



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΩΚΕΑΝΟΓΡΑΦΙΑΣ & ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Συσχέτιση περιβαλλοντικών παραμέτρων με την εμφάνιση ασθενειών στο εκτρεφόμενο λαβράκι *Dicentrarchus labrax*, L. 1758 και πρόληψη των ασθενειών αυτών»

Ευθύμιος Χ. Σπίνος
MSc Βιολόγος
Μυτιλήνη, Φεβρουάριος 2019



UNIVERSITY OF AEGEAN
SCHOOL OF ENVIRONMENT
DEPARTMENT OF MARINE SCIENCES

DOCTORAL THESIS

«Correlation of environmental parameters with the occurrence of diseases
in the farmed sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. 1758 and prevention of
these diseases»

Efthimios C. Spinos
MSc Biologist
Mytilene, February 2019

«Η θάλασσα είναι ένας μαγευτικός κόσμος. Έχει ψάρια, αστερίες, φύκια και κοχύλια. Επίσης έχει ωραία ζεστή άμμο, που έχει πάνω της γυαλιστερές πετρούλες. Όταν πηγαίνω στα γαλανά νερά της, βάζω τη μάσκα μου και εξερευνώ τον μυστηριώδη βυθό της. Κάνω αμέτρητες βουτιές, μακροβούτια και παίζω παιχνίδια. Βλέπω το απαλό αεράκι να θερίζει τα κυματάκια της. Μερικές φορές βλέπω δελφίνια να τσαλαβουτάνε στα καθαρά νερά της. Μακάρι όλοι οι άνθρωποι να μην πετούσαν σκουπίδια στη θάλασσα για να είναι πάντα καθαρές!»

Νάγια Σπίνου (Γ' τάξη Δημοτικού)

Αφιερώνεται στη μνήμη του πατέρα μου, στη μητέρα μου και στην κόρη μου

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Μπακόπουλος Βασίλειος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Αιγαίου, Επιβλέπων

Κουτσούμπας Δρόσος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Αιγαίου, μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής

Ζερβάκης Βασίλειος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Αιγαίου μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής

Λεονάρδος Ιωάννης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος Εξεταστικής Επιτροπής

Κατσέλης Γεώργιος, Καθηγητής ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας, μέλος Εξεταστικής Επιτροπής

Κόκκορης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Αιγαίου, μέλος Εξεταστικής
Επιτροπής

Χασιώτης Θωμάς, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Αιγαίου, μέλος Εξεταστικής Επιτροπής

	Σελίδες
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	1
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1 Υδατοκαλλιέργειες	11
1.2 Οι ιχθυοκαλλιέργειες στη Μεσόγειο θάλασσα	12
1.3 Οι ιχθυοκαλλιέργειες στην Ελλάδα	12
1.4 Οι ιχθυοκαλλιέργειες στην Κεφαλονιά	14
1.5 Οικολογία και Βιολογία των πιο σημαντικών από άποψη παραγωγής θαλάσσιων ιχθύων στην Ελλάδα	14
1.6 Μονάδες πάχυνσης θαλάσσιων ιχθύων σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς	16
1.7 Επιδράσεις της λειτουργίας των υδατοκαλλιεργειών στην ίδια την εκτροφή και στο θαλάσσιο περιβάλλον	17
1.8 Μικροοργανισμοί του νερού-Μεταβολισμός	18
1.9 Περιβαλλοντικοί και διαχειριστικοί παράγοντες που προκαλούν ή προδιαθέτουν στην ανάπτυξη ασθενειών στα εκτρεφόμενα ψάρια	20
1.10 Ασθένειες ιχθύων	21
1.10.1 Κυριότερες βακτηριακές ασθένειες των εκτρεφόμενων ψαριών	23
1.10.1.1 Δονακίωση προκαλούμενη από το <i>L. anguillarum</i>	23
1.10.1.2 Φωτοβακτηριδίαση προκαλούμενη από το <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	28
1.10.2 Κυριότερη ιογενής ασθένεια	36
1.10.2.1 Ιογενής (Nodavirus) Εγκεφαλοπάθεια-Αμφιβληστροειδοπάθεια	36
1.10.3 Κυριότερη ασθένεια εξαιτίας διατροφικών δυσλειτουργιών	41
1.10.3.1 Χειμερινό σύνδρομο (Winter syndrome)	41
1.11 Σύνοψη-Σκοπός	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	44
«Συσχέτιση περιβαλλοντικών παραμέτρων με την εμφάνιση ασθενειών στα εκτρεφόμενα ψάρια»	44
2.1 Εισαγωγή	44
2.1.1 Παράμετροι που επιδρούν στις υδατοκαλλιέργειες-Φυσικοχημικές παράμετροι	44
2.1.1.1 Θαλάσσια ρεύματα-Κινήσεις των υδάτινων μαζών	44
2.1.1.2 Θερμοκρασία (T°C)	44
2.1.1.3 Αλατότητα	45
2.1.1.4 Διαλυμένο Οξυγόνο (D.O.)	46
2.1.1.5 Ενεργός οξύτητα του νερού (pH)	47

2.1.1.6 Αμμωνία (NH ₃), Αμμωνιακά (NH ₄), Νιτρώδη (NO ₂), Νιτρικά (NO ₃) του νερού	50
2.1.1.7 Θρεπτικά άλατα	50
2.1.2 Περιβαλλοντικές παράμετροι που επηρεάζουν τα εκτρεφόμενα ψάρια	51
2.1.3 Προσδιορισμός φυσικής κατάστασης των ψαριών	51
2.1.4 Η απόκριση στους παράγοντες καταπόνησης των εκτρεφόμενων ψαριών	52
2.1.4.1 Καταπόνηση στα ψάρια	52
2.1.4.2 Αντίδραση των ψαριών στην καταπόνηση	52
2.1.4.3 Η φύση της απόκρισης καταπόνησης στα εκτρεφόμενα ψάρια	54
2.1.4.4 Ολοκληρωμένη αντίδραση καταπόνησης	56
2.1.4.5 Γονιδιακή απόκριση	57
2.1.4.6 Επίδραση της θερμοκρασίας	58
2.1.4.7 Διατροφή και διατροφικές επιδράσεις	59
2.1.5 Διαχείριση μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας	59
2.1.6 Σύνοψη-Σκοπός	60
2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	60
2.2.1 Περιοχές μελέτης	60
2.2.1.1 Κόλπος Αργοστολίου	60
2.2.1.2 Όρμος Κακογκύλου	61
2.2.2 Χαρτογράφηση και αποτύπωση πυθμένα περιοχών μελέτης	62
2.2.2.1 Χαρτογράφηση και αποτύπωση πυθμένα Κόλπου Αργοστολίου	62
2.2.2.2 Χαρτογράφηση και αποτύπωση πυθμένα Όρμου Κακογκύλου	66
2.2.3 Τα ρεύματα στις περιοχές μελέτης	66
2.2.3.1 Κόλπος Αργοστολίου	66
2.2.3.2 Όρμος Κακογκύλου	67
2.2.4 Οι ιχθυοκαλλιέργειες στις περιοχές μελέτης	67
2.2.4.1 Κόλπος Αργοστολίου	67
2.2.4.2 Όρμος Κακογκύλου	69
2.2.5 Συλλογή δεδομένων	69
2.2.5.1 Κόλπος Αργοστολίου	69
2.2.5.2 Όρμος Κακογκύλου	73
2.2.6 Μικροβιολογικές παράμετροι του νερού	73
2.2.6.1 Κόλπος Αργοστολίου	73
2.2.6.2 Όρμος Κακογκύλου	74
2.2.7 Στοιχεία διαχείρισης των μονάδων πάχυνσης στις περιοχές μελέτης	74
2.2.7.1 Κόλπος Αργοστολίου	74
2.2.7.2 Όρμος Κακογκύλου	74
2.2.8 Στατιστική ανάλυση συσχέτισης φυσικοχημικών παραμέτρων με την εμφάνιση ασθενειών	75
2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	80

2.3.1 Αποτύπωση πυθμένα περιοχών μελέτης	80
2.3.1.1 Κόλπος Αργοστολίου-Χαρακτηριστικά και σύσταση του πυθμένα	80
2.3.1.2 Όρμος Κακογκύλου-Χαρακτηριστικά και σύσταση του πυθμένα	82
2.3.2 Φυσικοχημικές παράμετροι του νερού του Κόλπου Αργοστολίου	83
2.3.2.1 Ρεύματα	83
2.3.2.2 Θερμοκρασία	86
2.3.2.3 Αλατότητα	89
2.3.2.4 Διαλυμένο οξυγόνο (D.O.)	90
2.3.2.5 Ενεργός οξύτητα του νερού (pH)	92
2.3.2.6 Θρεπτικά άλατα	94
2.3.2.7 Χλωροφύλλη (chl-a)	97
2.3.2.8 Ποιότητα υδάτων Κόλπου Αργοστολίου	97
2.3.3 Φυσικοχημικές παράμετροι του θαλασσινού νερού στον Όρμο Κακογκύλου	99
2.3.4 Μικροβιολογικές παράμετροι του νερού Κόλπου Αργοστολίου	101
2.3.5 Στοιχεία διαχείρισης μονάδων ιχθυοκαλλιέργειών του Κόλπου Αργοστολίου	104
2.3.6 Εμφάνιση ασθενειών σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου	111
2.3.7 Συσχέτιση της θνησιμότητας εξαιτίας εμφάνισης ασθενειών με τις φυσικοχημικές παραμέτρους και τα διαχειριστικά μέτρα σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου	113
2.3.8 Στατιστική ανάλυση συσχέτισης φυσικοχημικών παραμέτρων με την εμφάνιση ασθενειών σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου	117
2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	124
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	134
Πρόληψη των ασθενειών του εκτρεφόμενου λαβρακιού <i>Dicentrarchus labrax</i>, L. 1758	134
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	134
3.1.1 Βακτηριακές, νόσοι, εμβόλια και προβιοτικά βακτήρια	134
3.1.2 Μέθοδοι εμβολιασμού	136
3.1.3 Σύνοψη-Σκοπός	138
3.2 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	138
3.2.1 Περιοχή μελέτης (ΒΑ Κεφαλονιά-Όρμος Κακογκύλου)	138
3.2.2 Χορηγούμενη τροφή	139
3.2.3 Εμπορικά εμβόλια	139
3.2.4 Εμβολιασμός ομάδων ψαριών μελέτης-Περιγραφή της μεθόδου	141
3.2.4.1 Χειμερινός εμβολιασμός	143
3.2.5 Βακτήρια	143
3.2.6 Μεταφορά ψαριών	145
3.2.7 Προσδιορισμός του Lethal Dose (LD ₅₀₋₇₀)	145

3.2.8 Συλλογή στοιχείων φυσικής θνησιμότητας στο πεδίο του πειραματικού πληθυσμού	146
3.2.9 Έλεγχος της αποτελεσματικότητας <i>in vitro</i> μετά από πειραματικές μολύνσεις	146
3.2.10 Μεθοδολογία επεξεργασίας και χρώσης ιστολογικών δειγμάτων και αξιολόγηση παρενεργειών που προκαλούνται στα ψάρια από τα εμβόλια	152
3.2.11 Συλλογή αίματος-Απομόνωση ορού αίματος	154
3.2.12 Ανάλυση της Χυμικής ανοσολογικής αντίδρασης	156
3.2.13 Υπολογισμοί αποτελεσματικότητας εμβολίων, αναπτυξιακών δεικτών και στατιστική επεξεργασία	158
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	161
3.3.1 Φυσικοχημικές παράμετροι του νερού των ενυδρείων που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα	161
3.3.2 Ανάλυση δεδομένων θνησιμότητας των εμβολιασμένων ψαριών και των μη εμβολιασμένων	163
3.3.3 Προσδιορισμός του LD ₅₀₋₇₀	166
3.3.4 Πειραματικές μολύνσεις με <i>L. anguillarum</i> & <i>Photobacterium damsela</i> sbsp. <i>piscicida</i> και αξιολόγηση της προστασίας που παρέχεται από τα εμβόλια στις εμβολιασμένες ομάδες ψαριών	168
3.3.4.1 Ανάλυση δεδομένων πειραματικών μολύνσεων με <i>L. (Vibrio) anguillarum</i>	174
3.3.4.2 Ειδική ανοσολογική απόκριση (<i>L. anguillarum</i>)	175
3.3.4.3 Ανάλυση δεδομένων πειραματικών μολύνσεων με <i>Photobacterium damsela</i> sbsp. <i>piscicida</i>	181
3.3.4.4 Ειδική ανοσολογική απόκριση (<i>Photobacterium damsela</i> sbsp. <i>piscicida</i>)	182
3.3.5 Παρενέργειες της μόλυνσης-Μακροσκοπική αξιολόγηση της εξωτερικής κατάστασης και της κοιλιακής κοιλότητας των ψαριών	183
3.3.6 Ανάλυση δεδομένων ανάπτυξης ψαριών	191
3.3.6.1 Στατιστική ανάλυση ανάπτυξης ψαριών	195
3.3.7 Ειδικός Ρυθμός Αύξησης (SGR) και Συντελεστής Μετατρεψιμότητας Τροφής (FCR)	197
3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	204
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	214
4.1 Διεθνής βιβλιογραφία	214
4.2 Ελληνική βιβλιογραφία	235
4.3 Διαδικτυακές βιβλιογραφικές πηγές	237
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	238
Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά	239
Εργασίες που ανακοινώθηκαν σε διεθνή επιστημονικά συνέδρια με κριτές	260
Εργασίες που ανακοινώθηκαν σε πανελλήνια επιστημονικά συνέδρια με κριτές	274

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η αγάπη μου για την θάλασσα σε συνδυασμό με την επιστήμη την οποία σπούδασα, με ταξίδευσαν στη γνώση για τον θαλάσσιο κόσμο. Αποκτώντας στη διάρκεια των σπουδών μου γνώσεις και δεξιότητες, βλέπω, παρατηρώ και αντιλαμβάνομαι πολύ διαφορετικά το θαλάσσιο περιβάλλον. Αισθάνομαι έτσι την ανάγκη να συνεισφέρω στη μελέτη και στη προστασία της θάλασσας και να προσφέρω με όλες μου τις δυνάμεις και τις γνώσεις μου στη διατήρηση του υπέροχου θαλάσσιου πλούτου. Θα ήθελα η αναζήτησή μου για τη γνώση και η ανακάλυψη νέων πολύτιμων πραγμάτων να είναι συνεχής και αδιάλειπτη.

Ευχαριστώ τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής για την αξιολόγηση της εργασίας μου και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους, καθώς και την Συμβουλευτική Επιτροπή της διατριβής μου.

Για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής απευθύνθηκα στον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Ωκεανογραφίας και Θαλασσιών Βιοεπιστημών (Τ.Ω.Θ.Β) του Πανεπιστημίου Αιγαίου κ. Βασίλη Μπακόπουλο, ο οποίος ανταποκρίθηκε θετικά και τον ευχαριστώ για την ανάθεση του θέματος, την εμπειριστατωμένη καθοδήγηση και την υποστήριξή του. Ο κ. Μπακόπουλος, ως επιβλέπων της εργασίας μου, μου έδειξε τον δρόμο έτσι ώστε να μπορέσω να καταφέρω να ολοκληρώσω τη διατριβή μου και να πετύχω το στόχο μου. Η καθοδήγησή του ήταν συνεχής και συστηματική, τόσο στο πειραματικό μέρος της διατριβής μου όσο και στο θεωρητικό.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή του Τ.Ω.Θ.Β κ. Δρόσο Κουτσούμπα, μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής, για τις επιστημονικές του συμβουλές και την ηθική του συμπαράσταση. Ο κ. Κουτσούμπας πιστεύοντας ότι μπορώ να καταφέρω να ξεκινήσω και να ολοκληρώσω την διατριβή μου, είναι ο Καθηγητής που με παρότρυνε και με βοήθησε να ξεκινήσω και να ζήσω το ταξίδι της δημιουργίας μέσω της διδακτορικής μου διατριβής. Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή του Τ.Ω.Θ.Β κ. Βασίλη Ζερβάκη ο οποίος είναι επίσης μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής.

Ευχαριστώ την εταιρεία «Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ» και ιδιαιτέρως τα στελέχη της, τον κ. Αθανάσιο Φρέντζο, τον κ. Δημήτρη Τρωιάνο, την κα Κατερίνα Κατσικά, την κα Εύη Αμπατζίδου, τον κ. Βαγγέλη Βολτέρα και την κα Αγγελική Λαδά. Στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας της εν λόγω εταιρείας πραγματοποιήθηκαν αρκετές διαδικασίες οι οποίες αναφέρονται στο 2^ο Κεφάλαιο της παρούσας διατριβής, καθώς επίσης και για την παροχή πολύ χρήσιμων δεδομένων και πληροφοριών απαραίτητων για την ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ τον κ. Κων/νο Ρασιιά ιδιοκτήτη και υπεύθυνο της εταιρείας «Ιχθυοκαλλιεργητική Ερύσσου Ε.Π.Ε.», στη μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας της οποίας πραγματοποιήθηκαν σημαντικές διαδικασίες του 3^{ου} Κεφαλαίου (πρόληψη ασθενειών) της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστώ την εταιρεία Aquavet A.E. για τη διάθεση εμβολίων και ιδιαιτέρως τους

συνεργάτες της κ. Αθανάσιο Πράπα (Ιχθυοπαθολόγο) και κ. Αθανάσιο Παπαπάσχο (Ιχθυολόγο ΤΕ) για την επιμέλεια της διαδικασίας των εμβολιασμών στη μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας που έγινε μέρος της διατριβής και αντλήθηκαν στοιχεία για το 3^ο Κεφάλαιο. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι ένα στέλεχος του *Listonella anguillarum* (ορότυπος O1) απομονώθηκε από το λαβράκι το 2013 στη Δυτική Ελλάδα και χορηγήθηκε από τον κ. Αθανάσιο Πράπα και ένα στέλεχος του *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* απομονώθηκε από το λαβράκι το 2012 στο νησί της Εύβοιας και χορηγήθηκε από τον Δρ Kantham Paranna (Νηρέυς Ιχθυοκαλλιέργειες Α.Ε.).

Θέλω να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή του ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας κ. Αλέξη Ράμφο και τον Καθηγητή κ. Γιώργο Κατσέλη για την βοήθειά τους σε κάποιες εργασίες πεδίου, για τη συλλογή περιβαλλοντικών παραμέτρων από τις περιοχές μελέτης, τη χαρτογράφηση των περιοχών αυτών και την επεξεργασία των δεδομένων. Τον κ. Κατσέλη τον ευχαριστώ επίσης για την βοήθειά του στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της διατριβής και για τις συμβουλές του στη στατιστική ανάλυση.

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τ.Ω.Θ.Β κ. Γεώργιο Κόκκορη για την πολύτιμη βοήθειά του στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων του 3^{ου} Κεφαλαίου της διατριβής και για τις συμβουλές του στη στατιστική ανάλυση.

Ευχαριστίες θέλω να δώσω στον κ. Άγγελο Δόριζα και στην κα Χαρά Καλαφάτη, πτυχιούχους του Τμήματος Επιστημών της Θάλασσας (μετονομάστηκε σε Τ.Ω.Θ.Β) που ως φοιτητές με βοήθησαν στο πρακτικό μέρος των πειραμάτων της διατριβής μου και στον Δρ Καρούσο Νικόλαο (Χημικό) για τις φωτομετρήσεις οπτικής πυκνότητας στα δείγματα μικροοργανισμών που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό του.

Ευχαριστώ όλους τους έγκριτους επιστήμονες με τους οποίους συνεργαστήκαμε στη δημιουργία δημοσιεύσεων σε επιστημονικά περιοδικά και ανακοινώσεων σε επιστημονικά συνέδρια και αφορούν στη διατριβή μου.

Τέλος, ευχαριστώ τη μητέρα μου Γιώτα στην οποία οφείλω ό,τι έχω καταφέρει μέχρι σήμερα, την κόρη μου Νάγια, τον αδελφό μου Κώστα και τη σύζυγό μου Βανέσσα, για την πολύτιμη βοήθειά τους και τη συμπαράστασή τους.

Ευθύμιος Χ. Σπίνος

Μυτιλήνη Φεβρουάριος 2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην Ελλάδα οι πιο σημαντικές βακτηριακές ασθένειες που πλήττουν τις ιχθυοκαλλιέργειες είναι η δονακίωση που προκαλείται από το βακτήριο *Listonella (Vibrio) anguillarum* και η φωτοβακτηριδίαση που προκαλείται από το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phdp) και το πιο ευαίσθητο ψάρι σε αυτές είναι το λαβράκι. Άλλη σημαντική ασθένεια είναι η ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια, που οφείλεται στη μόλυνση των ψαριών από Betanoda-ιούς και το χειμερινό σύνδρομο που σχετίζεται με τη μείωση της θερμοκρασίας τους χειμερινούς μήνες και είναι ασθένεια που προσβάλλει κυρίως την τσιπούρα.

Η διατριβή πραγματεύεται τη συσχέτιση της πιθανότητας εμφάνισης των τεσσάρων κυριότερων ασθενειών του εκτρεφόμενου λαβρακιού και της τσιπούρας με τις φυσικοχημικές παραμέτρους του θαλασσινού νερού δύο μονάδων ιχθυοκαλλιεργειών στον Κόλπο Αργοστολίου και συγκεκριμένα της θερμοκρασίας, της αλατότητας, του διαλυμένου οξυγόνου και του pH, χρησιμοποιώντας δεδομένα τέτοιων παραμέτρων και ασθενειών από το 2011 έως το 2015. Έχουν επίσης συμπεριληφθεί δεδομένα χρονοσειρών θρεπτικών αλάτων, χλωροφύλλης α, μικροβιολογικών παραμέτρων και δεδομένα διαχείρισης για το χρονικό διάστημα 1994-2013. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θνησιμότητα εξαιτίας της δονακίωσης σχετίζεται σημαντικά με τη μείωση του pH του νερού, η θνησιμότητα εξαιτίας της φωτοβακτηριδίασης σχετίζεται έντονα με την αύξηση της θερμοκρασίας και της αλατότητας του νερού, η θνησιμότητα από την ιογενή εγκεφαλοπάθεια-αμφιβληστροειδοπάθεια σχετίζεται ευθέως με μειούμενη θερμοκρασία μετά από αύξησή της και η θνησιμότητα από το χειμερινό σύνδρομο συμπίπτει με χαμηλές θερμοκρασίες. Η μείωση του διαλυμένου οξυγόνου λειτουργεί συνεργιστικά με τις άλλες παραμέτρους και πυροδοτεί την εμφάνιση και των τεσσάρων ασθενειών. Ο Κόλπος Αργοστολίου είναι ένα οικοσύστημα που κατατάσσεται από ολιγότροφο όταν η θερμοκρασία είναι υψηλή και μεσοτροφικό όταν είναι χαμηλή. Υπάρχει σχετικά έντονη παρουσία μικροοργανισμών στο νερό του Κόλπου Αργοστολίου που οφείλεται κυρίως σε αστικά λύματα. Οι υψηλές τιμές κολοβακτηριδίων σ' αυτό το παράκτιο οικοσύστημα δείχνουν ότι θα υπάρχουν και άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί οι οποίοι δυνητικά μπορεί υπό κατάλληλες συνθήκες να προκαλέσουν ασθένειες στα ψάρια.

Επίσης, μελετήθηκε η πρόληψη των ασθενειών του εκτρεφόμενου λαβρακιού μέσω εφαρμογής εμβολιασμών και σύγκρισης της αποτελεσματικότητας δύο ενέσιμων διδύναμων (*Vibrio* spp. & *Photobacterium*) εμπορικών εμβολίων (Alphaject 2000 και Aquanac) σε πραγματικές και πειραματικές, ελεγχόμενες συνθήκες (ενυδρεία), όσον αφορά στην προστασία από φυσικές και πειραματικές λοιμώξεις, στην ανοσοαπόκριση των ψαριών, στην ανάπτυξη συμφύσεων στην κοιλιακή κοιλότητα στο σημείο της έγχυσης και στην ανάπτυξη των ψαριών. Τα δύο εμπορικά εμβόλια που μελετήθηκαν προστατεύουν σημαντικά τα ψάρια έναντι των λοιμώξεων με *L. anguillarum* O1 και Phdp σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων (control). Από τα δύο εμπορικά εμβόλια που χρησιμοποιήθηκαν, το ελαιώδες ανοσοενισχυμένο (Alphaject 2000), φαίνεται να προσφέρει μεγαλύτερη προστασία σε σχέση με το υδατοδιαλυτό (Aquanac) και προκάλεσε την παραγωγή σημαντικά υψηλότερων ειδικών τίτλων αντισωμάτων έναντι των δύο παθογόνων και τα ευρήματα αυτά σχετίζονται με την παρατηρούμενη συνολική απόδοση αυτού του εμβολίου κατά τη διάρκεια των δοκιμών αποτελεσματικότητας. Οι ειδικοί τίτλοι αντισωμάτων έναντι του Phdp που προκαλούνται από τις δύο εμβολιασμένες ομάδες ήταν υψηλότεροι σε σύγκριση με τους ειδικούς τίτλους

αντισωμάτων έναντι του *L. anguillarum* O1. Το ανοσοενισχυμένο εμβόλιο προκάλεσε τοπικές παρενέργειες στο σημείο της κοιλιακής κοιλότητας που διοχετεύθηκε, ενώ το υδατοδιαλυτό προκάλεσε μόνο μία ήπια τοπική φλεγμονώδη αντίδραση. Τα εμβολιασμένα ψάρια που συμμετείχαν στα πειράματα εμφάνισαν καλύτερη ανάπτυξη σε σχέση με τα ψάρια μάρτυρες.

Ο ειδικός ρυθμός αύξησης (SGR) για ολόκληρη την πειραματική περίοδο ήταν χαμηλότερος για τις δύο ομάδες των ψαριών μαρτύρων (0,22 για το μικρό και 0,26 για το μεσαίο μέγεθος). Ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR), από έξι (6) συνολικά παρτίδες ψαριών (2 μεσαίου και 2 μικρού μεγέθους ψάρια για κάθε εμπορικό εμβόλιο και μεσαίου και μικρού μεγέθους ψάρια μάρτυρες) στα μεσαίου μεγέθους ψάρια που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο Aquanac ήταν χαμηλότερος (0,60), ενώ τα μικρού μεγέθους ψάρια που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο Aquanac (0,74), τα μικρού και μεσαίου μεγέθους ψάρια που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο Alphaject 2000 (0,82 και 0,74) και οι ομάδες με τα μικρού και μεσαίου μεγέθους ψάρια μάρτυρες (0,78 και 0,79) είχαν σχετικά υψηλό FCR.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι πρωτότυπη και θα συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση των οικοσυστημάτων στα οποία έλαβε χώρα, καθώς και στην πρόληψη προσβολής των εκτρεφόμενων ψαριών από τις σημαντικότερες ασθένειες.

ABSTRACT

In Greece, the most important bacterial diseases afflicting fish farms are Vibriosis caused by *Listonella (Vibrio) anguillarum* and photobacteriosis caused by the bacterium *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* (Phdp) and the most sensitive fish is seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). Another major illness is viral encephalopathy and retinopathy, which is due to infection from Betanoda viruses, and the winter syndrome associated with temperature decrease during winter months, a disease primarily affecting seabream (*Sparus aurata*, L.).

The PhD thesis investigates the correlation of the possibility of occurrence of four main diseases affecting seabass and/or seabream with physicochemical parameters of the seawater in two fish farms in the Argostoli Gulf, namely temperature, salinity, dissolved oxygen and pH, utilizing data for these parameters and disease outbreak data from 2011 to 2015. Data on time series of nutrients, chlorophyll a, microbiological parameters and management data for the period 1994-2013 have also been included. The results showed that the mortality due to vibriosis is significantly associated with the decrease of water pH, development of photobacteriosis is strongly related to the increase of water temperature and salinity, Viral Encephalopathy and Retinopathy (VER) mortality is directly related to decreasing temperature after its increase and mortality from winter syndrome (only in the unit at the Red Rock site due to different characteristics from the unit at the Livadi) coincides with low temperatures. The reduction in dissolved oxygen works synergistically with other parameters and triggers the onset of all four diseases. The Argostoli Gulf is an ecosystem that is ranked as oligotrophic when the temperature is high and as mesotrophic when the temperature is low. There is a relatively strong presence of microorganisms in the Gulf of Argostoli, mainly due to urban waste water. High coliform levels in this coastal ecosystem may indicate that there will be other pathogenic micro-organisms that can potentially cause fish diseases.

The PhD thesis also studies the prevention of diseases of sea bass by applying vaccinations and the comparison of the effectiveness of two injectable bivalent (*Vibrio* spp. & *Photobacterium*) commercial vaccines (Alphaject 2000 and Aquavac) in field and experimental, controlled conditions (aquariums), in terms of protection from natural and experimental infections, the immune response of fish, the development of adhesions in the abdominal cavity and fish growth. The two commercial vaccines studied protect significantly fish against *L. anguillarum* O1 and Phdp infections compared to the control group. Of the two commercial vaccines used, the oil adjuvanted (Alphaject 2000) appears to offer greater protection than the water-soluble (Aquavac) vaccine and caused the production of significantly higher specific antibody titers against the two pathogens. These findings are directly related to the observed overall performance of this vaccine during the efficacy trials. Specific antibody titers against Phdp induced by the two vaccinated groups were higher compared to the specific titers of antibodies against *L. anguillarum* O1. The oil adjuvanted vaccine caused local side effects at the site of injection in the abdominal cavity while the water-soluble vaccine caused only a mild local inflammatory reaction. The vaccinated fish that participated in the experiments showed better growth than the control fish.

Specific Growth Rate (SGR) for the entire experimental period was lower for the two control groups (0.22 for the small and 0.26 for the medium size). The Food Conversion rate (FCR) of six (6) fish batches (2 medium and 2 small fish for each commercial vaccine and medium

and small sized control fish) in the medium sized fish vaccinated with the Aquavac vaccine was lower (0.60), while small-sized fish vaccinated with the Aquavac vaccine (0.74), small and medium-sized fish vaccinated with the Alphaject 2000 vaccine (0.82 and 0.74), and the groups of small and medium-sized control fish (0.78 and 0.79) had a relatively high FCR.

This PhD thesis dissertation is original and will make a significant contribution to the understanding of the ecosystems in which it has taken place, as well as to preventing the most important diseases of farmed fish.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδατοκαλλιέργειες

Υδατοκαλλιέργεια είναι η εκτροφή υδρόβιων οργανισμών (ψαριών, μαλάκιων, καρκινοειδών, ζωοπλαγκτονικών και φυτοπλαγκτονικών οργανισμών, μακροφυκών και σκωλήκων) σε φυσικό ή ελεγχόμενο θαλάσσιο περιβάλλον ή σε εσωτερικά νερά. Ως προς τη στρατηγική επίτευξης και εφαρμογής των υδατοκαλλιεργειών, λαμβάνονται υπόψη το σύστημα παραγωγής, ο εκτρεφόμενος οργανισμός, η καταλληλότητα των νερών, της τοποθεσίας και το τροφικό επίπεδο του οικοσυστήματος, το οικονομικό όφελος και η κοινωνική προσφορά. Σημαντική θεμελιώδης αρχή των υδατοκαλλιεργειών είναι η επιλογή της βιολογικής βάσης, μέσα από την οποία εξασφαλίζεται η παραγωγή του σωστού προϊόντος, στην σωστή εποχή, στο κατάλληλο μέρος, με το χαμηλότερο κόστος και με την καλύτερη αξιοποίηση του διαθέσιμου νερού.

Ειδικότερα, Ιχθυοκαλλιέργεια είναι η εκτροφή ψαριών θαλάσσης και γλυκού νερού σε



Εικόνα 1.1 Ελληνική μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας (φωτογραφία Ε. Σπίνος).

ελεγχόμενο περιβάλλον και αποτελεί ένα σημαντικό τομέα της Αγροτικής Ανάπτυξης. Η Ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί έναν από τους πιο αποτελεσματικούς τομείς παραγωγής πρωτεΐνης υψηλής διατροφικής αξίας, χαμηλού κόστους και σε σύντομο χρονικό διάστημα. Στο πλαίσιο μιας ισορροπημένης διατροφής, μια κανονική κατανάλωση ψαριών, δηλαδή 1-2 φορές την εβδομάδα, ενδείκνυται σε όσους ακολουθούν μια διατροφή με χαμηλές θερμίδες αλλά και σε όποιον θέλει να ακολουθήσει

μια υγιεινή και σωστή διατροφή. Μελέτες που έγιναν σε πληθυσμούς με υψηλή κατανάλωση ιχθυελαίων αποκάλυψαν χαμηλά επίπεδα καρδιαγγειακών ασθενειών και άρχισαν να μελετώνται τα πλεονεκτήματα των ω_3 λιπαρών οξέων. Η κατανάλωση ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας, χάρη στο χαμηλό ποσοστό της χοληστερόλης και την παρουσία ω_3 -πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, που απουσιάζουν σε άλλους ζωικούς ιστούς, βοηθά στην καλή λειτουργία της καρδιάς, στη διατήρηση της φυσιολογικής πίεσης του αίματος και στη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων τριγλυκεριδίων στο αίμα.

