηχανισμοί συναγερμού του ανοσοποιητικού συστήματος. Μόλις αισθανθούν την παρουσία εισβολέων μεταδίδουν το σήμα συναγερμού προς τα λευκά αιμοσφαίρια. Οι μηχανισμοί των σημάτων συναγερμού γίνονται μέσω υποδοχέων όπως ο TLR2 όπου χρησιμοποιεί τη βιταμίνη Α για να μεταδίδει τα μηνύματά του, γεγονός που παρέχει μία εξήγηση για τη σχέση που υπάρχει ανάμεσα στην έλλειψη της βιταμίνης Α και το ανοσοποιητικό σύστημα. Η βιταμίνη Α είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και είναι υπεύθυνη για την προστασία των κυττάρων των βλεννογόνων.

Η επίδραση του συνδυασμού της βιταμίνης Α και της ασταξανθίνης αυξάνουν τη δραστηριότητα της ανοσογλοβίνης και τη μετανάστευση των λευκών αιμοσφαιρίων στην εκτροφή της ιριδιίζουσας πέστροφας. Το συνολικό επίπεδο των

ανοσοσφαιρινών, της δραστηριότητας του συμπληρώματος και της βλέννας, της λυσοζυμικής και της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας ενισχύεται με την εισαγωγή της βιταμίνης A μετά από μόλυνση από το *Aeromonas salmonicida*. Φαίνεται ότι η επίδραση της ασταξανθίνης βοηθά στην παραγωγή των αντισωμάτων αλλά δεν επηρεάζει την κυτταρική ανοσία (Thompson *et al.*, 1995).

Η β-καροτίνη και η ασταξανθίνη, μέσω θαλάσσιων αλγών *Dunaliella* ενισχύουν τη μη ειδική ανοσία της ιριδιζουσας πέστροφας αυξάνοντας τη δραστηριότητα του συμπληρώματος και της λυσοζύμης. Επίσης επηρεάζουν τη κυτταρική ανοσία αυξάνοντας τη παραγωγή φαγοκυττάρων, ενώ η προσθήκη του άλγους *Phaffia rhodozyma* μπορεί να διαμορφώσει μερικούς από τους έμφυτους αμυντικούς μηχανισμούς στα άτομα της πέστροφας (Amar *et al.*, 2004).

## 5. ΤΑ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ

### 5.1. Η Ιστορική αναδρομή των προβιοτικών

Ο όρος προβιοτικά (probiotics) προέρχεται από τις λέξεις «pro» που σημαίνει «για» και «biotic» που σημαίνει «βίος - ζωή». Επομένως, θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα προβιοτικά δρουν «για τη ζωή». Η θεωρία των προβιοτικών προτάθηκε αρχικά από τον Metchnikoff το 1908 (Ouwehand, 2003), ο οποίος προσπαθούσε να ανακαλύψει τους λόγους για τους οποίους οι βοσκοί στη Βουλγαρία παρουσίαζαν καλή υγεία και μακροζωία. Τα αποτελέσματα της έρευνας του έδειξαν ότι τα άτομα αυτά κατανάλωναν συστηματικά γαλακτοκομικά προϊόντα με ζωντανές καλλιέργειες μη παθογόνων μικροοργανισμών (Gatesoupe, 1999).

Ιστορικά, πολύ πριν από την ανακάλυψή των προβιοτικών τα μικρόβια είχαν χρησιμοποιηθεί για να συντηρούν τα τρόφιμα. Αρχές του αιώνα, ο Metchnikoff

(1907-1908), πρότεινε την χορήγηση οξυγαλακτικών βακτηρίων στον ανθρώπινο με σκοπό την καταστολή της καταστρεπτικής δραστηριότητας άλλων μικροβίων.

Η σύγχρονη έννοια των προβιοτικών διατυπώθηκε πριν 25 έτη, όπου έπειτα η ξεκάθαρη σαφήνεια της, ταλαντεύονταν πολλά έτη από τις επιστημονικές επιτροπές. Διάφοροι ορισμοί δόθηκαν διαδοχικά στα προβιοτικά, όμως ο Parker το 1975 ήταν αυτός που αναφέρθηκε στους οργανισμούς και τις ουσίες που συμβάλουν στο εντερικό μικροβιακό περιβάλλον, ονομάζοντας τα «προβιοτικά». Έπειτα τα προβιοτικά πήραν τον σύγχρονο ορισμό τους και ορίζονται ως ζωντανοί μικροβιακοί οργανισμοί που χορηγούνται στην τροφή, με ευμενή επίδραση στην υγεία του πεπτικού συστήματος (Verschuere *et al.*, 2000).

Τα προβιοτικά καταπολεμούν ανταγωνιστικά παθογόνα μικρόβια, όπως τη *Salmonella* sp. και την *E. coli*, βελτιώνουν την μικροβιακή ισορροπία στο έντερο, επιδρούν στο pH του εντέρου (όπως τα *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*), διασπών τις κυτταρίνες υποβοηθώντας την πέψη (Sakai, 1999), ευνοούν την σύνθεση (Reuter, 2001), την απορρόφηση των βιταμινών και ιχνοστοιχείων και επενεργούν θετικά στην φαγοκυτταρική δράση και στις εκκριτικές ποσότητες της ιγουλίνης IgA (Davidson *et al.*, 1993).

Μία επιπλέον ιδιότητα των προβιοτικών αποτελεί η δέσμευση των μυκοτοξινών (δευτερογενών μεταβολιτών μυκήτων) όπου ειδικά προβιοτικά βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ δεσμεύουν τις μυκοτοξίνες στο βακτηριακό τοίχωμα τους και τις απομακρύνουν από το γαστρεντερικό σωλήνα (Robertson *et al.*, 2000).

Η ιδέα και η φιλοσοφία των προβιοτικών στηρίζεται στις λειτουργίες και την ισορροπία της εντερικής μικροχλωρίδας. Η εντερική χλωρίδα αποτελεί ένα πολύπλοκο μικροβιακό οικοσύστημα, με ξεχωριστή βιοποικιλότητα και σημαντική

βιολογική δράση. Τα 2/3 του αμυντικού συστήματος βρίσκονται στο έντερο και η παρουσία μεγάλου αριθμού βακτηρίων σε αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια σημαντική ανοσολογική πρόκληση (Skoufos *et al.*, 2007).

Η πρώτη εφαρμογή των προβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες φαίνεται σχετικά πρόσφατη, άλλα το φιλικό αυτό ενδιαφέρον προς το περιβάλλον αυξάνεται γρήγορα, παρατηρώντας μια ποικιλία επιστημονικών άρθρων, που ασχολούνται αποκλειστικά με τα προβιοτικά, ώστε η εμπειρική χρήση να συνδιαστεί με την επιστημονική προσέγγιση (Gatesoupe, 1999).

Ένας μικροοργανισμός για να μπορεί να οριστεί ως αποτελεσματικό προβιοτικό θα πρέπει να συγκεντρώνει τις παρακάτω ιδιότητες:

- να προσκολλάται σε κύτταρα του επιθηλίου του εντέρου
- να αποκλείει ή να μειώνει την προσκόλληση παθογόνων μικροοργανισμών
- να εμμένει και να πολλαπλασιάζεται
- να παράγει οξέα, υπεροξειδίο του υδρογόνου και βακτηριοξίνες που θα ανταγωνίζονται την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών
- να είναι ασφαλής, δηλαδή να μην είναι παθογόνος
- να αθροίζεται στη διαμόρφωση μιας φυσιολογικής ισορροπημένης μικροχλωρίδας.

## **5.2. Ο τρόπος δράσης των προβιοτικών**

Τα προβιοτικά υποκινούν το ανοσοποιητικό σύστημα των υδρόβιων οργανισμών και συμβάλουν στην αλλαγή του μικροβιακού μεταβολισμού με την αύξηση ή τη μείωση των σχετικών ενζυμικών επιπέδων. Τα προβιοτικά δρουν με ανταγωνιστικό αποκλεισμό, αντιμετωπίζοντας και καταπολεμώντας το παθογόνο μικροοργανισμό με την παραγωγή ανασταλτικών ενώσεων ή με τον ανταγωνισμό για τις θρεπτικές ουσίες στις περιοχές προσκόλλησης του εντέρου (Irianto & Austin, 2002).



Τα προβιοτικά χρησιμοποιούνται για τα ευεργετικά αποτελέσματα που προκαλούν στα ψάρια αλλά και στο περιβάλλον των υδατοκαλλιέργειών καθώς ρυθμίζουν τη μικροχλωρίδα του νερού, ενισχύουν την αποσύνθεση των ανεπιθύμητων οργανικών ουσιών στο νερό, βελτιώνουν το υδρόβιο οικοσύστημα με την ελαχιστοποίηση των τοξικών αερίων όπως είναι της αμμωνίας, του νιτρικού άλατος, του σουλφιδίου του υδρογόνου, του μεθανίου κ.λπ. (Parvez *et al.*, 2006).

Εντούτοις, ο ακριβής μηχανισμός της δράσης των προβιοτικών είναι κατά ένα μεγάλο μέρος άγνωστος. Η προσοχή πρέπει να αποδοθεί στην επιλογή του προβιοτικού και της δόσης του επειδή ουσιαστικά πρέπει να εξασφαλιστεί η υγεία του εκτρεφόμενου οργανισμού αλλά και του καταναλωτή του (Irianto & Austin, 2002).

### **5.3. Τα προβιοτικά για τους υδρόβιους οργανισμούς**

Η έρευνα των προβιοτικών για τους υδρόβιους οργανισμούς αυξάνεται ταυτόχρονα με την απαίτηση για ευνοϊκότερη μεταχείριση του περιβάλλοντος στις υδατοκαλλιέργειες. Το γαστρεντερικό μικροπεριβάλλον των ψαριών αλλά και των οστρακόδερμων είναι ευμετάβλητο και παραδόξως εξαρτώμενο από το εξωτερικό περιβάλλον λόγω της τροφής και της ροής του νερού που περνά από τα βράγχια.

Η πρώτη χρήση των προβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες έγινε από τον Kozasa το 1986, ο οποίος μελέτησε προβιοτικά εμπορικής μορφής που έβρισκαν εφαρμογή σε χερσαία ζώα. Αν και τα αποτελέσματα του προβιοτικού ήταν αναμενόμενα, η επιβίωση αυτών των βακτηρίων στο υδρόβιο οργανισμό ήταν αβέβαιη, έτσι παρουσιάστηκαν διάφορα προβλήματα, όπως η χαμηλή βιωσιμότητα του προβιοτικού λόγω του διαφορετικού περιβάλλοντος. Για αυτό τον λόγο αργότερα, έγινε προσπάθεια απομόνωσης μικροοργανισμών από το θαλάσσιο και γλυκό περιβάλλον (Gatesoupe, 1999, Moriarty *et al.*, 2005).

Μέχρι στιγμής τα προβιοτικά που έχουν προταθεί ανήκουν στην οικογένεια των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Αυτά εμφανίζουν περιορισμένη αντιβακτηριδιακή δράση ενάντια σε Gram αρνητικών βακτηρίων (η πιο συχνά εμπλεκόμενη ομάδα σε πρόκληση λοιμωδών νοσημάτων στους ιχθείς), αλλά και Gram θετικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα η δράση αυτή αναφέρεται ενάντια στα βακτήρια *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. salmonicida*, *V. parahaemolyticus*, *V. harvei*, *V. minicus*, *V. vulnificus*, *Edwardsiella trada* και *Streptococcus sp.*

Η υπόθεση της υποκίνησης του ανοσοποιητικού συστήματος των υδρόβιων οργανισμών είναι πολύ σημαντική. Είναι δυνατόν οι αυτόχθονοι μικροοργανισμοί να υποκινήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα των υδρόβιων ζώων και να δράσουν έναντι των παθογόνων μικροβίων του εντέρου (Moriarty, 1999). Πιθανά προβιοτικά μπορεί να είναι είτε Gram θετικά βακτήρια, είτε Gram αρνητικά βακτήρια.

Μερικά από τα Gram θετικά βακτήρια, που έχουν χρησιμοποιηθεί ως προβιοτικά στις υδατοκαλλιέργειες είναι της ομάδας των *Bacillus spp.*, όπως ο *Bacillus 48*, *Bacillus S11* και *Bacillus toyoi*. Θετικά αποτελέσματα έχουν καταγραφεί και από την χρήση του *Enterococcus faecium SF 68*, *Micrococcus luteus*, από την ομάδα των *Lactobacillus spp.*, όπως το *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus Helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus ATCC*, *Lactococcus lactis AR21* και από την ομάδα των *Carnobacterium spp.*, όπως το *Carnobacterium divergens*, και *Carnobacterium inhibens* K1. Μερικά από τα Gram αρνητικά βακτήρια, που χρησιμοποιήθηκαν ως προβιοτικά στις υδατοκαλλιέργειες ήταν το *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas I-2*, *P. fluorescens AH2*, *Vibrio proteolyticus*, *V. tubiashii*, *A. hydrophila*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus* και τέλος βακτήρια της οικογένειας *Photobacterium*. Επίσης, ως πιθανά προβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν και κάποια

βακτηριοφάγα βακτήρια όπως τα βακτήρια των οικογενειών *Myoviridae* και *Podoviridae* (Irianto & Austin, 2002).

#### **5.4. Η αξιολόγηση των δυνατοτήτων των υποψήφιων προβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες**

Οι περισσότερες επιστημονικές μελέτες ενδιαφέρονται και εστιάζουν στα θετικά αποτελέσματα των προβιοτικών πάνω στους εκτρεφόμενους υδρόβιους οργανισμούς, όπως είναι η μείωση των ποσοστών θνησιμότητας.

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης των προβιοτικών είναι:

- η αντίσταση τους στις ασθένειες
- η δυνατότητα να εμμένουν και να αποικούν στο τμήμα του εντέρου
- η δυνατότητα να αντιμετωπίζουν προκλητικά άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς
- η δυνατότητα τους να μειώσουν τον βακτηριακό πληθυσμό στο ήπαρ
- η δραστηριότητα πεπτικών ενζύμων
- η ανάπτυξη και ενίσχυση της μη ειδικής ανοσίας π.χ. μεγάλος αριθμός φαγοκυττάρων και αύξηση της δραστηριότητας της λυσοζύμης.

Ταυτόχρονα, έχει υπογραμμιστεί η αναγκαιότητα της εργαστηριακής δοκιμής ενός υποψήφιου προβιοτικού. Εντούτοις, ο ακριβής μηχανισμός της δράσης τους είναι κατά ένα μεγάλο μέρος άγνωστος. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην επιλογή των προβιοτικών, επειδή ουσιαστικά χορηγούνται για να εξασφαλίσουν την «καλή υγεία» του οργανισμού (Gatesoupe, 2008).

Η ανησυχία που έχει δημιουργηθεί για τα προβιοτικά οφείλεται στις προτεινόμενες δοσολογίες, όπου πολλοί επιστήμονες έρχονται σε αντιπαράθεση. Επίσης ιδιαίτερη ανησυχία προκαλεί το γεγονός ότι κάποια βακτήρια μπορεί να είναι παθογόνα για κάποιες οικογένειες ή και είδη υδρόβιων οργανισμών, ενώ για κάποια

άλλα όχι, αλλά αντίθετα να έχουν ευεργετικές ή ουδέτερες αντιδράσεις. Επομένως, τα εμπορικά προβιοτικά πρέπει να παρέχονται στην αγορά μόνο εάν έχουν δοκιμαστεί εργαστηριακά σε συνθήκες *in vitro* και *in vivo* για το συγκεκριμένο είδος (Irianto & Austin, 2002).

Τέλος, πρέπει είναι να τονιστεί ότι η λύση που αναζητούμε για την αντιμετώπιση των ασθενειών δεν βρίσκεται στον τομέα της φαρμακολογίας αλλά στον τομέα της μικροβιακής οικολογίας και της ιχθυοπαθολογίας, καθώς εκμεταλλευόμαστε τη ικανότητα του «ανταγωνιστικού αποκλεισμού» των βακτηρίων της ενδογενούς μικροχλωρίδας των οργανισμών, του νερού και του ιζήματος (Moriarty, 1999).

#### **5.5. Ο ρόλος των προβιοτικών στο προνυμφικό στάδιο των υδρόβιων οργανισμών**

Η επώαση των αυγών, η εκκόλαψη τους και τα αρχικά στάδια της ζωής των προνυμφών μπορεί να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στη δυναμική μιας μονάδας, εάν δεν δημιουργηθούν μετά την μεταμόρφωση, δυναμικά και υγιή ενήλικα άτομα. Οι προνύμφες έρχονται σε άμεση επαφή με το περιβάλλον, στο οποίο υπάρχει ποικιλία μικροοργανισμών. Είναι επομένως εμφανές ότι η κατάσταση της υγείας και η εμφάνιση της «γηγενούς» μικροχλωρίδας επηρεάζεται από το μικροβιολογικό πληθυσμό που υπάρχει στις δεξαμενές. Υπό κανονικές συνθήκες, η «γηγενής» μικροχλωρίδα λειτουργεί ως «εμπόδιο» για τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Η σύνθεση της επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως η διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών, η φυσιολογία του εντέρου και οι ανοσολογικοί παράγοντες. Επίσης, οι προνύμφες διαθέτουν ένα «ατελές» ανοσοποιητικό σύστημα το οποίο στηρίζεται κυρίως στα πρώτιστα (Gomez-Gil *et al.*, 2000).

Ωστόσο, ελάχιστα είναι γνωστά για την κατάσταση της μικροχλωρίδας των προνυμφών. Κατά την εκκόλαψη, το πεπτικό σύστημα των περισσότερων προνυμφών δεν είναι διαμορφωμένο και κυριαρχείται από ένα μικρό αριθμό βακτηρίων (μικροχλωρίδα αυγών), το οποίο με τον καιρό αποικίζεται από βακτήρια του υδρόβιου περιβάλλοντος. Η μικροχλωρίδα του εντέρου των προνυμφών, που βρίσκονταν σε ασιτία, είναι παρόμοια με αυτή του νερού (Nikoskelainen *et al.*, 2003). Γενικά έχει αποδειχθεί ότι η αποίκιση του εντέρου αυξάνεται με την εξωγενή διατροφή.

Ο αριθμός των βακτηρίων στις προνύμφες υδρόβιων οργανισμών, τις πρώτες 4<sup>ες</sup> ημέρες, είναι περίπου  $5 \cdot 10^2$ /προνύμφη. Μεταξύ 5<sup>ης</sup> και 16<sup>ης</sup> ημέρας ο αριθμός των βακτηρίων είναι  $5 \cdot 10^4$ /προνύμφη. Οι περισσότερες θαλάσσιες προνύμφες έχουν ως «γηγενή» μικροχλωρίδα βακτήρια όπως *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp. και *Acinetobacter* spp. ενώ στις προνύμφες των γλυκών νερών κυριαρχούν το *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp., *Pseudomonas* spp. και της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (Tinh *et al.*, 2008).

Στις προνύμφες, η ανάπτυξη του στομάχου γίνεται σταδιακά με συνέπεια η δράση του προβιοτικού να δυσχεραίνεται λόγω της ανικανότητας του να αναπτυχθεί σε ένα συγκεκριμένο μέρος της πεπτικής οδού και να αντιμετωπίζει με επιτυχία τα παθογόνα βακτήρια. Τα τροχόζωα, τα μικροφύκη και η *Atremia salina*, που κυριαρχούν στην διατροφή των ιχθυδίων χρησιμοποιούνται ως «μεταφορείς» των προβιοτικών. Για την άμεση αξιολόγηση των προβιοτικών, οι ερευνητές πρέπει να είναι σε θέση να μπορούν να ξαναπομονώσουν τα χορηγηθέντα προβιοτικά από το εντερικό τμήμα των προνυμφών. Αν και έχει εξεταστεί επανειλημμένα η δυνατότητα και η δράση των προβιοτικών, η μακροπρόθεσμη επίδρασή τους στην μικροχλωρίδα δεν έχει μελετηθεί.

Τα πλεονεκτήματα των προβιοτικών στο προνυμφικό στάδιο των υδρόβιων οργανισμών είναι:

- ενίσχυση και υποκίνηση της χυμικής και κυτταρικής ανοσίας
- ενίσχυση του μεταβολισμού με την ενζυμική δράση
- η δραστηριότητα του ανταγωνιστικού αποκλεισμού
- η παραγωγή ανασταλτικών ουσιών
- η καταστροφή των μυκήτων.

Τα μειονεκτήματα των προβιοτικών στο προνυμφικό στάδιο των υδρόβιων οργανισμών είναι:

- η απότομη αλλαγή της αρχικής μικροχλωρίδας που πολλές φορές οδηγεί σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα
- η μείωση της δράσης των αυτόχθονων βακτηρίων που υπάρχουν ήδη στο έντερο
- ο πιθανός εκφυλισμός.

Ένα προβιοτικό για να εγκατασταθεί στη «γηγενή» μικροχλωρίδα πρέπει να βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση από την ήδη υπάρχουσα μικροχλωρίδα. Η δόση πρέπει καθορίζεται προσεκτικά ώστε να αποφευχθεί η υπέρ-δοσολογία, που ίσως οδηγήσει σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Η συγκέντρωση ενός προβιοτικού ορίζεται ως αριθμό κυττάρων  $\text{ml}^{-1}$  μέσω νερού (άμεσα) ή με βιοκάψουλες (τροχόζωα - *Artemia salina*) ή με αδρανή τροφή (pellets). Τα περισσότερα προβιοτικά δίνονται σε δόσεις μεταξύ  $10^4$ - $10^6$  κύτταρα  $\text{ml}^{-1}$ . Έχει υποστηριχθεί, ότι οι υδατοκαλλιέργειες δεν μπορούν να υποστηρίξουν βακτηριακές συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από  $10^6$  κύτταρα  $\text{ml}^{-1}$  (Bricknell & Dalmo, 2005).

Μερικά από τα προβιοτικά που έχουν χρησιμοποιηθεί στις υδρόβιες προνύμφες είναι το *Roseobacter sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Vibrio sp.* 33, *Pseudomonas*

*sp.*, *Bacillus sp.*, *Aeromonas media* κ.ά. Η χρήση των προβιοτικών στις προνύμφες ίσως βοηθήσει στο να ξαναποικισθούν επιτυχώς τα προβιοτικά που θα επαναχορηγηθούν στα ενήλικα άτομα (Vine *et al.*, 2006).

Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι το βακτήριο *Lactobacillus sp.* εμπλουτισμένο σε τροχόζωα αυξάνει το βάρος των προνυμφών του καλκανίου ενισχύοντας την αντίστασή του στα παθογόνα είδη *Vibrio*. Ομοίως, έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση του προβιοτικού *Lactobacillus plantarum* που εγκαταστάθηκε στη μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού τμήματος των προνυμφών του βακαλάου (Gatesoupe, 1999). Το *Lactobacillus rhamnosus* καταστέλλει την ασθένεια δοθιήνωση των σαλμονοειδών στην εκτροφή της ιριδιζουσας πέστροφας (Nikoskelainen *et al.*, 2001).

Ο συνδυασμός του βακτηρίου *Pediococcus acidilactici* και του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, προστιθέμενα στην *Artemia salina*, καταπολεμούν τα παθογόνα κατά gram-αρνητικά βακτήρια στην εκτροφή της προνύμφης του κιτρινοπολλάκιου, *Pollachius pollachius*. Ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae* έχει παρατηρηθεί ότι βοηθά στην ανάπτυξη του εντέρου των προνυμφών, βελτιώνει την διαδικασία της πέψης και το συντελεστή μετατρεψιμότητας (Gatesoupe, 2002).

Το *Carnobacterium divergens* προκαλεί αντίσταση στο *V. anguillarum* στην εκτροφή των προνυμφών του *G. morhua* (Gildberg & Mikkelsen, 1998). Το θαλάσσιο βακτήριο *Roseobacter spp.* σε συγκέντρωση  $10^7$  κύτταρα  $\text{ml}^{-1}$ , αλλά όχι μικρότερη αυτής, παρέχει αντιβακτηριδιακή δράση ενάντια στο *V. anguillarum*, *Vibrio splendidus* και *Pseudoalteromonas* στις προνύμφες του καλανίου (Balcázar *et al.*, 2006).

Το προβιοτικό *Pseudomonas fluorescens*, σε συγκέντρωση  $10^5$  κύτταρα  $\text{ml}^{-1}$  προκαλεί αντίσταση στο παθογόνο *Vibrio anguillarum*, στα άτομα της ιριδιζουσας

πέστροφας (Gram *et al.*, 1999) ενώ το προβιοτικό *Saccharomyces boulardii*, όταν προστίθεται στους ναύπλους της *Artemia salina*, προκαλεί επιτυχή αντίσταση στο παθογόνο *Vibrio spp.*

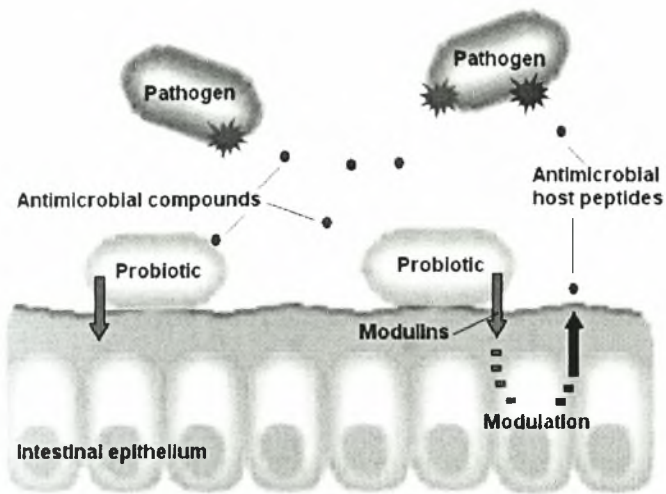
Στις προνύμφες της πέρκας το *Debaryomyces hansenii* CBS έχει βελτιώσει την ανάπτυξη τους και βοήθησε στην «ωρίμανση» της γαστρεντερικής περιοχής αυξάνοντας την απορροφητική του ικανότητα (Tuohy *et al.*, 2003, Vine *et al.*, 2006). Έξι βακτήρια, το *Cytophaga sp.*, *Roseobacter sp.*, *Ruegeria sp.*, *Paracoccus sp.*, *Aeromonas sp.* και *Shewanella sp.*, σε μια συγκέντρωση  $6 \pm 0.3 \cdot 10^5$  βακτήρια ml<sup>-1</sup>, αυξάνουν την επιβίωση σε ποσοστό 86% στις προνύμφες της τσιπούρας (Makridis *et al.*, 2005).

Αντίθετα τα *Vibrios* 334, C33, 11 και 770 ως πιθανά προβιοτικά, που χορηγήθηκαν σε μικροφύκη, έχει βρεθεί ότι δεν επηρεάζουν την αύξηση των προνυμφών του *Isochrysis galbana*. Το *Vibrio* C33 σε αντίθεση με τα υπόλοιπα παρουσιάζει μια επίμονη ανασταλτική ικανότητα στο παθογόνο *Vibrio anguillarum* (Avendaño & Riquelme, 1999).

Το *Bacillus subtilis* είναι ικανό να βελτιώσει τα ποσοστά επιβίωσης και τη διαδικασία της μεταμόρφωσης των προνυμφών της γαρίδας του γλυκού νερού *Macrobrachium rosenbergii*. Ο *Bacillus subtilis* αποτελεί μέρος της γηγενούς μικροχλωρίδας του *M. rosenbergii* και παρουσιάζει αντιμυκητιακή και αντιμικροβιακή δράση (Εικόνα 4) ενάντια στο *Aeromonas hydrophila* και *Vibrio parahaemolyticus*. Ο *Bacillus subtilis* βοηθά στην παραγωγή των πεπτικών ενζύμων όπως οι πρωτεάσες, ανταγωνίζεται για τις θρεπτικές ουσίες ή για την αποίκιση στη βλέννα του εντέρου (Keysami *et al.*, 2007).







Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της δράσης των προβιοτικών στη μικροχλωρίδα του εντέρου. Τα προβιοτικά παρέχουν προστασία παράγοντας αντιμικροβιακές ενώσεις (π.χ. βακτηριοσίνες) και ανταγωνίζοντας τους παθογόνους μικροοργανισμούς για τις θρεπτικές ουσίες και τις περιοχές προσκόλλησης.

Συνολικά 109 βακτήρια έχουν απομονωθεί από το νερό και το ίζημα της θάλασσας καθώς και από το έντερο ιχθύων και έχει μελετηθεί η ανταγωνιστικότητα τους ενάντια στα είδη *Vibrios*. Το *Paenibacillus spp.* και ο *Bacillus cereus* «εναντιώνονται» στο παθογόνο *Vibrio harveyi* και *Vibrio vulnificus* στην προνυμφιακή εκτροφή της γαρίδας (*Penaeus monodon*) και η επιβίωση με την προσθήκη του προβιοτικού μπορεί να φτάσει και το ποσοστό των 85% (Ravi *et al.*, 2007).

Εντούτοις, η χρήση των προβιοτικών στην εκτροφή προνυμφών είναι υπό αμφισβήτηση, με πολλές ερωτήσεις να παραμένουν αναπάντητες. Υπάρχει αναπάντητα ερωτήματα όπως αν ενεργούν ως τρόφιμα ή είναι αποκλειστικά ανταγωνιστές των επιβλαβών βακτηρίων, αν είναι σε θέση ένα προβιοτικό να προκαλέσει «stress» στις προνύμφες και να αποδυναμωθούν και αν μπορούν να γίνουν παθογόνα.

Πολλά είδη βακτηρίων έχουν υιοθετηθεί ως προβιοτικά στις εκτροφές των προνυμφών των υδρόβιων οργανισμών αλλά η επιλογή τους έχει βασιστεί κυρίως σε εμπειρικές παρατηρήσεις παρά σε επιστημονικά στοιχεία. Μέχρι τώρα στην πλειοψηφία, τα αποτελέσματά τους είναι αμφίβολα καθώς η γνώση του ανοσοποιητικού συστήματος των προνυμφών βρίσκεται σε νηπιακό επίπεδο. Στόχος είναι η διαμόρφωση ενός σταθερού πρωτόκολλου πρόληψης με τη χρήση των προβιοτικών, το οποίο θα είναι κατάλληλα διαμορφωμένο σε κάθε στάδιο ζωής των οργανισμών (Smith *et al.*, 2003).

#### **5.6. Τα προβιοτικά ως ανοσοενισχυτικά στους οστεϊχθύς**

Τα προβιοτικά, εκτός της αντιμικροβιακής τους δράσης, έχουν χρησιμοποιηθεί και για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (Vine *et al.*, 2004). Εντούτοις, αυτή τη στιγμή δεν είναι σαφές εάν τα βακτήρια, ως προβιοτικά που μπόρεσαν να έχουν μια ευεργετική επίδραση στην γαστρεντερική περιοχή των εκτρεφόμενων υδρόβιων ειδών, έχουν την ικανότητα της άνοσης απάντησης (Verschuere *et al.*, 2000).

Λίγες εργασίες έχουν αναφερθεί στην ανοσορυθμιστική δράση των προβιοτικών. Ο *Lactobacillus* JCM 136 είχε ευεργετική επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα ενισχύοντας τη μη ειδική ανοσολογική αντίδραση, με την παραγωγή ενός υψηλού ποσοστού φαγοκυττάρων, μακροφάγων, ανοσοσφαιρινών και λυσοζύμης, στα άτομα της ιριδίζουσας πέστροφας (Panigrahi *et al.*, 2004). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι ενισχύει η μη ειδική ανοσία της τιλάπιας (*Oreochromis niloticus*) βελτιώνοντας την επιβίωση της στην πίεση της αλατότητας και μειώνοντας την θνησιμότητα λόγω της μόλυνσης από το *E. tarda* (Taoka *et al.*, 2006).

Το βακτήριο *Lactobacillus rhamnosus* έχει βρεθεί ότι ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα της ιριδίζουσας πέστροφας, καθώς μειώνει σημαντικά τη

θνησιμότητα από το παθογόνο *Aeromonas salmonicida*. Η αποτελεσματικότητα της δράσης του προβιοτικού δεν εξαρτάται από τη δόση αφού η υπερβολική δόση δεν προσφέρει ταυτόχρονα και περισσότερη προστασία (Nikoskelainen *et al.*, 2001, 2003).

Δύο προβιοτικά το *Lactobacillus acidophilus* και το *Lactobacillus sporogenes* έχουν ανασταλτικό χαρακτήρα απέναντι σε gram-αρνητικά βακτήρια που βρίσκονταν στο έντερο του *M. rosenbergii* με το *L. sporogenes* να είναι πιο αποτελεσματικό στην αποίκιση και επιβίωση στην περιοχή του εντέρου από το *L. acidophilus* (Venkat *et al.*, 2004).

Τα γαλακτικά βακτήρια, *Lactobacillus sakei* CLFP 202, *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 και *Lactococcus lactis sp. lactis* CLFP 100 έχει βρεθεί ότι ενεργοποιούν τη χυμική και κυτταρική ανοσία της ιριδίζουσας πέστροφας προστατεύοντας την από το παθογόνο βακτήριο *Aeromonas salmonicida sp. salmonicida* (το οποίο βρίσκεται στο μικροβιακό περιβάλλον του γλυκού νερού) ενεργοποιώντας και πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό των φαγοκυττάρων του νεφρού (Balcázar *et al.*, 2007). Το *Lactococcus lactis* ( $10^6$  κύτταρα/ml) προστατεύει το καλκάνι από το βακτήριο *Vibrio anguillarum*, ενεργοποιώντας το ανοσοποιητικό του σύστημα (Villamil *et al.*, 2002).

Ο *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis*, που θεωρείται ένα από τα καλύτερα προβιοτικά, με ή χωρίς το *Bacillus subtilis* ενισχύει την έμφυτη ανοσία της τσιπούρας υποστηρίζοντας τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα των λευκών αιμοσφαιρίων από την πρώτη εβδομάδα. Ο συνδυασμός των προβιοτικών (μίγμα) μπορεί να οδηγήσει σε γρηγορότερα επιθυμητά αποτελέσματα. Τα *Lactobacillus delbrueckii sp. lactis* και *Bacillus subtilis*, ενισχύουν τη κυτταροτοξική δραστηριότητα, η οποία δεν είχε

προκληθεί σε καμία πειραματική ομάδα που είχε λάβει τα προβιοτικά ξεχωριστά (Salinas *et al.*, 2005).