Οι υδατοκαλλιέργειες (εικόνα 1.1) αποτελούν έναν τομέα με συνεχή και σταθερή ανάπτυξη παγκοσμίως. Η υδατοκαλλιέργεια συμβάλλει στο 50% των ψαριών που καταναλώνονται παγκοσμίως (FAO 2008), αποτελεί έναν τομέα που έχει μια σταθερή αύξηση από τη δεκαετία του '50 (FAO 2006) και εκτιμάται ότι μέχρι το 2030 θα προσφέρει τα περισσότερα από τα αλιεύματα που απαιτούνται για κατανάλωση από τον άνθρωπο (FAO 2004). Τα προϊόντα της ιχθυοκαλλιέργειας αποτελούν εναλλακτική πηγή τροφής σε σχέση με τα φυσικά αλιεύματα των λιμνών και των θαλασσών και εργαλείο αλιευτικής διαχείρισης, αφού είναι δυνατή η χρησιμοποίηση μεγάλης ποικιλίας τεχνολογιών με τις οποίες επιδιώκεται ο έλεγχος των

παραγόντων του περιβάλλοντος και η βέλτιστη ποιότητα του προϊόντος (FAO 2008).

Η θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια κυριαρχείται από τον σολωμό (*Salmo salar*) με τις μεγαλύτερες παραγωγούς χώρες να είναι η Νορβηγία, η Χιλή, η Μ. Βρετανία, ο Καναδάς και η Ιρλανδία. Άλλα σημαντικά οικονομικά είδη καλλιεργούμενων ψαριών είναι η τσιπούρα (*Sparus aurata*), το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και το καλκάνι (*Scophthalmus maximus*) σε χώρες όπως η Ελλάδα, η Ιταλία, η Γαλλία, η Ισπανία και η Πορτογαλία και τα είδη *Seriola quinqueradiata*, *Plecoglossus altivelis*, *Paralichthys olivaceus* και *Pagrus major* στην Ιαπωνία (Toranzo et al. 2005).

1.2 Οι ιχθυοκαλλιέργειες στη Μεσόγειο θάλασσα

Η σύγχρονη ιχθυοκαλλιέργεια στην Μεσόγειο ξεκίνησε τη δεκαετία του 1980 με την καλλιέργεια του λαβρακιού και της τσιπούρας, μετά από σημαντικές ανακαλύψεις στον κύκλο ζωής αυτών των ειδών. Ο κλάδος υιοθέτησε την τεχνολογία πάχυνσης σε κλωβούς δανειζόμενος τεχνολογία από την υδατοκαλλιέργεια του σολομού. Υποστηρίχθηκε και αναπτύχθηκε με σημαντική έρευνα, κυρίως στους τομείς της αναπαραγωγής, της καλλιέργειας νυμφών, της παρασκευής ιχθυοτροφών, της θεραπείας και πρόληψης ασθενειών και της θαλάσσιας μηχανικής. Σήμερα στη Μεσόγειο ο κλάδος παράγει πάνω από 300.000 τόνους έναντι μερικών χιλιάδων τόνων πριν 25 χρόνια (Νηρεύς Ιχθυοκαλλιέργειες 2017).

Η μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια επικεντρώνεται στην καλλιέργεια δημοφιλών σαρκοφάγων ψαριών, όπως το λαβράκι και η τσιπούρα, τα οποία είτε αλιεύονται σε μικρές ποσότητες ή είναι υπερ-αλιευμένα. Αν και η παραγωγή του λαβρακιού και της τσιπούρας αποτελεί περίπου το 95% της συνολικής παραγωγής, η καλλιέργεια των νέων παρεμφερών ειδών (φαγκρί, μυτάκι, κρانيός) κερδίζει έδαφος. Η Ελλάδα είναι η βασική χώρα παραγωγός μεσογειακών ψαριών και διατηρεί σταθερά μερίδιο περίπου 40% της παγκόσμιας παραγωγής. Το 30% περίπου της παραγωγής λαμβάνει χώρα στην Τουρκία, ενώ η παραγωγή του υπόλοιπου 30% σε άλλες μεσογειακές χώρες. Ο κλάδος της μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας και η σημαντική του ανάπτυξη έχουν επιφέρει αξιόλογα αποτελέσματα τόσο στην παραγωγή εγχώριων, νωπών, φθηνών και υψηλής ποιότητας ψαριών, όσο και στη δημιουργία μιας κοινωνικο-οικονομικής δομής που άμεσα και έμμεσα περιλαμβάνει χιλιάδες εργαζόμενους, κυρίως σε περιοχές που εξαρτώνται από την αλιεία. Επιπλέον, η θαλασσοκαλλιέργεια είναι η μοναδική παραγωγική δραστηριότητα που έχει εποικίσει ακατοίκητα νησιά και βραχονησίδες τα οποία συνήθως αποκλείονται από άλλες επενδύσεις (Νηρεύς Ιχθυοκαλλιέργειες 2017).

1.3 Οι ιχθυοκαλλιέργειες στην Ελλάδα

Η Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια από τις αρχές της δεκαετίας του '90 γνώρισε μια σημαντική αύξηση, με την Ελλάδα να έχει ηγετική θέση το 2016 στην Ε.Ε., με παραγωγή περίπου 101.000 τόνους που εκπροσωπείται κυρίως από δύο είδη θαλάσσιων ιχθύων, την τσιπούρα (*S. aurata*) και το λαβράκι (*D. labrax*) (Σ.Ε.Θ. 2016).

Το επίτευγμα αυτό οφείλεται τόσο στην εδραίωση της ελληνικής τεχνολογίας στο χώρο της ιχθυοκαλλιέργειας όσο και στο ιδανικό περιβάλλον που παρέχουν η γεωμορφολογική δομή

και οι επικρατούσες φυσικοχημικές συνθήκες των ελληνικών θαλασσών. Επισημαίνεται δε ότι το 70% της εγχώριας παραγωγής ιχθυοκαλλιεργειών, εξάγεται στη δυτική Ευρώπη και κυρίως στην Ιταλία και στην Ισπανία (Smart 2001).

Η εκτροφή του λαβρακιού και της τσιπούρας ασκείται εντατικά σε χερσαίες εγκαταστάσεις, κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης και εκτροφής προνυμφών-νυμφών και της προπάχυνσης, και σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς, κατά τη διάρκεια της πάχυνσης. Γενικά, η υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα στην Ελλάδα αναπτύχθηκε αξιοποιώντας την εκτεταμένη ακτογραμμή της χώρας η οποία προσφέρει πολλές θέσεις που ενώ είναι προστατευμένες από τον κυματισμό, παρουσιάζουν αξιόλογη ανανέωση του νερού και καλή ποιότητα των βασικών περιβαλλοντικών παραμέτρων (Athanasopoulou & Bitchava 2010).

Στους Πίνακες 1.1 και 1.2 δίνονται στοιχεία των τελευταίων ετών της ελληνικής παραγωγής, για όλους τους υδρόβιους εκτρεφόμενους οργανισμούς και για τα είδη τσιπούρα και λαβράκι.

Πίνακας 1.1. Η ελληνική παραγωγή υδρόβιων εκτρεφόμενων οργανισμών 2011-2015 σε τόνους (Ελ Στατ. 2014, Ελ.Στατ. 2016).

Εκτρεφόμενα είδη – Παραγόμενα προϊόντα	2011 Ποσότητα (τν)	2012 Ποσότητα (τν)	2013 Ποσότητα (τν)	2014 Ποσότητα (τν)	2015 Ποσότητα (τν)
Κέφαλος	390,2	245,6	274,9	263,5	251,0
Λαβράκι	37.089,0	35.805,1	34.919,7	32.141,5	35.382,3
Μυλοκόπτι	1.122,8	524,9	308,3	461,9	525,4
Μυτάκι	202,2	347,4	255,1	530,3	202,2
Πέστροφα	2.388,9	1.967,5	2.014,5	1.611,4	1.758,7
Τσιπούρα	51.308,6	53.459,2	55.751,3	50.688,2	47.007,7
Φαγκρί	346,5	696,9	638,5	711,3	752,8
Χέλι	304,3	322,0	250,3	284,8	322,1
Λοιπά ψάρια	849,6	798,4	773,3	1.068,1	1.087,5
Μύδια	17.194,9	16.611,6	18.638,4	16.678,4	18.628,4
Λοιπά Οστρακοειδή/Καρκινοειδή	1,8	1,2	1,1	22,8	51,8
Υδρόβια φυτά-Φύκη (Σπιρουλίνα)	19,8	17,4	20,3	12,6	14,8
Αυγοτάραχο (Κέφαλου-Οξύρυγχου)	5,3	0,5	0,9	6,5	2,3
Γενικό Σύνολο	111.197,0	110.779,8	113.825,3	104.481,3	105.987,0

Πίνακας 1.2. Η ελληνική παραγωγή τσιπούρας-λαβρακιού 2010-2016 σε τόνους (Σ.Ε.Θ. 2016).

Είδος ψαριού	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Τσιπούρα	74.000	63.000	75.000	71.000	71.000	65.000	58.000
Λαβράκι	45.000	45.000	43.000	45.000	42.000	45.000	43.000
Σύνολο	119.000	108.000	118.000	116.000	113.000	110.000	101.000

Το έτος 2016 η παραγωγή παρουσίασε μικρή μείωση σε σχέση με το 2015, κυρίως λόγω της μειωμένης παραγωγής γόνου που προηγήθηκε και κυμάνθηκε μεταξύ 100.000 - 105.000 τόνων. Η συνεχώς αυξανόμενη σημασία των υδατοκαλλιεργειών στην Ελλάδα, αποδίδεται στους ακόλουθους παράγοντες, στη μείωση των ειδών της συλλεκτικής αλιείας λόγω της ρύπανσης-μόλυνσης των υδάτων, της υπεραλίευσης και του αυξανόμενου κόστους

καυσίμων, στην εντυπωσιακή εξέλιξη της τεχνολογίας εκτροφής στα διάφορα είδη οργανισμών, μετά τον 2^ο Παγκόσμιο Πόλεμο και στη λύση που αποτελεί η ιχθυοκαλλιέργεια για την ικανοποίηση της αυξανόμενης τα τελευταία χρόνια ζήτησης αλιευμάτων.

1.4 Οι ιχθυοκαλλιέργειες στην Κεφαλονιά

Στο νομό Κεφαλονιάς δραστηριοποιούνται 25 περίπου μονάδες εκτροφής θαλάσσιων μεσογειακών ψαριών (κυρίως λαβρακιού και τσιπούρας) σε πλωτούς κλωβούς. Οι περισσότερες μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας βρίσκονται στις Εχινάδες νήσους οι οποίες ανήκουν διοικητικά στο νομό Κεφαλληνίας (Κεφαλονιά και Ιθάκη). Από αυτές, οι μονάδες δύο εταιρειών «Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ» και «Ιχθυοτροφεία Σάμης ΕΠΕ» είναι εγκατεστημένες και λειτουργούν στον Κόλπο Αργοστολίου και μία μονάδα στη ΒΑ Κεφαλονιά στον Όρμο Κακογκύλου της εταιρείας «Ιχθυοκαλλιεργητική Ερύσσου ΕΠΕ». Επίσης λειτουργούν στο νομό Κεφ/νιάς & Ιθάκης ένας ιχθυογεννητικός σταθμός που έχει δυναμικότητα 5.000.000 ιχθύδια/έτος (κυρίως λαβρακιού και τσιπούρας) και 2 συσκευαστήρια ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας. Ο Νομός Κεφαλληνίας κατέχει μια από τις πρώτες θέσεις στην Ελλάδα σε αριθμό πλωτών μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας, ετήσια δυναμικότητα και μισθωμένη θαλάσσια έκταση.

1.5 Οικολογία και Βιολογία των πιο σημαντικών εκτρεφόμενων θαλάσσιων ιχθύων στην Ελλάδα

Dicentrarchus labrax, L. 1758

Τα ενήλικα άτομα του είδους *Dicentrarchus labrax*, L. 1758 είναι βενθοπελαγικά, ζουν σε παράκτια νερά μέχρι 100 m βάθος, αλλά πιο συχνά σε ρηχά νερά (Lloris 2002, Bauchot 2003). Έχει βρεθεί σε παραλίμνιες ζώνες σε διάφορα είδη πυθμένων σε εκβολές ποταμών, σε λιμνοθάλασσες και περιστασιακά ποτάμια. Έχει προτίμηση σε ιλυοαμμώδεις πυθμένες, κοντά σε ανθρωπογενείς δραστηριότητες, γιατί σε αυτές τις περιοχές βρίσκει τους κατάλληλους για τη διατροφή του βενθικούς οργανισμούς. Μπαίνουν στα παράκτια ύδατα και εκβολές ποταμών το καλοκαίρι, αλλά μεταναστεύουν βαθύτερα όταν είναι ψυχρότερες οι καιρικές συνθήκες και μετακινούνται σε βαθιά νερά κατά τη διάρκεια του χειμώνα σε βόρεια γεωγραφικά πλάτη. Τα νερά λαβράκια ζουν κοπαδιαστά, αλλά τα ενήλικα φαίνεται να είναι περισσότερο μοναχικά (Frimodt 1995).

Το λαβράκι εξαπλώνεται στον ανατολικό Ατλαντικό, από τη Νορβηγία έως το Μαρόκο, στα Κανάρια Νησιά και τη Σενεγάλη, στη Μεσόγειο και στη Μαύρη Θάλασσα. Δεν έχει αναφερθεί η παρουσία και η εξάπλωσή του, στη Θάλασσα Μπάρεντς, στη Βαλτική και στην Κασπία Θάλασσα (Kottelat & Freyhof 2007). Γενικά είναι είδος ευρύθερμο με μεγάλο εύρος επιβίωσης σε θερμοκρασίες 8-30°C, ευρύαλο (με δυνατότητα προσαρμογής των μεγάλων ατόμων και σε γλυκά νερά), ενώ προτιμά να κινείται σε νερά με pH 7,8-8,3 και πάντα σε κορεσμένο διαλυμένο οξυγόνο. Ως θερμοκρασία βέλτιστης ανάπτυξης θεωρείται αυτή των 22°C. Προτιμά να ζει σε υφάλμυρα, παράκτια ύδατα, σε εκβολές ποταμών και λιμνοθάλασσες.

Η ταξινομική σειρά του λαβρακιού έχει ως εξής (Kirkoudis et al. 2001): Υπερβασιλείο: *Eukaryota*, Φύλο : *Chordota*, Κλάση: *Actinopterygii*, Σειρά: *Perciformes*, Οικογένεια:

Moronidae, Γένος : *Dicentrarchus*, Είδος: *Dicentrarchus labrax*.

Το λαβράκι είναι ψάρι μεσαίου έως μεγάλου μεγέθους με μήκος που φθάνει γύρω στα 50cm (μπορεί να φτάσει και τα 100cm) και σώμα επίμηκες. Το μέγιστο μέγεθος που μπορούν να αποκτήσουν είναι 103cm, μέγιστο βάρος 12 kg και μέγιστη ηλικία 15 χρόνια. Το στόμα του είναι αιχμηρό προεξέχοντας ελαφρώς, το ραχιαίο πτερύγιο είναι διπλό ενώ το ουραίο μέτρια διχαλωτό, η πλευρική γραμμή είναι εκτεταμένη αλλά δεν εκτείνεται μέχρι την ουρά και το βραγχιακό επικάλυμμα αποτελείται από δύο πλατιά οστά (Tortonese 1986).

Το λαβράκι ανήκει στην κατηγορία των αρπακτικών και τρέφεται με σχετικά μεγάλο μεγέθους κινούμενους οργανισμούς. Η διατροφή του είναι ευκαιριακή (τρέφεται με μεγάλο πλήθος ειδών από τα επιφανειακά νερά έως τα μεσόνερα και τον πυθμένα), ενώ η εξαιρετική αδηφαγία του δεν το εμποδίζει να αρπάξει όποια τροφή βρει μπροστά του ακόμη και αν έχει ήδη καταναλώσει μεγάλη ποσότητα τροφής. Τα βασικά του θηράματα είναι τα καβούρια (δεκάποδα, βραχύουρα, καρκινοειδή), τα χέλια της άμμου, άλλα μικρά ψάρια, οι γαρίδες (δεκάποδα, μακρούρα καρκινοειδή), ενώ μικρότερης σημασίας είναι οι δακτυλιοσκώληκες και τα μαλάκια. Τρέφονται με γαρίδες, μαλάκια και ψάρια (Tortonese 1986). Τα νεαρά λαβράκια τρέφονται με ασπόνδυλα, κυνηγώντας περισσότερο μικρά ψάρια όσο αυξάνεται η ηλικία τους (Muus & Nielsen 1999). Είναι γονοχωριστικό είδος και η ωοτοκία του λαμβάνει χώρα την άνοιξη κοντά στα βρετανικά νησιά και νωρίτερα τους μήνες Δεκέμβριο-Ιανουάριο στα νότια (Μεσόγειος θάλασσα) και τα αυγά τους είναι πελαγικά (Muus & Nielsen 1999). Η σεξουαλική ωριμότητα αναπτύσσεται στα αρσενικά 2 ετών (23-30cm), ενώ στα θηλυκά στα 3 έτη (31-40 cm) (Κλαουδάτος & Αποστολόπουλος 1984).

***Sparus aurata*, L. 1758**

Η τσιπούρα και τα άλλα είδη της οικογένειας στην οποία ανήκει, σχηματίζουν από μορφολογική άποψη ένα αρκετά ομοιογενές σύνολο ειδών που χαρακτηρίζεται από ένα υψηλό και συμπιεσμένο πλευρικά σώμα, μεγάλα κτενοειδή λέπια, ένα μοναδικό ραχιαίο πτερύγιο αποτελούμενο εν μέρει από ακαθώδεις ακτίνες και ένα διχαλωτό ουραίο πτερύγιο. Το στόμα τους είναι ελαφρώς προεκτεινόμενο και τα δόντια τους ανόμοια, προσαρμοσμένα για σαρκοφαγία (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Εξαπλώνεται στον ανατολικό Ατλαντικό, από τις Βρετανικές Νήσους, στο στενό του Γιβραλτάρ μέχρι το Πράσινο Ακρωτήριο και γύρω από τις Κανάριες Νήσους. Επίσης, εξαπλώνεται σε όλη τη Μεσόγειο και στη Μαύρη Θάλασσα. Ζει σε πεδία με ομαλό και αμμώδη πυθμένα, συνήθως σε βάθη 30 m, ενώ τα ενήλικα μπορεί να εμφανιστούν σε βάθος μέχρι 150 m. Είναι είδος μοναχικό που ζει όμως και σε μικρές συγκεντρώσεις. Την άνοιξη, εμφανίζεται συχνά σε παράκτιες λιμνοθάλασσες και εκβολές ποταμών. Είναι κυρίως σαρκοφάγο και σπάνια φυτοφάγο. Τρέφεται με όστρακα, συμπεριλαμβανομένων μυδιών και στρειδιών. Η τσιπούρα είναι ένα από τα σημαντικότερα εκτρεφόμενα ευρύαλα ψάρια (www.fishbase.org, διαπίστωση 2017).

Η ταξινομική σειρά της τσιπούρας έχει ως εξής: Υπερβασίλειο: *Eukaryota*, Φύλο : *Chordota* Κλάση: *Actinopterygii*, Σειρά: *Perciformes*, Οικογένεια: *Sparidae*, Γένος: *Sparus*, Είδος: *Sparus aurata*.

Είναι είδος ερμαφρόδιτο με τα αρσενικά να γίνονται θηλυκά σε ηλικία περίπου 3 ετών. Πρωτανδρικό ερμαφρόδιτο είδος, που ωριμάζει αρχικά ως αρσενικό (κατά το πρώτο ή το δεύτερο έτος της ηλικίας) και μετά το δεύτερο ή τρίτο έτος, ως θηλυκό. Η αναπαραγωγή

συμβαίνει γενικά από τον Οκτώβριο έως τον Δεκέμβριο, με αλληλουχίες αναπαραγωγής κατά τη διάρκεια ολόκληρης της περιόδου. Η επώαση των αυγών διαρκεί περίπου 2 ημέρες στους 16-17°C. Τα στάδια των προνυμφών διαρκούν περίπου 50 ημέρες στους 17,5°C ή περίπου 43 ημέρες στους 20°C. Το μέγεθος του αυγού κυμαίνεται από 0,9-1,1 mm και το ολικό μήκος των προνυμφών κατά την εκκόλαψη κυμαίνεται από 2,5-3,0 mm (www.fishbase.org, διαπίστωση 2017).

1.6 Μονάδες πάχυνσης θαλάσσιων ιχθύων σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς

Εκτροφή

Σε μονάδες πάχυνσης ιχθύων σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς στη θάλασσα, οι τελικές ιχθυοφορτίσεις κυμαίνονται συνήθως στα 20-25 kg/m³. Ο προσδιορισμός του μέσου εμπορεύσιμου μεγέθους των ψαριών κατά τον προγραμματισμό της παραγωγής οδηγεί σε μικρότερες ή μεγαλύτερες τελικές ιχθυοφορτίσεις.

Η πάχυνση στα κλουβιά αρχίζει από μέσο μέγεθος που κυμαίνεται από 1-10 g και ολοκληρώνεται όταν τα ψάρια αποκτήσουν εμπορεύσιμο μέγεθος, δηλαδή τα 300-400 g. Η μέση διάρκεια αυτού του σταδίου εξαρτάται από:

- Το μέσο μέγεθος των ιχθυδίων στην έναρξη της εκτροφής.
- Την εποχή εκκίνησης της εκτροφής.
- Το θερμοκρασιακό προφίλ της θαλάσσιας περιοχής κατά τη διάρκεια του έτους.

Για να φτάσει το λαβράκι στο εμπορεύσιμο μέγεθος χρειάζεται από 16-22 περίπου μήνες (Κλαδάς 1999).

Ιχθυοπυκνότητα

Η διαχείριση των κλωβών όσον αφορά την ιχθυοπυκνότητά τους, γίνεται αφ'ενός με τις αραιώσεις των πληθυσμών και αφ'ετέρου με τις διαλογές και τις ανακατατάξεις των μεγεθών που υφίστανται οι πληθυσμοί μία με δύο φορές κατά την διάρκεια της εκτροφής. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ομοιογενοποίηση των πληθυσμών για την ευκολότερη ιχθυοοικονομική τους διαχείριση (τάϊσμα, μείωση επιθετικών συμπεριφορών, παρακολούθηση της ανάπτυξης, ομοιόμορφη διακύμανση βάρους κ.λπ.).

Ο αριθμός ψαριών ανά m³ είναι ανάλογος με το μέγεθος των ψαριών, την διαθέσιμη χωρητικότητα των ιχθυοκλωβών και το πρόγραμμα εκτροφής. Οι συνηθισμένες ιχθυοφορτίσεις παρατίθενται στον Πίνακα 1.3 (Χώτος & Ρογδάκης, 1992):

Πίνακας 1.3. Ιχθυοφόρτιση (πυκνότητα) εκτροφής (Χώτος & Ρογδάκης, 1992).

Μέσο Βάρος ψαριών (g)	Ιχθυοφόρτιση άτομα/m ³
1-20	250-350
μέχρι 100	100-120
120 και άνω	45-60

Διατροφή

Στις μεσογειακές ιχθυοκαλλιέργειες χρησιμοποιούνται αποκλειστικά αποξηραμένες (ξηρές) ιχθυοτροφές με τη μορφή συμπήκτων (pellets). Ωστόσο στους ιχθυοκλωβούς συχνά φιλοξενούνται μεγάλα ψάρια, τα οποία πρόκειται να χρησιμοποιηθούν αργότερα ως γεννήτορες σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς και έτσι ένα μέρος της διατροφής τους αποτελείται από νωπές τροφές.

Μετατρεψιμότητα της τροφής σε βιομάζα

Η μετατρεψιμότητα της τροφής σε βιομάζα ψαριού μετριέται με τον συντελεστή μετατρεψιμότητας ο οποίος ορίζεται ως η ποσότητα της καταναλωθείσας τροφής σε kg (ξηρό βάρος), η οποία χρησίμευσε για να παραχθεί 1 kg ψαριού (νωπό βάρος). Ο συντελεστής αυτός εξαρτάται από:

- το εκτρεφόμενο είδος
- το στάδιο ανάπτυξης του ψαριού και γενικότερα τη φυσιολογική του κατάσταση,
- τη θερμοκρασία του νερού η οποία καθορίζει την μεταβολική δραστηριότητα του οργανισμού,
- την ποιότητα της τροφής
- τον τρόπο ταΐσματος.

Ο συντελεστής μετατρεψιμότητας κυμαίνεται από 1 (1kg τροφής : 1kg βιομάζας) για τα μικρά μεγέθη ψαριών, και για τα μεγάλα μεγέθη έως 2,5 (2,5kg τροφής : 1kg βιομάζας) (Κλαδάς 1999).

1.7 Επιδράσεις της λειτουργίας των υδατοκαλλιεργειών στην ίδια την εκτροφή και στο θαλάσσιο περιβάλλον

Οι επιδράσεις που μπορεί να εντοπιστούν μετά την εγκατάσταση μονάδας υδατοκαλλιέργειας σε μια περιοχή σχετίζονται με τη γενική κυκλοφορία των υδάτων μέσα στις εγκαταστάσεις από και προς το περιβάλλον. Επίσης τα δίκτυα φράσσονται και παρατηρείται μείωση της ταχύτητας του ρεύματος μέσα στους κλωβούς. Υπάρχει πιθανότητα πρόκλησης αύξησης του τροφικού επιπέδου των παράκτιων περιοχών λόγω αυξημένης συγκέντρωσης αζώτου και φωσφόρου εξαιτίας συσσώρευσης οργανικής ύλης από περιπτώματα των ψαριών και υπολείμματα της τροφής στη στήλη του νερού και στον πυθμένα τα οποία προσλαμβάνονται από το φυτοπλαγκτόν με αποτέλεσμα σε ακραίες περιπτώσεις την εκρηκτική ανάπτυξή του. Η χρήση διάφορων χημικών ουσιών και σκευασμάτων, μπορεί να επιφέρει διαταραχή της βιολογικής ισορροπίας των οικοσυστημάτων. Εξάλλου, υπάρχει ο κίνδυνος αλλοίωσης του γενετικού υποβάθρου των άγριων ψαριών λόγω διαφυγής των εκτρεφόμενων ψαριών. Τέλος, αποτελεί επίπτωση όταν έχουμε εκτροφή διαφορετικών ειδών (αλλόχθονα-ξενικά) από τα ενδημικά της περιοχής, σε περίπτωση διαφυγής τους (Μπελιάς 2004).

Η εντατικοποίηση της υδατοκαλλιέργειας εμφάνισε προβλήματα που δεν είχαν παρατηρηθεί πριν και ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου ο στρατηγικός σχεδιασμός της ανάπτυξης απουσίαζε ή ήταν ανεπαρκής. Προβλήματα που αφορούν το φυσικό ή και το κοινωνικο-οικονομικό περιβάλλον εμφανίστηκαν σε διάφορες τέτοιες περιπτώσεις έτσι ώστε να αμφισβητείται έντονα η βιωσιμότητα, από περιβαλλοντική άποψη, των σήμερα εφαρμοζόμενων πρακτικών καλλιέργειας. Η εκτίμηση των επιπτώσεων των υδατοκαλλιεργειών στο περιβάλλον είναι

σημαντική όχι μόνο για την προστασία του περιβάλλοντος αλλά και για την προστασία της ίδιας της υδατοκαλλιεργητικής δραστηριότητας από ανεπιθύμητες αρνητικές επιπτώσεις που σχετίζονται με την υποβάθμιση της ποιότητας του περιβάλλοντος. Οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις είναι ποικίλες και αφορούν στη στήλη του νερού και στο ίζημα, τις επιδράσεις των χημικών και χημειοθεραπευτικών ουσιών, τις συνέπειες της μεταφοράς αποθεμάτων και παρασίτων στην βιοποικιλότητα και άλλες μικρότερης έκτασης επιπτώσεις. Σε κάθε περίπτωση οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις σχετίζονται με τα οικολογικά χαρακτηριστικά του τόπου εκτροφής και τον τύπο και την κλίμακα της υδατοκαλλιεργητικής δραστηριότητας (Καρακάσσης κ.α. 1998).

Η επίδραση των υδατοκαλλιεργειών στο περιβάλλον, είναι ένας πολύπλοκος μηχανισμός ο οποίος λαμβάνει χώρα στην παράκτια ζώνη. Λόγω των μικρών βαθών και των υψηλών θερμοκρασιών που παρατηρούνται κατά την θερινή περίοδο στην παράκτια ζώνη, υπάρχει μια φυσική ετήσια αλλοίωση της ποικιλότητας και της αφθονίας του φυτοβένθους. Η μαζική θανάτωση ειδών λόγω υψηλών θερμοκρασιών δημιουργεί ένα στρώμα νεκρής οργανικής ύλης το οποίο με την αποικοδόμησή του επηρεάζει σημαντικά και την βιοποικιλότητα και αφθονία του ζωοβένθους. Όταν σε αυτό τον μηχανισμό, προστεθούν οι ανθρώπινες δραστηριότητες στην παράκτια ζώνη (ιχθυοκαλλιέργεια, κτηνοτροφία, γεωργία), τότε έχουμε ενίσχυση του φαινομένου αυτού. Εάν όμως η ανανέωση των νερών είναι καλή και η επιλογή της θέσης σωστή, από άποψη ρευμάτων, κυματισμού και ανταλλαγής υδάτινων μαζών, τότε δεν παρατηρείται τέτοια σημαντική αλλοίωση στην ποικιλότητα και αφθονία του βένθους. Ένας μεγάλος αριθμός ειδών βακτηρίων υπάρχουν και αναπτύσσονται στο περιβάλλον των μονάδων και συμμετέχουν στην βιοχημική διαδικασία οξειδοαναγωγής των διαφόρων συστατικών (μεθάνιο, υδρόθειο, νιτρώδη, νιτρικά, άζωτο) (Κονίδης κ.α. 1999)

1.8 Μικροοργανισμοί του νερού-Μεταβολισμός

Το θαλασσινό νερό φέρει μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών. Οι περισσότεροι αποτελούν μέρος της φυσικής χλωρίδας του νερού. Άλλοι καταλήγουν στη θάλασσα μέσω φυσικών φαινομένων (βροχές, κατολισθήσεις κλπ) και άλλοι μέσω των ανθρώπινων δραστηριοτήτων (εκτροφή χερσαίων και υδρόβιων οργανισμών, απόβλητα, αστικά λύματα κλπ). Οι μικροοργανισμοί, όταν υπάρχουν κατάλληλες συνθήκες πολλαπλασιάζονται συνεχώς. Αν κάποια/ες από αυτές τις συνθήκες εκλείψει τότε συχνά παύουν να πολλαπλασιάζονται, μπορεί να πεθάνουν ενώ μερικοί από αυτούς μπορούν και επιβιώνουν, καθώς περιέρχονται σε λανθάνουσα κατάσταση κατά την οποία αναστέλλονται ή επιβραδύνονται σημαντικά οι μεταβολικές διεργασίες τους ή μπορούν να δημιουργήσουν σπόρια (ανθεκτικές μορφές βακτηρίων). Αν οι συνθήκες γίνουν και πάλι ευνοϊκές για τον μεταβολισμό τους τότε επαναδραστηριοποιούνται και πολλαπλασιάζονται. Σε αντίθετη περίπτωση αρχίζει η αποσύνθεση του κυττάρου τους και πεθαίνουν. Οι πιο βασικές προϋποθέσεις για τις μεταβολικές λειτουργίες και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών είναι οι εξής:

1) Οι μικροοργανισμοί για να ζήσουν έχουν ανάγκη από υγρασία. Η μόνη περίπτωση επιβίωσης χωρίς υγρασία είναι η παραγωγή σπορίων από ορισμένα βακτήρια, τα οποία λέγονται σπορογόνα. Τα σπόρια επιβιώνουν σε πολύ αντίξοες συνθήκες υγρασίας και βλαστάνουν όταν βρεθούν σε ευνοϊκό για την ζωή του βακτηρίου περιβάλλον. Σπορογόνα βακτήρια είναι τα γένη *Bacillus*, *Clostridium* και ορισμένα είδη *Actinomyces*. Έχουν

αναφερθεί πειράματα με το παθογόνο για τα ψάρια φωτοβακτηρίδιο *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*, στα οποία οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί εκτέθηκαν στην έλλειψη θρεπτικών ουσιών και παρατηρήθηκε ότι η μεταβολική δραστηριότητά τους μειώνεται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 80%. Τα κύτταρα που συμμετείχαν στα πειράματα διατήρησαν τη μολυσματικότητα και τις παθογόνες ιδιότητές τους για τα ψάρια ξενιστές (Magarinos et al. 1994a).