Τα προβιοτικά, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* και *Saccharomyces cerevisiae*, όταν προστεθούν στο νερό εκτροφής του Ιαπωνικού *P. olivaceus*, αυξάνουν την αντοχή σε υψηλά επίπεδα «stress», ενισχύουν την έμφυτη ανοσία (αύξηση των ενζύμων όπως της λυσοζύμης, λεκτίνης και πρωτεάσης στη βλεννογόνο του εντέρου) και προκαλούν αντίσταση στο παθογόνο *V. anguillarum* (Taoka *et al.*, 2006).

Το βακτήριο *Bacillus subtilis* ABI έχει χρησιμοποιηθεί ως προβιοτικό, υποκινώντας το ανοσοποιητικό σύστημα της ιριδίζουσας πέστροφας παρέχοντας προστασία από το ιδιαίτερα επικίνδυνο *Aeromonas* spp. Η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος συμβάλλει και στην αύξηση των ψαριών, στον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων όπως και στην ενίσχυση της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας (Newaj-Fyzul *et al.*, 2007).

Θετικά αποτελέσματα έχει και το *Bacillus toyoi* στο ευρωπαϊκό χέλι (Chang & Liu, 2002), ενώ το μίγμα από *Bacillus* spp. θεωρείται αποτελεσματικό για την ιριδίζουσα πέστροφα αυξάνοντας την επιβίωση της ενάντια στη μόλυνση που προκλήθηκε από το *Yersinia ruckeri* (Salinas *et al.*, 2005).

Ο *Bacillus subtilis* που απομονώθηκε από το έντερο του *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) και ενσωματώθηκε στην διατροφή των *Poecilia reticulata*, *Poecilia sphenops*, *Xiphophorus helleri* και *Xiphophorus maculatus*, έχει βρεθεί ότι επηρεάζει θετικά την ανάπτυξη, την επιβίωση κατά την έκθεση τους στο παθογόνο *Aeromonas hydrophila* (παρέχοντας ανθεκτικότητα) και τη μετατρεψιμότητα της τροφής. Η ενσωμάτωση του στη διατροφή προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας της πρωτεάσης και της αμυλάσης (πεπτικών ενζύμων) στην πεπτική οδό όλων των ιχθύων και

παραμένει στο έντερο σε μεγάλους αριθμούς κατά τη διάρκεια της περιόδου της σίτισης (Ghosh *et al.*, 2007).

Το βακτήριο *Bacillus subtilis* είναι αποτελεσματικό απέναντι στο παθογόνο *Aeromonas hydrophila* αυξάνοντας το ποσοστό επιβίωσης και το βάρος του κυπρίνου (*Labeo rohita*) ενεργοποιώντας το ανοσοποιητικό του σύστημα και αυξάνοντας τον αριθμό των ερυθροκυττάρων, των λευκών αιμοσφαιρίων, της αιμογλοβίνης και της αιμοσφαιρίνης (Kumar *et al.*, 2006).

Μίγμα των βακτηρίων *Bacillus subtilis* (που απομονώθηκε από τον κυπρίνο, *Cyprinus carpio*) και *Bacillus circulans* (που απομονώθηκε από την τιλάπια της Μοζαμβίκης (*Oreochromis mossambicus*) όταν προστεθούν συμπληρωματικά στην διατροφή του κυπρίνου αυξάνουν τη δραστηριότητα της α-αμυλάσης και λιπάσης καθώς και της κυτταροτοξικής δραστηριότητας (Bairagi *et al.*, 2004).

Ο *Bacillus licheniformis* και ο *Bacillus subtilis*, είναι ανθεκτικοί στη διαδικασία της πελλετοποίησης, και εγκαθίστανται στο έντερο χρησιμοποιώντας έναν μεγάλο αριθμό σακχάρων (υδατανθράκων) για την αύξησή τους, με αποτέλεσμα να παράγουν μια σειρά από ένζυμα όπως η αμυλάση, η πρωτεάση και η λιπάση στην διατροφή της τιλάπιας του Νείλου (*O. niloticus*, L.) (Haroun *et al.*, 2006).

Το *Enterococcus faecium* SF68, ένα μη παθογόνο βακτήριο του γένους *Enterococcus spp.* και το *Bacillus toyoi* είναι αποτελεσματικά στο παθογόνο *Edwardsiella tarda* στην εκτροφή ευρωπαϊκών χελιών (Chang & Liu, 2002).

Το *Carnobacterium maltaromaticum* B26 και το *Carnobacterium divergens* B33 δρουν αποτελεσματικά στο ανοσοποιητικό σύστημα της ιριδίζουσας πέστροφας αντιμετωπίζοντας το *Aeromonas salmonicida* και *Yersinia ruckeri*. Και τα δύο προβιοτικά παραμένουν στο έντερο υποκινώντας τη χυμική και κυτταρική ανοσία. Αναλυτικότερα, το *Carnobacterium maltaromaticum* B26 αυξάνει τη φαγοκυτταρική

δραστηριότητα των μακροφάγων στο νεφρό, ενώ το *Carnobacterium divergens* B33 αυξάνει τα επίπεδα της λυσοζύμης (Kim & Austin, 2006).

Τα βακτήρια *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis*, *Carnobacterium sp.* έχει βρεθεί ότι βελτιώνουν τα ποσοστά της επιβίωσης της ιριδιζουσας πέστροφας μετά από την επαφή με το *A. salmonicida* και ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό συστήματα της αυξάνοντας τον αριθμό των ερυθροκυττάρων, των μακροφάγων κυττάρων, λεμφοκυττάρων, των λευκών αιμοσφαιρίων και της λυσοζύμης (Irianto & Austin, 2002).

Το βακτήριο *Aeromonas sobria* GC2 έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί την έμφυτη ανοσία της ιριδιζουσας πέστροφας καθώς αυξάνει τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και παρεμποδίζει τα παθογόνα βακτήρια *Lactococcus garvieae* (*lactococcosis*) και *Streptococcus iniae* (*streptococcosis*) (Brunt & Austin, 2005).

Τα βακτήρια *Lactococcus garvieae* 29-99 και *Streptococcus iniae* αντιμετωπίζουν τις μολύνσεις που προκαλούνται από τα παθογόνα *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* και *Yersinia ruckeri* στην ιριδιζουσα πέστροφα υποκινώντας την έμφυτη ανοσία (Brunt *et al.*, 2007).

Ο *Lactococcus lactis* AR21 εμποδίζει τη δράση του παθογόνου *V. anguillarum* στην εκτροφή του *Brachionus plicatilis* (Harzevili *et al.*, 1999). Η ομάδα των γαλακτοβάκκων όπως το *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactobacillus sakei* και *Leuconostoc mesenteroides* ενεργοποιούν τη χυμική ανοσία της καφέ πέστροφας. Η δραστηριότητα του συμπληρώματος και τα επίπεδα της ανοσοσφαιρίνης αυξάνονται ενώ το *Lc. lactis lactis* και το *Lc. mesenteroides* βελτιώνουν και τη δραστηριότητα της λυσοζύμης (Balcázar *et al.*, 2007).

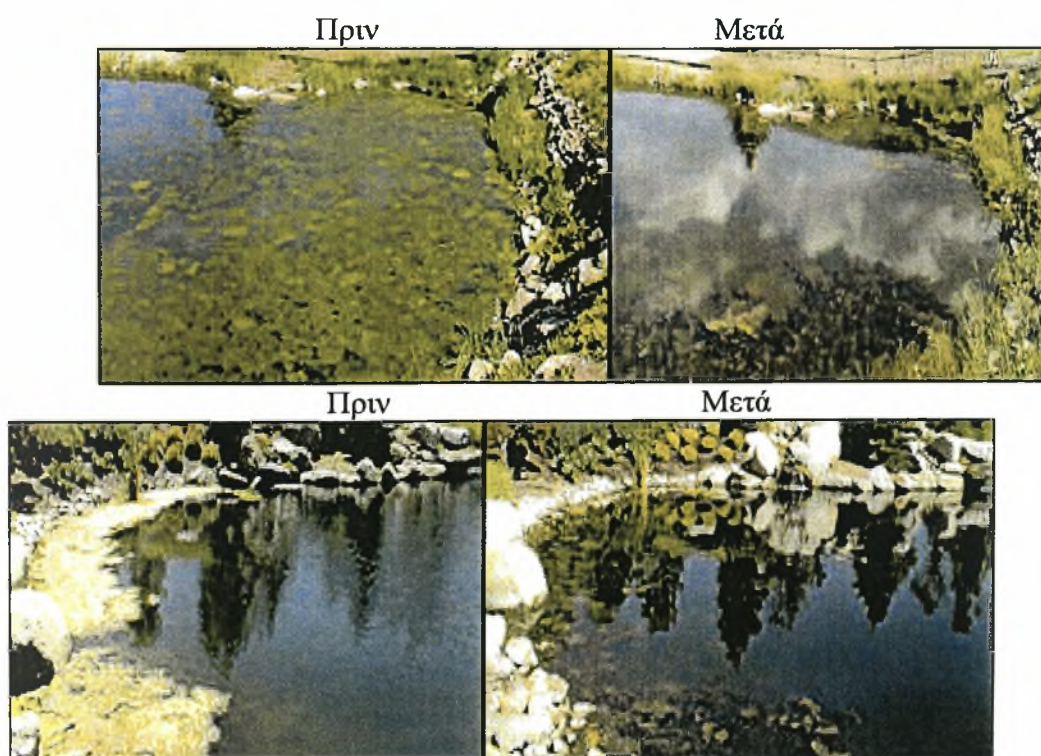
Το παθογόνο *Vibrio anguillarum* μπορεί να καταπολεμηθεί από το *Pseudomonas fluorescens* AH2 το οποίο αποτελεί μέρος της μικροχλωρίδας των βραγχίων, του δέρματος και του εντέρου της ιριδίζουσας πέστροφας (Gram *et al.*, 1999).

Τα βακτήρια Pdp11 και 51M6 από την οικογένεια Vibrionaceae έχει βρεθεί ότι ενισχύουν την έμφυτη ανοσία της τσιπούρας. Παράδοξο είναι το γεγονός ότι τα Pdp11 και 51M6 καθώς ανήκουν στην ίδια οικογένεια φαίνονται να έχουν μάλλον διαφορετικά ανοσοδιεργετικά αποτελέσματά, με το 51M6 να έχει ευεργετικό αντίκρισμα περισσότερο στην κυτταροτοξική δραστηριότητα και το Pdp11 να ενεργοποιεί τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα (υψηλά επίπεδα λευκών αιμοσφαιρινών). Τα παραπάνω προβιοτικά έχουν την ικανότητα να εναντιώνονται στο παθογόνο *Photobacterium damsela* sp. *piscicida* (Diaz-Rosales *et al.*, 2006).

#### **5.7. Τα προβιοτικά στο υδρόβιο περιβάλλον των εκτρεφόμενων οργανισμών**

Σχεδόν όλες οι έρευνες διαπίστωσαν ότι τα προβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν δεν έχουν θετικά αποτελέσματα μόνο στη υγεία των εκτρεφόμενων οργανισμών αλλά και στο υδρόβιο περιβάλλον στο οποίο εκτρέφονται. Καθώς οι οργανισμοί μεγαλώνουν, ο μεταβολισμός τους αλλά και η ενεργειακή τους ανάγκη μεγαλώνει, με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα μεταβολικά προϊόντα τους αλλά και μέρος της τροφής που δεν καταναλώνεται να βρίσκεται στο υδάτινο περιβάλλον. Μια ομάδα οργανισμών όπως *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Nitrosomonas*, *Cellulomonas*, *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodoseudomonas*, *Nitrosomonas* και *Acinetobacter* είναι ικανά να αντιμετωπίσουν παθογόνους μικροοργανισμούς αλλά και να συμβάλλουν στην καλή ποιότητα των υδάτων (Matias *et al.*, 2002).

Αναμφισβήτητα, τα αποτελέσματα των προβιοτικών στο νερό εκτροφής δε μπορούν να συγκριθούν με τα αποτελέσματα μέσω της τροφής στους οργανισμούς. Έχουν χαρακτηριστεί ως βιολογικοί «βελτιωτές» της ποιότητας του νερού καθώς μειώνουν την συγκέντρωση της οργανικής ύλης και της αμμωνίας (Εικόνα 5), όπως τα βακτηριακά είδη που ανήκουν στα γένη *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Acinetobacter* και *Cellulomonas*. Ιδιαίτερα, ο *Bacillus* spp. συμβάλλει στην ρύθμιση της ποιότητας νερού και μειώνει τον πληθυσμό των παθογόνων *Vibrios* (Farzanfar, 2006) και στη βελτίωση της διαφάνειας του νερού (Wang *et al.*, 2005).



Εικόνα 5. Βιοθεραπεία των λιμνών (Song & Huang, 2000).

## 6. ΤΑ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ

### 6.1. Τα προβιοτικά και η χρήση τους

Ο όρος «πρεβιοτικά» χρησιμοποιήθηκε από τους Gibson & Roberfroid (1995), που άλλαξαν το πρόθεμα «προ» σε «πρε», που σημαίνει «πριν» σε «για». Τα



πρεβιοτικά ορίζονται ως δυσαπορρόφητα συστατικά των τροφίμων, που επιδρούν ευεργετικά στον οργανισμό και έχουν ως στόχο την ανάπτυξη και την αύξηση της δραστηριότητας ενός ή ορισμένων ειδών βακτηρίων στο έντερο, με απώτερο σκοπό τη βελτίωση και ενδυνάμωση της υγείας του ξενιστή τους (Gibson *et al.*, 2005). Άρα, πρεβιοτικά ή αλλιώς πρεβιοτικές ίνες αποκαλούν τα άπεπτα συστατικά της τροφής που δρουν ευεργετικά για τον οργανισμό, ενεργοποιώντας την ανάπτυξη ή/και τη δραστηριότητα ενός ή περισσότερων βακτηριακών στελεχών που αποικίζουν το έντερο. Δηλαδή τα πρεβιοτικά διαπερνούν ανέπαφα στο έντερο του καταναλωτή και βοηθούν τη δραστηριότητα συγκεκριμένων ευεργετικών βακτηρίων, τα προβιοτικά.

Η διαφορά ανάμεσα στα πρεβιοτικά και τις διαιτητικές ίνες είναι ότι οι τελευταίες χρησιμοποιούνται από συγκεκριμένα ευεργετικά βακτήρια όπως των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, ως τροφή για την επιλεκτική ανάπτυξή τους.

Τα κυριότερα πρεβιοτικά είναι οι μη πεπτόμενες-φρουκτάνες από τις οποίες σημαντικότερες είναι οι φρουκτάνες τύπου ινουλίνης που περιλαμβάνουν τη φυσική ινουλίνη, την ενζυμικά υδρολυμένη ινουλίνη, την ολιγοφρουκτόζη και συνθετικά φρουκτοολισακχαρίδια. Γενικά, γνωρίζουμε ότι οι φρουκτάνες επιδρούν θετικά σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η συμμετοχή τους στη μείωση του κινδύνου για τις εντερικές μολυσματικές ασθένειες. Επίσης, οι μονοσακχαρίτες που βρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων (MOS), οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (GOS), οι μη-πεπτόμενοι ολιγοσακχαρίτες σόγιας και οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (FOS) βελτιώνουν την πεπτικότητα και υποστηρίζουν επάξια τη γαστρεντερική υγεία του ζωικού οργανισμού. Η διατροφή με τη χρήση πρεβιοτικών εμποδίζει την επικάθηση ή διείσδυση των βακτηρίων της *Salmonella spp*, των βακτηρίων του γένους *Clostridia*,

*Staphylococcus* και της *E. coli* στον εντερικό βλεννογόνο, αποκλίνοντας την απελευθέρωση των βλαβερών τοξινών τους (Πιτσιλαδή, 2005, Koufos *et al.*, 2007).

Παράλληλα, τα πρεβιοτικά προστατεύουν τον οργανισμό από τη δράση των μικροβίων λειτουργώντας ως επιλεκτικοί δεσμοί προσκόλλησης στα κύτταρα του εντέρου, δρώντας κατά των παθογόνων βακτηρίων.

Ειδικότερα, οι μη αμυλούχοι πολυσακχαρίτες υπόκεινται σε αναερόβια ζύμωση υπό την επίδραση βακτηριακών στελεχών στο έντερο, με αποτέλεσμα την παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων που υποβοηθούν τον έλεγχο του pH, τον αποκλεισμό παθογόνων βακτηρίων, την απορρόφηση του ασβεστίου (Ca) και σιδήρου (Fe) με ευμενή αποτελέσματα στην υγεία των οστών, τον πολλαπλασιασμό των ερυθρών κυττάρων μειώνοντας τις πιθανότητες παθογένειας (Tuohy *et al.*, 2003).

Τα πρεβιοτικά βρίσκονται ως φυσικά στοιχεία στα φρούτα, στα λαχανικά και τα δημητριακά (όπως το ραδίκι, το κρεμμύδι, το σκόρδο, τα δημητριακά ολικής άλεσης, η μπανάνα ή η σόγια).

## **6.2. Η διαφορά των πρεβιοτικών από τα προβιοτικά**

Πολλές φορές γίνεται λόγος για τη διαφορά ανάμεσα στα προβιοτικά και πρεβιοτικά προϊόντα και γεννάται το ερώτημα, ποιο από τα δύο να προτιμάτε. Η βασική διαφορά των προβιοτικών από τα πρεβιοτικά είναι ότι τα πρεβιοτικά δεν περιέχουν τους ίδιους τους ευεργετικούς μικροοργανισμούς/βακτήρια, αλλά συστατικά τα οποία ουσιαστικά τρέφουν και βοηθούν την ανάπτυξη και διατήρηση των ήδη υπαρχόντων ευεργετικών βακτηρίων της εντερικής μικροχλωρίδας.

Τα πρεβιοτικά προϊόντα έχουν αντίστοιχες δράσεις με τα προβιοτικά, ωστόσο όχι στον ίδιο βαθμό και με την ίδια αμεσότητα. Κι αυτό καθώς, τα πρεβιοτικά δρουν έμμεσα, ενισχύοντας ουσιαστικά την συγκέντρωση των προβιοτικών. Έτσι τα προβιοτικά των τροφίμων πρέπει να είναι ικανά να περάσουν αλώβητα από το όξινο

περιβάλλον του στομάχου και από τη συνάντησή τους με τα χολικά οξέα, να προσκολληθούν στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και να παραγάγουν αντιμικροβιακές ουσίες που θα ανταγωνιστούν τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι ικανότητες αυτές ενισχύονται από κάποια συστατικά ορισμένων τροφών, που είναι τα γνωστά πρεβιοτικά.

Τα πρεβιοτικά, όπως η ινουλίνη, οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες και οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες, δε διασπώνται επαρκώς στο ανώτερο πεπτικό και φτάνουν σχεδόν άπεπτα στο έντερο. Εκεί αποτελούν θρεπτικό υλικό για τα προβιοτικά, βοηθώντας στον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό ενός ή περισσότερων ειδών αλλά και στην αύξηση της δραστηριότητάς τους. Και τα δύο έχουν σημαντική επίδραση στην καλή λειτουργία του γαστρεντερικού, του ανοσοποιητικού και την εν γένει καλή υγεία του οργανισμού. Ωστόσο, τα προβιοτικά προϊόντα δρουν άμεσα, παρέχοντας τα συστατικά εκείνα που προστατεύουν, ενώ τα πρεβιοτικά δρουν έμμεσα ενισχύοντας τα ήδη υπάρχοντα προστατευτικά συστατικά. Κατά συνέπεια, δεν είναι εύκολο να ενισχύσεις μια «ελαττωματική εντερική μικροχλωρίδα» με πρεβιοτικά, αν πρώτα δεν την αποκαταστήσεις με προβιοτικά.

### **6.3. Η δράση των πρεβιοτικών**

Για να κατηγοριοποιηθεί ένα συστατικό της τροφής ως πρεβιοτική ίνα ή πρεβιοτικό θα πρέπει:

1. Να μην υδρολύεται ή απορροφάται στο ανώτερο τμήμα της γαστρεντερικής οδού
2. Να αποτελεί υπόστρωμα για έναν ή περιορισμένο αριθμό πιθανών ευεργετικών βακτηρίων στο έντερο ενεργοποιώντας την ανάπτυξή τους

3. Να έχει τη δυνατότητα να εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων βακτηρίων, εξισορροπώντας τη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας και ασκώντας προστατευτική δράση στο έντερο

Ορισμένοι μη αφομοιώσιμοι ολιγοσακχαρίτες (υδατάνθρακες με μικρή αλυσίδα ανθράκων που δεν αφομοιώνονται στο έντερο και φτάνουν αναλλοίωτοι) είναι οι:

- Φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες και ινουλίνη
- trans-γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες
- Ξυλιτο-ολιγοσακχαρίτες
- Μαννο-ολιγοσακχαρίτες
- Λακτουλόζη

Στα τελικά πρεβιοτικά προϊόντα της ζύμωσης στο έντερο, περιλαμβάνονται τα λιπαρά οξέα όπως, το οξικό, το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ. Το βουτυρικό οξύ χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας για τα κύτταρα του εντέρου. Το προπιονικό οξύ παρεμποδίζει τη διαδικασία σύνθεσης της χοληστερόλης και ίσως αυτός είναι ο λόγος που τα πρεβιοτικά συνδέονται με τη μείωσή των επιπέδων της στο αίμα. Ενώ, το προπιονικό οξύ βοηθά στη βελτίωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα.

Τα πρεβιοτικά προϊόντα που περιέχουν φρουκτολιγοσακχαρίτες βοηθούν στην απορρόφηση και στη ρύθμιση της αναπλήρωσης του ασβεστίου και του μαγνησίου στα κύτταρα του εντερικού τοιχώματος. Οι ολιγοσακχαρίτες (δηλαδή ζάχαρες που αποτελούνται από δύο μέχρι 20 μονάδες σακχαριτών, μικρότερης αλυσίδας από τους πολυσακχαρίτες) ενισχύουν την απορρόφηση του ασβεστίου και του μαγνησίου, συμβάλλοντας έτσι στην πρόληψη της οστεοπενίας. Η κατανάλωση πρεβιοτικών ινών αυξάνει τον όγκο των κοπράνων και βελτιώνει την κινητικότητα του εντέρου, καθώς πολλοί υδατάνθρακες αυξάνουν το υδατικό περιεχόμενο του εντέρου και τα

παραγόμενα οξέα προκαλούν αύξηση της κινητικότητας του (Manning & Gibson, 2004).

Τα πλεονεκτήματα των πρεβιοτικών αποτελούνται από:

- τη μείωση του εντερικού pH
- την αποκατάσταση της βακτηριακής ισορροπίας του εντέρου
- την επίδραση και ενδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος
- και τη βελτίωση της εντερικής χλωρίδας στα πρώτα στάδια ενός οργανισμού.

Αναλυτικότερα:

- Η μείωση του εντερικού pH:

Η επίδραση αυτή οφείλεται στην αλλαγή του μεταβολισμού λόγω της διαδικασίας της ζύμωσης των πρωτεϊνών (που οδηγεί στην παραγωγή αμμωνίας και υψηλού pH) και σε πιο εκτεταμένη ζύμωση των υδατανθράκων (που οδηγεί στην παραγωγή οξέος). Αρκετές παθολογικές καταστάσεις του εντέρου χαρακτηρίζονται από υψηλό pH. Το χαμηλό εντερικό pH αυξάνει την κινητικότητα του εντέρου και μπορεί να παρέχει προστασία ενάντια σε παθογόνα βακτήρια. Τα καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται με τη γρήγορη ζύμωση μειγμάτων υδατανθράκων, που στηρίζονται σε αλλαγή του μεταβολισμού (περισσότεροι υδατάνθρακες) και όχι στη διέγερση συγκεκριμένων βακτηρίων.

- Αποκατάσταση της βακτηριακής ισορροπίας του εντέρου:

Τα πρεβιοτικά μπορούν να αποκαταστήσουν την ισορροπία του εντέρου μετά από μία παθολογική διαταραχή που μπορεί να οφείλεται σε φαρμακευτικά προϊόντα όπως τα αντιβιοτικά ή από μια έντονη κατάσταση «stress» (Bricknell *et al.*, 1999). Αρχικά τα πρεβιοτικά δρουν επιλεκτικά με μια συγκεκριμένη ομάδα βακτηρίων για την επαναφορά της ισορροπίας του εντέρου. Έπειτα, ακολουθεί άμεση διέγερση (τα

επιλεγμένα βακτήρια αναπτύσσονται μέσω των πρεβιοτικών) ή με την έμμεση διέγερση (τα βακτήρια δημιουργούν ένα ευνοϊκό περιβάλλον για άλλα βακτήρια).

- Επίδραση και ενδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος:

Τα πρεβιοτικά, αυτά καθ' αυτά, δεν έχουν άμεση επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα. Ωστόσο, με την αλλαγή που επιφέρουν στην εντερική μικροχλωρίδα, το ανοσοποιητικό σύστημα είναι δυνατό να επηρεαστεί. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες πάνω στην επίδραση της εντερικής μικροχλωρίδας στο ανοσοποιητικό σύστημα, ωστόσο προς το παρόν δεν έχουν γνωστοποιηθεί οι πρεβιοτικές ουσίες που να επιδρούν κατευθείαν στο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος μπορούν να υποκινήσουν τους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος με την αυξημένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και το ανυψωμένο ανοσολογικό μόριο, IgA. Η εισαγωγή αυτή των ευεργετικών βακτηρίων είναι τα γνωστά προβιοτικά. Δεδομένου όμως ότι τα πρεβιοτικά εξυπηρετούν τα βακτήρια αυτά, τα οποία βελτιώνουν τη σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντέρου, η εισαγωγή τους ενισχύει έμμεσα το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού (Manning & Gibson, 2004).

- Βελτίωση της εντερικής μικροχλωρίδας στα πρώτα στάδια ενός οργανισμού:

Η εντερική μικροχλωρίδα νεαρών ατόμων είναι πολύ ασταθής και η γαστρεντερική περιοχή όπως και άλλα όργανα του σώματος δεν έχουν αναπτυχθεί πλήρως. Έτσι, πολλά ευκαιριακά παθογόνα βακτήρια μπορούν να διαταράξουν την εντερική μικροχλωρίδα των μικρών οργανισμών, που είναι ιδιαίτερα ευπαθείς και ευάλωτοι, καθώς δεν έχουν καλά ανεπτυγμένους μηχανισμούς αυτοάμυνας. Κατά συνέπεια, ουσίες που σταθεροποιούν την μικροχλωρίδα, όπως είναι οι ολιγοσακχαρίτες που μειώνουν το pH του εντέρου, είναι πολύ χρήσιμες.

### **6.3.1. Τα πρεβιοτικά του εμπορίου**

Τα περισσότερα από τα πρεβιοτικά του εμπορίου είναι ολιγοσακχαρίτες και διαιτητικές ίνες. Επιλεγμένοι μη αφομοιώσιμοι ολιγοσακχαρίτες αυξάνουν την ζύμωση των υδατανθράκων και αποδεικνύονται ιδιαίτερα αποτελεσματικοί. Εντούτοις, θα πρέπει να έχουμε υπόψη μας ότι δεν έχουν όλοι οι ολιγοσακχαρίτες ευεργετική επίδραση. Προς το παρόν, δεν υπάρχουν ολιγοσακχαρίτες που να διεγείρουν επιλεκτικά μία συγκεκριμένη ομάδα βακτηρίων. Επομένως, όλοι οι ολιγοσακχαρίτες εφόσον είναι δραστικοί, ενεργούν μέσω της αλλαγής του μεταβολισμού και όχι μέσω της επιλεκτικής διέγερσης μίας συγκεκριμένης βακτηριακής ομάδας. Αρνητικά συμπτώματα που μπορούν να παρατηρηθούν είναι το έντονο πρήξιμο στη γαστρεντερική περιοχή λόγω των αερίων που δημιουργούνται κατά τη ζύμωση υδατανθράκων. Οι παρενέργειες αυτές εξαρτώνται κυρίως από το είδος του ολιγοσακχαρίτη αλλά και από την ανεκτικότητα του οργανισμού.

### **6.4. Τα συμβιωτικά ή ευβιωτικά**

Τα συμβιωτικά προϊόντα είναι μία κατηγορία τροφίμων που περιέχουν ένα μείγμα προβιοτικών και πρεβιοτικών συστατικών, τα οποία ωφελούν τον οργανισμό και ενισχύουν την επιβίωση των ευεργετικών μικροοργανισμών (προβιοτικά), αλλά και την εγκατάσταση των μικροβιακών προσθέτων της τροφής που χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα (πρεβιοτικά) στο έντερο. Στόχος των συμβιωτικών τροφών είναι η συνεργατική αλληλεπίδραση προβιοτικών και πρεβιοτικών, ώστε να ενισχυθεί περαιτέρω η προσπάθεια εγκατάστασης των μικροβιακών προσθέτων της τροφής στον πεπτικό σωλήνα αλλά και η επιβίωσή τους. Ο όρος αυτός θα πρέπει να διατηρείται για προϊόντα στα οποία το πρεβιοτικό υποστηρίζει επιλεκτικά το συγκεκριμένο προβιοτικό (Sink & Lochmann, 2008).

Πολλοί επιστήμονες πιστεύουν ότι τα συμβιωτικά έχουν καλύτερα αποτελέσματα από τη μεμονωμένη χρήση των προβιοτικών ή των πρεβιοτικών συστατικών σε ένα τρόφιμο. Ένα μίγμα, γαλακτο-ολισακχαριτών και φρουκτολολισακχαριτών, αύξησε την επιβίωση των γαλακτοβακίλλων, τα οποία ανταγωνίστηκαν τα παθογόνα βακτήρια. Η παρέμβαση αυτή επέφερε πτωτικές τιμές στο pH του εντέρου με αποτέλεσμα την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (Fanaro *et al.*, 2005).

Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τα πρεβιοτικά για να διευκρινιστούν οι μηχανισμοί και τα όποια οφέλη τους. Στη σημερινή κτηνιατρική ορολογία, η χρήση του FOS με ευεργετικά βακτήρια καθώς και της λακτιτόλης με τους γαλακτοβάκιλλους, ονομάζονται ευβιωτικά και αποτελούν την πλέον διαδεδομένη και σύγχρονη διαιτητική μέθοδο που χρησιμοποιείται για τη μεταβολή της εντερικής μικροχλωρίδας. Τα ευβιωτικά προστίθενται στα τρόφιμα ή κυκλοφορούν ως φαρμακευτικά σκευάσματα που ανήκουν στη φυσιολογική μικροχλωρίδα και προφυλάσσουν ή δρουν θεραπευτικά σε ποικίλα νοσήματα (Roberfroid, 2006).

#### **6.5. Τα πρεβιοτικά ως ανοσοενισχυτικά στις υδατοκαλλιέργειες**

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα έντονο ενδιαφέρον για τη χρήση των ανοσοενισχυτικών στις υδατοκαλλιέργειες. Μια προσέγγιση που αποσκοπεί στη μείωση της ευαισθησίας των ασθενειών στους εκτρεφόμενους ιχθύς είναι και η χρήση των πρεβιοτικών, τα οποία διαπερνούν ακέραια την γαστρεντερική περιοχή, όπου μερικά βακτήρια μπορούν να τα χρησιμοποιήσουν και να τα αξιοποιήσουν ως πηγή ενέργειας κατά τη διεργασία της ζύμωσης (Barker, 2000).

Έχει αποδειχθεί ότι η επίδραση των πρεβιοτικών στην μικροχλωρίδα του εντέρου παίζει σημαντικό ρόλο σε πολυάριθμες βιολογικές διαδικασίες όπως είναι η



αύξηση, η πέψη, η ειδική ή μη ανοσία και η ανθεκτικότητα σε ασθένειες. Όπως αναφερθήκαμε και παραπάνω το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών αποτελείται από την ειδική ή μη ανοσία. Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από τα φυσικά εμπόδια όπως είναι η βλέννα, τα βράγχια και η επιδερμίδα όπου τα ανοσοκύτταρα συμπεριλαμβανομένου των φαγοκυττάρων, των μακροφάγων, των μη κυτταροτοξικών κυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και μια ευρεία άλλων παραγόντων όπως η τρανσαιρίνη, η λυσοζύμη (βασική βακτηριολυτική πρωτεΐνη) το συμπλήρωμα, οι ανασταλτικοί παράγοντες των πρωτεάσεων, τα φυσικά αντισώματα, οι λεκτίνες, οι κυτοκίνες και τα αντιμικροβιακά πεπτίδια (Bucki *et al.*, 2007). Ενώ, η ειδική ανοσία όπου εξαρτάται από τις δραστηριότητες των T και B λεμφοκυττάρων συμβάλουν στην παραγωγή των ανοσοσφαιρινών και των κυτοκινών (Li, 2005).

Ο επίμονος στόχος για μεγιστοποίηση και ενδυνάμωση της βέλτιστης αποδοτικότητας των υδατοκαλλιεργειών έχουν κάνει τις υδατοπαραγωγές ευαίσθητες στις ασθένειες λόγω της μόλυνσης και επιβάρυνσης της ποιότητας του νερού αλλά και του ολοένα αυξανόμενου «stress» των ιχθύων. Οι βακτηριακές μολύνσεις συχνά έχουν αρνητικές επιπτώσεις στους εκτρεφόμενους υδρόβιους οργανισμούς και παρατηρείται μια βαθμιαία υποβάθμιση του ανοσοποιητικού τους συστήματος, όπου μέχρι και σήμερα αντιμετωπίζονται με την χρήση των αντιβιοτικών.