2) Για να τραφούν και να πολλαπλασιαστούν οι μικροοργανισμοί πρέπει στο περιβάλλον στο οποίο ζουν να διατίθενται πηγές άνθρακα και αζώτου, πηγές ενέργειας, ανόργανα ιόντα και αυξητικοί παράγοντες όπως βιταμίνες. Η αποδόμηση οργανικών ουσιών είναι η κύρια πηγή άνθρακα και αζώτου. Έτσι οι οργανικές ουσίες είναι η βάση της διατροφής τους. Οι μικροοργανισμοί ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο τρέφονται χωρίζονται στους αυτότροφους και στους ετερότροφους. Οι αυτότροφοι συνθέτουν οργανικές ουσίες από ανόργανες. Η σύνθεση των οργανικών αυτών ουσιών μπορεί να γίνει με φωτοσύνθεση όπου το φως είναι η πηγή ενέργειας και με χημειοσύνθεση δηλαδή με την χρήση ενέργειας από ανόργανες ουσίες. Οι ετερότροφοι είναι οι μικροοργανισμοί οι οποίοι χρησιμοποιούν έτοιμες οργανικές ουσίες από το περιβάλλον και σε αυτήν την κατηγορία υπάγονται και οι παθογόνοι μικροοργανισμοί.

3) Οι μικροοργανισμοί χωρίζονται σε αερόβιους, όταν το οξυγόνο είναι απαραίτητο στον μεταβολισμό τους και σε αναερόβιους όταν χρησιμοποιούν CO₂. Ενδιάμεση κατηγορία είναι οι μικροαερόφιλοι μικροοργανισμοί οι οποίοι χρειάζονται CO₂ και μικρή ποσότητα οξυγόνου. Κάποιοι μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονται ως προαιρετικά αναερόβιοι διότι έχουν την δυνατότητα να πολλαπλασιασθούν και σε απουσία οξυγόνου.

4) Ο κάθε μικροοργανισμός έχει μιά ευνοϊκή θερμοκρασία μεταβολικών λειτουργιών και πολλαπλασιασμού. Σε σχέση με αυτή την ευνοϊκή θερμοκρασία έχουμε 3 βασικούς τύπους μικροοργανισμών: τους ψυχρόφιλους, οι οποίοι ευνοούνται σε θερμοκρασίες 4-20°C, τους μεσόφιλους σε θερμοκρασίες 25-40°C (με πιά ευνοϊκή την θερμοκρασία των 37°C) και τους θερμόφιλους σε θερμοκρασίες 40-65°C. Οι κατηγορίες αυτές όμως δεν είναι πολύ σαφείς σε όλα τα είδη των μικροοργανισμών του νερού. Για παράδειγμα υπάρχουν μικροοργανισμοί οι οποίοι είναι ψυχρότροφοι δηλαδή είναι μεσόφιλοι, αλλά μπορούν να πολλαπλασιαστούν, με βραδύτερους ρυθμούς, και σε χαμηλές θερμοκρασίες. Αυτή η τελευταία κατηγορία έχει μεγάλη σημασία στη μικροβιολογία των τροφίμων.

Ανάλογα με την κατασκευή του κυττάρου τους οι μικροοργανισμοί χωρίζονται στους προκαρυωτικούς και στους ευκαρυωτικούς. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι μικροοργανισμοί οι οποίοι είναι μεγέθους <5μm με το γενετικό τους υλικό να μην περικλείεται από πυρηνική μεμβράνη. Μερικές φορές μέσα στο κύτταρό τους παρατηρείται επιπλέον γενετικό υλικό που ονομάζεται πλασμίδιο. Ο πολλαπλασιασμός αυτών των μικροοργανισμών γίνεται με διχοτόμηση και είναι τα βακτήρια, οι ακτινομύκητες και τα κυανοφύκη. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι μικροοργανισμοί οι οποίοι είναι μεγαλύτεροι, με κυτταρική δομή παρόμοια με των ανώτερων οργανισμών, το γενετικό τους υλικό περιβάλλεται από πυρηνική μεμβράνη, η αναπαραγωγή τους μπορεί να είναι εγγενής ή μη αγενής και ο κύκλος ζωής τους συχνά είναι πολύ σύνθετος. Σε αυτήν την κατηγορία περιλαμβάνονται οι μύκητες, τα φύκη και τα πρωτόζωα. Οι ιοί είναι μια ξεχωριστή κατηγορία μικροοργανισμών που δεν είναι ούτε προκαρυωτικοί ούτε ευκαρυωτικοί. Είναι υποχρεωτικοί ξενιστές των κυττάρων άλλων οργανισμών (Παπαπετροπούλου & Μαυρίδου 1995).

1.9 Περιβαλλοντικοί και διαχειριστικοί παράγοντες που προκαλούν ή προδιαθέτουν στην ανάπτυξη ασθενειών στα εκτρεφόμενα ψάρια

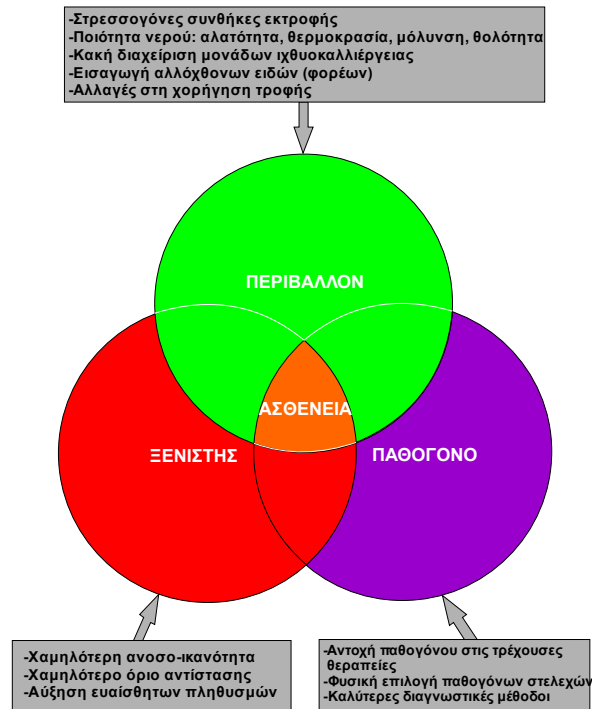
Η καλή βασική υγιεινή (ποιότητα νερού) και οι καλές πρακτικές διαχείρισης μιας μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας, μπορούν με επιτυχία να απομακρύνουν πολλά από τα προβλήματα που οφείλονται σε παθογόνα βακτήρια. Για την αντιμετώπιση τυχόν προβλημάτων που μπορεί να προκύψουν από παθογόνα βακτήρια των ψαριών που υπάρχουν στο περιβάλλον εκτροφής, οι επιχειρήσεις υδατοκαλλιέργειας πρέπει να επενδύσουν σε καλές πρακτικές διαχείρισης. Είναι ενδεδωμένη η χρήση γενετικά ανθεκτικού αποθέματος ψαριών. Παρόλα αυτά, στην εκτροφή ψαριών όπου επικρατούν περισσότερες από μία ασθένειες, δεν είναι απαραίτητο να ισχύει το ότι ένα στέλεχος ψαριών το οποίο είναι ανθεκτικό σε μία ασθένεια θα είναι το ίδιο ανθεκτικό και σε άλλες ασθένειες. Πάντως, ανθεκτικά στις ασθένειες στελέχη έχουν προοπτικές για χρήση σε περιοχές στις οποίες οι ασθένειες είναι ενδημικές (Austin & Austin 2007).

Όταν γίνεται διαχείριση των ψαριών πρέπει να υπάρχει ιδιαίτερη φροντίδα για την αποφυγή συνωστισμού και καταπόνησης γιατί από η καταπόνηση ακόμη και σύντομου χρονικού διαστήματος, όπως ο υπερπληθυσμός για λίγες ώρες, έχει αποδειχθεί βλαπτική στις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος (Ortuno et al. 2001). Πράγματι, οι Fast et al. (2008) έδειξαν με σαφήνεια την ύπαρξη καταπόνησης που δημιουργήθηκε από επαναλαμβανόμενο χειρισμό, η οποία είχε επιπτώσεις πάνω στη λευκοκυτταρική διέγερση και επιβίωση, μετά από έκθεση σε παθογόνα των ψαριών. Οι Varsamos et al. (2006) έδειξαν ότι νεαρά ιχθύδια λαβρακιού κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων ανάπτυξης, ερχόμενα αντιμέτωπα με καταπόνηση που σχετίζεται με την εκτροφή (καθαρισμός δεξαμενής, διακύμανση της θερμοκρασίας του νερού) παρουσίασαν χαμηλότερη αντίσταση σε ασθένειες και υψηλότερη θνησιμότητα. Πειραματική μόλυνση με ένα λοιμογόνο στέλεχος *Vibrio alginolyticus* είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά υψηλότερη θνησιμότητα σε γαρίδες υπό καταπόνηση σε σύγκριση με την ομάδα που δεν βρισκόταν υπό καταπόνηση. Γαρίδες που εκτέθηκαν σε σοβαρή υποξία για 24 ώρες είχαν σημαντική μείωση του αριθμού των συνολικών κυττάρων στο κυκλοφορικό τους σύστημα (Le Moullac et al. 1998).

Οι Ndong et al. (2007) έδειξαν μείωση της ικανότητας του ανοσοποιητικού συστήματος σε ψάρια που εκτέθηκαν σε καταπόνηση αλλαγής της θερμοκρασίας. Αυτή η μείωση είχε να κάνει με το συνολικό αριθμό λευκοκυττάρων, την αναπνευστική έκρηξη, τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα, τη δραστηριότητα της λυσοζύμης, την ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος και την αντίσταση σε βακτηριακή λοίμωξη. Ψάρια που εκτρέφονταν σε θερμοκρασία 23°C εμφάνισαν το καλύτερο προφίλ των παραμέτρων του αίματος και ήταν λιγότερο ευαίσθητα στην πρόκληση νόσου έναντι ιχθύων που εκτρέφονταν στους 17°C. Αυτό το αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι το λαβράκι έχει καλύτερη ανοσολογική απόκριση σε υψηλότερες θερμοκρασίες, αλλά σε κάθε περίπτωση, η μεταβολή της θερμοκρασίας δεν πρέπει να είναι γρήγορη. Επιπλέον, τα ψάρια που εκτρέφονται υπό σταθερές αλλά διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας επηρεάστηκαν λιγότερο από ασθένειες (Varsamos et al. 2006).

1.10 Ασθένειες ιχθύων

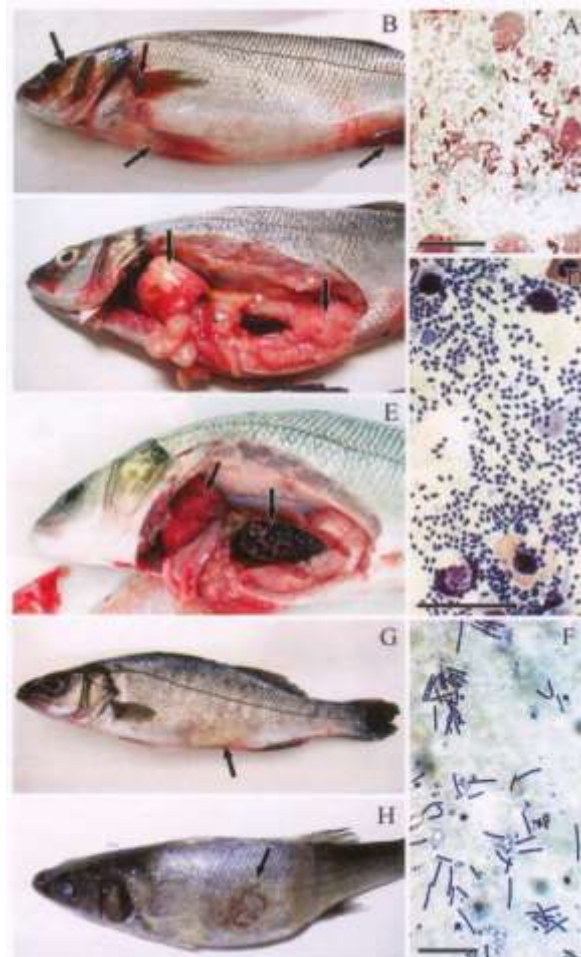
Για τα εκτρεφόμενα ψάρια, ο τύπος εκτροφής που χρησιμοποιείται επηρεάζει και επηρεάζεται άμεσα από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες του υδάτινου περιβάλλοντος στο οποίο διαβιούν με συνέπεια την εμφάνιση με μεγαλύτερη συχνότητα συγκεκριμένων ασθενειών (Σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1. Διάγραμμα με τους τρεις τύπους παραγόντων που εμπλέκονται σε μια ασθένεια. Για καθέναν από αυτούς ιδρούν πιθανοί διαμορφωτές (Sánchez Vázquez & Munoz Cueto 2014).

Η εντατικοποίηση των υδατοκαλλιεργειών έχει οδηγήσει στην εμφάνιση ασθενειών ποικίλης προελεύσεως. Αυτές μπορεί να οφείλονται σε μολυσματικούς ή μη μολυσματικούς παράγοντες. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που μπορεί να προκαλέσουν μολυσματικές ασθένειες στα ψάρια είναι ιοί, βακτήρια, μύκητες και παράσιτα (Athanasopoulou & Bitchava 2010). Η προσβολή των υδατοκαλλιεργειών από κάποια ασθένεια αποτελεί επίσης απειλή και για τα άγρια είδη της περιοχής της μονάδας εκτροφής (Terlizzi et al. 2012). Οι μη μολυσματικές ασθένειες οφείλονται σε αβιοτικά αίτια, όπως σε αντίξοες για τη ζωή φυσικοχημικές μεταβολές του νερού, σε διατροφικά αίτια και άλλα (Σχήμα 1.1).

Κάποιες ενδεικτικές ασθένειες των ιχθύων που εκτρέφονται στη Μεσόγειο είναι: ασθένειες που προκαλούνται από βακτήρια, όπως η Φωτοβακτηριδίαση, η Δονακίωση, η Μυξοβακτηριδίαση, ασθένειες που προκαλούνται από ιούς, όπως η Λεμφοκύστη, η Ιογενής Νευρική Νέκρωση (VNN) / Ιογενής Εγκεφαλοπάθεια και Αμφιβληστροειδοπάθεια (VER), ασθένειες που προκαλούνται από παράσιτα, όπως Επιθηλιοκύστη, Μυξιδίωση, διάφορα παράσιτα των βραγχίων κ.λπ. (Εικόνες 1.2, 1.3)



Εικόνα 1.2 Στην εικόνα 1.2 παρουσιάζονται μερικά από τα κύρια ευρήματα που οφείλονται σε βακτήρια στο λαβράκι. (A) Βάκιλλος του *L. anguillarum*, σε χρωματισμένο επίχρισμα, (B) εξωτερικά και (C) εσωτερικά τυπικά σημάδια δονακίωσης. Είναι εμφανείς οι αλλοιώσεις όπως στα πτερύγια (αιμορραγικά), στο κεφάλι (στο B), στο ήπαρ και στο πεπτικό σύστημα (στο C) (βέλη). (D) Βάκιλλος του *Rhdp* σε χρώση με κυανό του μεθυλενίου. (E) Εσωτερικά κλινικά σημάδια φωτοβακτηρίωσης, με τα τυπικά κιτρινωπά οζίδια στον σπλήνα και αιμορραγίες στο ήπαρ (βέλη). (F) Νηματοειδή βακτήρια *Tenacibaculum maritimum* σε χρώση με κυανό μεθυλενίου. (G-H) Εξωτερικές βλάβες και έλκη που είναι τυπικά του tenacibaculosis (βέλη). Μπάρες μέτρησης=10 μm (εικόνες από τους Sánchez Vázquez & Munoz Cueto 2014).



Εικόνα 1.3 Ευρήματα που οφείλονται σε βακτήρια (Α-Ε) και σε ιό (F-H) στο λαβράκι. Εξωτερικά (Α) και εσωτερικά (Β) κλινικά συμπτώματα Μυξοβακτηρίωσης, είναι εμφανή τα εξωτερικά τραύματα και τα έλκη (βέλη στο Α), καθώς και τα κοκκιώματα στον σπλήνα (βέλος στο Β). (C) Αποικίες *Mycobacterium marinum* που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό (άγαρ Lowenstein-Jensen), (Δ) κλινικά εσωτερικά συμπτώματα στρεπτόκοκκου, με εμφανείς αιμορραγίες στον πεπτικό σωλήνα (βέλη). (Ε) Εξωτερικές βλάβες Nocardiosis, με εμφανές το μεγάλο έλκος (βέλος). (F), Εξωτερικά (F) και εσωτερικά (G-H) κλινικά συμπτώματα, τα οποία είναι εμφανή στο κεφάλι (F, βέλος), στη νηκτική κύστη διάταση (H) και αιμορραγίες στον εγκέφαλο (G, βέλος) (εικόνες από τους Sánchez Vázquez & Munoz Cueto 2014).

1.10.1 Κυριότερες βακτηριακές ασθένειες των εκτρεφόμενων ψαριών

1.10.1.1 Δονακίωση προκαλούμενη από το *L. anguillarum*

Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από πολλά είδη του γένους *Vibrio*, καθώς και τα σχετικά γένη *Moritella* και *Photobacterium*, γνωστά ως δονάκια, μπορούν να επηρεάσουν πολλά καλλιεργούμενα και άγρια ψάρια σε θαλάσσια και γλυκά/υφάλμυρα ύδατα (Noga 2011). Ο ορότυπος του *L. anguillarum* που απομονώνεται συχνότερα στα μεσογειακά εκτρεφόμενα είδη ψαριών, είναι ο Ο1, ενώ ο ορότυπος Ο3 εμφανίζεται σε νύμφες λαβρακιού (Santos et al. 1995). Από τα είδη *Vibrio* προκαλείται η ασθένεια δονακίωση που προσβάλλει τα εκτρεφόμενα λαβράκια και την τσιπούρα. Το είδος *L. anguillarum*, είναι το πιο κοινό παθογόνο για τα ψάρια και προκαλεί θανατηφόρες ασθένειες σε περισσότερα από 50 είδη ψαριών (Trust 1986, Toranzo et al. 2005, Austin 2010). Είναι υπεύθυνο για οικονομικές απώλειες στις θαλάσσιες καλλιέργειες σε όλο τον κόσμο, ενώ το λαβράκι είναι το είδος που πλήττεται περισσότερο στα ύδατα της Μεσογείου. Στην πραγματικότητα, αυτό το βακτήριο προκαλεί

προβλήματα στην Ευρώπη από το 1977 στο καλλιεργούμενο λαβράκι, με τις υψηλότερες επιπτώσεις στην Τουρκία και την Ελλάδα. Το *L. anguillarum*, καθώς και άλλα παθογόνα βακτήρια, αυξάνονται ραγδαία σε θερμοκρασίες μεταξύ 25-30°C όπως καταγράφεται σε διάφορες προηγούμενες μελέτες θνησιμότητας (Sánchez Vázquez & Munoz Cueto 2014).

Με βάση την αλληλούχιση του 5S ριβοσωμικού RNA (rRNA), αυτό το βακτήριο ταξινομήθηκε εκ νέου ως *Listonella anguillarum*, αλλά ακόμη αναφέρεται ευρέως ως *Vibrio anguillarum* (MacDonell & Colwell 1984, Thompson et al. 2002) και αποτελεί μέρος της φυσιολογικής βακτηριακής χλωρίδας του νερού (Muroga et al. 1986). Σε ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να γίνει πολύ παθογόνο για τα ψάρια, επιβιώνοντας στο θαλασσινό νερό έως και 60 μήνες (Hoff 1989). Το *L. anguillarum* είναι ένα Gram (-) κινητό δονάκιο, με μορφή κόμματος, διαστάσεων 0,5–0,8 μm x 1,2-2,5 μm και η δυνατότητα κίνησής του οφείλεται σε ένα ή περισσότερα πολικά μαστίγια. Είναι προαιρετικά αναερόβιος οργανισμός, ζυμωτικός και θετικός για τα ένζυμα της οξειδάσης και της καταλάσης. Το *L. anguillarum* μπορεί να διαχωριστεί σε διαφορετικές ορολογικές ομάδες με ανοσολογικές μεθόδους που βασίζονται στα αντιγόνα του λιποπολυσακχαριδίου του. Έχουν περιγραφεί 23 ορότυποι (Naka et al. 2011), αλλά πιο συχνά απαντώνται οι ορότυποι O1, O2 και O3. Η λοιμικότητα και η ειδικότητα ξενιστή των βακτηρίων καθορίζεται από τον ορότυπό τους, με το λαβράκι και την τσιπούρα να μολύνονται συχνά από βακτήρια του ορότυπου O2, (Larsen et al. 1994). Ο μοριακός χαρακτηρισμός του ορότυπου O1 του *L. anguillarum* αποκάλυψε την παρουσία ενός πλασμιδίου (pJM1) (Crosa et al. 1977). Το πλασμίδιο pJM1 και όσα μοιάζουν με αυτό, κωδικοποιούν τη βιοσύνθεση και μεταφορά του σιδηροφόρου anguibactin το οποίο προσδίδει στο *L. anguillarum* την ικανότητα πρόσληψης ιόντων σιδήρου από υποστρώματα στα οποία ο σίδηρος βρίσκεται συνδεδεμένος είτε με transferrin, είτε με ethylenediamine-di(o-hydroxyphenyl-acetic acid), ή άλλα μόρια που δεσμεύουν σίδηρο (Di Lorenzo et al. 2003). Πλασμίδια έχουν επίσης ανιχνευθεί σε βακτήρια του ορότυπου O2 (Pedersen et al. 1999).

Παθογένεια

Ο κύριος μηχανισμός παθογένειας του *L. anguillarum* είναι η ικανότητά του να δεσμεύει σίδηρο από τους ιστούς των ψαριών, ο οποίος είναι σημαντικός για όλους τους ζώντες οργανισμούς. Στους ιστούς όμως είναι ισχυρά συνδεδεμένος με τρανσφεράσες και λακτοφεράσες έτσι ώστε η διαθεσιμότητα του ελεύθερου σιδήρου να είναι περιορισμένη. Για να μπορέσουν τα βακτήρια να πολλαπλασιαστούν σε έναν οργανισμό και να του προκαλέσουν ασθένεια, πρέπει να δεσμεύσουν τον σίδηρό του. Στο *L. anguillarum* αυτό το σύστημα πρόσληψης σιδήρου κωδικοποιείται κυρίως από το πλασμίδιο pJM1 (Tolmasky & Crosa 1990, 1991), το οποίο κωδικοποιεί τη βιοσύνθεση του σιδηροφόρου anguibactin και δεσμεύει αποτελεσματικά Fe^{3+} από τους ιστούς των ψαριών. Από το πλασμίδιο pJM1 κωδικοποιείται επίσης και ένα αποτελεσματικό σύστημα μεταφοράς του συμπλόκου anguibactin-Fe. Έχει παρατηρηθεί πολυμορφισμός σε αυτό το πλασμίδιο μεταξύ στελεχών του *L. anguillarum* του ορότυπου O1 (Olsen & Larsen 1990). Μερικά στελέχη *L. anguillarum* δεν φέρουν αυτό το πλασμίδιο, αλλά είναι και αυτά παθογόνα. Σε αυτά τα στελέχη το σύστημα πρόσληψης σιδήρου κωδικοποιείται σε χρωμοσωμικά γονίδια (Lemos et al. 1988, Conchas et al. 1991, Naka et al. 2011). Σε πρόσφατη μελέτη που έγινε χρησιμοποιώντας νεαρά άτομα λαβρακιού που μολύνθηκαν με ένα στέλεχος *L. anguillarum* που έφερε ένα πλασμίδιο που έμοιαζε με το pJM1 και ένα παράγωγο του στελέχους χωρίς πλασμίδιο, ο Teliousis (2011) συμπέρανε ότι η θνησιμότητα των νεαρών του λαβρακιού που μολύνθηκαν

με το στέλεχος του *L. anguillarum* δεν οφειλόταν αποκλειστικά στο παρόμοιο με το rJM1 πλασμίδιο. Ψάρια που μολύνθηκαν με το στέλεχος που δεν έφερε πλασμίδιο εμφάνισαν θνησιμότητα 2,5% σε σύγκριση με θνησιμότητα 87,5% που παρατηρήθηκε στα ψάρια που μολύνθηκαν με το φέρον πλασμίδιο. Τα νεαρά του λαβρακιού που μολύνθηκαν με το στέλεχος που δεν έφερε πλασμίδιο εμφάνισαν έντονες ενοχλήσεις του κυκλοφορικού και έντονη φλεγμονώδη αντίδραση, ενώ σπάνια παρατηρήθηκαν νεκρώσεις και αιμορραγίες (Angelidis 2014).

Τα στελέχη του ορότυπου O1 που δεν φέρουν το πλασμίδιο που μοιάζει με το rJM1 καθώς και τα στελέχη του ορότυπου O2, παράγουν ένα σιδηροφόρο που κωδικοποιείται από χρωμοσωμικά γονίδια καλούμενο *vanchrobactin* (Balado et al. 2009). Η παραγωγή του *vanchrobactin* είναι σημαντική για την ανάπτυξη σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου, αλλά δεν έχει αναφερθεί ο ρόλος του στην παθογένεια (Balado et al. 2008). Έχει επίσης περιγραφεί ένα σύστημα πρόσληψης σιδήρου από την αίμη, το οποίο είναι υπεύθυνο για την πρόσληψη σιδήρου από πρωτεΐνες που περιέχουν αίμη (Mourino et al. 2004). Χρωμοσωμικά γονίδια είναι επίσης υπεύθυνα για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας του *L. anguillarum* έναντι της βακτηριοκτόνας δράσης του συμπληρώματος των ψαριών (Trust et al. 1981).

Η παρουσία μαστιγίων και βακτηριακής κίνησης είναι παράγοντες που συμβάλλουν στη λοιμικότητα, διευκολύνοντας έτσι την διείσδυση στο δέρμα και στο εντερικό τοίχωμα των ψαριών (Chart 1983, Norqvist & Wolf-Watz 1993, O' Toole et al. 1996). Επιπλέον, το λιποπολυσακχαρίδιο το οποίο βρίσκεται στην εξώτατη επιφάνεια του κυττάρου συμβάλλει στη παθογένεια των *Vibrio* (Norqvist & Wolf-Watz 1993). Εξάλλου, η μόλυνση των ψαριών με παράσιτα, αυξάνει την ευαισθησία των ψαριών στη δονακίωση (Bandilla et al. 2006).

Το βακτήριο μετά τη προσκόλλησή του και τον εποικισμό των ιστών του ψαριού, εισέρχεται στο ψάρι (Actis et al. 1999). Εάν η εξωτερική ανοσολογική άμυνα του ψαριού (δέρμα, βλέννα) είναι άθικτη, τότε το βακτήριο κινητοποιεί μηχανισμούς παθογένειας ώστε να καταφέρει να εισβάλλει στους ιστούς του ψαριού, όπως η παραγωγή πρωτεασών και αιμολυσίνης (Norqvist et al. 1990, Farrell & Crosa 1991), κυτοτοξινών (Kodama et al. 1985), σιδηροφόρων (Balado et al. 2009) και η χημειοτακτική κινητικότητα (Chart 1983, Norqvist & Wolf-Watz 1993, O' Toole et al. 1996).

Η κινητική της μόλυνσης ψαριών από *L. anguillarum*

Η κινητική της προόδου της ασθένειας από το *L. anguillarum* εστιάζεται στη μόλυνση μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα έπειτα από την κατανάλωση μολυσμένης τροφής ή νερού (Roberts 1973). Οι Rekecki et al. (2012) ανέφεραν σε νύμφες λαβρακιού εποικισμό του εντέρου 2 ώρες μετά τη μόλυνση δια του στόματος. Παρατηρήθηκαν βακτήρια στην βασική στοιβάδα χωρίς βλάβη του τοιχώματος του εντέρου υποδηλώνοντας έναν πιθανό μηχανισμό ενδοκυττάρωσης. Παρατηρήθηκαν ελεύθερα κυκλοφορούντα βακτήρια στα αιμοφόρα αγγεία του ήπατος 6 ώρες μετά τη μόλυνση και στη νηκτική κύστη 48h μετά τη μόλυνση, πιθανά μετά την πρόκληση σηψαιμίας. Από το αίμα, τα βακτήρια κατόπιν εξαπλώνονται στον σπλήνα και τον πρόσθιο νεφρό. Η σηψαιμία συμβαίνει σε περίπου 48h μετά τη μόλυνση και ακολουθείται από θάνατο (Angelidis 2014).

Κλινικά συμπτώματα της δονακίωσης

Η δονακίωση μπορεί να είναι υπεροξεία και η θνησιμότητα στα νεαρά ψάρια μπορεί να φτάσει στα 25-35% ενώ στα ενήλικα 15%. Στα οξεία στάδια υπάρχει λίγος χρόνος για την

ανάπτυξη συμπτωμάτων και τα ψάρια πεθαίνουν γρήγορα (Actis et al. 1999). Σε πολλές περιπτώσεις η ασθένεια προκαλεί κλινικά συμπτώματα που περιλαμβάνουν σκουροχρωμία, ληθαργική συμπεριφορά, εξόφθαλμο και ανορεξία. Τα συμπτώματα αυτά μπορεί να αναπτυχθούν 24-48h μετά τη μόλυνση. Με τη πάροδο του χρόνου, αναπτύσσονται κυρίως αιμορραγίες στη βάση των πτερυγίων, στη διογκωμένη κοιλιά, γύρω από τα μάτια, στην έδρα και στο στόμα. Μπορεί να αναπτυχθεί οίδημα στη περιοχή γύρω από τα μάτια και στον κερατοειδή χιτώνα (Horne et al. 1977, Woo & Bruno 1996, Bruno & Ellis 1996, Austin & Austin 1999, Ackerman & Iwama 2001). Αργότερα, εμφανίζονται έλκη στο δέρμα και διάσπαρτες αιμορραγίες στο δέρμα και τα πτερύγια (Actis et al. 1999). Πολύ συχνά παρατηρούνται αναιμία και σήψη των βραγχίων. Τα ασθενή ψάρια μπορεί επίσης να εμφανίσουν λευκοπενία (Ransom et al. 1984).

Παθολογία-Διάγνωση

Όταν ξεκινάει η νόσος μπορεί να παρατηρηθούν μόνο λίγες πετέχειες στο συκώτι, στη καρδιά, στη σπλήνα και υπεραιμικό οίδημα στο έντερο. Με τη πρόοδο της ασθένειας μπορούν να παρατηρηθούν εξωτερικές και εσωτερικές αιμορραγίες. Όταν η μόλυνση γίνεται μέσω της εντερικής οδού, καταστρέφεται το επιθήλιο αλλά δεν παρατηρούνται βλάβες στο παρέγχυμα των εσωτερικών οργάνων (Grisez et al. 1996). Στο σαρκόπλασμα των μυϊκών κυττάρων της καρδιάς σχηματίζονται κενοτόπια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα διογκώνονται. Σε λιγότερο οξείες μορφές της ασθένειας οι αιμορραγίες αναπτύσσονται περισσότερο και μπορεί να παρατηρηθούν στο δέρμα, στη βάση των πτερυγίων, στα βράγχια και στα τοιχώματα της περιτοναϊκής κοιλότητας καθώς και στα εσωτερικά όργανα (Chart & Munn 1980, Richards 1980). Μπορεί να παρατηρηθεί αιμορραγικό οίδημα γύρω από τα μάτια και κατά τη διάρκεια της υποξείας φάσης της ασθένειας παρατηρούνται έλκη στο δέρμα τα οποία περιέχουν βακτήρια (Woo & Bruno 1996, Bruno & Ellis 1996). Τα εσωτερικά όργανα μπορεί επίσης να είναι διογκωμένα.