Εντούτοις, τα αντιβιοτικά στην υδρόβια διαχείριση έχουν επικριθεί για την ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηρίων αλλά και της καταστροφής της φυσικής περιβαλλοντικής μικροβιακής χλωρίδας. Ορισμένα αντιβιοτικά έχουν αποδειχθεί ότι είναι ικανά να καταστείλουν το ανοσοποιητικό σύστημα και αυστηροί κανονισμοί έχουν κάνει την εμφάνιση τους στην Ευρώπη και στις Ηνωμένες Πολιτείες για την απαγόρευση τους στις υδατοκαλλιέργειες στρέφοντας το ενδιαφέρον τους στην ανάπτυξη εναλλακτικών στρατηγικών ως προς τον έλεγχο των ασθενειών.

Τα πλεονεκτήματα των προβιοτικών έχουν στρέψει το ενδιαφέρον των επιστημόνων για την άμεση αξιολόγηση των πρεβιοτικών. Μερικά από τα πιο κοινά πρεβιοτικά που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες είναι οι φρουκτο-ολισακχαρίτες (FOS), οι γαλακτο-ολισακχαρίτες (TOS) και η ινουλίνη (Li, 2005).

Εντούτοις, αυτή τη στιγμή η εφαρμογή των πρεβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες έχει περιορισμένη χρήση. Η πρώτη *in vitro* δοκιμή πρεβιοτικών που πραγματοποιήθηκε στο είδος *Sciaenops ocellatus*, έχει δείξει ότι το ποσοστό των 0,375% FOS βελτιώνει τη μικροχλωρίδα του εντέρου του. Επίσης, η χορήγηση του FOS ενισχύει τα λεφμοκύτταρα και ενεργοποιεί το μη ειδικό ανοσοποιητικό σύστημα του *Litopenaeus vannamei*.

Ένα μίγμα μυκήτων, γαλακτοκομικών συστατικών και αποξηραμένων προϊόντα ζυμώσεως (GroBiotic-A) έχει αποδειχθεί ότι ενισχύσει την αντίσταση σε διάφορα παθογόνα βακτήρια των υβριδίων πέρκας (Li & Gatlin 2004, 2005), της ιριδίτσουσας πέστροφας (Sealey & Gatlin, 1999) και του χρυσόψαρου βελτιώνοντας την επιβίωση του *L. vannamei* που εκτρέφονταν σε συνθήκες χαμηλής αλατότητας.

Οι πρόσφατες *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι το GroBiotic-A με το FOS είναι τα πιο ευεργετικά πρεβιοτικά στην εκτροφή των υδρόβιων οργανισμών καθώς συμβάλουν στη μέγιστη πεπτικότητα των πρωτεϊνών και της οργανικής ουσίας έναντι του ολιγοσακχαριτών της μαννόζης και των γαλακτοολισακχαριτών. Η συμπλήρωση τους στη διατροφή αύξησε τη συγκέντρωση της γλυκόζης και της βιολογικής διαθεσιμότητας των ιχνοστοιχείων (Gatlin III *et al.*, 2006).

Τα δύο εμπορικά πρεβιοτικά Grobiotic™ AE (1 ή 2%) και το Brewtech® (μαγιά μύρας) έχει αποδειχθεί ότι προστιθέμενα στη διατροφή του υβριδίου πέρκας (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) και βοηθούν στην ανάπτυξη και στο μεταβολισμό των προβιοτικών, ενώ ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα αυξάνοντας τη

παραγωγή των φαγοκυττάρων και μακροφάγων του κεντρικού νεφρού στην περίπτωση μόλυνσης από το παθογόνο *Streptococcus iniae* και αυξάνοντας το ποσοστό επιβίωσης (Li *et al.*, 2003, 2004).

Η μαγιά μύρας (*Saccharomyces cerevisiae*) είναι ένα φυσικό προϊόν το οποίο περιέχει ανοσολογικές ουσίες όπως είναι η β-glucans, τα νουκλεϊνικά οξέα και οι ολιγοσακχαρίτες της μαννόζης. Βακτήρια όπως οι γαλακτοβάκιλλοι και τα *Bifidobacter* spp. βοηθούνται από τα πρεβιοτικά με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η εμφάνιση ασθενειών που δημιουργούνται από την *Salmonella*, *Listeria* και *E.coli* (Ortuño *et al.*, 2002).

Η μαγιά μύρας (πηγή νουκλεϊνικών οξέων και πολυσακχαριτών συμπεριλαμβανομένων β-1,3-glucans) ως συμπλήρωμα στη διατροφή της υβριδικής ριγωτής πέρκας αντί της κυτταρίνης, προσφέρει αντίσταση στο *Streptococcus iniae*. Τα ψάρια με τη μαγιά, αύξησαν το βάρος, βελτιώνουν το συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής, αυξάνουν τα επίπεδα του αιματοκρίτη και της λυσοζύμης, ενώ αυξάνουν και τα φαγοκυτταρικά, εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά μακροφάγα στο κεντρικό νεφρό (Li & Gatlin, 2003). Η μαγιά μύρας επηρεάζει θετικά την κυτταρική έμφυτη ανοσία της τσιπούρας καθώς ενεργοποιεί το συμπλήρωμα, τη φαγοκυττάρωση και τη φυσική κυτταροτοξίνη των λευκοκυττάρων στο κεντρικό νεφρό (μια ουσία που είναι τοξική για τα κύτταρα και είναι ικανή να τα βλάψει ή να τα καταστρέψει) (Ortuno *et al.*, 2002, 2005).

Επίσης η μαγιά μύρας παρέχει προστασία στα άτομα του *Crysoleucas notemigonus* από το *Flavobacterium columnare* (Sink & Lochmann, 2008).

Τα ολιγονουκλεοτίδια του εμπορικού πρεβιοτικού, Ascogen P<sup>®</sup> το οποίο περιέχει τη μαγιά μύρας έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα του υβριδίου πέρκας αυξάνοντας τα ποσοστά των φαγοκυττάρων και των αντισωμάτων

κατά τη μόλυνση που προκλήθηκε από το *Streptococcus iniae* μειώνοντας το ποσοστό θνησιμότητας (Li *et al.*, 2004).

Σε μια *in vitro* σύγκριση ανάμεσα στο 2% του GroBiotic®-A, στο 2% της μαγιάς μύρας και στο 2% του FOS βρέθηκε ότι τα εμπορικό GroBiotic®-A και η μαγιά μύρας άλλαξαν τη μικροχλωρίδα της γαστρεντερικής περιοχή του *S. ocellatus* (Burr *et al.*, 2008).

Ο συνδυασμός των δύο πρεβιοτικών GroBiotic®-A (2%) και της μαγιάς μύρας (2%) θεωρείται ισχυρά ανοσοενισχυτικός και ικανός να αντικαταστήσει τα αντιβιοτικά. Ο παραπάνω συνδυασμός ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα των υβριδίων πέρκας αυξάνοντας τα ποσοστά επιβίωσης από τον παθογόνο μικροοργανισμό *Mycobacterium marinum* (Li & Gatlin, 2005).

Έχει βρεθεί επίσης ότι η λακτόζη συμβάλλει στην αύξηση του πάχους του εντερικού ιστού στο φαγκρί (*Pagrus major*) όχι όμως του κυπρίνου (*L. rohita*) και της πέστροφας (Kihara *et al.*, 1995, 2001a,b).

Η συμπλήρωση της τροφής με ολιγοσακχαρίτες της μαννόζης (MOS), φρουκτολισακχαρίτες (FOS) και γαλακτολιγοσακχαρίτες (GOS) σε ένα επίπεδο των 10 g kg<sup>-1</sup> στην βασική διατροφή έχει βρεθεί ότι ενεργοποιούν τους ανοσολογικούς παράγοντες του ατλαντικό σολομό (Grisdale-Helland *et al.*, 2008).

Η συμπλήρωση της ινουλίνης 2% αλλάζει σημαντικά τη μικροχλωρίδα της γαστρεντερικής περιοχής αυξάνοντας τον *Bacillus spp* κατά 14% και μειώνοντας το ποσοστό των *Vibriosis* στις προνύμφες του *Psetta maxima* (Mahious, 2006).

Το βακτηριακό φορτίο στη γαστρεντερική περιοχή ενός ιχθυδίου όπως του *P. maxima* είναι ιδιαίτερα μεταβλητό όσον αφορά τα είδη *Vibrio* L2C55, *V. ordalii* 6.30, *Vibrio* sp. S12411 και *Vibrio* sp. Csur-1 το οποίο βρίσκεται σε ποσοστό 96%. Η επίδραση των πρεβιοτικών, όπως η ινουλίνη (2%), η ολιγοφρουκτόζη (2%) και η

λακτοσακχαρόζη (2%) έχει βρεθεί ότι βοηθούν στην ανάπτυξη του *Bacillus* sp. και εμποδίζουν την αύξηση του *Vibrio anguillarum* στο ιχθύδιο του *P. maxima* (Mahious *et al.*, 2006).

Σε αντίθεση με τα ελπιδοφόρα μηνύματα των πρεβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες έχει βρεθεί ότι η ινουλίνη μπορεί να μειώσει το βακτηριακό πληθυσμό προκαλώντας αρνητικά αποτελέσματα στο *Salvelinus alpinus* L. (Ringø *et al.*, 2006).

#### **6.6. Τα συμβιωτικά στις υδατοκαλλιέργειες**

Τα συμβιωτικά έχουν οριστεί από τους από Gibson & Roberfroid (1995) ως ένα μίγμα προβιοτικών και πρεβιοτικών, το οποίο έχει ευεργετικές ενέργειες στην εκτροφή των οργανισμών. Κύριος σκοπός των συμβιωτικών είναι η βελτίωση της επιβίωσης, η επιλεκτική υποκίνηση της αύξησης, η γρήγορη εγκατάσταση ή /και η ενεργοποίηση του μεταβολισμού ενός ή πολλών ευεργετικών βακτηρίων (των προβιοτικών) στη γαστρεντερική περιοχή, για τη βελτίωση της υγείας των οργανισμών.

Η έννοια του συμβιωτικού είναι πολύ καινούργια στις υδατοκαλλιέργειες και η αξιολόγηση αυτών των προϊόντων δεν έχει γίνει μέχρι σήμερα στα υδρόβια είδη. Οι μελλοντικές έρευνες στόχο έχουν την πλήρη κατανόηση των αποτελεσμάτων των πρεβιοτικών ώστε μετέπειτα να προβούν στη εμπορική χρήση των συμβιωτικών για τη βελτίωση της μικροβιακής οικολογίας της γαστρεντερικής περιοχής, την ενίσχυση και ενδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος των υδρόβιων οργανισμών (Gatlin III *et al.*, 2006).

Στόχος των συμβιωτικών είναι η πρόληψη των ασθενειών ώστε τα ψάρια να φτάσουν το εμπορεύσιμο μέγεθος χωρίς τη χρήση χημικών φαρμάκων. Η εφαρμογή ενός εμπορικού συμβιωτικού βελτιώνει τη μικροχλωρίδα της γαστρεντερικής του

περιοχής, ενισχύει την αύξηση, την πέψη, την ανοσία, την ανθεκτικότητα στις ασθένειες και τη δραστηριότητα των ευεργετικών βακτηρίων *Lactobacillus* και *Bifidobacter* sp. στο έντερο των οστεϊχθύων, ενώ περιορίζει τα παθογόνα βακτήρια όπως τη *Salmonella*, *Listeria* και *Escherichia coli* (Burr *et al.*, 2008).

Η χρήση ενός μίγματος προβιοτικού, με τον *Bacillus subtilis* και του πρεβιοτικού Biogen<sup>®</sup>, στο οποίο εμπεριέχονται και διάφορα άλλα πεπτικά ένζυμα όπως η αμυλάση, πρωτεάση και λιπάση, αυξάνει τα επίπεδα της αύξησης, του συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής και βελτιώνει την πεπτικότητα της τροφής (Haroun *et al.*, 2006).

#### **6.7. Η χρήση των πρεβιοτικών για αντίσταση στις βακτηριακές μολύνσεις του γαστρεντερικού συστήματος και το μέλλον τους**

Ορισμένα παθογόνα βακτήρια είναι ικανά να περάσουν και να εγκατασταθούν στο έντερο, μέσω της τροφή ή του νερού και να προκαλέσουν παθολογικά προβλήματα στην εκτροφή ενός υδρόβιου οργανισμού. Η ανάγκη για τη ρύθμιση και μείωση του κινδύνου των εντερικών μολύνσεων είναι επιτακτική. Τα αντιβιοτικά είναι αποτελεσματικά για την παρεμπόδιση των παθογόνων οργανισμών, όμως η χρήση τους για την πρόληψη απαγορεύεται καθώς η συχνή χρήση τους μειώνει την αποτελεσματικότητά τους (Hong *et al.*, 2005).

Οι επιστήμονες του 20<sup>ου</sup> αιώνα βρήκαν ότι μερικά βακτήρια είναι προαγωγοί της καλής κατάστασης του εντέρου. Η ενίσχυση της δράσης και βελτίωσης των προβιοτικών γίνεται με τη χρήση των πρεβιοτικών. Η ενίσχυση των προβιοτικών είναι μεγίστης σημασίας καθώς συμβάλουν στην μείωση των εντερικών μολύνσεων με τα μεταβολικά τους προϊόντα, όπως είναι τα οξέα που εκκρίνονται μειώνοντας το pH του εντέρου σε ικανά επίπεδα. Μέσα σε αυτό το όξινο περιβάλλον τα παθογόνα βακτήρια αδρανοποιούνται. Η υποκίνηση της ανοσίας, ο ανταγωνισμός για τις

θρεπτικές ουσίες και ο αποκλεισμός των περιοχών προσκόλλησης στο επιθήλιο του εντέρου είναι κάποιοι από τους προστατευτικούς μηχανισμούς.

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στη χρήση των πρεβιοτικών καθώς η επιλογή τους πρέπει να είναι επιλεκτική μόνο για τα ευεργετικά βακτήρια (προβιοτικά) ώστε να λειτουργούν ως «κολλητικές ταινίες» για αυτά και ως «αντικολλητικές ταινίες» για τα παθογόνα βακτήρια, όπως *Escherichia coli* τύπου 1, *Salmonellae* και *Campylobacters*, τα οποία χρησιμοποιούν τους ολιγομονοσακχαρίτες και ολιγοσακχαρίτες ως πηγές ενέργειας για τη δράση τους.

Ένα από τα καλύτερα μελλοντικά πρεβιοτικά θεωρείται η ινουλίνη με τη φρουκτάνη τύπου Glu a1-2 [b fructans 1-2], ενώ ο *Lactobacillus* και *Bacillus* sp. θεωρούνται από τα καλύτερα προβιοτικά για τις υδατοκαλλιέργειες. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες κάθε βακτήριο προτιμά σε μέγιστο βαθμό κάποιο συγκεκριμένο πρεβιοτικό ως υπόστρωμα του για την ανάπτυξη και δράση του. Αναμφισβήτητα, ένα εμπορικό συμβιωτικό πρέπει να βελτιώσει τη μικροχλωρίδα του εντέρου και να ενισχύει την άμυνα του υδρόβιου οργανισμού με την πρεβιοτική του σύσταση να λειτουργεί ως δότης «ολιγοσακχαρίτης-δόλωμα» ενώ με την προβιοτική του σύσταση να λειτουργεί ως δέκτης (Gibson *et al.*, 2005).

## **7. ΒΟΤΑΝΑ-ΦΥΤΑ-ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ- ΦΥΚΗ**

### **7.1. Εισαγωγή**

Η φύση υπήρξε ανέκαθεν γενναϊόδωρη. Από αρχαιοτάτων χρόνων προσέφερε το πλουσιότερο και πολυτιμότερο φαρμακείο. Η αξία των βοτάνων και φυτών με θεραπευτικές ιδιότητες αναγνωρίστηκε και επιβεβαιώθηκε μέσα από την πρακτική εφαρμογή τους. Η χρήση τους για φαρμακευτικούς σκοπούς είναι τόσο παλιά όσο και

ο πολιτισμός. Ο πατέρας της Ιατρικής, ο Ιπποκράτης, κατέγραψε περίπου 400 είδη βοτάνων που η χρήση τους ήταν γνωστή κατά τον 5ο αιώνα π.Χ.

Η χρήση βοτάνων μπορεί να συμβάλει στην πρόληψη των ασθενειών, ενισχύοντας την άμυνα του οργανισμού, αλλά αυτό δεν είναι αρκετό εάν δεν υπάρχει μια ήδη ισορροπημένη διατροφή.

Οι δυνατότητες των βοτάνων για ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος είναι μια ακόμα περίπτωση, στην οποία οι παραδοσιακές γνώσεις επιβεβαιώνονται από τη σύγχρονη φαρμακολογία. Έρευνες αποδεικνύουν ότι ένας όλο και αυξανόμενος αριθμός βοτάνων έχει σημαντικές ανοσοποιητικές επιδράσεις. Κάποια βότανα ενεργοποιούν την ανοσία, αλλά τα περισσότερα θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ρυθμιστές της, αφού επιτρέπουν τις φυσικές αντιδράσεις του οργανισμού να λειτουργούν πιο αποτελεσματικά όταν αντιμετωπίζουν κάποιο κίνδυνο (Rao *et al.*, 2005).

Φυτικά εκχυλίσματα όπως του δενδρολίβανου, του θυμαριού, του φασκόμηλου, της ρίγανης έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Η προσθήκη β-γλουκανών και ολιγοσακχαριτών της μαννόζης και της φρουκτόζης σε σιτηρέσια σχετίζονται με την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απάντησης, την καλή κατάσταση του εντέρου, τη δέσμευση μυκοτοξινών, ενώ ιδιαίτερα οι β-γλουκάνες έχουν την ιδιότητα της μείωσης της χοληστερόλης στον ορό του αίματος. Τα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών και βοτάνων αποκτούν εξαιρετικό ενδιαφέρον στη διατροφή των ζώων, προσδίδοντας ευεργετικές ιδιότητες στα τελικά ζωοκομικά προϊόντα και παρέχοντας ασφαλέστερα και υγιεινότερα προϊόντα, κάτι το οποίο αποτελεί ζητούμενο στη σύγχρονη διατροφική αλυσίδα (Skoufos *et al.*, 2007).



Τα τελευταία χρόνια, στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχουν αρκετές δημοσιευμένες εργασίες για τη θεραπευτική χρήση των βοτάνων, αλλά ελάχιστες από αυτές αφορούν στη χρήση τους στην εκτροφή των υδρόβιων οργανισμών. Παρόλα αυτά, οι εργασίες αυτές που αφορούν τα σιτηρέσια των χερσαίων ζώων θα μπορούσαν να αποτελέσουν πειραματικό μοντέλο και για τα ψάρια.

## 7.2. Χρήση βοτάνων και αιθέριων ελαίων στις υδατοκαλλιέργειες

Τα εκχυλίσματα των φυτών *Viscum album*, *Urtica dioica* και *Zingiber officinale*, προστιθέμενα στην διατροφή σε ένα ποσοστό 2% του βάρους του σώματος παρουσιάζουν κάποια επίδραση στην έμφυτη ανοσία της ιριδιζουσας πέστροφας. Συγκεκριμένα, ενεργοποιήθηκε ο μηχανισμός της φαγοκυττάρωσης και της εξωτερικής οξειδωτικής δραστηριότητας των λευκοκυττάρων (Düğenci *et al.*, 2003).

Τα εκχυλίσματα των βοτάνων, *Ocimum sanctum* και *Withania somnifera* προστατεύουν τα νεαρά άτομα του *Epinephelus tauvina* από το παθογόνο βακτήριο *Vibrio harveyi*. Τα εκχυλίσματα των βοτάνων ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα αυξάνουν τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα, το συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής, μειώνοντας το ποσοστό θνησιμότητας (Sivaram *et al.*, 2004).

Το βότανο *Achyranthes aspera* Linn., είναι ευρέως διαθέσιμο και διανεμημένο σε όλη την Ινδία το οποίο έχει ευεργετικές ιδιότητες (πεπτικές, στομαχικές, διουρητικές, καταπραυντικές και αντιφλεγμονώδεις) και χρησιμοποιείται στον βήχα, στο άσθμα, στη βρογχίτιδα, στη δυσπεψία, στον κωλικό, στην υδρωπικία, σε οφθαλμολογικά προβλήματα, στον εμετό, σε δερματικές ασθένειες, στον κνησμό, σε προβλήματα των νεφρών και της ουροδόχου κύστης καθώς και σε καρδιακές παθήσεις. Ο σπόρος του βοτάνου αυτού έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό

(ειδική ή μη ανοσία) σύστημα του ινδικού κυπρίνου (*Catla catla*) ανυψώνοντας τα επίπεδα των ερυθρών αντισωμάτων και της γλοβουλίνης.

Το εκχύλισμα του φυτού *Catharanthus roseus* στη διατροφή του κυπρίνου ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό του σύστημα (Rao & Chakrabarti, 2005), ενώ τα εκχυλίσματα της αιθανόλης και του αιθέρα του φυτού, *Tinospora cordifolia* σε συγκέντρωση 8 mg/kg αυξάνουν τον αριθμό των αντισωμάτων, τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και προσφέρουν προστασία ενάντια στο *Aeromonas hydrophila* στην εκτροφή του *O. mossambicus*.

Η δραστηριότητα των βοτάνων για θεραπευτικούς σκοπούς, δεν παρουσιάζει πάντα τα αναμενόμενα θετικά αποτελέσματα. Υπάρχουν βότανα τα οποία μπορούν να γίνουν τοξικά για τα ψάρια, όπως είναι η φτέρη (*Filix mas*) ή μπορούν να επιφέρουν οξεία θανατηφόρο τοξικότητα, όπως το ανθελμινθικό *Aspidinolfilicin* (Filmaron). Επίσης, μπορεί να προκαλέσουν καρκίνωμα όπως το αιθέριο έλαιο του *Jerusalem oak* που χορηγήθηκε μέσω της τροφής στον αιγυπτιακό βάτραχο, *Bufo regularis*.

Η χρήση των εμπορικών βοτάνων πρέπει να δίνεται προσεκτικά και μετά από επιστημονική έρευνα. Η χορηγούμενη δόση πρέπει πάντα να δίνεται με βάση το είδος, την ηλικία, το φύλο και τον τύπο εκτροφής (Sudhakaran *et al.*, 2006).

### **7.3. Οι ευεργετικές ιδιότητες των φυκών στο ανοσοποιητικό σύστημα των υδρόβιων οργανισμών**

Οι βιταμίνες και τα ιχνοστοιχεία των φυκών είναι σημαντικά γιατί παρεμποδίζουν την εκδήλωση ασθενειών που προκαλούνται κυρίως από διατροφικές ανεπάρκειες. Ακατέργαστα εκχυλίσματα πολλών ειδών φυκών περιέχουν αντιβιοτικές ουσίες ενάντια σε βακτήρια, μύκητες και ιούς. Για παράδειγμα αντι-ιικά συστατικά που ελέγχουν την εξέλιξη ερπητοϊών έχουν βρεθεί σε κόκκινα φύκη καθώς εμποδίζουν τις θέσεις σύνδεσης ιών στη κυτταρική μεμβράνη. Πολλά μακροφύκη

διαθέτουν στερόλες και συγγενή συστατικά τα οποία ανταγωνίζονται τη χοληστερόλη και μπορούν να μειώσουν την υψηλή αρτηριακή πίεση που σχετίζεται με την αρτηριοσκλήρωση. Εκχυλίσματα των *Laminaria* και *Sargassum* έχει βρεθεί ότι εμποδίζουν την ανάπτυξη σαρκώματος και λευχαιμίας σε κύτταρα ποντικιού. Το άλγος *Tetraselmis* έχει προταθεί για τη χρήση του στις υδατοκαλλιέργειες (Ouyang *et al.*, 2003).

Ένας αριθμός συγκεκριμένων συστατικών που προέρχονται από φύκη έχουν χρησιμοποιηθεί πειραματικά στην ιατρική. Οι σαξιτοξίνες που παράγονται από δινομαστιγοφόρα χρησιμοποιούνται σε νευροβιολογικές έρευνες. Το καινικό οξύ αποτελεί επίσης νευροτοξίνη που προκαλεί την καταστροφή των δενδριτών νευρικών κυττάρων και οι καραγενάνες χρησιμοποιούνται για την επαγωγή εξέλκωσης του στομάχου και του εντέρου. Οι ικανότητες των καραγεννανών και του αλγινικού οξέος να σχηματίζουν άλατα έχει προταθεί για τη χρήση τους ως χηλικούς φορείς για τη θεραπεία δηλητηρίασης από βαρέα μέταλλα και ραδιονουκλεοτίδια. Τα φύκη διαθέτουν πολλές δυνατότητες αξιοποίησης, οι οποίες μόλις έχουν αρχίσει να προσεγγίζονται.

Η σπιρουλίνα (*Spirulina*) είναι ένα κυανοβακτήριο (blue-green algae) που ανήκει στην τάξη Oscillatoriales. Είναι ένας πολυκύτταρος, ινώδης και σπειροειδής (κυλινδρικά τριχώματα, μεμονωμένες ίνες ή συσσωματώματα μέσα σε ζελατίνη) οργανισμός που ζει πάνω από 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια ζωής στον πλανήτη. Αποτελείται από 65-71% πρωτεΐνη, 15-25% υδατάνθρακες, 18% λιπαρά οξέα (κατά βάρος) και περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα. Ζει στα γλυκά αλλά και θαλασσινά νερά κυρίως όμως προτιμά τα αλκαλικά περιβάλλοντα (pH 9-11) και έχει φωτοσυνθετική απόδοση 8-10% (για τα χερσαία φυτά είναι 3%). Περιέχει το β-καροτένιο, τη βιταμίνη B12, το γ-λινολενικό οξύ, τη χλωροφύλλη, τη βιταμίνη E, B1,

B5, B6, τα ιχνοστοιχεία (ψευδάργυρο, μαγγάνιο, χαλκό, σελήνιο) και τα απαραίτητα αμινοξέα (μεθειονίνη, φυκοκυανίνη και ζεαξανθίνη) (Ντίκου, 2008).

Έχει βρεθεί ότι η συμπλήρωση της *Spirulina* στη διατροφή του γατόψαρου ενεργοποιεί τη μη ειδική ανοσία αυξάνοντας τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα στην περιτοναϊκή κοιλότητα χωρίς όμως να προκαλέσει αντίσταση στο *Edwardsiella ictaluri* καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά ανάμεσα στα ποσοστά της πειραματικής διατροφής και της βασικής διατροφής (Duncan & Klesius, 1996).

Η *Spirulina platensis* σε συγκέντρωση 10mg ενεργοποιεί τη μη ειδική ανοσία του κυπρίνου ενισχύοντας τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και τη παραγωγή των φαγοκυττάρων στο νεφρό για τουλάχιστον 5 ημέρες. Η προσθήκη της σπιρουλίνας προκαλεί μείωση στον πληθυσμό του *Aeromonas hydrophila* στο ήπαρ και το νεφρό ενώ αυξάνει την ιντερλευκίνη (μια ομάδα πεπτιδίων τα οποία εκπέμπουν σήματα μεταξύ των κυττάρων που εμπλέκονται στο ανοσοποιητικό σύστημα) (Zou *et al.*, 2000) και συγκεκριμένα της κυτοκίνης και λεμφοκίνης (ένας διαλυτός μεσολαβητής που εκκρίνεται από τα λεμφοκύτταρα μόλις έλθουν σε επαφή με συγκεκριμένα αντιγόνα) καθώς και της ιντερφερόνης (παράγεται από κύτταρα ως αντίδραση στην προσβολή από ιούς) (Watanuki *et al.*, 2006).

#### **7.4. Η συνδυαστική δράση των φυκών με τα βότανα**

Η συνδυαστική χορήγηση φυκών και φυτικών εκχυλισμάτων των *Laminaria digitata* και *Ascophylum nodosum* βελτιώνουν την αύξηση, το συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής, τα ποσοστά επιβίωσης και το ανοσοποιητικό σύστημα με υψηλά επίπεδα λυσοζύμης και συμπληρώματος του νεαρού σολομού από τον Ειρηνικό (*Onchorynchus tshawytscha*) (Peddie & Wardle, 2005).

Τα ευεργετικά αποτελέσματα του συνδιασμού αυτού παρατηρήθηκαν και στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος της ιριδίτσουσας πέστροφας. Μετά τη

χορήγηση του αυξάνεται η φαγοκυτταρική και η μεταναστευτική δραστηριότητα και ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων στην περιτοναϊκή κοιλότητα (φαγοκυτταρικό με βακτηριοκτόνο δραστηριότητα). Επίσης αυξάνεται ο αριθμός των μακροφάγων, των κυτοκυττάρων και η δραστηριότητα του συμπληρώματος (Peddie & Wardle, 2005).

Αντιμικροβιακή δράση κατά του παθογόνου βακτηρίου *Vibrio parahaemolyticus* παρουσιάζουν και τα τέσσερα χερσαία φυτά (*Ricinus communis*, *Phyllanthus niruri*, *Leucus aspera* και *Manihot esculenta*) καθώς και τα δύο φύκη *Ulva lactuca* και *Sargassum wightii* στα ανήλικα άτομα του καβουριού (*Peneaus indicus*) (Immanuel *et al.*, 2004).

## 8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα φυσικά ανοσοενισχυτικά, όπως οι βιταμίνες C, E και A, τα προβιοτικά, τα πρεβιοτικά και τα εκχυλίσματα βοτάνων ή φυκών, από την παρούσα βιβλιογραφική έρευνα, φαίνεται ότι είναι ένα μελλοντικό, αισιόδοξο εργαλείο για τον κλάδο των υδατοκαλλιεργειών, καθώς συμβάλει στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και βοηθά τους εκτρεφόμενους οργανισμούς με φυσικό τρόπο να προστατευθούν από διάφορες παθολογικές καταστάσεις (Esteban *et al.*, 2001).

Οι μολυσματικές ή μη ασθένειες των υδρόβιων οργανισμών εκτός από τα οικονομικά πρόβλημα που δημιουργούν στη διαχείριση μιας μονάδας, λόγω της υψηλής θνησιμότητας, της αποτυχίας της επίτευξης του εμπορικού μεγέθους ή της προμήθειας ακριβών αντιβιοτικών, προκαλούν ένα κλίμα δυσφορίας καθώς δημιουργείται μια δυσφήμιση της επιχειρήσεως και κλονίζεται η σχέση ανάμεσα στον παραγωγό και τον καταναλωτή.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να αναδείξει την αναγκαιότητα της πρόληψης αντί της θεραπείας με τη χρήση φυσικών ουσιών τα οποία είναι ιδιαίτερα

φιλικά προς τους εκτρεφόμενους οργανισμούς αλλά και προς το ίδιο το υδρόβιο περιβάλλον σεβόμενα τη πολύπλοκη βιοποικιλότητα του υδρόβιου οικοσυστήματος.

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι το άλφα και το ωμέγα για την αντιμετώπιση των ασθενειών από τον ίδιο τον οργανισμό. Η λειτουργία του αυτή μπορεί να διατηρηθεί και να ενισχυθεί με τη χορήγηση φυσικών ανοσοενισχυτικών με κόστος μικρότερο από αυτό των φαρμάκων. Αν και το ανοσοποιητικό σύστημα των υδρόβιων οργανισμών δεν έχει αναγνωριστεί και καταγραφεί πλήρως, όπως έχει γίνει στον άνθρωπο και τα χερσαία ζώα, η πλήρης κατανόηση και χρήση του θα οδηγήσει τον κλάδο των υδατοκαλλιεργειών σε πιο σύγχρονα και παραγωγικά μοντέλα.

## 9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 9.1. Ξένη βιβλιογραφία

- Adhm, K.G., Hashem, H.O., Abu-Shabana, M.B. & Kame, L.A.H. (2000). Vitamin C deficiency in the catfish *Clarias gariepinus*, *Aquaculture Nutrition*, 6, 129-139.
- Ai, Q., Mai, K., Tan, B., Xu, W., Zhang, W., Ma, H. & Liufu, Z. (2006). Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*, *Aquaculture*, 261, 327-336.
- Ai, Q., Mai, K., Zhang, C., Xu, W., Duan, Q., Tan, B. & Liufu, Z. (2004). Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*, *Aquaculture*, 242, 489-500.
- Al-Amoudi, M.M., El-Nakkadi, A.M.N. & El-Nouman, B.M. (1992). Evaluation of optimum dietary requirement of vitamin C for the growth of *Oreochromis spilurus* fingerlings in water from the Red Sea, *Aquaculture*, 105, 165-173.
- Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S. & Watanabe, T. (2004). Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products, *Fish & Shellfish Immunology*, 16, 527-537.

- Anbarasu† K. & Chandran, M.R. (2001). Effect of ascorbic acid on the immune response of the catfish, *Mystus gulio* (Hamilton), to different bacterins of *Aeromonas hydrophila*, *Fish & Shellfish Immunology*, 11, 347-355.
- Anderson, D.P. (1992). Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture, *Annual Rev. of Fish Diseases*, 281-307.
- Arnesen, S. M., Schröder, M. B., Dalmo, R. A. & Bøgwald J. (2002). Antigen uptake and immunoglobulin production in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) after intraperitoneal injection of *Vibrio anguillarum*, *Fish & Shellfish Immunology*, 13, 159-170.
- Avendaño, R.E. & Riquelme, C.E. (1999). Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae, *Aquaculture Research*, 30, 893-900.
- Bagni, M., Archetti, L., Amadori, M. & Marino, G. (2000). Effect of long-term oral administration of an immunostimulant diet on innate immunity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 47 (10), 745-51.
- Bai, S.C. & Lee, K.J. (1998). Different levels of dietary DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*, *Aquaculture*, 161, 405-414.
- Bairagi, A., Ghosh, K S., Sen, S.K. & Ray, A.K. (2004). Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings, *Aquaculture Research*, 35, 436-446.
- Balcázar J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. & Múzquiz, J.L. (2006). The role of probiotics in aquaculture, *Veterinary Microbiology*, 114, 173-186.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Calvo, A.C., Márquez, I., Gironés, O. & Muzquiz, J.L. (2007). Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*), *The British journal of nutrition*, 97 (3), 522-7.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Girones, O. & Muzquiz, J.L. (2007). Enhancement of the immuneresponse and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*), *FEMS Immunol Med Microbiol*, 51, 185-193.