Οι δερματικές βλάβες, ιδιαίτερα αυτές της επιδερμίδας, εμφανίζουν ενδοκυτταρικό οίδημα και κυτταρική νέκρωση, οι κυτταρικές μεμβράνες των πλασμοκυττάρων σπάζουν, παρατηρείται καρυορρηξία και πυρηνικό υλικό διασπείρεται ανάμεσα στα κύτταρα σαν βασίφιλα συσσωματώματα (Richards 1980). Παρατηρούνται νέκρωση και αιμορραγίες στον καρδιακό μυ. Το ενδοθήλιο του κόλπου διαχωρίζεται από το καρδιακό μυ (Richards 1980, Chart & Munn 1980, Baumann et al. 1984, Ransom et al. 1984, Lamas et al. 1994). Ο νεφρός είναι διογκωμένος και εμφανίζονται ωχρές κηλίδες οι οποίες περιβάλλονται από αιμορραγίες. Αιμορραγίες υπάρχουν επίσης στο νεφρικό παρέγχυμα και τα επιθηλιακά κύτταρα των ουροφόρων σωληναρίων εμφανίζουν κενοτόπια. Τελικά, παρατηρείται νέκρωση των νεφρικών κυττάρων (Richards 1980, Chart & Munn 1980, Baumann et al. 1984, Ransom et al. 1984, Lamas et al. 1994). Στα μελανομακροφάγα κέντρα του νεφρού παρατηρείται η συσσώρευση εναποθέσεων σιδήρου. Τέλος, στον σπλήνα και το ήπαρ υπάρχουν νεκρωτικές περιοχές (Baumann et al. 1984, Ransom et al. 1984, Lamas et al. 1994).

Το έντερο, ιδιαίτερα το οπίσθιο τμήμα του, εμφανίζεται διογκωμένο και υπεραιμικό. Στον αυλό του εντέρου υπάρχουν βλενώδεις και αιμορραγικές εκκρίσεις (Richards 1980, Rucker 1959, Novotny 1975). Η έδρα εμφανίζεται αιμορραγική (Chart & Munn 1980), οι μύες του εντερικού τοιχώματος είναι νεκρωτικοί, το περιτόναιο είναι αιμορραγικό και συνήθως παρατηρείται ασκίτης (Lamas et al. 1994). Παρατηρείται σπληνομεγαλία και ο νεφρός είναι διογκωμένος. Στο παρέγχυμα αυτών των αιμοποιητικών οργάνων συσσωρεύεται

αιμοσιδηρίνη στα μελανομακροφάγα κέντρα (Woo & Bruno 1996, Bruno & Ellis 1996). Στους μύες μπορεί να υπάρχουν μεγάλες νεκρωτικές βλάβες. Τα ψάρια είναι αναιμικά και τα βράγχια είναι ανοικτόχρωμα. Ψάρια που είναι χρονίως μολυσμένα εμφανίζουν χαμηλή όρεξη και καθυστερημένη ανάπτυξη, αλλά ο ρυθμός θνησιμότητας δεν είναι πολύ υψηλός (Angelidis 2014).

Η δονακίωση είναι σχετικά εύκολο να διαγνωσθεί εξαιτίας της παρουσίας χαρακτηριστικών συμπτωμάτων και βλαβών και λόγω της ευκολίας απομόνωσης και ταυτοποίησης του παθογόνου. Επιδημίες της ασθένειας συμβαίνουν στη Μεσόγειο όταν η θερμοκρασία του νερού είναι 18-20°C και η θνησιμότητα μπορεί να είναι σημαντική από τις πρώτες ημέρες της επιδημίας. Για την απομόνωση του παθογόνου λαμβάνονται δείγματα από τον πρόσθιο νεφρό, τον σπλήνα και το συκώτι (Angelidis 2014).

Πρόληψη-Εμβολιασμός

Για το έλεγχο της δονακίωσης των ψαριών ο καλύτερος τρόπος, εκτός της ορθής διαχείρισης, είναι ο εμβολιασμός. Για την ενεργή προστασία των ψαριών από τη δονακίωση έχουν αναπτυχθεί με επιτυχία εμβόλια. Από τη χρήση τους δεν έχουν αναφερθεί σοβαρές αρνητικές επιδράσεις. Τα αδειοδοτημένα εμβόλια για το *L. anguillarum* έχουν αποδειχθεί επιτυχή στο πεδίο με σχετικά ποσοστά επιβίωσης (RPS) >80%. Τυπικά, τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά, συλλέγονται και κατόπιν αδρανοποιούνται με φορμαλδεΐδη ή θέρμανση. Συνήθως προστίθενται ανοσοενισχυτικά στο διάλυμα των αντιγόνων για την διέγερση της ανοσολογικής αντίδρασης των ψαριών (Ellis 1988a, 1988b, 1989a). Τα ανοσοενισχυτικά μπορεί να είναι χημικές ουσίες (διάλυμα που περιέχουν έλαιο μετάλλου ή μεταβολιζόμενα έλαια) αλλά επίσης και διάφορες προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες (όχι όμως σε εμπορικά σκευάσματα).

Για την κάλυψη των ψαριών έναντι περισσότερων οροτύπων δονακίων χρησιμοποιούνται πολυδύναμα εμβόλια. Αυτά περιέχουν αντιγόνα 2 ή περισσότερων οροτύπων, συνήθως του *L. anguillarum* O1 και O2 (Angelidis et al. 2006). Μπορεί όμως να χρησιμοποιηθεί συνδυασμός δύο διαφορετικών ειδών παθογόνων στο ίδιο εμβολιακό μίγμα (π.χ. συνδυασμός εμβολίου έναντι των *L. anguillarum* και Phdp). Η αποτελεσματικότητα του εμβολίου εξαρτάται από τη ποιότητά του αλλά επίσης και από το είδος του ψαριού στο οποίο χορηγείται, την ηλικία και την υγεία του ψαριού, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την οδό χορήγησης. Τα εμβόλια μπορούν να χορηγηθούν με έγχυση, συνήθως ενδοπεριτοναϊκά (ip), με εμβάπτιση (dip) ή ενσωματωμένα στη τροφή των ψαριών.

Η ανάπτυξη πιο εξελιγμένων τύπων εμβολίων βασίζεται στη χρήση μοριακών μεθόδων για το σχεδιασμό ουσιών που προάγουν την εσωτερική ανοσία των ψαριών. Ανάμεσα σε αυτές έχουν περιγραφεί τεχνικές που βασίζονται σε PCR, ποσοτικές PCR σε πραγματικό χρόνο, ανοσολογικές τεχνικές, ανάλυση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και μελέτες μικροσυστοιχιών (Aoki et al. 2008).

Τα εμπορικά εμβόλια που είναι διαθέσιμα (αδειοδοτημένα) έναντι της δονακίωσης στην Ελλάδα, περιέχουν τους ορότυπους O1, O2a, ή O1 βιότυπος I, O2 βιότυπος I, O2 βιότυπος II του *L. anguillarum*, είναι πολυδύναμα και μπορεί να περιέχουν επίσης το παθογόνο Phdp. Όλα αυτά τα σκευάσματα περιέχουν ολόκληρα βακτηριακά κύτταρα αδρανοποιημένα με φορμόλη. Ένα από αυτά τα πολυδύναμα εμβόλια περιέχει ολόκληρα κύτταρα του *V. ordalii*. Συμπερασματικά, δεν υπάρχουν διαθέσιμα στη αγορά εμβόλια (τουλάχιστον για την Ελλάδα)

έναντι των άλλων δονακίων που πιστεύεται ότι εμπλέκονται στην εμφάνιση ασθένειας όλο και πιο συχνά τα τελευταία χρόνια (Angelidis 2014).

Θεραπεία

Στα ψάρια χρησιμοποιούνται αποτελεσματικά αντιμικροβιακές ουσίες για τον έλεγχο των μολύνσεων από το *L. anguillarum*, οι οποίες χορηγούνται στα ψάρια κυρίως με τη τροφή τους. Είναι πολύ σημαντικό η θεραπεία να αρχίσει όσο το δυνατό νωρίτερα από τη στιγμή της εμφάνισης των πρώτων συμπτωμάτων της μόλυνσης στην εκτροφή, όσο ακόμη τα περισσότερα ψάρια έχουν ακόμη όρεξη και θα καταναλώσουν ευκολότερα τη χορηγούμενη θεραπευτική τροφή. Συνιστάται η διενέργεια δοκιμής ευαισθησίας του παθογόνου σε αντιβιοτικά για την επιλογή του πιο αποτελεσματικού, οπότε η θεραπεία είναι αποτελεσματική, χρησιμοποιούνται μικρές ποσότητες αντιβιοτικού και επίσης μικρές ποσότητες του φαρμάκου διασπείρονται στο περιβάλλον. Η μόλυνση πρέπει να ελεγχθεί σε αρχικό στάδιο για την αποφυγή υψηλής θνησιμότητας και τη μείωση της μετάδοσης της νόσου. Στη θεραπεία των ψαριών με αντιβιοτικά, θα πρέπει να υπάρχει αναμονή μέχρι να μην ανιχνεύονται κατάλοιπα των αντιβιοτικών στη σάρκα τους. Για την ασφαλή διάθεση στην κατανάλωση της τσιπούρας που έχει υποστεί θεραπεία και για να μην υπάρξει υπέρβαση των μέγιστων ορίων καταλοίπων (maximum residue limit -MRL), ο προτεινόμενος χρόνος αναμονής είναι περίπου 37 ημέρες. Η περίοδος αναμονής εξαρτάται από τη θερμοκρασία του νερού, το είδος του ψαριού, την ουσία που χρησιμοποιείται, τη δόση, τη διάρκεια της θεραπείας και το μέγεθος των ψαριών (Angelidis 2014).

Τα εκτρεφόμενα ψάρια στην εντατική ιχθυοκαλλιέργεια βασίζονται αποκλειστικά στη βιομηχανική τροφή που χορηγείται για να λάβουν όλες τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες για την ανάπτυξη και τη διατήρηση της φυσιολογικής τους κατάστασης. Η τροφή θα πρέπει να παρέχει τα απαραίτητα αμινοξέα, λιπαρά οξέα, βιταμίνες και μέταλλα. Οποιαδήποτε απόκλιση από την πλήρη κάλυψη των διατροφικών αναγκών των εκτρεφόμενων ψαριών μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ικανότητα να αντισταθούν στην εισβολή παθογόνων και την ανάπτυξη νόσου. Υπάρχουν αναφορές πάνω στα ευεργετικά αποτελέσματα κάποιων πρόσθετων ουσιών στην τροφή (Austin & Austin 2007). Για να παρουσιαστούν μερικά, οι Ρ-γλυκάνες ενισχύουν την μη-ειδική αντίσταση στις ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης της μόλυνσης από *A. hydrophila* (Selvaraj et al. 2005), της φωτοβακτηριδίασης (Couso et al. 2003), της ERM, της ασθένειας Hitra και της δονακίωσης, λόγω ανοσοδιέγερσης (Robertsen et al. 1990). Επιπλέον, αποξηραμένα σκευάσματα του μονοκύτταρου φύκου *Tetraselmis suecica* έχουν σχετισθεί με αντιμικροβιακή δράση και, ενδεχομένως, ανοσοδιεγερτική δραστηριότητα, όταν χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα διατροφής. Η αλόη έχει βρεθεί να αυξάνει την αντίσταση σε μολύνσεις από το *V. alginolyticus* σε πετρόψαρα όταν τρέφονταν με 5g/kg αλόη στη δίαιτά τους για 6 εβδομάδες (Kim et al. 1999).

1.10.1.2 Φωτοβακτηριδίαση προκαλούμενη από το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Η φωτοβακτηριδίαση αποδίδεται στο βακτήριο *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* (Phdp) (παλιότερα *Pasteurella piscicida*), (Romalde 2002). Η ασθένεια εμφανίζεται και προσβάλλει τα εκτρεφόμενα ψάρια (κυρίως το λαβράκι και την τσιπούρα) από την άνοιξη έως το φθινόπωρο σε θερμοκρασίες θάλασσας 18-20°C (Magarinos et al. 1992). Το

βακτήριο Phdp, είναι ένα Gram (-) βακτήριο, αλόφιλο, ακίνητο, που εμφανίζει διπολική χρώση (σαν παραμάνα) και πολυμορφισμό από κόκκους και δονάκια μέχρι και νηματοειδείς μορφές (Romalde 2002). Ονομάστηκε *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (συντομογραφία Phdp) για να διαχωριστεί από το συγγενικό του *Photobacterium damsela* που είναι βακτήριο του περιβάλλοντος (Bakoroulos et al. 2004). Το συγκεκριμένο βακτήριο μπορεί να αναπτυχθεί και να εγκατασταθεί στο νερό και στα βενθικά ιζήματα.

Το Phdp είναι θετικό για οξειδάση και καταλάση, με ζυμωτικό μεταβολισμό και ευαίσθητο στον δονακιοστατικό παράγοντα O/129. Παράγει θετικές αντιδράσεις για την διυδρολάση της αργινίνης, τη λιπάση και τη φωσφολιπάση. Αυτό το βακτήριο είναι αρνητικό για τη παραγωγή ινδόλης, ουρεάσης, ζελατινάσης, αμυλάσης και υδρόθειου και την αναγωγή νιτρικών. Όσον αφορά στη χρήση των υδατανθράκων, το βακτήριο παράγει οξύ μόνο από γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη και φρουκτόζη. Το Phdp μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες από 15 έως 32,5°C και η βέλτιστη θερμοκρασία για το πολλαπλασιασμό του είναι 22,5°C. Το Phdp αποτελεί φαινοτυπικά μία ομοιογενή ομάδα (Magariños et al. 1992a). Η κλασική περιγραφή του Phdp περιλαμβάνει κοκκοβακίλους που είναι χωρίς κάψα (Koike et al. 1975). Ωστόσο, μελέτες των Bonet et al. (1994) έδειξαν ότι η πλειοψηφία των στελεχών του *P. damsela* subsp. *piscicida* παράγει, ως συστατικό των κυττάρων τους, υλικό κάψας, αποτελούμενο από 99,6% υδαάνθρακες και 0,4% πρωτεΐνη, που παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια αυτού του μικροοργανισμού.

Η ασθένεια παρατηρείται από το τέλος της άνοιξης μέχρι τα μέσα φθινοπώρου όταν οι θερμοκρασίες του νερού κυμαίνονται μεταξύ 18-29°C (Matsusato 1975, Bullock 1978, Egusa 1983, Hawke et al. 1987, Toranzo et al. 1991, Balebona et al. 1992). Πάντως, εξάρσεις της νόσου έχουν καταγραφεί και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (<18-15°C).

Ορολογικά, το Phdp αποτελεί επίσης μια εξαιρετικά ομοιογενή ομάδα (Kusuda & Fukuda 1980, Nomura & Aoki 1985, Magariños et al. 1992a). Αυτή η ορολογική ομοιογένεια υποστηρίχθηκε από αναλύσεις του προφίλ των λιποπολυσακχαριδίων (LPS) του βακτηρίου με όλα τα στελέχη να εμφανίζουν τα ίδια ηλεκτροφορητικά μοτίβα: Ο πλευρικός αλυσίδες αποτελούμενες από ζώνες υψηλής μοριακής μάζας με τη μορφή σκάλας. Παρατηρήθηκαν επίσης για όλα τα στελέχη παρόμοια πρότυπα συνολικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών των εξωκυτταρικών μεμβρανών. Αυτό το LPS και οι πρωτεΐνες των μεμβρανών σχετίζονταν ανοσολογικά μεταξύ όλων των στελεχών του Phdp. Οι μέθοδοι αποτύπωσης DNA, όπως η ριβοτύπηση και διάφορες τεχνικές PCR, AFLP, RAPD, ERIC και REP, έδειξαν την ύπαρξη δύο κυρίων γενεαλογικών κλώνων για το βακτήριο, έναν που περιλαμβάνει τα ευρωπαϊκά στελέχη και έναν που περιλαμβάνει τα στελέχη από την Ιαπωνία και τις ΗΠΑ (Magariños et al. 1997, Thyssen et al. 1999, Magariños et al. 2000, Mancuso et al. 2007). Αυτά τα αποτελέσματα απέδειξαν την ύπαρξη μιας γενετικής ετερογένειας για το Phdp και βρήκαν εφαρμογή ως επιζωοτιολογικά εργαλεία για αυτό το βακτήριο.

Πρόσφατα, η ανάλυση διαφορετικών περιοχών του γενώματος του βακτηρίου χρησιμοποιώντας μεθοδολογία SSH (Suppression Subtractive Hybridization) συνηγόρησε προς την υψηλή ετερογένεια του βακτηρίου δείχνοντας, επιπλέον, ότι ένα στοιχείο ολοκλήρωσης σύζευξης (ICE) μπορεί να επιτρέψει τη μεταφορά γονιδίων λοιμικότητας σε αυτό το παθογόνο (Osorio et al. 2008). Το Phdp έδειξε διαφορετική περιεκτικότητα σε πλασμίδια ανάλογα με το στέλεχος που αναλύθηκε. Έτσι, ενώ στη πλειονότητα των ευρωπαϊκών στελεχών έχει ανιχνευθεί πλασμίδιο περίπου 50 MDa, τα ιαπωνικά στελέχη

φέρουν ένα κοινό πλασμίδιο 37 MDa (Magariños et al. 1992a).

Παθολογία

Τα κλινικά σημάδια της μόλυνσης από το Phdp έχουν περιγραφεί λεπτομερώς από τους Kubota et al. (1970) και Fukuda & Kusuda (1981), στο εκτρεφόμενο είδος *Seriola quinqueradiata* (το ιαπωνικό μαγιάτικο) στην Ιαπωνία και είναι παρόμοια με αυτά που περιγράφονται στην εκτρεφόμενη τσιπούρα στη Γαλικία (ΒΔ Ισπανία) και στην περιοχή της Μεσογείου (Toranzo et al. 1991). Τα μακροσκοπικά εξωτερικά συμπτώματα της φωτοβακτηριδίασης είναι συνήθως δυσδιάκριτα και δεν υπάρχουν γενικά επιφανειακές βλάβες. Μόνο μερικά από τα άρρωστα ψάρια μπορεί να εμφανίσουν σκουροχρωμία ή αποχρωματισμό του σώματος και μικρές αιμορραγικές περιοχές στο κεφάλι και στα βράγχια. Εσωτερικά, οι παθολογικές αλλαγές μπορεί να είναι διαφορετικές ανάλογα με το εάν η ασθένεια είναι οξεία ή χρόνια. Στην οξεία μορφή, υπάρχουν λίγες μακροσκοπικές παθολογοανατομικές μεταβολές. Ιστολογικά, το συκώτι, ο νεφρός και ο σπλήνας εμφανίζουν πολυεστιακή νέκρωση και παρουσία βακτηριακών συναθροίσεων, ελεύθερων και μέσα σε φαγοκύτταρα, στα τριχοειδή αγγεία και τους διάμεσους χώρους. Οι χρόνιες βλάβες στα εσωτερικά όργανα χαρακτηρίζονται από την παρουσία λευκών οζιδίων διαμέτρου περίπου 0,5 έως 3,5mm. Η δημιουργία κοκκιωμάτων φαίνεται να εξαρτάται από το είδος του ψαριού που έχει προσβληθεί, εάν η μόλυνση είναι φυσική ή προκλήθηκε πειραματικά και κατά πόσο ή όχι χρησιμοποιήθηκε αντιβίωση για να περιορίσει την πρόοδο της νόσου. Η ιστοπαθολογική μελέτη των κοκκιωματωδών αποθέσεων έδειξε την παρουσία βακτηριακών αποικιών και νεκρωτικών φαγοκυττάρων. Επιπλέον, ο σπλήνας, ο νεφρός και το ήπαρ εμφανίζουν συσσωρεύσεις μακροφάγων, πολλά από τα οποία είναι νεκρωτικά, που περιέχουν πολυάριθμα άθικτα βακτήρια (Nelson et al. 1989, Noya et al. 1995b). Το γεγονός αυτό μπορεί να είναι ενδεικτικό του ότι το Phdp επιβιώνει εντός των μακροφάγων που το έχουν φαγοκυτταρώσει και δεν αποδομείται. Επιπλέον, τα βράγχια εμφανίζουν επίσης εκφυλισμένα μακροφάγα που περιέχουν κύτταρα του παθογόνου και νέκρωση διαφόρων τύπων κυττάρων που επηρεάζει την αναπνευστική λειτουργία (Noya et al. 1995b).

Διάγνωση

Η κύρια απομόνωση του Phdp γίνεται από τα εσωτερικά όργανα ασθενών ψαριών (νεφροί, ήπαρ και σπλήνας) χρησιμοποιώντας υλικά καλλιέργειας όπως άγαρ σόγιας (TSA), άγαρ καρδιάς-εγκεφάλου (BHIA) και άγαρ με αίμα, που συμπληρώνονται με 1-2% NaCl ή χρησιμοποιώντας θαλάσσιο άγαρ. Η ταχεία προκαταρκτική διάγνωση βασίζεται στην απομόνωση Gram(-), ακίνητων διπολικών δονακίων, που είναι θετικά στις δοκιμές οξειδάσης και καταλάσης, ζυμωτικά, ευαίσθητα στον δονακιοστατικό παράγοντα O/129, και έχουν μια αυστηρή απαίτηση για αλάτι. Για την ανίχνευση και τη διάγνωση αυτού του παθογόνου των ψαριών έχουν χρησιμοποιηθεί με αποτελεσματικότητα ορολογικές τεχνικές, καθώς και για την επιβεβαίωση της ταυτότητάς του. Αυτές οι τεχνικές, χρησιμοποιώντας ειδικό αντιγόνο, επιβεβαίωσαν την ταυτότητα των μικροοργανισμών που προκαταρκτικά είχαν θεωρηθεί ως Phdp και, επιπλέον, έχουν αποδείξει ότι τα στελέχη αυτού του είδους, ανεξάρτητα από τη γεωγραφική τους προέλευση, είναι ορολογικά ομοιογενή (Magariños et al. 1992a, Salati et al. 1994) γεγονός που καθιστά αδύνατο να προσδιοριστούν διαφορετικοί ορότυποι. Αυτή η αντιγονική ομοιομορφία βοήθησε την ανάπτυξη δοκιμών ανοσοσυγκόλλησης, τεχνικών ανοσοφθορισμού, ανοσοπροσοφθητικών τεχνικών (ELISA), που επιτρέπουν μια ταχεία ανίχνευση αυτού του παθογόνου των ψαριών (Romalde et al. 1995b, Romalde et al. 1995c,

Romalde et al. 1999). Από το 1997 (Zhao & Aoki 1989, Aoki et al. 1997, Osorio et al. 1999), για μια γρήγορη και ειδική ανίχνευση του αιτιολογικού παράγοντα της φωτοβακτηριδίασης έχει αναπτυχθεί μια ποικιλία από πρωτόκολλα με βάση το DNA. Ωστόσο, μία πολλαπλή προσέγγιση PCR που στοχεύει στο 16S ριβοσωματικό RNA (16S rRNA) και στα γονίδια ureC είναι επί του παρόντος η μόνη δοκιμασία που μπορεί με επιτυχία να διακρίνει τα δύο υποείδη του *P. damsela* και ιδανικό για να γίνει ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση ρουτίνας και για τη διάγνωση της φωτοβακτηριδίασης στο πεδίο (Osorio et al. 2000).

Παράγοντες λοιμικότητας

Η υψηλή παθογένεια του Phdp που έχει αναφερθεί για διάφορα στελέχη υποδηλώνει ότι το συγκεκριμένο παθογόνο πρέπει να διαθέτει σημαντικούς λοιμογόνους μηχανισμούς. Όσον αφορά τα επιφανειακά χαρακτηριστικά, έχει αναφερθεί ότι το Phdp είναι μέτρια υδροφοβικό και αδύναμα ή μη αιμοσυγκολλητικό (Magariños et al. 1996a). Η ανάλυση των εισβολικών ιδιοτήτων του αποκάλυψε ότι το συγκεκριμένο παθογόνο είναι μετρίως εισβολικό. Ωστόσο, είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι τα βακτηριακά κύτταρα είναι σε θέση να επιβιώσουν για τουλάχιστον 6 ημέρες εντός κυττάρων του ξενιστή και να εξαπλωθούν από κύτταρο σε κύτταρο παράγοντας κενοτόπια σε μονοστρωματικές καλλιέργειες κυττάρων ψαριών στο εργαστήριο. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί με δοκιμές κυττατοχλασίνης D ότι ο κυτταροσκελετός του κυττάρου ξενιστή συμμετέχει ενεργά στη διαδικασία εισβολής (Magariños et al. 1996a). Η παρουσία κάψας πολυσακχαριδικής φύσης σε στελέχη Phdp (Magariños et al. 1996b) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην λοιμικότητα του παθογόνου. Στην πραγματικότητα, η παρουσία του υλικού της κάψας προκάλεσε την αντοχή του παθογόνου στη βακτηριοκτόνο δράση του ορού ψαριών και είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερες τιμές LD50. Η δυνατότητα παθογόνων βακτηρίων να αποκτήσουν σίδηρο είναι απαραίτητη για την ανάπτυξή τους στον ξενιστή και ουσιαστική για να προκαλούν λοιμώξεις. Έχει αναφερθεί (Magariños et al. 1994b) ότι το Phdp διαθέτει επίσης ένα σύστημα απόκτησης σιδήρου. Αυτό το σύστημα αποτελείται από ένα σιδηροφόρο και τουλάχιστον τρεις ρυθμιζόμενες από τον σίδηρο υψηλής μοριακής μάζας πρωτεΐνες των εξωκυτταρικών μεμβρανών. Επιπλέον, τα κύτταρα του Phdp ήταν σε θέση να χρησιμοποιήσουν την αίμη και την αιμοσφαιρίνη ως μοναδικές πηγές σιδήρου με άμεση δέσμευση αυτών των ενώσεων σιδήρου με υποδοχείς στη μεμβράνη τους που ρυθμίζονται από τον σίδηρο (Magariños et al. 1994b, Do Vale et al. 2002). Στην πραγματικότητα, είναι γνωστό ότι η σύνθεση της σιδηροφόρου ουσίας που εμπλέκεται στην λοιμικότητα του Phdp είναι κωδικοποιημένη από ένα νησίδιο παθογένειας που είναι εισαγμένο σε ένα κινητό πλασμίδιο (Osorio et al. 2008).

Τα εξωκυτταρικά προϊόντα (ECP) που εκκρίνονται από μια ποικιλία παθογόνων βακτηρίων των ψαριών είναι σημαντικοί λοιμογόνοι παράγοντες αφού μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη της νόσου από την άποψη της διατροφής των βακτηρίων που επιτρέπουν στα βακτήρια να εξουδετερώσουν τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή. Τα ECP των στελεχών του Phdp έχει δείχθει ότι είναι θανατηφόρα για διάφορα είδη ψαριών όπως τσιπούρα, λαβράκι, καλκάνι και ιριδίζουσα πέστροφα. Επιπλέον, αυτά τα ECP περιείχαν τοξίνες με θανατηφόρο δράση για ποντίκια, και διέθεταν ισχυρή δραστηριότητα φωσφολιπάσης, κυτταροτοξικές και αιμολυτικές δραστηριότητες (Magariños et al. 1992b).

Αντιγονική δομή, ανοσολογία-οροτύπιση του Phdp

Σχετικά πρόσφατες μελέτες επικεντρώθηκαν στην ορολογική σύγκριση νέων παθογόνων

στελεχών του Phdp που απομονώθηκαν από την Ευρώπη με στελέχη που είχαν απομονωθεί από την Ιαπωνία και τις Η.Π.Α. Οι Magarinos et al. (1992) χρησιμοποιώντας ορό από κουνέλι ανοσοποιημένο με βακτηριακά κύτταρα του Phdp σε αναλύσεις Western Blot (WB) διαπίστωσαν την αντιγονική ομοιογένεια μεταξύ ισπανικών, γαλλικών, ιταλικών, ιαπωνικών και αμερικανικών στελεχών. Οι Salati et al. (1993) ανέφεραν παρόμοια αποτελέσματα χρησιμοποιώντας διάφορα ιταλικά στελέχη. Οι Bonet et al. (1994), οι οποίοι ανακάλυψαν τη παρουσία πολυσακχαριδικής κάψας, παρήγαγαν αντισώματα σε κουνέλι έναντι αυτού του κυτταρικού στοιχείου τα οποία δεν αντέδρασαν με το λιποπολυσακχαρίδιο του παθογόνου. Αυτά τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι το πολυσακχαρίδιο της κάψας αποτελεί ένα αντιγονικά διακριτό στοιχείο της εξωκυτταρικής επιφάνειας του βακτηριακού κυττάρου του Phdp. Οι Magarinos et al. (1994) ανέπτυξαν αντισώματα σε κουνέλι έναντι των IROMP του βακτηρίου και διαπίστωσαν ότι αυτά τα κυτταρικά συστατικά σχετίζονταν ορολογικά σε όλα τα στελέχη Phdp που μελετήθηκαν. Οι Bakoroulos et al. (1995a) χρησιμοποιώντας ορούς κουνελιού που αναπτύχθηκαν έναντι βακτηριακών κυττάρων από ένα ελληνικό και ένα ιταλικό στέλεχος του βακτηρίου, διαπίστωσαν αντιγονική ομοιότητα μεταξύ στελεχών Phdp από την Ελλάδα, Ιταλία, Γαλλία και Ιαπωνία. Οι συγγραφείς μπόρεσαν επίσης να ταυτοποιήσουν μικρές ποσοτικές διαφορές μεταξύ των στελεχών που μελετήθηκαν, και επιπρόσθετα, επιπλέον ανοσογόνο υλικό υψηλού μοριακού βάρους σε κάποια από τα στελέχη που μελετήθηκαν. Οι ίδιοι συγγραφείς ταυτοποίησαν υλικό πολύ χαμηλού μοριακού βάρους (<20kD) το οποίο ήταν ισχυρά ανοσογόνο (για το κουνέλι). Το υλικό αυτό δεν ήταν πρωτεϊνικής φύσεως και είχε μοριακό βάρος από 20 έως 65kD. Συμπερασματικά, οι μελέτες δείχνουν μια γενική ομοιογένεια μεταξύ στελεχών του Phdp, αν και ταυτοποιήθηκαν μικρές διαφορές οι οποίες δεν αξιολογήθηκαν ως σημαντικές για περαιτέρω διερεύνηση.

Η παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων (MAb) έναντι του Phdp (Bakoroulos et al. 1997b) επέτρεψε επιπλέον οροτυπικές μελέτες πάνω στα κυτταρικά συστατικά του παθογόνου. Τέτοια ανοσολογικά εργαλεία επιτρέπουν μια πιο λεπτομερή ανάλυση των αντιγόνων ενός παθογόνου. Έτσι, η οροτυπική ανάλυση στελεχών του Phdp χρησιμοποιώντας 6 αντι-Phdp MAb (Bakoroulos et al. 1997c) έδειξε ότι 4 από αυτά αντέδρασαν με πολύ χαμηλού μοριακού βάρους συστατικά λιποπολυσακχαριδικής και λιποπρωτεϊνικής φύσης. Ένα από τα MAb αντέδρασε με ένα σαφώς καθορισμένο πρωτεϊνικό συστατικό του βακτηριακού κυττάρου μοριακού βάρους περίπου 75kD και το άλλο με έναν επίτοπο του παθογόνου το οποίο φαίνεται να επαναλαμβάνεται σε κυτταρικά συστατικά που εκτείνονται σε μεγάλο εύρος μοριακών βαρών από 30 έως 200kD. Μετά από δοκιμές μεγάλου αριθμού στελεχών διαφορετικής προέλευσης με πέντε από τα MAb, φάνηκε ότι τα αντιγόνα που αναγνωρίστηκαν παράγονταν ομοιογενώς από όλα τα στελέχη που δοκιμάστηκαν, με μικρές μόνο ποσοτικού χαρακτήρα διαφορές. Παρόλα αυτά, το έκτο MAb (που αντιδρά με το προαναφερθέν βακτηριακό συστατικό που επαναλαμβάνεται) αποκάλυψε αντιγονικές διαφορές οι οποίες αφορούσαν, σχεδόν αποκλειστικά, τα Ιαπωνικά στελέχη.

Ενδιαφέρουσα είναι και η μελέτη των Magarinos et al. (1995) οι οποίοι διενεργώντας ριβοσωμική ανάλυση στελεχών του Phdp ανακάλυψε γενετική ποικιλότητα στα στελέχη που μελετήθηκαν και, επιπλέον, ανέφεραν ότι τα ισπανικά και ιταλικά στελέχη ανήκουν στον ίδιο ριβότυπο ενώ άλλοι δύο διακριτοί ριβότυποι βρέθηκαν για τα γαλλικά και ιαπωνικά στελέχη, αντίστοιχα. Μια τέτοια γενετική ποικιλότητα δείχνει πιθανότητα και αντιγονικής ποικιλότητας. Έτσι, επιπλέον έρευνες πάνω στους ριβότυπους του παθογόνου και πως μπορούν να

επιδράσουν την έκφραση αντιγονικών καθοριστών θα μπορούσε να είναι ένας μελλοντικός τομέας έρευνας. Τέτοιες αντιγονικές ποικιλότητες μπορεί να έχουν επιπλέον σημασία σε ότι αφορά την ανάπτυξη διαγνωστικών δοκιμών για γενικευμένη χρήση και την έρευνα πάνω στην ανάπτυξη εμβολίων.

Οι Bakoroulos et al. (1997d) αναφέρουν μία συγκριτική μελέτη των αντιγόνων του Phdp που αναγνωρίζονται από ορούς έναντι του παθογόνου που αναπτύχθηκαν σε κουνέλι, ποντικό και λαβράκι. Το λαβράκι φάνηκε να αναγνωρίζει περισσότερα προϊόντα των βακτηριακών κυττάρων του Phdp από ότι οι οροί του κουνελιού και ποντικού. Επιπλέον, ο ορός λαβρακιού που αναπτύχθηκε έναντι ζωντανών κυττάρων του παθογόνου αναγνώρισε περισσότερα αντιγόνα σε σύγκριση με τον ορό λαβρακιού που αναπτύχθηκε έναντι βακτηριακών κυττάρων του Phdp που αδρανοποιήθηκαν με θέρμανση. Αυτή η ανακάλυψη πιθανόν να έχει σημαντικές προεκτάσεις στην έρευνα για παραγωγή εμβολίων. Οι ίδιοι συγγραφείς συνέκριναν την αντίδραση ορών λαβρακιού έναντι κυττάρων του Phdp που είχαν αναπτυχθεί κάτω από συνθήκες περίσσειας και έλλειψης σιδήρου και βρήκαν ότι συγκεκριμένα αντιγόνα είχαν συντεθεί σε μεγαλύτερες ποσότητες κάτω από συνθήκες ανάπτυξης του παθογόνου υπό έλλειψη σιδήρου. Άλλα αντιγόνα, που ήταν παρόντα σε συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου υπό περίσσεια σιδήρου, παρατηρήθηκαν ως διαφορετικό (σε ότι αφορά το μοριακό τους βάρος) ανοσογόνο υλικό κάτω από συνθήκες ανάπτυξης με έλλειψη σιδήρου.

Επιδημιολογία-Ευαισθησία

Όλες οι αναφορές σε εξάρσεις φωτοβακτηριδίασης υποδεικνύουν μία αρνητική σχέση μεταξύ της ηλικίας των ψαριών και της νόσου. Νεαρότερα ψάρια είναι πιο ευαίσθητα από μεγαλύτερης ηλικίας άτομα (Bullock 1978, Yasunaga et al. 1983, Toranzo et al. 1991). Επιπλέον, φαίνεται να υπάρχει και συσχέτιση της ευαισθησίας στο Phdp με το είδος των ψαριών. Ο κιτρινόπτερος τόνος όταν μολύνθηκε πειραματικά με στέλεχος του παθογόνου που είχε απομονωθεί από φαγκρί βρέθηκε να είναι πιο ευαίσθητος (Yasunaga et al. 1983). Πειραματικά (ενδοπεριτοναϊκά) μολυσμένα καλκάνια βρέθηκαν να είναι πιο ευαίσθητα στο βακτήριο από τη τσιπούρα (Toranzo et al. 1991, Magarinos et al. 1995). Παρόλα αυτά το καλκάνι φαίνεται να είναι ανθεκτικό στη φωτοβακτηριδίαση μετά από πειραματική μόλυνση με εμβάπτιση και φυσική μόλυνση. Οι δημοσιευμένες δόσεις του Phdp που προκαλούν 50% θνησιμότητα σε μολυσμένα ψάρια (LD50) ποικίλλουν μεταξύ 10^3 και 10^6 βακτηριακά κύτταρα/ml για ενδοπεριτοναϊκές μολύνσεις και μεταξύ 10^5 και 10^6 κύτταρα/ml μετά από μόλυνση με εμβάπτιση.

Πηγή και δεξαμενή της μόλυνσης-τρόπος μετάδοσης

Παρά τις αναφορές που υποδηλώνουν ότι το θαλασσινό νερό θα μπορούσε να είναι η πηγή της μόλυνσης (Ohnishi et al. 1982, Egusa, 1983), πειράματα που έγιναν από τους Janssen & Surgalla (1968), Sako (1988) και Toranzo et al. (1991) έδειξαν ότι το Phdp δεν μπορεί να επιβιώσει στο υδάτινο περιβάλλον για πολύ, επιβιώνοντας 4-6 ημέρες στο υφάλμυρο νερό. Ωστόσο, οι Magarinos et al. (1993) ανέφεραν επιβίωση έως 12 ημέρες σε ιζήματα, ανάλογα με τον βακτηριακό μικρόκοσμο. Δεν θα πρέπει να παραβλεφθεί, ωστόσο, ότι υπάρχει δυνατότητα μεγαλύτερων χρόνων επιβίωσης σε περιβάλλοντα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά όπως σε περιοχές δίπλα σε ιχθυοκλωβούς. Επιπλέον, δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι το Phdp μπορεί να επιβιώσει στο νερό της θάλασσας σε μία μη-καλλιεργήσιμη ή λανθάνουσα κατάσταση (Austin & Allen-Austin, 1987). Οι Magarinos et al. (1993) ανέφεραν

ότι ένα τέτοιο βιώσιμο αλλά μη-καλλιεργήσιμο στάδιο του παθογόνου παράγοντα μπορεί να προκαλείται κάτω από συνθήκες ασιτίας (έλλειψη θρεπτικών ουσιών) και στη συνέχεια εύκολα να επανέρχεται σε καλλιεργήσιμη κατάσταση όταν υπάρχουν διαθέσιμα θρεπτικά. Οι LD50s των μη-καλλιεργήσιμων σταδίων φέρεται να είναι παρόμοιες με αυτές των καλλιεργήσιμων σταδίων. Ο Bullock (1978) θεώρησε ότι μόλις ένας πληθυσμός μολυνθεί η ασθένεια μεταδίδεται μέσω επαφής των ψαριών και ότι μπορεί να υπάρχουν ασυμπτωματικοί φορείς υπεύθυνοι για την εξάπλωση της νόσου. Επίσης έχει προταθεί ότι ένας ασπόνδυλος φορέας θα μπορούσε να είναι υπεύθυνος για τη μετάδοση της νόσου (Robohm 1983).

Κινητική της φωτοβακτηριδίασης

Η πρώτη αλληλεπίδραση μεταξύ του παθογόνου και του σπονδυλωτού ξενιστή περιλαμβάνει τη προσκόλληση σε επιφάνειες των ευκαρυωτικών κυττάρων. Οι Magarinos et al. (1996) διαπίστωσαν ότι τα κύτταρα του Phdp προσκολλώνται αδύναμα ή μέτρια σε κυτταρικές σειρές ψαριών, με τα επίπεδα της προσκόλλησης να είναι μεταβλητά ανάλογα με τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται. Όλα τα στελέχη Phdp που δοκιμάστηκαν έδειξαν υψηλή ικανότητα δέσμευσης με τη κυτταρική σειρά CHSE-214. Οι συγγραφείς ανέφεραν επίσης ότι η θερμότητα και τα σάκχαρα, αλλά όχι η πρωτεΐνη K, επηρέασαν τη δυνατότητα προσκόλλησης. Αντιοροί που αναπτύχθηκαν εναντίον του λιποπολυσακχαριδίου του Phdp δεν επηρέασαν την προσκόλληση του παθογόνου. Το τελευταίο παρέχει αποδεικτικά στοιχεία ότι το λιποπολυσακχαρίδιο της εξωτερικής μεμβράνης των κυττάρων του Phdp πιθανόν να μην εμπλέκεται στη διαδικασία πρόσφυσης του βακτηρίου και δείχνει ότι γλυκοπρωτεΐνη(ες) μπορεί να ενεργεί (ούν) ως συνδετικό (ά) μόριο (α) στη διαδικασία πρόσφυσης. Ωστόσο, δεδομένου ότι αυτοί οι συγγραφείς ανέφεραν ότι πρωτεΐνη K δεν επηρέασε την ικανότητα προσκόλλησης του παθογόνου παράγοντα οποιαδήποτε πρόταση ότι ένα πρωτεϊνικό μόριο συμμετέχει στην εν λόγω διαδικασία πρέπει να επανεξεταστεί. Ένας καλός υποψήφιος θα μπορούσε να είναι το βακτηριακό πολυσακχαρίδιο της κάψας του Phdp που αναφέρθηκε νωρίτερα, εάν αυτό είναι παρόν στο μολυσματικό στάδιο του παθογόνου.

Οι Magarinos et al. (1996), επίσης, ανακάλυψαν ότι το Phdp έδειξε ενισχυμένη ικανότητα δέσμευσης στο έντερο ψαριών φυσικών ξενιστών του όπως το λαβράκι και η τσιπούρα, σε σύγκριση με άλλα είδη ψαριών, με ποσότητες που κυμάνθηκαν μεταξύ 10^4 - 10^5 βακτηριακά κύτταρα / gr ιστού. Επιφάνειες στόχοι για τη πρώτη προσκόλληση των παθογόνων βακτηρίων των ψαριών είναι εκείνοι που βρίσκονται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον, π.χ. το δέρμα, τα βράγχια και το πεπτικό σύστημα (Magarinos et al. 1996), και αυτό συμβαίνει και με τη φωτοβακτηριδίαση (Kawahara et al. 1989).

Κλινικά συμπτώματα και παθολογία

Έχουν περιγραφεί δύο μορφές της νόσου. Στην οξεία μορφή, η οποία επηρεάζει νεαρά άτομα, τα ψάρια εμφανίζουν υψηλή θνησιμότητα χωρίς εμφανή συμπτώματα. Όντας μια σηψαιμική ασθένεια η φωτοβακτηριδίαση δεν παρουσιάζει μοναδικά χαρακτηριστικά σημάδια. Ο Egusa (1983) σε μία αναθεώρηση της νόσου στον κιτρινόπτερο στην Ιαπωνία ανέφερε ότι, αρχικά, τα ψάρια χάνουν την ικανότητά τους να κατεβαίνουν στο πυθμένα των κλωβών και περιστασιακά αναπτύσσουν μια μικρή αλλοίωση στο δέρμα η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε έλκος. Τα κλινικά συμπτώματα της οξείας φάσης της νόσου αποτελούνται από αποχρωματισμό/μαύρο χρωματισμό και ανορεξία (Matsubato 1975, Muroga et al 1977, Hawke et al. 1987, Ceschia et al. 1991, Baudin-Laurencin et al. 1991) και πρήξιμο στην

κοιλιακή κοιλότητα (Balebona et al. 1992). Η χρόνια μορφή της νόσου δεν εμφανίζει κανένα σύμπτωμα εκτός από μια σταθερά χαμηλή θνησιμότητα, συνήθως σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, ή σε ψάρια που έχουν επιζήσει της οξείας φάσης της νόσου.

Νεκροψία των ψαριών που πεθαίνουν / ή είναι ετοιμοθάνατα κατά την οξεία φάση της νόσου, συνήθως, αποκαλύπτει ένα χλωμό ήπαρ και νεφρούς (Balebona et al. 1992), διόγκωση σπλήνα και νεφρών (Hawke et al. 1987, Baudin-Laurencin et al. 1991), μικροερυθρήματα με πετέχειες σε όργανα και ιστούς (Ceschia et al. 1991) και περιστασιακά, υπόλευκα οζίδια στον σπλήνα, συνήθως, 1-2 mm σε διάμετρο (Hawke et al. 1987, Ceschia et al. 1991, Toranzo et al. 1991). Αυτά τα οζίδια χαρακτηρίζουν τη χρόνια μορφή της νόσου (Bullock 1978, Egusa 1983, Baudin-Laurencin et al. 1991, Toranzo et al. 1991).

Η ιστοπαθολογική εξέταση κατά την οξεία μορφή της φωτοβακτηριδίασης αποκαλύπτει οξείες νεκρωτικές αλλαγές, ιδίως στον σπλήνα και στους νεφρούς, συνοδευόμενες από διήθηση των ιστών με αιμοσφαίρια μαζί με μάζες βακτηριακών κυττάρων, εντός και εκτός μακροφάγων, γεμίζοντας τριχοειδή αγγεία και διάμεσους χώρους. Μπορεί να παρατηρηθεί επίσης μια μέτρια πολυεστιακή νέκρωση ηπατοκυττάρων (Hawke et al. 1987, Toranzo et al. 1991, Galleotti et al. 1995, Bakoroulos et al. 1999). Οι Hawke et al. (1987), επίσης παρατήρησαν οξεία πολυεστιακή νέκρωση του παγκρέατος σε ασθενή ριγωτά λαβράκια, η οποία συνοδευόταν από απώλεια ή μείωση του μεγέθους των κοκκίων ζυμογόνου.

Η χρόνια μορφή της νόσου χαρακτηρίζεται από υπόλευκα οζίδια στον σπλήνα και στους νεφρούς τα οποία είναι κοκκιοματώδεις βλάβες που περιλαμβάνουν μάζες κυττάρων Phdp, επιθηλιοειδή κύτταρα και μακροφάγα σε διάφορα στάδια εκφύλισης (μερικά γεμάτα με άθικτα βακτηριδία) και ινοβλάστες (Bullock 1978, Toranzo et al. 1991, Galleotti et al. 1995).

Θεραπεία και πρόληψη

Η χημειοθεραπεία ήταν αποτελεσματική για τη θεραπεία της φωτοβακτηριδίασης των ψαριών μέχρι τη δεκαετία του 1980. Έκτοτε, έχουν παρατηρηθεί κωδικοποιημένες από πλασμίδιο ή χρωμοσωμικές ανθεκτικότητες σε διαφορετικά αντιβιοτικά και άλλα φάρμακα (Magariños et al. 1992b, Kim et al. 1993). Επιπλέον, έχει περιγραφεί ότι το Phdp έχει μια περίοδο ενδοκυτταρικού παρασιτισμού μέσα στα μακροφάγα κατά τη διάρκεια λοίμωξης (Kusuda & Salati 1993), ο οποίος μπορεί να εξηγήσει την αναποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας στην αντιμετώπιση κάποιων κρουσμάτων της νόσου. Τα τελευταία 20 χρόνια, διάφορες μελέτες που χρησιμοποίησαν αδρανολογικά με θερμότητα ή φορμόλη βακτηριακά κύτταρα έχουν αναλύσει την αποτελεσματικότητα του εμβολιασμού στην πρόληψη της φωτοβακτηριδίασης (Romalde & Magariños 1997). Ωστόσο, τα σκευάσματα που αξιολογήθηκαν έδειξαν προβλήματα επαναληψιμότητας και δυσκολίες αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων σε μεγάλη κλίμακα. Οι Fukuda & Kusuda (1981) αξιολόγησαν τη παθητική ανοσοποίηση, αλλά τα αποτελέσματα έδειξαν μια σύντομη μόνο περίοδο προστασίας. Η καλύτερη προστασία έναντι της φωτοβακτηριδίασης στη τσιπούρα και στο λαβράκι επιτεύχθηκε με εμπλουτισμένα με ECP εμβολιακά μίγματα, επιτυγχάνοντας σχετικό ποσοστό επιβίωσης άνω του 75% σε ψάρια που εμβολιάστηκαν σε βάρος μεταξύ 0,5 και 2g (Magariños et al. 1994c, Magariños et al. 1999). Διάφορα αδειοδοτημένα εμβόλια είναι εμπορικά διαθέσιμα και εφαρμόζονται με επιτυχία σε αρκετές ευρωπαϊκές χώρες. Περαιτέρω μελέτες στη γλώσσα (Romalde et al. 2005), έδειξαν ότι η ανοσοποίηση των ψαριών με αυτό το σκευάσμα είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην πρόληψη της νόσου. Παρόμοια

αποτελέσματα προέκυψαν όταν αυτό το σκεύασμα χρησιμοποιήθηκε σε διδύναμα εμβόλια κατά της φωτοβακτηριδίασης και δονακίωσης στη γλώσσα καθώς και στη τσιπούρα (Moriñigo et al. 2002, Arijo et al. 2005). Ωστόσο, εντοπίστηκε μια ανταγωνιστική επίδραση μεταξύ των αντιγόνων του Phdp και του βακτηρίου *Tenacibaculum maritimum*, όταν αυτοί οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση διδύναμου σκευάσματος για την πρόληψη της φωτοβακτηριδίασης και της μυξοβακτηριδίασης (Romalde et al. 2005).

Αν και έχουν γίνει μελέτες πειραματικών εμβολιασμών που χρησιμοποιούν διαφορετικά, σταθερά, ελλειμματικά σε σιδηροφόρα και με διαγραφή του *ago-A* γονιδίου μεταλλαγμένα στελέχη (Kusuda & Hamaguchi 1988, Thune et al. 2003), η χρησιμοποίηση ζωντανών εξασθενημένων εμβολίων δεν επιτρέπεται στις ευρωπαϊκές χώρες. Όσον αφορά στη χρήση ανοσοενισχυτικών πάνω στην ανθεκτικότητα έναντι του Phdp, οι γλυκάνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διατροφή για την πρόληψη ή τη μείωση της θνησιμότητας στην τσιπούρα λόγω της ασθένειας (Couso et al. 2003).

Συμπερασματικά, ένας συνδυασμός εμβολιασμού, ελέγχου της θερμοκρασίας του νερού και χρήσης γλυκάνης στη διατροφή, συμβάλλουν σε μια καλύτερη πρόληψη της φωτοβακτηριδίασης που προκαλείται από το Phdp.

1.10.2 Κυριότερη ιογενής ασθένεια

1.10.2.1 Ιογενής (Nodavirus) Εγκεφαλοπάθεια-Αμφιβληστροειδοπάθεια

Η ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια (Viral Encephalopathy and Retinopathy, VER), ή ιογενής νευρική νέκρωση (Viral Nervous Necrosis, VNN), (Munday et al. 1992, OIE 2016), είναι η νόσος που οφείλεται στη μόλυνση των ψαριών από Betanodavirus (Yoshikoshi & Inoue, 1990). Η ασθένεια προσβάλλει τα ψάρια στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Κ.Ν.Σ.) και τον αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού τους και εμφανίζουν νευρικά συμπτώματα. Η πρώτη αναφορά της νόσου περιγράφηκε στην Αυστραλία στο είδος *Lates calcarifer* (Barramundi) από τους Glazebrook & Campbell (1987). Έχει αναφερθεί σε πολλούς εκτρεφόμενους και φυσικούς πληθυσμούς ψαριών του θαλασσινού και του γλυκού νερού. Εμφανίστηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα στις αρχές της δεκαετίας του '90 και από τότε προκαλεί περιοδικά κρούσματα σε εκτρεφόμενα και μη εκτρεφόμενα ψάρια (Πράπας κ.α. 2000).

Ο ιός της εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας έχει παγκόσμια εξάπλωση. Οι λοιμώξεις που οφείλονται στον ιό αυτό έχουν αναδειχθεί, σχεδόν σε όλα τα μέρη του κόσμου σε σημαντικούς περιοριστικούς παράγοντες στη θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια. Οι λοιμώξεις αυτές εμφανίζονται σε συνάρτηση με την ένταση της καλλιέργειας και με τον αριθμό των ειδών που καλλιεργούνται (Munday et al. 2002). Η νόσος στην Ευρώπη έχει παρατηρηθεί στο καλκάνι, στους ροφούς, στο λαβράκι και σε άλλα είδη, ενώ έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη σωματιδίων ιού όμοιων με αυτών της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστροειδοπάθειας σε λάρβες τσιπούρας (Πράπας κ.α. 2000). Στην Ελλάδα η ασθένεια είναι αποκλειστικά νόσος των ψαριών και προσβάλλει κυρίως το εκτρεφόμενο λαβράκι (Le Breton et al. 1997).

Φυλογενετική συγγένεια και γενότυποι των Betanoda-ιών

Οι Betanoda-ιοί έχουν ταξινομηθεί σε 4 γενότυπους ανάλογα με τη φυλογενετική ανάλυση που βασίστηκε στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων της T4 μεταβλητής περιοχής του

γενωμικού τμήματος RNA2 (Nishizawa et al. 1997):

1. Striped Jack Nervous Necrosis Virus (SJNNV)
2. Tiger Puffer Nervous Necrosis Virus (TPNNV)
3. Red-spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV)
4. Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus (BFNNV)

Η ονομασία κάθε γενότυπου, αποδόθηκε από το είδος ψαριού από το οποίο είχαν απομονωθεί οι ιοί που κατατάσσονται στον κάθε γενότυπο. Από το κοκάλι (Striped jack, *Pseudocaranx dentex*) και το ψάρι tiger puffer (*Takifugu rubripes*) αντίστοιχα, πήραν το όνομά τους οι δύο πρώτοι γενότυποι SJNNV και TPNNV, από το ψάρι red spotted grouper (*Epinephelus akaara*) πήρε το όνομά του ο γενότυπος RGNNV, ενώ από το ψάρι barfin flounder (*Verasper moseri*) ο γενότυπος BFNNV. Οι τέσσερις γενότυποι δείχνουν ομοιότητα στο γενωμικό τους τμήμα RNA2, η οποία κυμαίνεται 76-82% στα νουκλεοτίδια και 81-88% στα εκφραζόμενα αμινοξέα (Nishizawa et al. 1995), ενώ παρόμοια ποσοστά ομοιότητας παρατηρούνται και στο γενωμικό τμήμα RNA1 (Nishizawa et al. 1995). Τα αντίστοιχα τμήματα μεταξύ Alphanoda-ιών και Betanoda-ιών, έδειξε ομοιότητα της τάξεως 29%, στα νουκλεοτίδια και περίπου 11% στα εκφραζόμενα αμινοξέα (Nishizawa et al. 1995, Λάμπου 2017).

Οι γενότυποι SJNNV, TPNNV, RGNNV και BFNNV έχουν διαφορετικούς ξενιστές και διαφορετική γεωγραφική εξάπλωση, κάτι το οποίο οφείλεται στην προσαρμογή τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες νερού (Cherif et al. 2009, Binesh et al. 2013, Vendramin et al. 2014). Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι για τους τέσσερις γενότυπους είναι: για τον BFNNV 15-20°C, για τον TPNNV 20°C, για τον SJNNV 20-25°C και για τον RGNNV 25-30°C, ενώ έχουν ανευρεθεί, διαφορετικοί γενότυποι στον ίδιο ξενιστή (Lopez-Jimena et al. 2010). Έχει βρεθεί ότι Betanoda-ιοί με τα ίδια γενετικά χαρακτηριστικά, μπορούν να μολύνουν είδη ψαριών διαφορετικών τάξεων. Διαφορετικά γενετικά στελέχη, έχουν ανιχνευθεί σε ψάρια ενός συγκεκριμένου είδους σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Thiery et al. 1999).

Γεωγραφική εξάπλωση

Οι Betanoda-ιοί αποτελούν αιτία της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας (VER) Η ασθένεια αυτή είναι μια από τις πιο σοβαρές των θαλάσσιων υδατοκαλλιεργειών, αποτελούν όμως και μεγάλη απειλή για τους φυσικούς πληθυσμούς ψαριών, λόγω του μεγάλου εύρους ξενιστών και της μεγάλης μολυσματικότητάς τους. Εκτός της Αφρικής έχουν ανιχνευθεί σε ψάρια σε όλες τις άλλες ηπείρους, κυρίως σε περιοχές που εκτρέφονται εντατικά θαλάσσια είδη ψαριών (Johnson et al. 2002, Munday et al. 2002, Nakai et al. 2009). Αρχικά αναφέρθηκε η προσβολή 19 ειδών ψαριών από 10 οικογένειες και 3 τάξεις, μεταξύ των οποίων το κοκάλι, το καλκάνι και το ευρωπαϊκό λαβράκι. Αργότερα διαπιστώθηκε η ύπαρξη του ιού σε 32 επιπλέον είδη-ξενιστές (16 οικογένειες, 5 τάξεις) (Munday et al. 2002). Ο αριθμός των ειδών των ψαριών που θεωρούνται ξενιστές του ιού μεγαλώνει συνεχώς, τόσο σε φυσικούς όσο και σε εκτρεφόμενους πληθυσμούς (Λάμπου 2017). Η ασθένεια, είναι αποκλειστικά νόσος των ψαριών και πλήττει στην Ελλάδα κυρίως το εκτρεφόμενο λαβράκι (Le Breton et al. 1997).

Επίδραση των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού

Οι Betanoda-ιοί σε τιμές pH του νερού 3-7 διατηρούν αυξημένη τη μολυσματικότητά τους. Όταν ο ιός διατηρήθηκε σε κυτταροκαλλιέργεια, μετά από τέσσερις ημέρες στους 37°C και

έπειτα από 3 μήνες στους 25°C αδρανοποιήθηκε, αλλά διατήρησε τη μολυσματικότητά του μετά από 12 μήνες παραμονής του στους 15°C (Frerichs et al. 2000). Ο πολλαπλασιασμός των Betanoda-ιών αναστέλλεται σε θερμοκρασίες 30-35°C, οπότε αδυνατούν να πολλαπλασιαστούν στους 37°C (μέση θερμοκρασία του ανθρώπινου οργανισμού) και έτσι καθίστανται ακίνδυνοι για τον άνθρωπο μετά από κατανάλωση μολυσμένου ψαριού (Hata et al. 2007).

Παθογένεια

Ο εγκέφαλος και ο αμφιβληστροειδής χιτώνας του ματιού των ψαριών προσβάλλονται από τον ιό. Οι Betanoda-ιοί εισέρχονται στον οργανισμό του ψαριού και από το δέρμα, καθώς σε επιθηλιακά κύτταρα της επιδερμίδας έχουν βρεθεί ιοσωμάτια NNV παράλληλα (Nguyen et al., 1996), ή προγενέστερα της ανίχνευσής τους στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Κ.Ν.Σ.) προσβεβλημένων ψαριών (Azad et al. 2006). Άλλη πιθανή πύλη εισόδου των Betanoda-ιών είναι το πεπτικό σύστημα και έχει βρεθεί ταυτόχρονα ο ιός στο εντερικό επιθήλιο και σε ιστούς του νευρικού συστήματος ψαριών (Grotmol et al. 1999). Από το εξωτερικό περιβάλλον ως είσοδος του ιού στον οργανισμό του ψαριού έχουν αναφερθεί τα βράγχια (Grotmol et al. 1999) και το επιθήλιο του οργάνου της όσφρησης (Banu et al. 2004, Mladineo 2003, Tanaka et al. 2004).

Η ιογενής εγκεφαλοπάθεια-αμφιβληστροειδοπάθεια και η ανίχνευση θετικών ανοσοϊστοχημικών αντιδράσεων σε Betanoda-ιούς σε συγκεκριμένες περιοχές του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του ματιού και του εγκεφάλου, έχουν δείξει ότι μέσω νευρικών οδών ή μέσω του αίματος μεταφέρεται ο ιός στο Κ.Ν.Σ. (Nguyen et al. 1996, Grotmol et al. 1999, Húsgaro et al. 2001). Σε μελέτες που έχουν γίνει για τη διασπορά του ιού στους ιστούς των ψαριών, έχουν δείξει ότι μπορεί να ανιχνευθεί και σε μη-νευρικούς ιστούς όπως στους μύες (Nguyen et al. 1996, Ararungen et al. 2002, Su et al. 2015a), στο ήπαρ (Mladineo 2003, Lopez-Jimena et al. 2012, Su et al. 2015a), στον νεφρό (Husgaro et al. 2001, Su et al. 2015a), στον σπλήνα (Lopez-Jimena et al. 2012, Su et al. 2015a), στο ουραίο πτερύγιο (Mazelet et al. 2011, Lopez-Jimena et al. 2011), στην καρδιά (Su et al. 2015a) και στο αίμα (Dalla Valle et al. 2000, Oliveira et al. 2008, Korsnes et al. 2009, Lopez-Jimena et al. 2010).

Κλινικά συμπτώματα

Τα κλινικά συμπτώματα των προσβεβλημένων ψαριών είναι έντονη νευρική συμπεριφορά, ανωμαλία στην κολύμβηση (κυκλική ή σπειροειδή κολύμβηση), κάμψη του σώματος και ληθαργική συμπεριφορά κινούμενα στην επιφάνεια ή στον πυθμένα του διχτυού και τέλος υπερκινητικότητα όταν ενοχληθούν. Τα προσβεβλημένα ψάρια μαυρίζουν έντονα στην υποξεία μορφή σαν αποτέλεσμα τύφλωσης, ενώ παρουσιάζουν εξελκώσεις στο πρόσθιο τμήμα του ρύγχους (την άνω και κάτω γνάθο) ως συνέπεια της σύγκρουσής τους στα δίχτυα. Συνήθως οι αλλοιώσεις αυτές παρατηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες ενώ σε θερμοκρασίες άνω των 25°C κυριαρχούν τα νευρικά συμπτώματα. Εσωτερικά οι μόνες αλλοιώσεις που συνήθως παρατηρούνται είναι εκφύλιση του εγκεφάλου, συμφόρηση των μηνίγγων και διάταση της νηκτικής κύστης (Γράπας κ.α. 2000). Παρατηρούνται υπερβολικό αδυνάτισμα των προσβεβλημένων ψαριών λόγω του ότι προκαλείται ανορεξία, καθώς και μαζικοί θάνατοι κατά την περίοδο έξαρσης της νόσου, ειδικά στις προνύμφες (Munday and Nakai 1997, Λάμπου 2017).

Αλλοιώσεις εξαιτίας της νόσου

Το κύριο παθολογοανατομικό εύρημα της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστροειδοπάθειας είναι η παρουσία κενотоπιώδους εκφύλισης στο Κ.Ν.Σ. και τον αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού. Ο πρόσθιος εγκέφαλος προσβάλλεται συνήθως εντονότερα σε σχέση με τον οπίσθιο εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Επιπλέον, στα μικρότερης ηλικίας ψάρια οι αλλοιώσεις είναι πιο έντονες, ενώ στα μεγαλύτερης ηλικίας οι αλλοιώσεις είναι λιγότερο εκτεταμένες και εντοπίζονται συνήθως στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού (Munday et al. 2002). Έχει περιγραφεί στον αμφιβληστροειδή χιτώνα κενотоπίωση στα διπολικά κύτταρα της εσωτερικής και εξωτερικής πυρηνικής στιβάδας, στη γαγγλιωνική κυτταρική στοιβάδα (Munday et al. 1992, Tanaka et al. 2004, Zorriehzahra et al. 2014), καθώς και στη στοιβάδα των ραβδίων και των κωνίων (Grotmol et al. 1995).

Διάγνωση

Η διάγνωση επιβεβαιώνεται από ιστολογικές αλλοιώσεις και συγκεκριμένα από την κενотоπιώδη εκφύλιση του εγκεφάλου και του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του ματιού. Ανάλογα με το μέγεθος των ψαριών και τη διάρκεια της νόσου διαφέρουν τα ποσοστά θνησιμότητας του προσβεβλημένου πληθυσμού. Σε λίγες μόνο ημέρες, μετά την εκδήλωση της νόσου, η θνησιμότητα στις λάρβες λαβρακιού μπορεί να φθάσει σε ποσοστό 90-100%, ενώ στα μεγαλύτερα ψάρια είναι μικρότερο και κυμαίνεται από 15-60% (Πράπας κ.α. 2000).

Η διεξαγωγή εργαστηριακών εξετάσεων είναι απαραίτητη για την ταυτοποίηση του αιτιολογικού παράγοντα. Η εργαστηριακή διάγνωση περιλαμβάνει μεθόδους που στοχεύουν στην ανίχνευση του ιού και ορολογικές μεθόδους που στοχεύουν στην ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι Betanoda-ιών. Είναι δυνατόν να γίνει διάγνωση και ανίχνευση του ιού με απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες, με την ανοσοχημική μέθοδο ELISA, με ανοσοφθορισμό (ανίχνευση των ιικών αντιγόνων IFAT), με ανοσοϊστοχημεία (IHC), με την ανεύρεση ιικών σωματιδίων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και την ανίχνευση του ιικού γενώματος με μοριακές τεχνικές (Πράπας κ.α. 2000).