- Barker, G. (2000). Novel methods to reduce disease in aquaculture, *Fish Veterinary Journal*, 5, 66-71.
- Blazer, V.S. & Wolke, R.E. (1984). The Effects of  $\alpha$ -Tocopherol on the immune response and non specific resistance factors of rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson), *Aquaculture*, 37, 1-9.
- Bowden, T.J., Thompson, K.D., Morgan, A.L., Gratacap, R.M.L. & Nikoskelainen, S. (2007). Seasonal variation and the immune response: A fish perspective, *Fish & Shellfish Immunology*, 22, 695-706.
- Bruno, A. (1986). Nutrition in marine aquaculture, project regional Mediterranean de developpement de l' aquaculture, W/S5347 Tunis Science Publishers.
- Brunt, J. & Austin, B. (2005). Use of a probiotic to control *lactococcosis* and *streptococcosis* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Journal of Fish Diseases*, 28, 693-701.
- Brunt, J., Newaj-Fyzul, A. & Austin, B. (2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Journal of Fish Diseases*, 30, 573-579.
- Bucki, R., Levental, I. & Janmey, P.A. (2007). Antibacterial Peptides - A Bright Future or a False Hope, *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents), 6 (3), 175-184 (10), Bentham Science Publishers.
- Burr, G., Gatlin III, D. & Ricke, S. (2008). Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract of Fish and the Potential Application of Prebiotics and Probiotics in Finfish Aquaculture, *Journal of the World Aquaculture Society*, 36 (4), 425-436.
- Burr, G., Hume, M., Ricke, S., Nisbet, D. & Gatlin III, D. (2008). A preliminary *in vitro* assessment of GroBiotic®-A, brewer's yeast and fructooligosaccharide as prebiotics for the red drum *Sciaenops ocellatus*, *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 43 (3), 253-260.
- Chaiyapechara, S., Casten, M.T., Hardy, R.W. & Dong, F.M. (2003). Fish performance, fillet characteristics, and health assessment index of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing adequate and high concentrations of lipid and vitamin E, *Aquaculture*, 219, 715-738.



- Chand, R.K., Sahoo, P.K., Kumari, J., Pillai, B.R. & Mishra, B.K. (2006). Dietary administration of bovine lactoferrin influences the immune ability of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) and its resistance against *Aeromonas hydrophila* infection and nitrite stress, *Fish & Shellfish Immunology*, 21, 119-129.
- Chang, C-I. & Liu, W-Y. (2002). An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing *edwardsiellosis* in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L., *Journal of Fish Diseases*, 25, 311-315.
- Chen, R., Lochmann, R., Goodwin, A., Praveen, K., Dabrowski, K. & Lee, K-J. (2004). Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*), *Aquaculture*, 242, 553-569.
- Chinabut, S. & Puttinaowarat, S. (2005). The choice of disease control strategies to secure international market access for aquaculture products, *Developments in biological*, 121, 255-61.
- Clerton, P., Troutaud, D., Verlhac, V., Gabaudan, J. & Deschaux, P. (2001). Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head.
- Cowey, C.B., Adron, J.W., Walton, M.J., Murray, J., Youngson, A. & Knox, D. (2008). Tissue Distribution, Uptake, and Requirement for  $\alpha$ -Tocopherol of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Fed Diets with a Minimal Content of Unsaturated Fatty Acids, *JN The journal of nutrition*, 1556-1567.
- Cowey, C. B., Degener, E., Tacon, A.G.J., Youngson, A. & Bell, J.G. (1984). The effect of vitamin E and oxidized fish oil on the nutrition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) grown at natural, varying water temperatures, *British Journal of Nutrition*, 51, 443-451.
- Cuesta, A., Esteban, M.A. & Meseguer, J. (2002). Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by vitamin C, *Fish & Shellfish Immunology*, 13, 97-109.
- Cuesta, A., Esteban, M. A., Ortuno, J. & Meseguer, J. (2001). Vitamin E increases natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.), *Fish & Shellfish Immunology*, 11, 293-302.

- Davidson, G.A., Ellis, A.E. & Secombes, C.J. (1993). Route of immunization influences the generation of antibody secreting cells in the gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Developmental and Comparative Immunology*, 17, 373-376.
- Davidson, G.A., Lin, S.H., Secombes, C.J & Ellis, A.E. (1997). Detection of specific and «constitutive» antibody secreting cells in the gills, head kidney and peripheral blood leucocytes of dab (*Limanda limanda*), *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 58, 363-374.
- Diaz-Rosales, P., Salinas, I., Rodriguez, A., Cuesta, A., Chabrillon, M., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A., Esteban, M.A. & Meseguer, J. (2006). Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics, *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 482-492.
- Dügenci, S.K., Arda, N. & Candan, A. (2003). Some medicinal plants as immunostimulant for fish, *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 99-106.
- Duncan, P.L. & Klesius, P.H. (1996). Effects of feeding Spirulina on specific and nonspecific immune responses of channel catfish, *Journal of Aquatic Animal Health*, 8, 308-313.
- Ellis, A.E. (1999). Immunity to bacteria in fish, *Fish & Shellfish Immunology*, 9, 291-308.
- Esteban, M.A., Cuesta, A., Ortuño, J. & Meseguer, J. (2001). Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system, *Fish & Shellfish Immunology*, 11, 303-315.
- Esteban, M.A., Rodriguez, A., Cuesta, A. & Meseguer, J. (2005). Effects of lactoferrin on non-specific immune responses of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), *Fish & Shellfish Immunology*, 18, 109-124.
- Fanaro, S., Boehm, G., Garssen, J., Knol, J., Mosca, F., Stahl, B. & Vigi, V. (2005). Galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides as prebiotics in infant formulas: A review, Symposium, Milano, 5, 22-26.
- Farzanfar, A. (2006). The use of probiotics in shrimp aquaculture, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 48, 149-158.
- Food and Agriculture organization of the United nations. (2007). Improving *Penaeus monodon* hatchery practices Manual based on experience in India, *FAO Fisheries Technical Paper*, 446, 1-101.

- Fracalossi, D.M., Allen, M.E., Yuyama, L.K. & Oftedal, O.T. (2001). Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes, *Aquaculture*, 192, 321-332.
- Francis-Floyd, R. (2003). Introduction to Fish Health Management, Fisheries and Aquatic Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, CIR921, 1-5.
- Francis-Floyd, R. (1992). Stress - Its Role in Fish Disease, SRAC Publication No. 474
- Frigg, M., Prabucki, A.L. & Ruhdel, E.U. (1990). Effect of Dietary Vitamin E Levels on Oxidative Stability of Trout Fillets, *Aquaculture*, 84, 145-158.
- Gatesoupe, F-J. (2008). Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments, *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 14 (1-3), 107-14.
- Gatesoupe, F-J. (2002). Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*, *Aquaculture*, 212, 347-360.
- Gatesoupe, F-J. (1999). The use of probiotics in aquaculture, *Aquaculture*, 180,147-165.
- Gatlin III, D.M., Li, P., Wang, X., Burr, G.S., Castille, F. & Lawrence, A.L. (2006). Potential Application of Prebiotics in Aquaculture. VIII Simposium Internacional de Nutricion Acuicola.
- Ghosh, S., Sinha, A. & Sahu, C. (2007). Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes, *Aquaculture Nutrition*, 13, 1-11.
- Gibson, G.R., McCartney, A.L. & Rastall, R.A. (2005). Probiotics and resistance to gastrointestinal infections, *British Journal of Nutrition*, 93 (1), S31-S34.
- Gildberg, A. & Mikkelsen, H. (1998). Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with (*Vibrio anguillarum*), *Aquaculture*, 167, 103-113.
- Gomez-Gil, B., Roque, A. & Turnbull, J.F. (2000). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms, *Aquaculture*, 191, 259-270.
- Gouillou-Coustans, M.F., Bergot, P. & Kaushik, S.J. (1998). Dietary ascorbic acid needs of common carp (*Cyprinus carpio*) larvae, *Aquaculture*, 161, 453-461.

- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I. & Nielsen, T. F. (1999). Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (3), 969-973.
- Gridsdale-Helland, B., Helland, S.J. & Gatlin III, D.M. (2008). The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Aquaculture*, 10, 1016.
- Hansen, G.H. & Olafsen, J.A. (1999). Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish, *PubMed*, 38, (1), 1-26.
- Hardie, L.J., Fletcher, T.C. & Secombes, C.J. (1991). The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Aquaculture*, 95, 201-214.
- Hardie, L.J., Fletcher, T.C. & Secombes, C.J. (1990). The Effect of Vitamin E on the Immune Response of the Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.), *Aquaculture*, 87, 1-13.
- Hardie, L.J., Marsden, M.J., Fletcher, T.C. & Secombes, C.J. (1993). *In vitro* addition of vitamin C affects rainbow trout lymphocyte responses, *Fish & Shellfish Immunology*, 3, 207-219.
- Haroun, E.R., Goda, A. & Chowdhury, M.A.K. (2006). Effect of dietary probiotic Biogens supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.), *Aquaculture Research*, 37, 1473-1480.
- Harzevili, A.R.S., Duffel, V.H., Dhert, P., Swings, J. & Sorgeloos, P. (1999). Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachiounus plicatilis* (Müller), *Aquaculture Research*, 29, 411-417.
- Hatnre, K. & Lie, O. (1995). Minimum requirement of vitamin E for Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at first feeding, *Aquaculture Research*, 26, 175-184.
- Hong, H.A., Duc, L.H. & Cutting, S.M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics, *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (4), 813-835.
- Hrubec, T.C., Ward, D., Smith, A.S. & Robertson, J.L. (2004). Age related changes in humoral immune response of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*), *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 101, 103-108.

- Huang, C.H. & Huang, S.L. (2004). Effect of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation, and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, fed oxidized oil, *Aquaculture*, 237, 381-389.
- Immanuel, G., Vincybai, V. C., Sivaram, V., Palavesam A. & Marian, M. P. (2004). Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles, *Aquaculture*, 236, (1-4), 53-65.
- Irianto, A. & Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture, *Journal of Fish Diseases*, 25, 633-642.
- Irianto, A. & Austin, B. (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Journal of Fish Diseases*, 25, 333-342.
- Ji, H., Om, A.D., Yoshimatsu, T., Hayashi, M., Umino, T., Nakagawa, H., Asano, M. & Nakagawa, A. (2003). Effect of dietary vitamins C and E fortification on lipid metabolism in red sea bream *Pagrus major* and black sea bream *Acanthopagrus schlegeli*, *Fisheries Science*, 69, 1001-1009.
- Kihara M. & Sakata T. (2001a). Effects of rearing temperature and dietary on the production of gases and organic acids by gut microbes of an omnivorous Teleost, carp, *Cyprinus carpio*, in micro-scale batch cultures, *Suisanzoshoku*, 49, 329-338.
- Keysami, M.A., Saad, C.R., Sijam, K., Daud, H.M. & Alimon, A.R. (2007). Effect of *Bacillus subtilis* on growth development and survival of larvae *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), *Aquaculture Nutrition*, 13, 131-136.
- Kihara M., Ohba K. & Sakata T. (1995). Trophic effect of dietary lactosucrose on intestinal tunica muscularis and utilization of this sugar by gut microbes in red seabream, *Pagrus major*, a marine carnivorous teleost, under artificial rearing, *Comp. Biochem. Physiol.*, 112, 629-634.
- Kim, D-H. & Austin, B. (2006). Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics, *Fish & Shellfish Immunology*, 21, 513-524.
- Kirkoudis, I., Angelidis, P., Iliadis, N., Photis, G. (2002). Study of the bacterial flora in sea bass and sea bream up to 90 days of age, Proceedings of the 19th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology , Thessaloniki, 25-28.

- Kitani, Y., Mori, T., Nagai, H., Toyooka, K., Ishizaki S., Shimakura, K., Shiomi, K. & Nagashima Y. (2007). Gene expression and distribution of antibacterial L-amino acid oxidase in the rockfish *Sebastes schlegeli*, *Fish & Shellfish Immunology*, 23, 1178-1186.
- Kocabas, A.M. & Gatlin III, D.M. (1999). Dietary vitamin E requirement of hybrid striped bass (*Morone chrysops* female × *M. saxatilis* male), *Aquaculture Nutrition*.
- Köllner, B., Fischer, U., Rombout, J.H.W.M., Taverne-Thiele, J.J. & Hansen, J.D. (2004). Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR, *Developmental and Comparative Immunology*, 28, 1049-1062.
- Kumar, R., Mukherjee, S.C., Prasad, K.P. & Pal, A.K. (2006). Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.), *Aquaculture Research*, 37, 1215-1221.
- Kumari, J., Swain, T. & Sahoo, P.K. (2003). Dietary bovine lactoferrin induces changes in immunity level and disease resistance in Asian catfish *Clarias batrachus*, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 94, 1-9.
- Lall, S.P. (2002). Nutrition and health of fish, Institute for Marine Biosciences. National Research Council of Canada, 13-23.
- Lee, M.H. & Shiau, S.Y. (2005). Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses, *Fish & Shellfish Immunology*, 16, 475-485.
- Li, M., Johnson, M.R. & Robinson, E.H. (1993). Elevated dietary vitamin C concentrations did not improve resistance of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, against *Edwardsiella ictaluri* infection, *Aquaculture*, 117, 303-312.
- Li, M., Wise, D.J. & Robinson, E.H. (1998). Effect of Dietary Vitamin C on Weight Gain, Tissue Ascorbate Concentration, Stress Response, and Disease Resistance of Channel Catfish *Ictalurus punctatus*, *Journal of the world aquaculture society*, 29 (1), 1-8.
- Li, P. & Gatlin III, D.M. (2005). Evaluation of the probiotic GroBiotic®-A and brewer's yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*, *Aquaculture*, 248 (1-4), 197-205.

- Li, P. & Gatlin III, D.M. (2004). Dietary brewer's yeast and the prebiotic Grobiotic™AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection, *Aquaculture*, 231, 445-456.
- Li, P. & Gatlin III, D.M. (2004). Strategies of Dietary Supplementation for Health Management of Hybrid Striped Bass *Morone Chrysops* x *M. Saxatilis*: A Review of Research at Texas A&M University.
- Li, P. & Gatlin III, D.M. (2003). Evaluation of brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*), *Aquaculture*, 219, 681-692.
- Li, P. (2005). Evaluation of various dietary supplements and strategies to enhance growth and disease management of hybrid striped bass *Morone chrysops* × *M. saxatilis*. (2005). *Aquaculture*, 449 (1-5), 197-205.
- Li, P., Lewis, D.H. & Gatlin III, D.M. (2004). Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection, *Fish & Shellfish Immunology*, 16, 561-569.
- Liao, I.C. (2005). Aquaculture Practices in Taiwan and Its Visions, *J. Fish. Soc Taiwan*, 32 (3), 193-206.
- Lorenzen, N. (1999). Recombinant vaccines: experimental and applied aspects, *Fish & Shellfish Immunology*, 9 (4), 361-365.
- Lovell, R.T. (1991). Nutrition of aquaculture species, *PubMed*, 69 (10), 4193-200.
- Lygren, B., Hamre, K. & Waagbø, R. (2000). Effect of induced hyperoxia on the antioxidant status of Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed three different levels of dietary vitamin E, *Aquaculture Research*, 31, 401-407.
- Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Metailler, R. & Ollevier, F. (2006). Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758), *Aquaculture International*, 14 (3), 219-229.
- Makridis, P., Martins, S., Vercauteren, T., Van Driessche, K., Decamp, O. & Dinis M.T. (2005). Evaluation of candidate probiotic strains for gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*) using an in vivo approach, *Letters in Applied Microbiology*, 40, 274-277.

- Manning, T.S. & Gibson, G.R. (2004). Prebiotics, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18 (2), 287-298.
- Matias, H.B., Yusoff, F.M., Shariff, M. & Azhar, O. (2002). Effects of Commercial Microbial Products on Water Quality in Tropical Shrimp Culture Ponds, *Asian Fisheries Science*, 15, 239-248.
- Menezes, G.C., Tavares-Dias, M., Ono, E.A., Andrade, J.I.A., Brasil, E.M., Roubach, R., Urbinati, E.C., Marcon, J.L. & Affonso, E.G. (2006). The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 145, 274-279.
- Merchie, G., Luuem, P., Storch, V., Iibel, U., Nelis, H., De Leenheer, A. & Sorgeloos, P. (1996). Influence of Dietary Vitamin C Dosage on Turbot (*Scophthalmus maximus*) and European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Nursery Stages, *Camp. Biochem. Physiol.*, 114A (2), 123-133.
- Misra, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C. & Pradhan J. (2007). Effects of dietary vitamin C on immunity, growth and survival of Indian major carp *Labeo rohita*, fingerlings, *Aquaculture Nutrition*, 13, 35-44.
- Misra, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C. & Meher, P.K. (2006). The immunomodulatory effects of tuftsin on the non-specific immune system of Indian Major carp, *Labeo rohita*, *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 728-738.
- Moe, Y.Y., Koshio, S., Teshima, S., Ishikawa, M., Matsunaga, Y. & Panganiban, A.J. (2004). Effect of vitamin C derivatives on the performance of larval kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*, *Aquaculture*, 242, 501-512.
- Montero, D., Marrero, M., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Vergara, J.M. & Tort, L. (1999). Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress, *Aquaculture*, 171, 269-278.
- Montero, D., Tort, L., Izquierdo, M.S., Robaina, L. & Vergara, J.M. (1998). Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by a-tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies, *Fish Physiology and Biochemistry*, 18, 399-407.