Πρόληψη-Εμβολιασμός

Εξαιτίας της πιθανότητας κάθετης μετάδοσης της νόσου (γεννήτορες, αυγά, προνύμφες, νεαρά ψάρια, ενήλικα) και λόγω της αυξημένης ευπάθειας των ψαριών στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης θα πρέπει να λαμβάνονται τα εξής μέτρα:

α) Θα πρέπει να ελέγχονται οι γεννήτορες για παρουσία Betanoda-ιών στον ωοθηκικό ιστό, στα αυγά και στο σπέρμα με RT-PCR και για παρουσία ειδικών αντισωμάτων του ιού στον ορό με τη μέθοδο της ELISA (Breuil et al. 2000, Watanabe et al. 2000). Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για αναπαραγωγή μόνο οι αρνητικοί στον ιό γεννήτορες, ενώ οι θετικοί θα πρέπει να απομακρύνονται.

β) Θα πρέπει ξεπλένονται τα αυγά με θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με όζον (O₃) (Arimoto et al. 1996, Grotmol & Totland 2000), ή με θαλασσινό νερό στο οποίο έχει γίνει ηλεκτρόλυση (Watanabe et al. 2013), για την αδρανοποίηση του ιού που μπορεί να βρίσκεται προσκολλημένος στην επιφάνεια τους.

γ) Θα πρέπει να γίνεται έλεγχος για παρουσία του ιού με PCR, στις εκκολαπτόμενες προνύμφες ή στον γόνο που εισάγεται στην εκτροφή (Mori et al. 1998, Watanabe et al. 1998).

Ο περιορισμός του αριθμού των ωτοκοκίων θα μπορούσε να μειώσει την πιθανότητα κάθετης μετάδοσης του ιού, αφού η νόσος παρατηρείται συχνότερα σε προνύμφες που προέρχονται από αυγά που συλλέχθηκαν κατά τα τέλη της αναπαραγωγικής περιόδου (Mushiake et al. 1994). Άλλοι τρόποι πρόληψης είναι η μείωση της πυκνότητας των προνυμφών στις δεξαμενές (Munday et al. 2002), καθώς και ο εμβολιασμός των γεννητόρων, κάτι που βοηθάει στον περιορισμό της εξάπλωσης του ιού στα αυγά.

Η οριζόντια μετάδοση της νόσου (από δεξαμενή σε δεξαμενή στον ιχθυογεννητικό σταθμό, ή από κλωβό σε κλωβό στην πάχυνση) μπορεί να αποφευχθεί με την αποφυγή εκτεταμένης ανάμιξης παρτίδων ψαριών (Samuelsen et al. 2006). Άλλοι τρόποι πρόληψης είναι η καραντίνα (αναμονή και έλεγχος για την παρουσία του ιού) των νεοεισερχόμενων ψαριών, η απολύμανση των δεξαμενών και η δημιουργία ζωνών ελεύθερων από τον ιό (Munday et al. 2002).

Για τον έλεγχο της προσβολής από Betanoda-ιούς, έχει διερευνηθεί τελευταία η χρήση χημειοθεραπευτικών ουσιών. Η ριμπαβιρίνη είναι μια τέτοια ουσία που βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με την RdRp του ιού RGNNV και αναστέλλει την ιική μόλυνση (Huang et al. 2015a). Άλλη μέθοδος θεραπείας νοσούντων ψαριών από Betanoda-ιούς είναι η χρήση αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs) και η ικανότητά τους να ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. Σημαντικό ρόλο στην απόκριση του ξενιστή έναντι του στρες παίζουν οι α-κρυσταλλίνες, πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται σε όλα τα σπονδυλωτά (Wistom et al. 1994). Τέλος, στη θεραπεία ιογενών λοιμώξεων χρησιμοποιούνται και οι ιντερφερόνες (Strannegård et al. 2000).

Είναι διαθέσιμα σήμερα ελάχιστα εμπορικά εμβόλια για την πρόληψη από τον γενότυπο RGNNV της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστροειδοπάθειας που προσβάλλει το λαβράκι στη Μεσόγειο. Η αντίσταση των ψαριών σε φυσικές επαναμολύνσεις εξηγείται από το γεγονός ότι επιβιώνουν από την ασθένεια με το να παράγουν αντισώματα (Tanaka et al. 2001). Σύμφωνα με διάφορες μελέτες ο εμβολιασμός προσφέρει ορισμένου βαθμού προστασία έναντι των λοιμώξεων από Betanoda-ιούς. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι προληπτικού εμβολιασμού. Τέτοιες μέθοδοι είναι η χρήση αδρανοποιημένου ιού, ανασυνδυασμένης ιικής καψιδιακής πρωτεΐνης ή όμοιων με τον ιό σωματιδίων που παράγονται σε διάφορα συστήματα έκφρασης. Η αποτελεσματικότητα των τεχνικών αυτών αξιολογείται μετά από μόλυνση με τον ιό με τη μέτρηση των παραγόμενων αντισωμάτων μετά τον εμβολιασμό ή με τον προσδιορισμό του σχετικού ποσοστού επιβίωσης (RPS) (Λάμπου 2017).

Για τον έλεγχο της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστροειδοπάθειας έχει διερευνηθεί εκτός των άλλων τεχνικών και η δυνατότητα χρήσης DNA εμβολίων. Εξετάστηκε σε μελέτη η ικανότητα των DNA εμβολίων που παράγονται από ραβδοϊούς να επάγουν μη ειδική ανοσολογική απόκριση που παρέχει προστασία έναντι άλλων ιών. Μελετήθηκε η ανοσοποίηση καλκανιού έναντι της μόλυνσης από Betanoda-ιούς, μετά από χορήγηση DNA-VHSV εμβολίου και διαπιστώθηκε η προστασία του μόνο στα αρχικά στάδια της μόλυνσης (Somerset et al. 2003).

Σε νεαρά και μεγαλύτερου μεγέθους ψάρια, έχουν χορηγηθεί εμβόλια, με ενδοπεριτοναϊκή ένεση. Εμβολιασμός δεν μπορεί να γίνει με ενέσιμο τρόπο σε πρώιμα στάδια ανάπτυξης των ψαριών, αλλά η χορήγηση γίνεται είτε από το στόμα είτε με εμβάπτιση. Η χρήση

ανασυνδυασμένης καψιδιακής πρωτεΐνης NNV και η χορήγηση από το στόμα για την ανοσοποίηση προνυμφών, είχε θετικά αποτελέσματα (Lin et al. 2007). Η χρήση αδραντοποιημένων Betanoda-ιών για τον εμβολιασμό ψαριών με εμφάνιση για την ανοσοποίησή τους (Kai & Chi 2008), είχε για τουλάχιστον τρεις μήνες ικανοποιητικά αποτελέσματα προστασίας. Οι εμβολιασμοί των γεννητόρων πριν την περίοδο ωοτοκίας με ενδοπεριτοναϊκή ένεση βρέθηκε ότι μειώνουν την πιθανότητα κάθετης μετάδοσης Betanoda-ιών (Olsen and Press 1997, Kai et al. 2010).

1.10.3 Κυριότερη ασθένεια εξαιτίας διατροφικών δυσλειτουργιών

1.10.3.1 Χειμερινό σύνδρομο (Winter syndrome)

Οι αιτίες του χειμερινού συνδρόμου δεν είναι πλήρως κατανοητές και δεν μπορούν να εξηγηθούν ως αποτέλεσμα μόνο ενός παράγοντα (Tort et al. 1998a). Αν και η θνησιμότητα σχετίζεται με μειωμένες θερμοκρασίες, αυτός μπορεί να μην είναι ο μόνος παράγοντας που επηρεάζει τη θνησιμότητα, καθώς η πλειοψηφία των ψαριών επιβιώνει από τις ψυχρές περιόδους. Τα ποσοστά θνησιμότητας κυμαίνονται συνήθως γύρω στο 7-10% του εκτρεφόμενου πληθυσμού, αν και σε ορισμένες πολύ ακραίες περιπτώσεις, μπορούν να φθάσουν το 80%.

Το Χειμερινό σύνδρομο ("Winter syndrome" ή "Winter disease") επηρεάζει αποκλειστικά καλλιέργειες στη Μεσόγειο θάλασσα και είναι πιο σοβαρό στις βόρειες περιοχές της. Τα είδη που επηρεάζονται από αυτή την ασθένεια είναι η τσιπούρα (είναι το είδος που έχει αναφερθεί κυρίως η παθολογική κατάσταση-μπορεί να συνδέεται/συνοδεύεται και από βακτηριακές μολύνσεις), το λαβράκι, και το καλκάνι, που συχνά μπορεί να εκτρέφονται στις ίδιες εγκαταστάσεις (Gallardo et al. 2003). Η νόσος προκαλεί θνησιμότητα κατά τους ψυχρότερους μήνες και οξεία επεισόδια θνησιμότητας όταν η θερμοκρασία ανεβαίνει. Τα ποσοστά θνησιμότητας είναι συνήθως γύρω στο 7-10%, αλλά σε ορισμένες πολύ σοβαρές περιπτώσεις, μπορεί να φτάσει το 80%. Το Χειμερινό σύνδρομο μειώνει την ικανότητα των ψαριών να αντιστέκονται σε επιθέσεις από ευκαιριακά παράσιτα, φαίνεται να επηρεάζει μόνο τα πιο αδύναμα ψάρια, είτε τα μικρότερα ψάρια είτε ψάρια που είναι πιο ευαίσθητα στην καταπόνηση και τις τοξίνες (Ανδριοπούλου & Βλησμά, 1996).

Όταν η θερμοκρασία πέφτει στους 8-10°C, η κορτιζόλη του πλάσματος των εκτιθέμενων ψαριών αυξάνεται ως αντίδραση στην καταπόνηση (Gallardo et al. 2003), μειώνεται το συμπλήρωμα και η λυσοζύμη και ελαττώνονται τα λεμφοκύτταρα, μειώνεται έτσι η ικανότητα των ψαριών να αντιστέκονται σε προσβολή από ευκαιριακά παθογόνα και παράσιτα (Tort et al. 1998a). Σε θερμοκρασίες κάτω των 12°C, τα ψάρια σταματούν να τρέφονται (Gallardo et al. 2003). Το χειμερινό σύνδρομο αυξάνει τη κορτιζόλη πλάσματος, Διαφορετικά βακτήρια και ιοί, ιδιαίτερα το *Pseudomonas anguilliseptica* (Berther et al. 1995), απομονώθηκαν από διαφορετικά δείγματα προσβεβλημένων ψαριών από το χειμερινό σύνδρομο, αλλά δεν βρέθηκε ειδικό παθογόνο (Padro's et al. 1998). Σε αντίθεση, οι λοιμώξεις σε άλλα είδη ψαριών που εκτίθενται σε χαμηλές θερμοκρασίες συνήθως οφείλονται σε συγκεκριμένα παθογόνα είδη (Holt et al. 1993, Roberts 2001).

Τα ορατά σημάδια των ψαριών που επηρεάζονται από το χειμερινό σύνδρομο είναι λήθαργος, ακανόνιστη κολύμβηση και ελαχιστοποίηση αντίδρασης σε εξωτερικά ερεθίσματα. Μια ποικιλία σημαντικών βλαβών των ιστών έχουν περιγραφεί σε ψάρια με την συγκεκριμένη

συμπτωματολογία, όπως ο κοκκιωματώδης εκφυλισμός και η νέκρωση στις λευκές μυϊκές ίνες, ατροφία του εξωκρινούς παγκρέατος, χλωμό και εύθρυπτο συκώτι και λιπώδης εκφυλισμός σε ηπατοκύτταρα (Tort et al. 1998b). Ο πεπτικός σωλήνας φαίνεται να είναι τεταμένος και γεμάτος με διαυγές υγρό, υποδεικνύοντας μια πιθανώς μειωμένη απορρόφηση θρεπτικών ουσιών, και πολλά από τα προσβεβλημένα ψάρια έχουν επίσης λευκά ινοβλαστικά υλικά στο έντερο. Εξάλλου, ο βλεννογόνος του εντέρου συχνά εμφανίζει υπερπλασία.

Οι περισσότερες μελέτες που σχετίζονται με χειμερινές ασθένειες περιγράφουν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις και ανοσολογικές μεταβολές, αλλά λίγες έχουν δείξει αλλαγές στην φυσιολογία των ψαριών. Είναι σημαντική η διερεύνηση αλλαγών σε ορισμένες φυσιολογικές παραμέτρους που σχετίζονται, με την ομοίωση των ψαριών που οφείλεται σε πρωτεΐνες, αμινοξέα, γλυκόζη και ιόντα στο πλάσμα του αίματος και με το κυκλοφορικό και τη δομή των ιστών. Η περαιτέρω μελέτη αυτών των παραμέτρων θα μπορούσε να βοηθήσει στην αποκάλυψη των αίτιων της εμφάνισης στα εκτρεφόμενα ψάρια του χειμερινού συνδρόμου (Gallardo et al. 2003).

Κλινικά συμπτώματα και ανατομοπαθολογικά ευρήματα

Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από διογκωμένη κοιλιά (swollen belly) και αυξημένη θνησιμότητα. Τα προσβεβλημένα ψάρια εμφανίζουν έντονα φαινόμενα ασκίτη και ανώμαλη κολύμβηση. Δεν παρατηρούνται ανωμαλίες, αλλά είναι εμφανές οίδημα, τόσο στο δέρμα όσο και σε όλα τα εσωτερικά όργανα. Το έντερο είναι συνήθως διεσταλμένο και γεμάτο από υγρό και μία άμορφη λευκή μάζα. Στα πρώιμα στάδια του συνδρόμου, το ασκίτικό υγρό είναι καθαρό και διαφανές, και δε διακρίνονται βακτήρια. Σε πιο προχωρημένα στάδια του συνδρόμου, το ασκίτικό υγρό είναι θολό και είναι δυνατή η διάκριση ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών ειδών βακτηρίων (Ανδριοπούλου & Βλησμά, 1996).

Τα κλινικά συμπτώματα των προσβεβλημένων ψαριών είναι σκουροχρωμία του σώματος, νωχελική συμπεριφορά και μερική ή ολική απολέπιση. Χαρακτηριστική είναι πέραν της διόγκωσης της κοιλιακής χώρας και η παρουσία νεκρώσεων στα βράγχια. Σε νεκροψίες που έγιναν σε εκτρεφόμενα ψάρια, παρατηρήθηκε αποχρωματισμένο και εύθρυπτο ήπαρ, υπήρξε διάταση και υπεραιμία του εντέρου που συνοδευόταν από υδαρές περιεχόμενο και σε μερικές περιπτώσεις σπληνομεγαλία ποικίλου βαθμού (Πράπας κ.α. 2000). Από αναλύσεις που έγιναν στη σάρκα των ψαριών, προκύπτει ότι τα προσβεβλημένα ψάρια περιείχαν σημαντικά λιγότερες πρωτεΐνες και περισσότερα λίπη και τέφρα στο σώμα τους απ' ότι τα υγιή. Επιπλέον, το ηπατοσωματικό τους περιεχόμενο ήταν σημαντικά υψηλό. Το συκώτι των άρρωστων ψαριών περιέχει χαμηλότερα επίπεδα γλυκογόνου και υψηλότερα επίπεδα λιπών. Ο ασκίτης που παρατηρείται, είναι ένδειξη υδρομεταλλικής ανισορροπίας. Στην παρούσα περίπτωση δεν μπορεί να προκλήθηκε από βακτήρια, εφόσον τα τελευταία ήταν απόντα στα πρώτα στάδια του φαινομένου (Ανδριοπούλου & Βλησμά, 1996).

Διάγνωση

Η διάγνωση τίθεται με βάση τα κλινικά συμπτώματα και την περίοδο εκδήλωσης της νόσου. Συνήθως προσβάλλονται ψάρια του πρώτου έτους εκτροφής στους πλωτούς κλωβούς. Η θνησιμότητα ποικίλλει ανάλογα με τη σοβαρότητα του συνδρόμου, κυμαίνεται δε συνήθως από 15-20% του προσβεβλημένου πληθυσμού (Πράπας κ.α. 2000).

Πρόληψη

Για την πρόληψη από την εκδήλωσή του είναι απαραίτητη η ορθολογικότερη διαχείριση όσον αφορά στη διατροφή και στην ιχθυοπυκνότητα. Για την θεραπεία των προσβεβλημένων ψαριών έχουν δοκιμαστεί διάφορα αντιβιοτικά (Πράπας κ.α. 2000), χωρίς όμως σημαντικά αποτελέσματα. Η μείωση του ταΐσματος, η μείωση της συγκέντρωσης λιπαρών στην τροφή και η αραίωση των ψαριών στους ιχθυοκλωβούς, συνιστώνται ως ενδεικτικές διαχειριστικές λύσεις όταν εμφανίζεται η νόσος.

1.11 Σύνοψη-Σκοπός

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η επίδραση των περιβαλλοντικών παραμέτρων στην εμφάνιση ασθενειών του εκτρεφόμενου λαβρακιού *Dicentrarchus labrax*, L. 1758 (και μόνο η εμφάνιση του χειμερινού συνδρόμου στην τσιπούρα *Sparus aurata*, L. 1758) και στην πρόληψη των ασθενειών αυτών, σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας της Νήσου Κεφαλονιάς. Στη διατριβή αναπτύχθηκε ένα εισαγωγικό μέρος (Κεφάλαιο 1) στο οποίο αναφέρονται πληροφορίες για τις ιχθυοκαλλιέργειες, τις αλληλεπιδράσεις τους με το θαλάσσιο περιβάλλον και τις ασθένειες που πλήττουν τα εκτρεφόμενα ψάρια και στη συνέχεια χωρίζεται σε δύο μέρη (Κεφάλαιο 2 και Κεφάλαιο 3) τα οποία αναφέρονται παρακάτω.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

«Συσχέτιση περιβαλλοντικών παραμέτρων με την εμφάνιση ασθενειών στα εκτρεφόμενα ψάρια»

2.1 Εισαγωγή

Στην ιχθυοκαλλιέργεια οι περιβαλλοντικές παράμετροι είναι ουσιώδεις και πολλές δρουν ως προδιαθετικοί παράγοντες στην ανάπτυξη ασθενειών. Το θαλάσσιο περιβάλλον και οι φυσικοχημικές παράμετροι που το χαρακτηρίζουν παίζουν καθοριστικό ρόλο στις ιχθυοκαλλιέργειες. Οι πιο σημαντικές παράμετροι είναι η θερμοκρασία (T°C), η αλατότητα (S‰), το διαλυμένο οξυγόνο (D.O.), η ενεργός οξύτητα (pH) Boeuf et al. (2001), καθώς επίσης και η αμμωνία (NH₃), τα νιτρώδη (NO₂⁻), τα νιτρικά (NO₃⁻), για κλειστά και ημίκλειστα συστήματα εκτροφής σε ότι αφορά την χρήση του νερού και τα φωσφορικά άλατα (PO₄³⁻).

2.1.1 Παράμετροι που επιδρούν στις υδατοκαλλιέργειες-Φυσικοχημικές παράμετροι

2.1.1.1 Θαλάσσια ρεύματα-Κινήσεις των υδάτινων μαζών

Η κίνηση του θαλασσινού νερού, που μπορεί να είναι συνεχής, εποχιακή, περιοδική ή/και μη περιοδική, έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία θαλασσίων ρευμάτων μεγάλης ή μικρής κλίμακας.

Η παρουσία εμποδίων στο νερό παρεμποδίζει και αλλοιώνει την φυσική κυκλοφορία του νερού. Αυτό αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για τις υδατοκαλλιέργειες όπου όλα τα κλουβιά πρέπει να δέχονται ποσότητες φρέσκου θαλασσινού νερού και να μην παρεμποδίζει το ένα κλουβί τα υπόλοιπα. Η παρουσία διχτυών στο νερό καθώς και άλλες παράμετροι όπως η πυκνότητα του νερού, τα ρεύματα, το μέγεθος του ματιού του διχτυού, η παρουσία ή όχι κόμπων στο δίχτυ, το σχήμα του ματιού των διχτυών, ο βαθμός ανάπτυξης σταθερής προσκόλησης οργανισμών στο δίχτυ και η πυκνότητα εκτροφής (αριθμός ψαριών/m³) είναι ιδιαίτερα σημαντικές και δίνουν το μέγεθος της πολυπλοκότητας του θέματος. Σύμφωνα με δεδομένα της ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας και εφαρμόζοντας το μοντέλο Milne (Milne 1970) κάθε άκομπο δίχτυ nylon εμφανίζει συντελεστή αντίστασης (Cd) στο νερό ίσο προς:

$$Cd=1+2.73(d/a)+3.12(d/a)^2$$

Όπου a το μέγεθος ματιού (mm) και d η διάμετρος του νήματος (mm) του διχτυού. Με εφαρμογή αυτή την εξίσωση, τα συνήθη μάτια των 5, 8 και 12 mm παρουσιάζουν συντελεστή 2,6-1,9 και 1,5 αντίστοιχα.

2.1.1.2 Θερμοκρασία (T°C)

Τα ψάρια είναι ποικιλόθερμοι οργανισμοί που δεν ρυθμίζουν μόνοι τους τη θερμοκρασία του σώματος, ενώ η εσωτερική θερμοκρασία ακολουθεί εκείνη του νερού που τους περιβάλλει. Τα ψάρια επιδεικνύουν όρια στην ανοχή της θερμοκρασίας και μπορούν να ταξινομηθούν σε στενόθερμα που ανέχονται μικρό εύρος θερμοκρασίας και σε ευρύθερμα με μεγάλο εύρος ανοχής. Η θερμοκρασία ρυθμίζει τον ρυθμό μεταβολισμού επηρεάζοντας τη μοριακή ενεργοποίηση της μεταβολικής αλυσίδας. Ως εκ τούτου, ελέγχει τις περισσότερες

φυσιολογικές διεργασίες που άμεσα ή έμμεσα σχετίζονται με τη συμπεριφορά διατροφής και την πρόσληψη τροφής. Η θερμοκρασία είναι ο κύριος παράγοντας που ελέγχει το επίπεδο πρόσληψης τροφής στα ποικιλόθερμα ζώα, αλλά οι θερμικές επιδράσεις αλληλεπιδρούν τόσο με εξωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (οξυγόνο, αλατότητα, διαθεσιμότητα τροφής), όσο και με εσωτερικούς βιολογικούς παράγοντες (ηλικία, γενετικό υλικό). Για παράδειγμα, όταν η διατροφή ή η διαθεσιμότητα οξυγόνου περιορίζεται, η βέλτιστη θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται καλύτερα τα ψάρια είναι συνήθως χαμηλότερη από ό,τι όταν δεν υπάρχει περιορισμός στις παραπάνω παραμέτρους. Επιπλέον, υπάρχουν ενδοειδικές διαφορές για τη διατροφή και τη σχέση ανάπτυξης/θερμοκρασίας ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή (Sánchez Vázquez & Munoz Cueto, 2014).

Στα υδάτινα οικοσυστήματα, οι διακυμάνσεις αυτές προκαλούν μεταβολές σε όλες τις βιολογικές και φυσιολογικές λειτουργίες των ποικιλόθερων ζώων, όπως η αναπαραγωγή, η ανάπτυξη, η αύξηση, η θνησιμότητα και τέλος η γεωγραφική κατανομή τους, παρόλο που το νερό παρουσιάζει μεγαλύτερη θερμοχωρητικότητα από τον αέρα ο οποίος μπορεί να παρουσιάσει μεγάλες και γρήγορες αλλαγές στη θερμοκρασία (Pörtner 2001, Pörtner & Knust 2007, Somero 2010, 2012).

2.1.1.3 Αλατότητα

Στο σύνολο των διαλυμένων στοιχείων του θαλασσινού νερού, τα ιόντα χλωρίου (Cl^-) αποτελούν το 55%, τα ιόντα του νατρίου (Na^+) το 30,6%, οι θειϊκές ρίζες (SO_4^{2-}) το 7,7%, τα ιόντα του μαγνησίου (Mg^{++}) το 3,7% και τα ιόντα του καλίου (K^+) το 1,1%. Αλατότητα ορίζεται το ολικό ποσό των στερεών διαλυμένων στοιχείων σε gr βάρους που περιέχεται σε ένα kg θαλασσινού νερού, όταν όλα τα ανθρακικά ιόντα έχουν μετατραπεί σε οξείδια, όταν τα ιόντα Br^- και J^- αντικατασταθούν από τα ιόντα Cl^- και το οργανικό υλικό οξειδωθεί στους 480°C . Η μέση αλατότητα του θαλασσινού νερού είναι 35‰ ή 35 μέρη ανά 1000. Η μονάδα μέτρησης της αλατότητας του νερού είναι το psu (part salinity unit-μονάδα αλατότητας) (Castro & Huber, 1999).

Οι θαλάσσιοι οργανισμοί έχουν προσαρμοστεί στα προβλήματα διατήρησης της κατάλληλης ισορροπίας του νερού και των αλάτων, με διάφορους τρόπους, ενώ μερικοί δεν διατηρούν ενεργά την ισορροπία αλάτων και νερού και οι εσωτερικές τους συγκεντρώσεις αλλάζουν καθώς αλλάζει η αλατότητα του νερού. Τέτοιοι οργανισμοί ονομάζονται οσμωταγείς, οι οποίοι είναι πολύ συχνά αναγκασμένοι να μένουν εκεί όπου η αλατότητα του νερού ταιριάζει με αυτή των εσωτερικών υγρών τους. Έξω από ένα στενό φάσμα τιμών αλατότητας, αντιμετωπίζουν οσμωτικά προβλήματα. Αν τοποθετηθούν σε γλυκό νερό, θα διογκωθούν και θα διαρρηχθούν τα κύτταρά τους, εξαιτίας της οσμωτικής ροής του νερού μέσα στους ιστούς τους. Σε περιοχές όπως ο ανοιχτός ωκεανός, όπου η αλατότητα δεν παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση, οι οσμωταγείς οργανισμοί δεν αντιμετωπίζουν μεγάλες δυσκολίες. Η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης είναι εκλεκτική, λύνει το πρόβλημα της διάχυσης των ιόντων και των οργανικών μορίων, αφού το νερό διαχέεται από περιοχές με μεγάλη συγκέντρωση προς αυτές με μικρότερη. Άλλοι θαλάσσιοι οργανισμοί οσμωρυθμίζουν, ελέγχοντας τις εσωτερικές συγκεντρώσεις τους για την αποφυγή οσμωτικών προβλημάτων. Ένας τρόπος προσαρμογής τους σε διαφορετικές αλατότητες είναι η ρύθμιση της συγκέντρωσης των διαλυμένων ουσιών στα υγρά του σώματός τους, έτσι ώστε η ολική συγκέντρωση των υγρών

τους να εξισώνεται με αυτή του εξωτερικού νερού. Μερικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν μια συγκεκριμένη χημική ένωση για την οσμωρύθμιση, αυξάνοντας ή ελαττώνοντας την ποσότητά της ανάλογα με τις αλλαγές της αλατότητας (Castro & Huber 1999). Τα νεαρά λαβράκια δείχνουν ανθεκτικότητα στην αλατότητα, χωρίς θνησιμότητα σε συγκεντρώσεις άλατος 3-30 ppt, 48 ώρες μετά από την έκθεσή τους. Χαμηλή θνησιμότητα παρατηρείται μεταξύ 30 και 40 ppt, και 100% θνησιμότητα σε αλατότητα 40-60 ppt, μέσα σε λίγες ώρες. Οξείες αλλαγές αλατότητας προκαλούν παροδική αύξηση του μεταβολισμού των ψαριών. Οι μεταβολές της εξωτερικής αλατότητας προκαλούν αύξηση των ποσοστών του μεταβολικού ρυθμού σε κάθε αλλαγή αλατότητας. Η αλατότητα είναι ένας από τους παράγοντες που διαταράσσουν, τον μεταβολισμό των ψαριών. Οξείες μεταβολές της αλατότητας προκαλούν παροδική αύξηση έως 80% του μεταβολικού ρυθμού, ο ρυθμός παραμένει αυξημένος έως 10 ώρες μετά την αλλαγή αλατότητας.

2.1.1.4 Διαλυμένο Οξυγόνο (D.O.)

Η παρακολούθηση του διαλυμένου οξυγόνου παρέχει ένδειξη της ποιότητας του νερού σε παράκτιες περιοχές και χρησιμοποιείται ως ένα εργαλείο στα οικοσυστήματα ακεραιότητας (NLWRA 2002). Το οξυγόνο απαιτείται για τη παραγωγή ενέργειας μέσω χημικών οξειδώσεων. Η ενέργεια αυτή χρειάζεται όχι μόνο για τις απαραίτητες λειτουργίες του οργανισμού, όπως η πέψη και η χρησιμοποίηση της τροφής και η οσμωρύθμιση αλλά και για τη δραστηριότητα. Οι ανάγκες σε οξυγόνο ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του υδρόβιου οργανισμού, το στάδιο της ανάπτυξής του και το μέγεθός του και επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η αλατότητα του νερού κ.λπ. Εάν η παροχή οξυγόνου σε ένα ζώο παρεκκλίνει από το ιδανικό τότε η λήψη τροφής, η μετατρεψιμότητά της, η ανάπτυξη και η υγεία του μπορεί να επηρεαστούν αρνητικά. Οποιαδήποτε πτώση του οξυγόνου κάτω από τα επίπεδα που απαιτούνται σε μία συγκεκριμένη στιγμή επιφέρει αλλαγή στη συμπεριφορά των ψαριών, αύξηση της κίνησης των βραγχιακών επικαλυμμάτων (αναπνοής) για πρόσληψη μεγαλύτερης ποσότητας οξυγόνου στη μονάδα του χρόνου και εάν οι ανάγκες δεν καλυφθούν προκαλείται υποξία και τελικά ασφυξία και θάνατος. Η όλη κατάσταση προκαλεί εξαιρετικό στρες και όταν το στρες είναι μακροχρόνιο έχει επιπτώσεις και στην ανάπτυξη των ψαριών αλλά και στην ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να ανταπεξέλθει μολύνσεων (Castro & Huber 1999).

Η κυριότερη πηγή οξυγόνωσης του νερού είναι η ατμόσφαιρα. Το οξυγόνο που βρίσκεται διαλυμένο στο νερό μεταφέρεται από την επιφάνεια με το φαινόμενο της διάχυσης. Η ολική ποσότητα του οξυγόνου που διαλύεται στο νερό εξαρτάται από την θερμοκρασία, την αλατότητα και την πίεση. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία και η αλατότητα του νερού η διαλυτότητα του οξυγόνου μειώνεται. Άλλη πηγή οξυγόνωσης του νερού των υδάτινων οικοσυστημάτων είναι η φωτοσύνθεση των υδρόβιων φυτικών οργανισμών. Η φωτοσυνθετική παραγωγή οξυγόνου περιορίζεται στην εύρωτη ζώνη. Η αναπνοή και η αποσύνθεση καταναλώνουν οξυγόνο σε όλα τα βάθη. Όταν η αναπνοή είναι μεγάλη σε κατάσταση ευτροφισμού για παράδειγμα και η αποσύνθεση νεκρής οργανικής ύλης αυξημένη, τότε η συγκέντρωση οξυγόνου πέφτει σε οριακά επίπεδα. Η κατάσταση επιδεινώνεται σε περιπτώσεις οργανικής ή θερμικής ρύπανσης. Ο βαθμός οξυγόνωσης των υδάτων στα διάφορα βάθη επηρεάζει την κατανομή και πυκνότητα των υδρόβιων οργανισμών. Το διοξείδιο του άνθρακα είναι απαραίτητο συστατικό για την φωτοσύνθεση και

την αναπνοή, αλλά και σε άλλες σημαντικές διεργασίες, επηρεάζει έμμεσα το pH του υδάτινου περιβάλλοντος και το σχηματισμό ενώσεων του ασβεστίου που είναι απαραίτητες στην κατασκευή οστών και οσφράκων (Castro & Huber 1999).

Ο ατμοσφαιρικός αέρας, η ανταλλαγή νερού μεταξύ πλωτών ιχθυοκλωβών και εξωτερικού θαλάσσιου νερού και η φωτοσύνθεση είναι συνήθως οι κύριες πηγές διαλυμένου οξυγόνου (DO) για τα εκτρεφόμενα ψάρια, ενώ η αναπνοή του αποθέματος ιχθύων και του οξυγόνου που καταναλώνεται από τους μικροοργανισμούς για αποσύνθεση των ιχθυοτροφών και των αποβλήτων κυριαρχούν στην κατανάλωση του DO. Ο εμπλουτισμός οξυγόνου από τον ατμοσφαιρικό αέρα αντιπροσωπεύει ένα αμελητέο μέρος του συνολικού DO του νερού. Η ανταλλαγή νερού είναι απαραίτητη στην αναπλήρωση του οξυγόνου σε ένα σύστημα εκτροφής που είναι απαραίτητη η απομάκρυνση των προϊόντων του μεταβολισμού (αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα) και η αποικοδόμηση της ανεκμετάλλευτης (αφάγωτης) ιχθυοτροφής. Σε ιχθυοκλωβούς, η ανταλλαγή νερού και ο εμπλουτισμός σε οξυγόνο βασίζεται κυρίως στη δράση των φυσικών θαλάσσιων ρευμάτων, αλλά και στις κινήσεις των συστοιχιών των κλωβών μιας μονάδας. Η χαμηλή συγκέντρωση DO στο θαλασσινό νερό αποτελεί υποτιμημένο πρόβλημα στις θαλάσσιες ιχθυοκαλλιέργειες σε πλωτούς κλωβούς στη Μεσόγειο. Πολύ λίγες επιστημονικές μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε αυτό το θέμα. Ταυτόχρονα, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον και ευαισθητοποίηση του κλάδου για το ότι οι διακυμάνσεις του διαλυμένου οξυγόνου θα μπορούσαν να είναι καθοριστικές για τη βιωσιμότητα του τομέα, καθώς μπορεί να επηρεάσει παραμέτρους όπως τη χρήση των ιχθυοτροφών, την ορθή διαχείριση των ψαριών και την εύρυθμη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος των εκτρεφόμενων ψαριών (Makridis et al. 2017).

Η μεσογειακή καλλιέργεια ιχθύων βασίζεται στον συστηματικό καθαρισμό των κλωβών, των δικτυών και των άλλων πλωτών εγκαταστάσεων, προκειμένου επιτευχθούν υψηλά επίπεδα ανάπτυξης κατά τις περιόδους που ανεβαίνει η θερμοκρασία. Κατά τα τέλη του καλοκαιριού και στις αρχές του φθινοπώρου, αυξάνεται η βιομάζα και η παροχή τροφής στις περιοχές που υπάρχουν κλουβιά. Το DO μειώνεται με την αύξηση των θερμοκρασιών, ενώ ο ρυθμός μεταβολισμού του αποθέματος ιχθύων είναι στενά συνδεδεμένος με τη θερμοκρασία και είναι ευθέως ανάλογος της αύξησής της. Η κατανάλωση οξυγόνου και ο ρυθμός απέκκρισης του λαβρακιού είναι 2-3 φορές υψηλότεροι στους 25°C σε σύγκριση με τους 13°C. Περιορισμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου (<40% κορεσμός) κατά τη διάρκεια αυτής της κρίσιμης περιόδου με τη μεγαλύτερη βιομάζα στα κλουβιά πάχυνσης θα έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη όρεξη και μείωση της μετατρεψιμότητας της τροφής και συνεπώς μείωση της ανάπτυξης των ψαριών (Makridis et al. 2017).

2.1.1.5 Ενεργός οξύτητα του νερού (pH)

Στις ιχθυοκαλλιέργειες ένας σημαντικός παράγοντας για την διασφάλιση καλής ποιότητας του νερού και αυξημένης παραγωγής, είναι το pH με εύρος 6,5-9,0 είναι γενικά αποδεκτό για την εκτροφή ψαριών. Σχετικές μελέτες για διάφορα είδη τελεόστεων έχουν δείξει ότι σε pH 9,0-11,0 τα περισσότερα είδη ψαριών πεθαίνουν μέσα σε λίγες ημέρες. Το pH επηρεάζει πολλές βιολογικές και χημικές αντιδράσεις και πολλές φορές χρησιμεύει σαν δείκτης ρύπανσης. Το σύνολο των βιοχημικών αντιδράσεων πραγματοποιείται σε ουδέτερο pH. Όξινα ή αλκαλικά περιβάλλοντα δυσχεραίνουν την πορεία των αντιδράσεων ή αναστέλλουν την

πραγματοποίησή τους. Τα φυσικά νερά έχουν τιμές pH που κυμαίνονται μεταξύ 4,0 και 9,0, ενώ τιμές 6,5-8,5 είναι στις περισσότερες περιπτώσεις οι καταλληλότερες για τους υδρόβιους οργανισμούς, παρόλο που σε αυτό το εύρος είναι δυνατό να ενεργοποιηθεί η «δηλητηριώδης» δράση των τοξικών ουσιών (Βρυώνης 2013).

Η οργανική ύλη στον ωκεανό είναι μια από τις μεγαλύτερες δεξαμενές άνθρακα στη Γη που αλληλεπιδρούν με την ατμόσφαιρα. Η αύξηση του CO₂ στο θαλασσινό νερό που οφείλεται στην αύξηση του CO₂ στην ατμόσφαιρα έχει ήδη μειώσει το pH του ωκεανού κατά 0,12 μονάδες σε σύγκριση με τα προβιομηχανικά χρόνια, με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου κατά 30% (Houghton et al. 2001, Sabine et al. 2004, Raven et al. 2005). Οι επιπτώσεις της οξίνισης των ωκεανών στον βακτηριακό μεταβολισμό είναι επί του παρόντος σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητες αλλά εξαιρετικής σημασίας για ακριβείς εκτιμήσεις της οργανικής ύλης και του ισοζυγίου του άνθρακα για το μέλλον των ωκεανών. Οι πολυσακχαρίτες είναι ένα σημαντικό συστατικό της οργανικής ύλης και περιέχουν έως και 15% βυθισμένα και αιωρούμενα σωματίδια οργανικού άνθρακα (Tanoue & Handa 1987, Bhosle et al. 1992, Hernes et al. 1996) και μέχρι 32% διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) (Pakulski & Benner 1994). Αυτοί οι πολυσακχαρίτες αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 50% του συνολικού φυτοπλαγκτού (Baines & Pace 1991) και παρέχουν ενέργεια και πηγή άνθρακα στο βακτηριοπλαγκτό υπό μορφή δομικών κυτταρικών συστατικών. Η βακτηριακή αποικοδόμηση των πρωτεϊνών υψηλού μοριακού βάρους και οργανικών ενώσεων όπως οι πολυσακχαρίτες αρχίζει με τη δράση των εξωκυτταρικών ενζύμων (Hoppe et al 1988, Chrost 1991). Έτσι, μακρομόρια υδρολύονται ενζυματικά εκτός των βακτηριακών κυττάρων σχηματίζοντας μονάδες χαμηλού μοριακού βάρους που είναι αρκετά μικρές για να μεταφερθούν μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Το pH είναι ένας σημαντικός παράγοντας ρύθμισης της ταχύτητας των ενζυματικών αντιδράσεων (Arrhenius 1889, Tipton & Dixon 1979). Αλλαγή των συγκεντρώσεων των ιόντων υδρογόνου στο θαλάσσιο περιβάλλον, μεταβάλλουν την κατάσταση των αμινοξέων και έτσι επηρεάζουν την τρισδιάστατη πρωτεϊνική δομή της ενεργού θέσης των κυττάρων των μικροοργανισμών. Σήμερα, δεν είναι γνωστό πώς θα επηρεάσει η οξίνιση των ωκεανών τη δραστηριότητα αποδόμησης των θαλάσσιων μικροοργανισμών και το βιολογικό τους κύκλο (Piontek et al. 2010).

Οι μικροοργανισμοί είναι από τους βασικούς βιοτικούς παράγοντες του θαλάσσιου περιβάλλοντος που εμπλέκονται στην ανακύκλωση θρεπτικών ουσιών και τη ροή άνθρακα στα θαλάσσια οικοσυστήματα. Έτσι, η οξίνιση του θαλασσινού νερού επηρεάζει την μικροβιακή ποικιλότητα, την πρωτογενή παραγωγικότητα και τα ιχνοστοιχεία στους ωκεανούς. Εκτός από αυτό, μπορεί επίσης να επηρεάσει τις μικροβιακές δραστηριότητες, την εξωκυτταρική δραστηριότητα των ενζύμων και την ανακύκλωση του αζώτου. Τα βραχυπρόθεσμα εργαστηριακά πειράματα, σε μελέτες μεσόκοσμου και τα μοντέλα μεταβολής της θαλάσσιας ποικιλότητας έχουν απεικονίσει τις ανεπιθύμητες επιπτώσεις της οξίνισης στους θαλάσσιους μικροοργανισμούς και στα οικοσυστήματα. Ωστόσο, η τρέχουσα κατανόηση σχετικά με την επίδραση της οξίνισης στους μικροοργανισμούς, βασίζεται κυρίως σε περιορισμένες πειραματικές μελέτες. Είναι δύσκολο να προβλεφθεί η αντίδραση των θαλάσσιων μικροοργανισμών βάσει τέτοιων πειραμάτων για αυτή τη σύνθετη διαδικασία. Για να μελετηθεί η ανταπόκριση των θαλάσσιων μικροβίων στην οξίνιση, πρέπει να εφαρμοστούν πολλαπλές προσεγγίσεις με τη χρήση λειτουργικής γονιδιωματικής

μικροσκοπίας νέας γενιάς και να μελετηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ μικροοργανισμών ή / και οργανικής ύλης με τους υπόλοιπους οργανισμούς (Surajit & Neelam 2015).

Πειράματα μεσόκοσμου έδειξαν ότι μικρές μειώσεις του pH από 0,2 έως 0,3 μονάδες, που αντιστοιχούν σε μελλοντική μείωση του pH του θαλασσινού νερού, είχαν άμεση επίδραση στον φυσικοχημικό έλεγχο φυσικών εξωκυττάρων συγκεντρώσεων γλυκοσιδάσης στους θαλάσσια πελαγικά οικοσυστήματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι οι ρυθμοί υδρόλυσης πολυσακχαρίτη από τις συγκεντρώσεις θαλάσσιας γλυκοσιδάσης δεν είναι στο μέγιστο στο σημερινό pH του θαλασσινού νερού. Η οξίνιση μετατόπισε το pH που μελετήθηκε *in situ* σε τιμή ευνοϊκότερη για τη δραστηριότητα της γλυκοσιδάσης στη θάλασσα και οδήγησε σε βελτιωμένη παροχή ασταθών υποστρωμάτων σε βακτηριοπλαγκτό. Ως εκ τούτου, αυξητική τάση της γλυκοσιδάσης στους ωκεανούς λόγω μείωσης του pH θα έχει ως αποτέλεσμα τη χημική οξίνιση των φυσικών ενζύμων τα οποία είναι ευεργετικά για τον μεταβολισμό των βακτηρίων. Έτσι, αναμένεται ο εγκλιματισμός ή η προσαρμογή του βακτηριοπλαγκτού, αλλά δεν θα αντισταθμιστεί η υποβάθμιση των πολυσακχαριτών στον ωκεανό στο μέλλον (Piontek et al. 2010). Κυτταρικά ένζυμα, τα οποία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στον κύκλο της θαλάσσιας οργανικής ύλης, βρέθηκαν να είναι ευαίσθητα στο pH. Δεδομένου ότι τα ένζυμα καταλύουν τις βιοχημικές αντιδράσεις σε όλες τις μορφές ζωής, μπορεί να υποθεθεί ότι οι επιπτώσεις της μείωσης του pH σε ενζυματικές διαδικασίες θα επηρεάσουν μεγάλη ποικιλία βιολογικών διεργασιών στον ωκεανό μελλοντικά και θα προκληθούν συνέπειες πρωτοφανούς πολυπλοκότητας. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι τα ένζυμα των μυών στα ψάρια θα ανταποκρίνονται με τον ίδιο τρόπο στην οξίνιση των ωκεανών με τα ένζυμα που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του φυτοπλαγκτού (Piontek et al. 2010).

Οι περισσότεροι ετερότροφοι οργανισμοί διατηρούν το pH του σώματός τους χαμηλότερο από αυτό του θαλασσινού νερού (Hochachka & Somero 2002). Τα βακτήρια συχνά έχουν βέλτιστες ενδοκυτταρικές τιμές pH μεταξύ 7,4 και 7,8 που τις διατηρούν σε αρκετά ευρύ φάσμα εξωτερικού pH (Booth 1985, Padan et al. 2005). Το εσωτερικό pH των πολυκύτταρων θαλάσσιων οργανισμών είναι επίσης τυπικά χαμηλότερο από το θαλασσινό νερό. Πιο συγκεκριμένα τα εξωκυτταρικά υγρά όπως το αίμα, τα υγρά που περιβάλλουν τα κύτταρα, έχουν χαμηλότερο pH περίπου 0,4 μονάδες από το θαλασσινό νερό (Pörtner et al. 2004). Κατά συνέπεια, η αύξηση της περιβαλλοντικής συγκέντρωσης του CO₂ και η οξίνιση των ωκεανών θα μπορούσε να διαταράξει την εσωτερική ισορροπία όξινων βάσεων των οργανισμών, επηρεάζοντας δυνητικά μια ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών που κυμαίνονται από τη σύνθεση πρωτεϊνών μέχρι την ασβεστοποίηση.

Το pH για τους λόγους που προαναφέρθηκαν μπορεί να επηρεάσει και την εμφάνιση ασθενειών προάγοντας την ανάπτυξη συγκεκριμένων παθογόνων εις βάρος άλλων μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, σε εκτροφή γαρίδας στη Σρι Λάνκα όπου παρατηρήθηκαν συμπτώματα δονακίωσης από βακτηριολογικές αναλύσεις απομονώθηκαν 40 είδη βακτηρίων που ανήκουν στην οικογένεια *Vibrionaceae*. Από αυτά, 24 στελέχη ανήκαν σε είδη του γένους *Vibrio* τα οποία ευθύνονταν για τις μολύνσεις σε γαρίδες (Heenatigala & Fernando 2016). Αυτά ήταν τα *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela* και *V. anguillarum*. Το είδος *V. parahaemolyticus* ήταν το πιο συχνά απαντώμενο. Οι συνθήκες ποιότητας του νερού έδειξαν ότι το αλκαλικό pH και τα υψηλά επίπεδα αλατότητας και αμμωνίας ευνοούν την εμφάνιση υψηλών αριθμών *Vibrio*.

2.1.1.6 Αμμωνία (NH₃), Αμμωνιακά (NH₄), Νιτρώδη (NO₂), Νιτρικά (NO₃) του νερού

Η ολική συγκέντρωση της αμμωνίας στο νερό αποτελείται από δύο μορφές: την αμμωνία (NH₃) και τα αμμωνιακά άλατα (NH₄). Η αμμωνία στη μη-ιονισμένη μορφή της είναι η πιο τοξική μορφή για τα ψάρια. Η αμμωνία μπορεί να προέλθει στο νερό από διάφορες πηγές: α) Την αποσύνθεση τα οργανικής ύλης, β) Βιομηχανική και αστική μόλυνση και γ) Αποαζωτοποίηση σε ανοξυγόνωτα νερά (Φειδάντσης, 2012). Το ασφαλές όριο αμμωνίας (NH₃) για τα ψάρια (γλυκού και θαλασσινού νερού) είναι τα 0,025 ppm. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις αμμωνίας (NH₃) κάτω των 0,025 ppm συμβαίνει το εξής: το ψάρι έχει στον οργανισμό του αμμώνιο (NH₄), το οποίο δεν διαπερνά τα επιθηλιακά κύτταρα των βραγχίων επειδή έχουν λίπη, μετατρέπεται σε NH₃ διαπερνά τα βράγχια και ενώνεται στο περιβάλλον με το H₂O οπότε μετατρέπεται πάλι σε NH₄. Αν το NH₄ του περιβάλλοντος έχει μεγαλύτερη τιμή απ' αυτή του ψαριού, το ψάρι το κατακρατά με αρνητικές επιπτώσεις για τον οργανισμό του. Η συγκέντρωσή της στο νερό εξαρτάται από το pH και τη θερμοκρασία.

Η αμμωνία είναι ένας από τους πολύ κρίσιμους παράγοντες που πρέπει να ελέγχεται σε ασφαλή επίπεδα για την επιτυχία μιας καλλιέργειας ψαριών. Η αμμωνία και το οξυγόνο είναι στην ουσία οι δύο κρίσιμότερες παράμετροι που σε ένα σύστημα καλλιέργειας τείνουν να χειροτερεύουν με την πάροδο του χρόνου.

Τα νιτρώδη (NO₂), είναι το ενδιάμεσο προϊόν που παράγεται κατά την οξειδωτική μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρικά. Βρίσκονται σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις στο φυσικό υδάτινο περιβάλλον, αλλά μπορεί να αυξηθεί η συγκέντρωσή τους παρουσία υψηλού οργανικού φορτίου (κλειστά κυκλώματα) και χαμηλών επιπέδων διαλυμένου οξυγόνου. Τα νιτρώδη είναι αρκετά τοξικά για τα ψάρια, διότι όταν απορροφώνται από τον οργανισμό, αντιδρούν με την αιμογλοβίνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων και παράγεται μεθαιμογλοβίνη. Η μεθαιμογλοβίνη δεν είναι τόσο αποτελεσματικός μεταφορέας οξυγόνου όσο η αιμογλοβίνη, με αποτέλεσμα τα ψάρια να πεθαίνουν από ασφυξία σε υψηλές συγκεντρώσεις νιτρωδών. Ο βασικός περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει τη τοξικότητα των νιτρωδών είναι η συγκέντρωση των χλωριόντων. Προβλήματα με τα νιτρώδη μπορούν να αποφευχθούν, με την καλή οξυγόνωση του νερού, τη σωστή διατροφή και την επιλογή της κατάλληλης ιχθυοπυκνότητας, την προσθήκη NaCl (250mg/l), τη βιολογική επεξεργασία (μετατροπή των νιτρωδών σε νιτρικά). Τα νιτρικά ιόντα (NO₃) είναι το τελικό προϊόν της βιολογικής οξειδωσης της αμμωνίας και δεν είναι τοξικά για τα ψάρια σε συγκεντρώσεις <400 mg/l. Σε περιπτώσεις υψηλής συγκέντρωσης τους στο νερό της εκτροφής είναι απαραίτητη η μερική ανανέωση του νερού (Φυτιάνος, 1996).

2.1.1.7 Θρεπτικά άλατα

Ο εμπλουτισμός των υδάτων με θρεπτικά συστατικά οδηγεί στο φαινόμενο του ευτροφισμού (eutrophication) όπου η περίσσεια των απαραίτητων για τη θρέψη υλικών προκαλεί υπέρμετρη ανάπτυξη των φυτικών κυρίως πλαγκτονικών οργανισμών με διατάραξη της υπάρχουσας ισορροπίας. Ο εμπλουτισμός με θρεπτικά, μπορεί να οδηγήσει σε εξαιρετικά δυσμενείς συνθήκες τη δομή και τη λειτουργία του οικοσυστήματος. Ο ευτροφισμός επηρεάζει τη μεταφορά και τη μετατροπή των ρύπων στο υδάτινο περιβάλλον και προκαλεί εξαιρετικά περιβαλλοντικά προβλήματα (Φυτιάνος 1996).

Σήμερα, η ρύπανση από τα θρεπτικά συστατικά (N, P) και την οργανική ύλη αποτελεί τη

μεγαλύτερη πηγή υποβάθμισης των παράκτιων υδάτων. Οι συγκεντρώσεις των βιολογικά διαθέσιμων ποσοτήτων αζώτου και φωσφόρου είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της οικολογικής κατάστασης των υδάτινων συστημάτων (Jarvie et al. 1998).

2.1.2 Περιβαλλοντικές παράμετροι που επηρεάζουν τα εκτρεφόμενα ψάρια

Το λαβράκι και η τσιπούρα είναι ευρύθερμα είδη. Μελέτες σε λαβράκι της ανατολικής Μεσογείου, χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες εγκλιματισμού, έδειξαν ότι η θερμοκρασιακή ανοχή κυμαίνεται από 4,1-6,7°C έως 33,2-35,9°C. Το όριο κάτω από το οποίο παύει η σίτιση του λαβρακιού φαίνεται να είναι κοντά στους 7°C. Επειδή το λαβράκι έχει μεγάλη σημασία για τη μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια, έχουν γίνει αρκετές μελέτες για τη βέλτιστη θερμοκρασία διατροφής και την αποτελεσματικότητα των ιχθυοτροφών (Sánchez Vázquez & Munoz Cueto 2014). Τα νεαρά λαβράκια είναι πολύ ανθεκτικά σε μεταβολές θερμοκρασίας και αλατότητας του περιβάλλοντός τους. Οι 22°C φέρεται να είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη, ενώ οι 32°C είναι το ανώτατο όριο επιβίωσης. Το λαβράκι σταματάει να αυξάνεται στους 10°C, αν και μπορεί να επιβιώσει κατά το πέρασμα του χειμώνα και σε θερμοκρασίες 2-3°C. Η θερμοκρασία έχει σημαντική επίδραση σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες. Η θερμοκρασία μπορεί να δράσει ως παράγοντας καταπόνησης, ιδιαίτερα λόγω αύξησης του ημερήσιου κύκλου θερμοκρασίας σε ρηγά νερά, λίμνες ή δεξαμενές, ή σε τυχαία σοκ θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια των δραστηριοτήτων αντικατάστασης του νερού. Οι θερμικές επιδράσεις αλληλεπιδρούν τόσο με εξωτερικούς (οξυγόνο, αλατότητα, παροχή τροφής) όσο και με εγγενείς βιολογικούς παράγοντες (ηλικία, πληθυσμός). Τα λαβράκια αυξάνουν το βάρος τους από 13 έως 25°C θερμοκρασία, ενώ σημαντική μείωση παρουσιάζει η μάζα τους στους 29°C περίπου. Ο ρυθμός ανάπτυξης αυξάνεται με τη θερμοκρασία μέχρι το μέγιστο στους 25°C που ακολουθείται από μια μικρή αλλά σημαντική μείωση στους 29°C. Η πρόσληψη τροφής αυξάνεται με τη θερμοκρασία μέχρι το μέγιστο στους 25-29°C. Η θερμοκρασία παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του λαβρακιού μέσω επιπτώσεων στη σίτιση και το μεταβολισμό (Dalla Via et al. 1998., Person-Le Ruyet et al. 2004).

Η κατανάλωση O₂ στο λαβράκι και η απέκκριση αμμωνίας εξαρτώνται από τη θερμοκρασία και την πρόσληψη τροφής, όπως γενικά παρατηρείται στα ψάρια. Η κατανάλωση O₂ είναι περίπου διπλάσια στους 25°C απ' ό,τι στους 15°C. Ο μέσος ημερήσιος ρυθμός απέκκρισης αμμωνίας είναι περίπου 3 φορές υψηλότερος στους 25°C από ό,τι στους 13°C, και υπάρχει μια εκθετική σχέση μεταξύ απέκκρισης αζώτου, διατροφής και θερμοκρασίας (Person-Le Ruyet et al. 2004).

2.1.3 Προσδιορισμός φυσικής κατάστασης των ψαριών

Για να προσδιοριστεί η κατάσταση της υγείας και η κατάσταση της καλής διαβίωσης των ψαριών χρησιμοποιούνται διάφορα εργαλεία όπως η ανάλυση της ανάπτυξης των ψαριών, ο προσδιορισμός του συντελεστή κατάστασής τους, καθώς και αρκετοί οργανοσωματικοί δείκτες, και πολυάριθμα βιοχημικά, φυσιολογικά και παθολογικά κριτήρια. Οι ιστοπαθολογικές αλλαγές έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως ένα ολοκληρωμένο εργαλείο για τον καθορισμό της κατάστασης της υγείας των ψαριών, δεδομένου ότι εκφράζουν αλλοιώσεις που προκαλούνται από παθογόνα, ανεπαρκή διατροφή, κακή ποιότητα του νερού ή την

διαχείριση της εκτροφής (Saraiva et al. 2015).

Η εμφάνιση κακών περιβαλλοντικών συνθηκών μαζί με την κακή διαχείριση των μονάδων συνεπάγονται αύξηση των ασθενειών και μεγάλες θνησιμότητες στους εκτρεφόμενους πληθυσμούς. Η παραγωγική διαδικασία μειώνεται και το περιβάλλον χάνει την οικονομική και οικολογική του αξία. Η θνησιμότητα στην περίπτωση των εκτρεφόμενων ψαριών δεν σχετίζεται σχεδόν καθόλου με τη θήρευση. Σχετίζεται μόνο με τις μεταβολές των περιβαλλοντικών παραμέτρων και των θρεπτικών αλάτων στο νερό, τις παθολογικές καταστάσεις από μολυσματικούς παράγοντες και τη συχνότητα συγκομιδής του παραγωγού (Pauly 1980).

2.1.4 Η απόκριση στους παράγοντες καταπόνησης των εκτρεφόμενων ψαριών

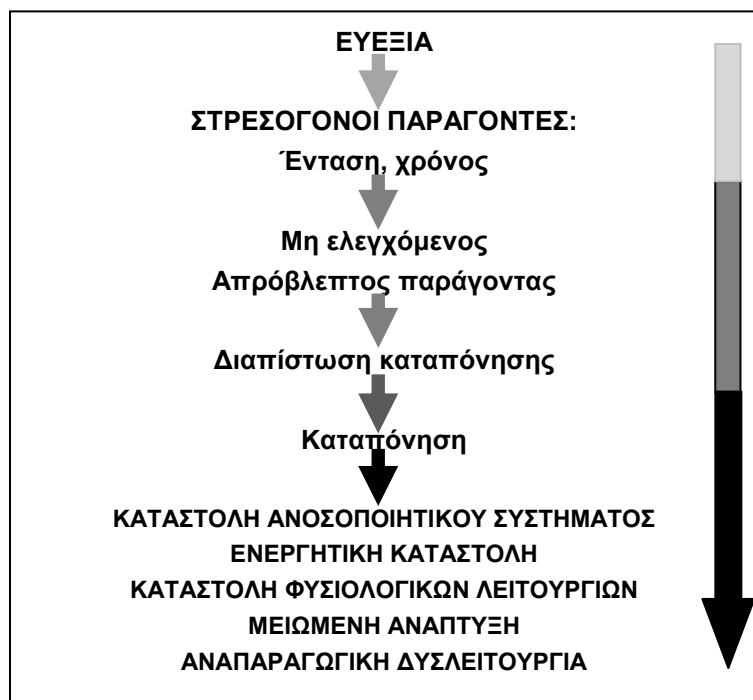
2.1.4.1 Καταπόνηση στα ψάρια

Η καταπόνηση είναι μια σημαντική φυσιολογική απόκριση που όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών, βιώνουν όταν υποβάλλονται σε καταστάσεις διέγερσης. Ο αντίκτυπος της καταπόνησης στα ψάρια και οι συνέπειές του εντοπίστηκαν και αξιολογήθηκαν έγκαιρα κατά τις μεταφορές στις υδατοκαλλιέργειες (Barton 1997). Οι μεταγενέστερες μελέτες για την αντιμετώπιση του στρες των ψαριών αφορούσαν όλους τους πιθανούς παράγοντες καταπόνησης, όπως οι φυσικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες, αλλά κυρίως εκείνοι που σχετίζονται με την διαχείριση της εκτροφής. Από την άλλη πλευρά υπάρχει εκτεταμένη επιστημονική βιβλιογραφία (Roche & Boge 1996, Romeo et al. 2000) σχετικά με τους χημικούς στρεσογόνους παράγοντες στο νερό (ρύποι, βαρέα μέταλλα, παρασιτοκτόνα). Παράλληλα με τη μελέτη των επιπτώσεων των στρεσογόνων παραγόντων, αναπτύχθηκαν αρκετές μελέτες για την φυσιολογία του στρες και τις αντιδράσεις στρες κατά τις τελευταίες δεκαετίες.

2.1.4.2 Αντίδραση των ψαριών στην καταπόνηση

Για τα ψάρια, οι συγγραφείς όπως ο Brett (1958) πρότειναν ότι η καταπόνηση είναι η κατάσταση που επεκτείνει τις προσαρμοστικές αποκρίσεις ενός ψαριού πέρα από το φυσιολογικό εύρος ή την κανονική λειτουργία. Ο Schreck (2000) περιέλαβε τη φυσιολογική σειρά γεγονότων που συμβαίνουν όταν ο οργανισμός επιχειρεί να αντισταθεί στον θάνατο ή να αποκαταστήσει τους ομοιοστατικούς κανόνες ενάντια στην προσβολή. Δεν είναι γνωστό αν τα ψάρια αναπτύσσουν ολοκληρωμένες αποκρίσεις στην καταπόνηση όταν ο κίνδυνος δεν είναι πραγματικός, δηλαδή η αντίληψη συμβολικού στρες, όπως συμβαίνει στα θηλαστικά, αλλά μερικές μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη μιας χαρακτηριστικής φυσιολογικής αντίδρασης (Schreck 1981) και μερικές αναφορές έχουν περιγράψει τη χαρακτηριστική αύξηση της κορτιζόλης και της γλυκόζης σε ψάρια από την ίδια δεξαμενή στα οποία εφαρμόζεται άμεσα ο στρεσογόνος παράγοντας σε σχέση με άλλα άθικτα (Molinero et al. 1997). Συνολικά, υπάρχουν όλο και περισσότερες ενδείξεις ότι τα ψάρια έχουν περίπλοκη συμπεριφορά και αντιδράσεις σε μη φυσιολογικούς στρεσογόνους παράγοντες. Αυτό έχει αποδειχθεί με σαφήνεια σε περιστατικά επιθετικότητας των ψαριών για λόγους ιεραρχίας, ανταπόκριση σε ειδικά και διαφορετικά κοινωνικά πλαίσια, ανταγωνισμό για την τροφή κ.λπ. (Mackenzie et al. 2009).

Οι καταστολείς του ανοσοποιητικού συστήματος των ψαριών μπορεί να είναι κοινοί στη φύση, όπου οι ακραίες φυσικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία, η αλατότητα, η συγκέντρωση οξυγόνου, ή μια ταχεία αλλαγή σε αυτές τις μεταβλητές (Altimiras et al. 1994, Tort et al. 1998) μπορεί να προκαλέσουν στα ψάρια αντίδραση συναγερμού. Άλλοι παράγοντες όπως η παρουσία θηρευτών ή ανταγωνιστών μπορεί να συμπεριληφθούν ως κανονικοί παράγοντες πίεσης για τα ψάρια. Ωστόσο, στην αιχμαλωσία, τα ψάρια υποβάλλονται σε μη φυσιολογικούς στρεσογόνους παράγοντες, οι οποίοι μπορεί να είναι μεγάλης ποικιλίας. Έτσι, οι παράγοντες καταπόνησης μπορούν να σχετίζονται με τις φυσικές συνθήκες του νερού (μεταβολή θερμοκρασίας, μεταβολή αλατότητας, χαμηλό οξυγόνο), τα χημικά συστατικά του νερού (αμμωνία ή νιτρώδη, χημικές ουσίες, βαρέα μέταλλα ή μολυσματικοί παράγοντες, το pH) ή μπορεί να σχετίζονται με την κατάσταση του ίδιου του τεχνητού περιβάλλοντος (περιορισμένος χώρος ιχθυοκλωβών, ιχθυοφόρτιση) και τις συνέπειες που δημιουργεί αυτή η κατάσταση, όπως οι αλληλεπιδράσεις ιεραρχίας. Ένα βασικό χαρακτηριστικό αυτών των επιβαλλόμενων καταστάσεων είναι ότι τα ψάρια δεν μπορούν να ξεφύγουν από αυτό το περιβάλλον και επομένως δεν μπορούν να εμφανιστούν φυσικοί μηχανισμοί αποφυγής όπως η μετανάστευση, η προστασία διαφυγής προς τον πυθμένα και η αλλαγή του οικοτόπου και ως εκ τούτου η αντίδραση στρες γίνεται ανεξέλεγκτη. Εκτός από τη σοβαρότητα των στρεσογόνων παραγόντων με τον χρόνο, οι ανεξέλεγκτοι και απρόβλεπτοι παράγοντες αυτοί σχετίζονται με την απόκριση στην καταπόνηση (σχήμα 2.2).



Σχήμα 2.2 Αντίδραση στο στρες μετά από εμφάνιση στρεσογόνου παράγοντα σε σχέση με την ένταση και το χρόνο και τελικά η εμφάνιση καταπόνησης εάν υπάρχει μη ελεγχόμενος και απρόβλεπτος παράγοντας (Tort et al. 2014).