- Montero, D., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J. M. & Izquierdo, M.S. (2001). Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles, *Fish & Shellfish Immunology*, 11, 473-490.
- Moriarty, D.J.W., Decamp, O. & Lavens, P. (2005). Probiotics in aquaculture, *AQUA Culture AsiaPasific Magazine*, 14-16.
- Moriarty, D.J.W. (1999). Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria, Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, Microbial Interactions in Aquaculture.
- Mourente, G., Diaz-Salvago, E., Bell, J.G. & Tocher, D.R. (2002). Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E, *Aquaculture*, 214, 343-361.
- Mulero, V., Esteban, M.A. & Meseguer, J. (1998). Effects of in vitro addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) phagocytes, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 66, 185-199.
- Navarre, O. & Halver, J. E. (1989). Disease Resistance and Humoral Antibody Production in Rainbow Trout Fed High Levels of Vitamin C, *Aquaculture*, 79, 207-221.
- Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A.A., Mutani, A., Ramsabhag, A., Brunt, J. & Austin, B. (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1699-1706.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S. & Lilius, E-M. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*), *Fish & Shellfish Immunology*, 15, 443-452.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S. & Bylund, G. (2001). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*, *Aquaculture*, 198, 229-236.
- Obach, A., Quentel, C. & Baudin Laurencin, F. (1993). Effects of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*, *Diseases of aquatic organisms*, 15, 175-185.

- Ortuño, J., Cuesta, A., Esteban, M.A. & Meseguer, J. (2001). Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 79, 167-180.
- Ortuño, J., Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M.A. & Meseguer, J. (2002). Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 85, 41-50.
- Ortuño, J., Esteban, M.A. & Meseguer, J. (2003). The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), *Fish & Shellfish Immunology*, 14, 145-156.
- Ortuño, J., Esteban, M.A. & Meseguer, J. (2000). High dietary intake of  $\alpha$ -tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), *Fish & Shellfish Immunology*, 10, 293-307.
- Ortuño, J., Esteban, M.A. & Meseguer, J. (1999). Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), *Fish & Shellfish Immunology*, 9, 429-443.
- Ouwehand, C. (2003). Probiotics: time to move beyond Metchnikoff, *Drug Discovery Today*, 8 (23), 1063.
- Ouyang, Y., Luo, L., Hu, H., Zhang, C. & Li, Y. (2003). Laboratory culture of *Tetraselmis* strains isolated from the coasts of China, *PubMed*, 14(10), 1701-4.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. & Sugita, H. (2004). Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102, 379-388.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S. & Sugita, H. (2005). The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Aquaculture*, 243, 241-254.
- Parvez, S., Malik, K.A., Kang, S.A. & Kim, H.Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1171-1185.

- Pearce, J., Harris, J.E. & Davies, S.J. (2003). The effect of vitamin E on the serum complement activity of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Aquaculture Nutrition*, 9, 337-340.
- Peddie, S. & Wardle, R. (2005). *Research Feature: AquaVac\* Ergosan\* Enhances Growth and Survival in Juvenile Chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha)*, Schering-Plough Animal Health Corporation.
- Poston, H.A., Combs, G.F. Jr., & Leibovitz, L. (1976). Vitamin E and Selenium Interrelations in the Diet of Atlantic Salmon (*Salmo salar*): Gross, Histological and Biochemical Deficiency Signs, *Journal of Nutrition*, 106 (7), 892-904.
- Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T. & Watanabe, T. (2004). Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids, *Fish & Shellfish Immunology*, 16, 25-39.
- Qin, Q., Wu, Z. & Pan, J. (2001). Disease resistance and humoral immunomodulatory effects of vitamin C on grouper, *Epinephelus Awoara*, *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 18 (3), 247-252.
- Raa, J. (2000). The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds, *Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*, 47-56.
- Rao, V.Y. & Chakrabarti, R. (2005). Stimulation of immunity in Indian major carp Catla catla with herbal feed ingredients, *Fish & Shellfish Immunology*, 18, 327-334.
- Ravi, A.V., Musthafa, K.S., Jegathammbal, G., Kathiresan, K. & Pandian, S.K. (2007). Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic Vibrios in marine aquaculture, *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 45, 219-223.
- Ren, T., Koshios, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Micheal, F.R., Uyan, O. & Tung, H.T. (2007). Influence of dietary vitamin C and bovine lactoferrin on blood chemistry and non-specific immune responses of Japanese eel, *Anguilla japonica*, *Aquaculture*, 267, 31-37.
- Ren, T., Koshios, S., Teshima, H., Ishikawa, Alam, S., Panganiban, A. & Moe, Y.Y. (2005). Optimum Dietary Level of L-ascorbic Acid for Japanese Eel, *Anguilla japonica*, *Journal of the world aquaculture society*, 36 (4), 437-443.

- Reuter, G. (2001). Probiotics--possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for men and animals, *PubMed*, 114 (11-12), 410.
- Ringø, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Mayhew, T.M. & Olsen, R.E. (2006). The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.), *Aquaculture Research*, 37 (9), 891-897.
- Roberfroid, M.B. (2006). Prebiotics and probiotics: are they functional foods, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1682S-1687S.
- Rodriguez, J. & Moullac, G. (2000). State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp, *Aquaculture*, 191, 109-119.
- Roem, A.J., Kohler, C.C. & Stickney, R.R. (1990). Vitamin E Requirements of the Blue Tilapia, *Oreochromis uureus* (Steindachner), in Relation to Dietary Lipid Level, *Aquaculture*, 87, 155-164.
- Roberts, M. L., Davies, S. J. & Pulsford, A.L. (1995). The influence of ascorbic acid (vitamin C) on non-specific immunity in the turbot (*Scophthalmus maximus* L.), *Fish & Shellfish Immunology*, 5, 27-38.
- Sahoo, P.K. & Mukherjee, S.C. (2003). Immunomodulation by dietary vitamin C in healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita*). *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 26 (1). 65-76.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants, *Aquaculture*, 172, 63-92.
- Salinas, I., Cuesta, A., Esteban, M.A. & Meseguer, J. (2005). Dietary administration of *Lactobacillus delbrückii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses, *Fish & Shellfish Immunology*, 19, 67-77.
- Sealey, W.M. & Gatlin, III D.M. (2002). Dietary Vitamin C and Vitamin E Interact to Influence Growth and Tissue Composition of Juvenile Hybrid Striped Bass (*Morone chrysops* ♀ x *M. saxatilis* ♂) but Have Limited Effects on Immune Responses, *The American Society for Nutritional Sciences*, 132, 748-755.
- Sealey, W.M. & Gatlin, D.M. (1999). Dietary Vitamin C Requirement of Hybrid Striped Bass *Morone chrysops* ♀ x *M. saxatilis* ♂, *Journal of the world aquaculture society*, 30 (3), 297-301.

- Shao, Z.J. (2001). Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50, 229-243.
- Shiau, S.Y. & Hsu, T.S. (1999). Quantification of vitamin C requirement for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na and L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg, *Aquaculture*, 175, 317-326.
- Sink, T.D. & Lochmann, R.T. (2008). Preliminary Observations of Mortality Reduction in Stressed, *Flavobacterium columnare*, Challenged Golden Shiners after Treatment with a Dairy-Yeast Probiotic, *North American Journal of Aquaculture*, 70, 192-194.
- Sivaram, V., Babu, M.M., Immanuel, G., Murugadass, S., Citarasu, T. & Marian, M.P. (2004). Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections, *Aquaculture*, 237 (1-4), 9-20.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P. & Rumsey, G.L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41, 125-139.
- Skoufos, I., Zelovitis, I., Fotou, K., Anastasiou, I. Tsolkas, F., Tsinas, A. & Tzora, A. (2007). Functional farms and functional food: From animal health to human health.
- Smith, V.J., Brown, J.H. & Hauton, C. (2003). Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection, *Fish & Shellfish Immunology*, 15, 71-90.
- Song, Y.L. & Huang, C.C. (2000). Application of Immunostimulants to Prevent Shrimp Diseases, Recent Advances in Marine biotechnology, *Immunobiology and Pathology*, 5, 173-187.
- Stolen, J.C., Fletcher, T.C., Bayne, C.J., Secombes, C.J., Zelikoff, J.T., Twerdok, L.E. & Anderson, D.P. (2004). Effect of  $\alpha$ -Tocopherol and n-3 HUFA Deficient Diets on Blood Cells, Selected Immune Parameters and Body Composition of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*), *Modulators of Immune Responses*, Chapter 21, 251-266.
- Sudhakaran, D.S., Sreirekha, P., Devasree, L.D., Premsingh, S. & Michael, R.D. (2006). Immunostimulatory effect of *Tinospora cordifolia* Miers leaf extract in *Oreochromis mossambicus*, *Indian journal of experimental biology*, 44 (9), 726-32.

- Supamattaya, K., Chittiwat, V. & Boonyaratralin, M. (2000). Immunological factors in Black Tiger shrimp, *Penaeus monodon*, Fabricius, *Immunological factors in Black Tiger shrimp*, 345-358.
- Takeuchi, T., Dedi, J., Haga, Y., Seikai, T. & Watanabe, T. (1998). Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Aquaculture*, 169, 155-165.
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.-Y., Jeon, M.-J., Bai, S.C., Lee, W.-J., Yuge, K. & Koshio, S. (2006). Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system, *Fisheries science*, 72, 310-321.
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.-Y., Kim, S.-M., Park, S.-I., Yoshikawa T. & Sakata, T. (2006). Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*, *Fisheries science*, 72, 755-766.
- Thompson, I., Choubert, G., Houlihan, D.F. & Secombes, C.J. (1995). The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout, *Aquaculture*, 133, 91-102.
- Thompson, I., Fletcher, T.C., Houlihan, D.F. & Secombes, C.J. (1994). The effect of dietary vitamin A on the immunocompetence of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Fish Physiology and Biochemistry*, 12 (6), 513-523.
- Thompson, I., White, A., Fletcher, T.C., Houlihan, D.F. & Secombes, C.J. (1993). The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C, *Aquaculture*, 114, 1-18.
- Tinh, N.T., Dierckens, K., Sorgeloos, P. & Bossier, P. (2008). A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain, *Marine biotechnology*, 10 (1), 1-12.
- Tocher, D.R., Mourente, G., Dereecken, A.V., Evjemo, J.O., Diaz, E., Bell, J.G., Geurden, I., Lavens, P. & Olsen, Y. (2002). Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.), *Aquaculture Nutrition*, 8, 195-207.
- Tuohy, K.M., Probert, H.M., Smejkal, C.W. & Gibson, G.R. (2003). Using probiotics and prebiotics to improve gut health, *Drug Discovery Today*, 8 (15), 692-700.

- Turner, R. J. & Finch, J.M. (1991). Selenium and the immune response, *Proceedings of the Nutrition Society*, 50, 275-285.
- Vadstein, O. (1997). The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges, *Aquaculture*, 155, 401-417.
- Vega, E., Garcia-Galaz, A., Diaz-Cinco, M.E. & Sotelo-Mundo, R.R. (2006). White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholera*, *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 405-408.
- Venkat, H.K., Sahu, N.P. & Jain, K.K. (2004). Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), *Aquaculture Research*, 35, 501-507.
- Verlhac, V. & Gabaudan, J. (1994). Influence of vitamin C on the immune system of salmonids, *Aquaculture and Fisheries Management*, 25, 21-36.
- Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schüep W. & Hole, R. (1996). Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture*, 143, 123-133.
- Verlhac, V., Obach, A., Gabaudan J., Schüep W., & Hole, R. (1998). Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Fish & Shellfish Immunology*, 8, 409-424.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. & Verstraete, W. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4), 655-671.
- Villamil, L., Tafalla, C., Figueras, A. & Novoa, B. (2002). Evaluation of Immunomodulatory Effects of Lactic Acid Bacteria in Turbot (*Scophthalmus maximus*), *American Society for Microbiology*, 9 (6), 1318-1323.
- Vine, N.G., Leukes, W.D. & Kaiser, H. (2006). Probiotics in marine larviculture, *Federation of European Microbiological Societies*, 30, 404-427.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J. & Hecht, T. (2004). Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus, *Journal of Fish Diseases*, 27, 319-326.

- Waagbø, R., Glette, J., Raa-Nilsen, E. & Sandnes, K. (1993). Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Fish Physiology and Biochemistry*, 12 (1), 61-73.
- Waagbø, R., Sandnes, K., Torrissen, O.J., Sandvin, A. & Lie, O. (1993). Chemical and sensory evaluation of fillets from Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed three levels of N-3 polyunsaturated fatty acids at two levels of vitamin E, *Food Chemistry*, 46, 361-366.
- Wang, S-H. & Chen, J-C. (2005). The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Fish & Shellfish Immunology*, 19, 191-204.
- Wang, X., Kim, K., Bai, S.C., Huh M. & Cho, B. (2003). Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*), *Aquaculture*, 215, 203-211.
- Wang, Y.B., Xu, Z-R. & Xia, M-S. (2005). The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds, *Fisheries Science*, 71, 1036-1041.
- Wang, Y.C., Chang, P.S. & Chen, H.Y. (2007). Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Fish & Shellfish Immunology*, 23, 1161-1177.
- Wang, Z., Mai, K., Liufu, Z., Ma, H., Xu, W., Ai, Q., Zhang, W., Tan, B. & Wang, X. (2006). Effect of high dietary intakes of vitamin E and n-3 HUFA on immune responses and resistance to *Edwardsiella tarda* challenge in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck and Schlegel), *Aquaculture Research*, 37, 681-692.
- Watanuki, H., Ota, K., A. Tassakka, C.M., Kato, T. & Sakai, M. (2006). Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*, *Aquaculture*, 258, 157-163.
- Whyte, S.K. (2007). The innate immune response of finfish - A review of current knowledge, *Fish & Shellfish Immunology*, 23, 1127-1151.
- Wilson, R.P. (1973). Absence of Ascorbic acid synthesis in channel catfish, *Ictalurus Punctatus* and blue catfish, *Ictalurus frucatus*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 46B, 635-638. Printed in Great Britain, Pergamon Press.
- Wilson, R.P., Bowserazand, P. R. & Poe, W. E. (2008). Dietary Vitamin E Requirement of Fingerling Channel Catfish, *JN American Institute of Nutrition*, 5807, 2053-2058.



- Wise, D.J., Tomasso, J.R., Schwedler, T.E., Blazer, V.S. & Gatlin, III D.M. (1993). Effect of Vitamin E on the Immune Response of Channel Catfish to *Edwardsiella ictaluri*, *Journal of Aquatic Animal Health*, 5, 183-188.
- Wise, D.J., Tomasso, R.J., Gatlin III D.M., Bai, S.C. & Blazer, V.S. (1993). Effects of Dietary Selenium and Vitamin E on Red Blood Cell Peroxidation, Glutathione Peroxidase Activity, and Macrophage Superoxide Anion Production in Channel Catfish, *Journal of Aquatic Animal Health*, 5, 177-182.
- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutierrez-de Frias, C. & Cortes, A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish, *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 126-136.
- Zou, J., Wang, T., Hong, S., Cunningham, C. & Secombes, C.J. (2000). Role of interleukin-1 $\beta$  in immune responses of rainbow trout, *Fish & Shellfish Immunology*, 10, 289.

## 9.2. Ελληνική βιβλιογραφία

- Γκολομάζου, Ε. (2007). Ιχθυοπαθολογία. Πανεπιστημιακές παραδόσεις, Βόλος.
- Πιτσιλαδή, Ε. (2005). Βιολειτουργικά τρόφιμα και ο ρόλος των φυτοιστρογόνων στην υγεία και πρόληψη νοσημάτων, Πτυχιακή διατριβή. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.
- Ντίκου, Α. (2007). Φυκολογία. Πανεπιστημιακές παραδόσεις, Βόλος.

## 10. Abstract

In the present diplomatic work, the use of natural immunomodulators in breeding the aquatic organisms so as to prevent various diseases is being studied. It seems to be a promising new development and at the same time, an imperative need altogether.

The extraordinary use of antibiotics has resulted in the development of bacterial strains which are resistant to the antibiotics and thus decrease their qualities of substances different in nature from the common drugs.

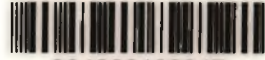
The natural immunomodulators like the vitamins C, E, A, the probiotics, the prebiotics and the herb or algae/ seaweed extracts seem, from the present

bibliographic research, to be a future optimistic tool for the aquaculture sector industry, as they contribute to the strengthening of the immune system and help the farmed organisms be protected from the various pathological states/ conditions in a natural way.

**Keywords:** prevention, immunomodulators, immune system



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000102047