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι καταπόνησης (στρες), η οξεία και η χρόνια που καθορίζονται από την ένταση και τον χρόνο. Ενώ η οξεία καταπόνηση είναι υψηλή σε ένταση και βραχυχρόνια, η χρόνια πίεση είναι συνήθως χαμηλότερης έντασης αλλά μεγαλύτερης διάρκειας. Η απόκριση στην οξεία καταπόνηση είναι συνήθως μια προσαρμοστική απόκριση

η οποία μπορεί να υπερνικήσει τον επόμενο στρεσογόνο παράγοντα της ίδιας κατηγορίας με μεγαλύτερη επιτυχία. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, εμπλέκονται σημαντικές αλλαγές στα περισσότερα φυσιολογικά συστήματα, όπως η ενέργεια, τα συστήματα σηματοδότησης, η αισθητηριακή συνείδηση, η συμπεριφορά και ο μεταβολισμός, τα οποία όλα στοχεύουν στο να ξεπεραστούν στρεσογόνες καταστάσεις. Αυτή η ισχυρή ανταπόκριση μετά από οξύ στρες συνεπάγεται σημαντικές ποσοτικές μεταβολές στην ενέργεια και το μεταβολισμό, καθώς οι μεσοπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες διαδικασίες καθυστερούν.

Το χρόνιο στρες των ψαριών είναι λιγότερο συνηθισμένο στη φύση, παρατηρείται όμως συχνά στις υδατοκαλλιέργειες όπου τα ψάρια βρίσκονται σε αιχμαλωσία. Αυτή η κατάσταση καθιστά πιο πιθανό τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του νερού ή η αλληλεπίδραση μεταξύ τους να γίνονται χρόνιοι παράγοντες πίεσης, καθώς οι στρεσογόνοι παράγοντες δεν μπορούν να αποφευχθούν. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι παράγοντες πίεσης μπορεί να δημιουργήσουν μια ανταπόκριση από τα ψάρια, όπως συνεχή μείωση των ενεργειακών πόρων, ευαισθησία σε ασθένειες και μειωμένη ανάπτυξη.

Εκτός από τους κλασικούς οξείς και χρόνιους παράγοντες πίεσης, πρέπει να ληφθούν υπόψη και άλλα μοντέλα καταπόνησης, όπως η επαναλαμβανόμενη οξεία καταπόνηση ή συνδυασμοί όπως η οξεία καταπόνηση σε χρόνιους τόνους, καθώς ευνοείται ένα πιο περίπλοκο ρυθμιστικό έργο των νευροενδοκρινικών συστημάτων, συμπεριλαμβανομένων των επιδράσεων των συνδυασμένων παραγόντων πίεσης και των κανονισμών επανατροφοδότησης για τα ενδοκρινικά, ανοσολογικά και νευρικά συστήματα.

2.1.4.3 Η φύση της απόκρισης καταπόνησης στα εκτρεφόμενα ψάρια

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) περιγράφεται ως είδος ευαίσθητο στην καταπόνηση, όπως αποδεικνύεται από το γεγονός ότι τόσο πριν όσο και μετά την καταπόνηση οι τιμές της κορτιζόλης πλάσματος είναι πολύ υψηλότερες (Cerde-Reverter et al. 1998, Rotllant et al. 2003, Fanouraki et al. 2008, Pavlidis et al. 2011) σε σύγκριση με άλλα φυλογενετικά συγγενικά είδη, όπως η τσιπούρα (*Sparus aurata* L. 1758), (Tort et al. 2001) ή το φαγκρί (*Pagrus pagrus*) (Fanouraki et al. 2007). Έτσι, έχει αποδειχθεί ότι οι παράγοντες πίεσης όπως η πυκνότητα εκτροφής επηρεάζουν σοβαρά τις επιδόσεις του λαβρακιού (Paspatis et al. 2003) καθώς και την αντίδραση των ψαριών σε διάφορες προκλήσεις έντονης πίεσης (Di Marco et al. 2008). Αυτό επιβεβαιώθηκε σε μια μελέτη από τους Rotllant et al. (2006), όπου η ανταπόκριση στην καταπόνηση των ψαριών σε όμοια δείγματα (καταπόνησης) και με την ίδια μέθοδο ανάλυσης (ραδιοανοσοπροσδιορισμός) ήταν υψηλή. Επιπρόσθετα, δεδομένα που ελήφθησαν από απομονωμένα νεφρικά κύτταρα, έδειξαν ότι η βασική απελευθέρωση της κορτιζόλης από τους νεφρούς ψαριών με περισσότερους σκουρόχρωμους μυς είναι πολύ υψηλότερη από εκείνη που απελευθερώνεται από άλλα είδη ψαριών (Rotllant et al. 2000, 2003). Επιπλέον, το επίπεδο των ορμονών στο λαβράκι λόγω καταπόνησης διαφέρει μεταξύ των ψαριών, ανάλογα με το μέγεθος και την ηλικία. Είναι επίσης γνωστό ότι οι ιχθυοκαλλιεργητές προτιμούν να μην κάνουν πολλές διαλογές στα ψάρια που βρίσκονται σε πλωτούς κλωβούς, επειδή καταγράφεται σημαντική θνησιμότητα συνήθως μετά από τέτοιου είδους χειρισμούς. Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι η παρουσία ανθρώπων στους κλωβούς μπορεί να μειώσει σημαντικά την πρόσληψη τροφής (Rubio et al. 2010). Αυτά τα δύο στοιχεία (επίπεδα ορμονών και άγχος εκτροφής) δεν απαντώνται σε τόσο

υψηλό βαθμό σε άλλα συγγενικά με το λαβράκι είδη τα οποία εκτρέφονται υπό παρόμοιες συνθήκες. Η βάση για αυτή την διαφορετική απόκριση λόγω καταπόνησης στο λαβράκι, μπορεί να εξηγηθεί από την ανατομία και τη φυσιολογία του.

Το λαβράκι μετά την έκθεση σε οξύ στρεσογόνο παράγοντα δείχνει μια γρήγορη αύξηση των συγκεντρώσεων κορτιζόλης στο πλάσμα του αίματος που φθάνουν το μέγιστο περίπου μία ώρα μετά την καταπόνηση (Fanouraki et al. 2011). Εντούτοις, το μέγεθος της απόκρισης κορτιζόλης είναι μεταξύ των υψηλότερων που αναφέρονται για τα ψάρια και ειδικά περίπου δύο έως τέσσερις φορές υψηλότερα από ότι σε μυτάκι (*Diplodus puntazzo*), τσιπούρα (*Sparus aurata*) και λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*) και 20 φορές υψηλότερο από ροφό (*Epinephelus marginatus*), κρανίο (*Argyrosomus regius*) και συναγρίδα (*Dentex dentex*) (Fanouraki et al. 2011). Το μέγεθος του ψαριού φαίνεται να σχετίζεται με τον χρόνο διάρκειας της καταπόνησης, π.χ. 0,5 ώρες μετά την καταπόνηση για μέσο σωματικό βάρος 30 ($\pm 7,1$) g και σε μία ώρα για 125 ($\pm 13,9$) g ή μεγαλύτερα ψάρια. Το μέγεθος δεν φαίνεται να σχετίζεται με τη διάρκεια συγκέντρωσης κορτιζόλης. Τα λαβράκια παρουσιάζουν επίσης μια τυπική δευτερογενή απόκριση καταπόνησης μετά από έκθεση σε τέτοια οξεία κατάσταση με αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και γαλακτικού οξέος στο πλάσμα. Εντούτοις, τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης εμφανίζουν μεγαλύτερη διάρκεια από ότι σε άλλα είδη, από 0,5-8 ώρες μετά το στρες, με πλάτω τις δύο ώρες. Υπερκαλιαιμία παρατηρείται επίσης σε 0,5 ώρες και παραμένει μέχρι 2-4 ώρες μετά το στρες (Fanouraki et al. 2008).

Οι περισσότερες, εάν όχι όλες οι μελέτες σχετικά με την απόκριση χρόνιας καταπόνησης στο λαβράκι σχετίζονται με τις διαδικασίες εκτροφής στην υδατοκαλλιέργεια. Το λαβράκι καλλιεργείται σε μεγάλες πυκνότητες για να μειωθεί το σχετικό κόστος παραγωγής. Η συνηθισμένη πυκνότητα εκτροφής για το λαβράκι στις εμπορικές εκμεταλλεύσεις μπορεί να φτάσει περίπου 15-30 kg/m³ (Paspatis et al., 2003), αλλά και σε πολύ υψηλές πυκνότητες (40-150 kg/m³), όταν τα συστήματα ανακύκλωσης νερού, η οξυγόνωση με καθαρό οξυγόνο και η συνεχής παρακολούθηση εξασφαλίζουν υψηλά πρότυπα ποιότητας νερού (Terona et al. 2005). Η επίδραση της πυκνότητας των ζώων στη δευτερογενή και τριτογενή ανταπόκριση καταπόνησης έχει μελετηθεί εκτενώς στο λαβράκι.

Η πυκνότητα εκτροφής επηρεάζει τους δείκτες πρωτογενούς και δευτερογενούς καταπόνησης. Μετά την πρόκληση καταπόνησης, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στα επίπεδα γλυκόζης στο λαβράκι που διατηρήθηκε σε πυκνότητες εκτροφής 15 kg/m³ και 30 kg/m³. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η αύξηση των επιπέδων γλυκόζης ήταν λιγότερο έντονη στα λαβράκια που διατηρήθηκαν στην υψηλότερη πυκνότητα των 45 kg/m³. Παρόμοια ευρήματα έχουν ήδη αναφερθεί στο λαβράκι που περιορίστηκε για 3 ώρες στα 10 kg/m³, τα οποία έδειξαν υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα από τα λαβράκια που περιορίστηκαν στα 60 kg/m³ για την ίδια χρονική περίοδο (Vazzana et al., 2002). Εάν οι συνθήκες ιχθυοφόρτισης των 45 kg/m³ λαβρακιού διατηρηθούν για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους, δεν επηρεάζουν σημαντικά την ικανότητα των ψαριών να αντιμετωπίσουν μια επακόλουθη καταπόνηση. Το μέγεθος των αποκρίσεων σε έναν παράγοντα καταπόνησης ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στο λαβράκι που διατηρήθηκε με πυκνότητα 45 kg/m³, παρόλο που τα επίπεδα πριν την καταπόνηση ανακτήθηκαν μετά από 24-48 ώρες σε όλες τις ομάδες, ανεξάρτητα από την πυκνότητα (Di Marco et al. 2008). Έχουν περιγραφεί σε ενήλικα λαβράκια που εκτρέφονται σε ιχθυοφόρτιση 60 kg/m³ για 48 ώρες ορισμένα ανοσολογικά αποτελέσματα, όπως η κατάπτωση της τοξικότητας των περιτοναϊκών λευκοκυττάρων,

(Vazzana et al. 2002). Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση τόσο των επιπέδων έκφρασης της κορτιζόλης στο πλάσμα όσο και των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων του στρες όταν τα νεαρά ψάρια εκτρέφονταν σε ιχθυοφόρτιση 80 και 100 kg/m³ για τρεις μήνες (Gomati et al. 2004, Terova et al. 2005).

Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι μετά από πέντε λεπτά καθαρισμού των τοιχωμάτων δεξαμενής, τα νεαρά λαβράκια εμφάνισαν δευτερογενή αντίδραση καταπόνησης συγκρίσιμη με τις συνέπειες μιας σοβαρής μη υποξικής καταπόνησης, η οποία χαρακτηρίστηκε από αύξηση σε αρκετές αιματολογικές παραμέτρους, όπως γλυκαιμία, πρωτεϊναιμία, αιματοκρίτης και αιμοσφαιριναιμία. Ο καθαρισμός προκάλεσε απόκριση κορτιζόλης, η οποία οδήγησε σε μια αντίδραση προσαρμογής με βάση την προηγούμενη εμπειρία (Hadj-Kacem et al. 1986). Σε μελέτη που έγινε για την καταπόνηση ψαριών, ο καθαρισμός εγκαταστάσεων εκτροφής προκάλεσε ορισμένες διαταραχές χαρακτηριστικές για ήπια βραχυπρόθεσμη οξεία καταπόνηση, αλλά δεν επηρέασε την κορτιζόλη του πλάσματος, την ανάπτυξη ή την ευαισθησία στον νωτιαίο μυελό του λαβρακιού. Η συγκέντρωση της κορτιζόλης στο πλάσμα και οι τάσεις οσμωτικότητας ήταν αντίθετες με εκείνες που εμφανίστηκαν με την περιεκτικότητα και το βάρος IgM στον ορό (Varsamos et al. 2006).

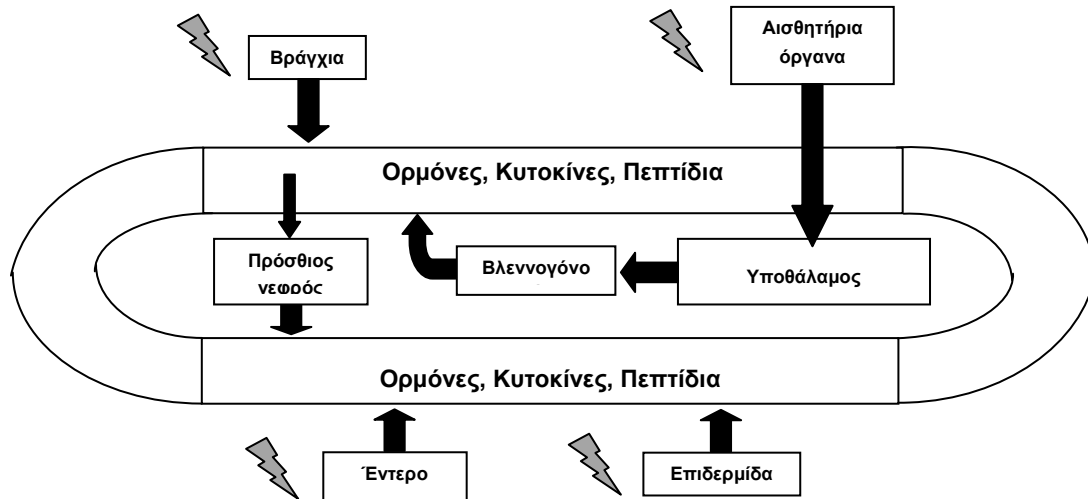
Ένας συνδυασμός παραγόντων καταπόνησης μπορεί επίσης να προκαλέσει σημαντικές αλλαγές στην απόκριση των ψαριών. Το λαβράκι, που προηγουμένως υποβλήθηκε σε καταπόνηση εξαιτίας μεγάλης ιχθυοφόρτισης και στη συνέχεια μολύνθηκε με έγχυση βακτηρίων ή ιού, έδειξε σαφώς μια επαγόμενη ανοσοκατασταλτική αντίδραση. Τα ψάρια που εκτρέφονται σε εγκαταστάσεις με μεγάλη ιχθυοφόρτιση έδειξαν χαμηλότερη ικανότητα ανταπόκρισης στην πρόκληση παθογόνων παραγόντων (Mauri et al. 2011). Η καταπόνηση λόγω ακτινοβολίας μικρής διάρκειας (3 ώρες) αλλά σε υψηλή ιχθυοφόρτιση (10-60 kg/m³), επηρεάζει τόσο τις παραμέτρους που σχετίζονται με το πλάσμα όσο και τις κυτταρικές εγγενείς ανοσολογικές αποκρίσεις, οι οποίες δεν επανέρχονται σε φυσιολογική ανοσολογική επάρκεια για τις επόμενες δύο ημέρες.

2.1.4.4 Ολοκληρωμένη αντίδραση καταπόνησης

Η ανταπόκριση στην καταπόνηση είναι ένας ιδιαίτερα συντηρητικός μηχανισμός σε όλα τα ζώα. Περιλαμβάνει μια σειρά αλλαγών στα κύτταρα, τους ιστούς, τα όργανα και τα οργανικά συστήματα, δημιουργώντας αποκρίσεις σε γονιδιακό, μοριακό, κυτταρικό, φυσιολογικό και συμπεριφορικό επίπεδο. Έτσι, η αντίδραση καταπόνησης είναι ένας ολοκληρωμένος μηχανισμός στον οποίο τόσο η αντίδραση όσο και οι συνέπειες αυτής της αντίδρασης και επομένως η ρύθμισή της, ασκείται σε όλα τα επίπεδα ενός οργανισμού. Στο σχήμα 2.3, δίνεται είδη μορίων που έχουν κύριο ρόλο ως κύριοι διαμεσολαβητές στην ενεργοποίηση τόσο της απόκρισης όσο και της ρύθμισής της.

Υπάρχουν ορισμένες υποθέσεις σχετικά με την ανταπόκριση στα ερεθίσματα που σχετίζονται με την εξέλιξη της αντίδρασης στην καταπόνηση. Μερικοί συγγραφείς προτείνουν ότι αυτή η πρώιμη απόκριση θα μπορούσε να σχετίζεται με την ανάπτυξη βασικών λειτουργιών των ανοσοκυττάρων, οι οποίες αργότερα θα μπορούσαν να παράγουν ορμόνες και νευροπεπτίδια που στοχεύουν στην ανάπτυξη ανοσοαντίδρασης (Borghetti et al. 2009). Αυτός ο διαφοροποιημένος ρόλος μπορεί να αναγνωριστεί σε ψάρια στα οποία οι κυτοκίνες και τα νευροπεπτίδια εκτελούν νευροενδοκρινικές και ανοσολογικές λειτουργίες. Έτσι, αυτά

τα βασικά μόρια και ο νεφρός διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην οργάνωση της αντίδρασης στην καταπόνηση, που συνεπάγεται στενή επικοινωνία μεταξύ των ρυθμιστικών συστημάτων. Αυτό εξηγεί γιατί η καταπόνηση ενεργοποιεί τα κεντρικά και περιφερειακά νευροενδοκρινικά κύτταρα και τα κύτταρα ανοσίας, καθώς και τα κύτταρα αγγελιαφόρους.



Σχήμα 2.3 Διάγραμμα των στρεσογόνων παραγόντων (μικροί κεραυνοί) που προκαλούν αλλαγές σε διαφορετικούς ιστούς και απελευθερώνουν χημικές ουσίες στο αίμα. Επιπλέον, στο διάγραμμα περιλαμβάνεται ο άξονας εγκεφάλου-βλεννογόνου-πρόσθιου νεφρού (Tort et al. 2014).

Η αντίδραση στη φυσιολογική καταπόνηση στους θαλάσσιους τελεόστεους ιχθείς ξεκινά με την ενεργοποίηση του άξονα Brain-Sympathetic-Chromaffin (BSC) και του Hypothalamus-Hypophysis-Interrenal άξονα (άξονας HPI). Αυτή η πρωτογενής απόκριση έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση κατεχολαμινών (BSC) και κορτιζόλης (HPI). Δεν υπάρχουν στοιχεία για τις συγκεντρώσεις κυκλοφορικής ή εγκεφαλικής κατεχολαμίνης ή άλλους σημαντικούς νευροδιαβιβαστές για το λαβράκι. Αντίθετα, τα δεδομένα σχετικά με την κορτιζόλη είναι διαθέσιμα όσον αφορά στην οντογένεση, την ανταπόκριση σε οξείες ή χρόνιες στρεσογόνες καταστάσεις και σε σχέση με τις μεταβολές των αβιοτικών (φωτοπεριόδου) και βιοτικών (διατροφικές και διαιτητικές επιδράσεις) συνθηκών.

2.1.4.5 Γονιδιακή απόκριση

Στο λαβράκι και την τσιπούρα έχει μελετηθεί από διάφορους ερευνητές, μεγάλος αριθμός γονιδίων με σκοπό να ελεγχθεί εάν η έκφραση αυτών των γονιδίων είναι αντιπροσωπευτικός ή χρήσιμος δείκτης αντίδρασης στην καταπόνηση. Ορισμένα από αυτά τα γονίδια σχετίζονται με τις επιδράσεις που προκαλούνται από τους ρύπους και την επακόλουθη κυτταρική και μοριακή απόκριση, μεταξύ των οποίων οι μεταλλοθειονίνες (MT), οι πρωτεΐνες θερμοκρασιακού σοκ και ορισμένα άλλα ειδικά γονίδια. Οι MT είναι πλούσιες σε κυστεΐνη πρωτεΐνες δέσμευσης μετάλλων που αυξάνουν τόσο στο συκώτι του λαβρακιού όσο και στον εγκέφαλο λόγω μεγάλης ιχθυοφόρτισης, υποδεικνύοντας ότι οι MT δεν είναι συγκεκριμένος βιοδείκτης, αλλά ότι μπορεί να είναι χρήσιμες στην παρακολούθηση των συνθηκών

καταπόνησης των ψαριών (Gomati et al. 2004).

Το mRNA της πρωτεΐνης θερμοκρασιακού σοκ (HSP) αυξάνεται πάρα πολύ μετά την έκθεση σε συνωστισμό. Πιο συγκεκριμένα, στο λαβράκι υπάρχουν συστατικά και επαγωγίμα μέλη των HSP70 και HSP90 και είναι γνωστό ότι οι συστατικές μορφές του HSP παίζουν σημαντικό ρόλο σε ανεπιθύμητα κύτταρα ενώ οι επαγωγίμες μορφές είναι σημαντικές για τους πρωτεϊνικούς μηχανισμούς. Το HSP90 υπάρχει στον εγκέφαλο, όπου αυξάνεται σημαντικά μετά από θερμοκρασιακή καταπόνηση, αλλά είναι δύσκολο να ανιχνευθεί στα ψάρια που δεν έχουν υποστεί βλάβη (Gomati et al. 2004).

Οι χημικοί παράγοντες καταπόνησης, όπως τα μέταλλα, μπορεί να μεταβάλλουν τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών, διεγείροντας τη διεργασία λιπιδίων υπεροξειδάσης, μια σύνθετη αλληλουχία βιοχημικών αντιδράσεων και επιδείνωση των οξειδωτικών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Το κυτταρικό σύστημα άμυνας έναντι της τοξικότητας που προέρχεται από τις ενεργές μορφές οξυγόνου περιλαμβάνει την επαγωγή ελευθέρων ριζών υπεροξειδίων και την εξάλειψη του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Romeo et al. 2000).

2.1.4.6 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία έχει μεγάλες επιδράσεις στο μεταβολισμό των ψαριών και επηρεάζει επίσης την ανταπόκριση στην καταπόνηση. Η εκτροφή νεαρών ιχθυδίων του *D. labrax* κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της ζωής τους σε υψηλή και σταθερή θερμοκρασία είναι μια καλή διαδικασία, όπως υποδεικνύεται από τα χαμηλά επίπεδα κορτιζόλης και την οσμωτικότητα στο πλάσμα, καθώς και την καλύτερη ανάπτυξη. Οι μεταβλητές συνθήκες θερμοκρασίας προκαλούν μια δραστική αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης στο πλάσμα, ταυτόχρονα με την αιμοσυγκέντρωση, δηλαδή αυξημένη οσμωτικότητα και καθυστέρηση στην ανάπτυξη, κάτι που υποδηλώνει μια χρόνια ενεργοποίηση του άξονα HPI. Εντούτοις, στο φυσιολογικό εύρος θερμοκρασίας για ένα ποικιλόθερμο είδος, οι ξαφνικές μεταβολές της θερμοκρασίας μπορεί να προκαλούν καταπόνηση (Varsamos et al. 2006). Οι Varsamos et al. (2006) έδειξαν ότι τα νεαρά λαβράκια με διαφορετική εμπειρία καταπόνησης που σχετίζεται με την εκτροφή, εμφανίζουν διαφορές τόσο στην καταπόνηση όσο και στην κατάσταση υγείας. Τα ιχθύδια λαβρακιού που εκτρέφονται κατά την πρώιμη φάση της ζωής τους σε υψηλή και σταθερή θερμοκρασία, έχουν καλύτερες επιδόσεις όσον αφορά στους δείκτες που σχετίζονται με το άγχος. Η μεταβαλλόμενη θερμοκρασία του νερού προκάλεσε δραματικές αλλαγές όσον αφορά στις παραμέτρους της καταπόνησης και στην ευαισθησία στον ιό της εγκεφαλοπάθειας (nodavirus). Αυτό υποδηλώνει ισχυρή και παρατεταμένη ενεργοποίηση του άξονα HPI, η οποία αντιστοιχεί σε αλλοστατική υπερφόρτωση. Ο βαθμός δειγματοληψίας δεν είχε καμία επίδραση στα πειράματα που διεξήχθησαν υπό συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας, αλλά διαπιστώθηκε σαφής επίδραση στο σωματικό βάρος και την κατάσταση, γεγονός που εξηγείται από το γεγονός ότι τα μεγαλύτερα ψάρια συλλαμβάνονται πιο εύκολα από τα μικρότερα (Varsamos et al. 2006).

Οι μεταβολές της θερμοκρασίας μπορούν να έχουν σοβαρές επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα. Θα πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι καθώς η θερμοκρασία του νερού αυξάνεται, η χωρητικότητα του O₂ στο νερό μειώνεται και συνεπώς η τάση από την θερμοκρασία του σώματος πιθανώς συνδέεται με την υποξική καταπόνηση. Αυτό επιβεβαιώνεται εν μέρει από άλλους συγγραφείς (Hadj-Kacem et al. 1986), οι οποίοι ανέφεραν ότι η γρήγορη αύξηση της

θερμοκρασίας από 17°C σε 26°C τροποποίησε την αιματολογία του *D. labrax*, κάτι που θυμίζει μια υποξική κατάσταση. Η θερμοκρασία προκάλεσε υψηλά επίπεδα κορτιζόλης και μείωση της περιεκτικότητας IgM στον ορό, τα οποία σχετίζονταν με την υψηλότερη ευαισθησία όταν τα ψάρια εκτίθενται σε ιώσεις.

2.1.4.7 Διατροφή και διατροφικές επιδράσεις

Η ευαισθησία του λαβρακιού στην καταπόνηση μπορεί επίσης να εντοπιστεί στη διατροφή του. Παρόλο που τα ψάρια μπορούν να απομονωθούν με τρόπο ώστε να μειωθεί η επίδραση των ανθρώπινων παρεμβολών, μειώνεται η κατανάλωση τροφής από την παρουσία ανθρώπων όταν εργάζονται στις εγκαταστάσεις εκτροφής. Για παράδειγμα, το πρωτόκολλο καθαρισμού που ενέχει τη μερική εκκένωση και καθαρισμό των δεξαμενών οδηγεί σε μείωση της λήψης τροφής για δύο ημέρες (Rubio et al., 2010). Η ανταπόκριση της τροφής σε οξείες καταπονήσεις, έδειξε εποχιακές διαφορές. Η μετατρεψιμότητα τροφής που παρατηρήθηκε στα ψάρια κατά το τέλος της άνοιξης ήταν πιο έντονη από ότι στα ψάρια κατά τη χειμερινή περίοδο. Η διαφορά αυτή μπορεί να μην σχετίζεται με την ανταπόκριση στο στρες αλλά μπορεί να αντανακλά εποχιακές διαφορές στην κατανάλωση ενέργειας (Rubio et al. 2010).

Οι μεταβολές στη διατροφή ή στο διαιτολόγιο των εκτρεφόμενων λαβρακιών, έχουν αποδειχθεί καθοριστικοί παράγοντες της αντίδρασης στο στρες στα ψάρια (Montero et al., 2003, Montero & Izquierdo 2010, Ganga et al. 2011a, 2011b). Η νηστεία και οι διαφορετικές διατροφικές διαδικασίες, έχουν αποδειχθεί ότι λειτουργούν ως χρόνιος στρεσογόνος παράγοντας. Σε μια πρόσφατη μελέτη σχετικά με την εξέλιξη της κορτιζόλης πλάσματος στο λαβράκι που παρατηρήθηκε σε διαφορετικούς τύπους καταπόνησης, η νηστεία μέσα σε μια εβδομάδα αύξησε τις βασικές τιμές κορτιζόλης πλάσματος και ήταν τετραπλάσια από ψάρια που τρέφονταν κανονικά (65,21 και 14,12 ng/ml αντίστοιχα). Η υψηλή ιχθυοφόρτιση αύξησε την ανταπόκριση του λαβρακιού σε έναν οξύ στρεσογόνο παράγοντα, με αποτέλεσμα να εξαρτάται από το τρόπο διατροφής και να μειώνεται σημαντικά σε ψάρια που ταιΐζονται καλά (Luratsch et al. 2010).

Οι μεταβολές στη διαδικασία διατροφής καθώς και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των θρεπτικών συστατικών της τροφής, μεταβάλλουν τη απόκριση στο στρες, ειδικότερα όταν υπάρχει ανεπάρκεια κάποιας θρεπτικής ουσίας ή ανισορροπίες στις αναλογίες μεταξύ διαφορετικών θρεπτικών ουσιών. Ορισμένα βασικά λιπαρά οξέα όπως το αραχιδονικό οξύ (20: 4n-6, ARA) πρέπει να παρέχονται στη δίαιτα αυτού του είδους, διότι, ως θαλάσσιο ψάρι, το λαβράκι δεν είναι ικανό να αφομοιώσει λιπαρά οξέα. Το ARA έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται άμεσα με την αντίδραση στο στρες του λαβρακιού (Atalah et al. 2011), όπως περιγράφηκε και για άλλα είδη, όπως η τσιπούρα (Koven et al. 2001).

2.1.5 Διαχείριση μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας

Στις πλωτές μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας πρέπει να λαμβάνονται μέτρα κατά την διαχείριση για να αποφεύγεται η καταπόνηση των εκτρεφόμενων ψαριών τα οποία αναφέρονται παρακάτω. Η ορθολογική διαχείριση μιας μονάδας πάχυνσης περιλαμβάνει τις παρακάτω διαδικασίες (Κλαδάς 1999):

- Τον εμπλουτισμό σε κατάλληλες πυκνότητες, ανάλογα με την περιοχή.
- Την επιλογή του κατάλληλου είδους ψαριού και της μεθόδου εκτροφής.
- Το σωστό τάισμα των ψαριών χωρίς να γίνεται σπατάλη της τροφής.
- Τη διασφάλιση της καλύτερης δυνατής ποιότητας νερού εντός των κλωβών.
- Τη συντήρηση των κλωβών, των αλυσίδων, των αγκυρών και όλου του βοηθητικού εξοπλισμού.
- Τον τακτικό καθαρισμό των διχτυών.
- Την καταγραφή και παρακολούθηση των κυριότερων περιβαλλοντικών παραμέτρων στις μονάδες εκτροφής.
- Τον τακτικό έλεγχο των καλλιεργούμενων πληθυσμών των ψαριών για τον εντοπισμό τυχόν ενδείξεων ασθενειών.
- Την πρόληψη των ασθενειών με εμβολιασμούς.
- Τη θεραπεία των ασθενών ψαριών.
- Την άμεση απομάκρυνση των νεκρών ψαριών.
- Την υδρανάπαυση των κλωβών όταν υφίσταται περιβαλλοντική επιβάρυνση στις μονάδες εκτροφής.

2.1.6 Σύνοψη-Σκοπός

Σκοπός του δεύτερου κεφαλαίου της διατριβής είναι η συσχέτιση με την πιθανότητα εμφάνισης 4 κυριότερων ασθενειών του εκτρεφόμενου λαβρακιού και της τσιπούρας και συγκεκριμένα της δονακίωσης, της φωτοβακτηριδίασης της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστροειδοπάθειας και του Χειμερινού Συνδρόμου, με περιβαλλοντικές παραμέτρους και κυρίως της θερμοκρασίας (T°C), της αλατότητας (S‰), του διαλυμένου οξυγόνου (D.O. mg/l) και της ενεργού οξύτητας (pH) του θαλασσινού νερού στον Κόλπο Αργοστολίου της εντατικής εκτροφής τους, έτσι ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση κάθε παραμέτρου.

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Περιοχές μελέτης

2.2.1.1 Κόλπος Αργοστολίου

Ο Κόλπος Αργοστολίου είναι ένας ημίκλειστος Κόλπος με μήκος 13,5km στον άξονα βορρά-νότου και μέσο πλάτος 2,8km (σχήμα 2.4). Επικοινωνεί με το Ιόνιο Πέλαγος στο νότιο τμήμα του μέσω ενός ανοίγματος πλάτους 2,9km. Στο μεγαλύτερο μέρος του ο Κόλπος έχει βάθος 10m ενώ το μέγιστο βάθος του είναι περίπου 25m. Κατά μήκος της δυτικής και βόρειας ακτογραμμής ο πυθμένας έχει ήπια κλίση ενώ κατά μήκος της ανατολικής ακτογραμμής υπάρχει απότομη κλίση. Ήπια κλίση απαντάται και στο νότιο τμήμα.

Στην περιοχή του Κόλπου Αργοστολίου συμβαίνουν διάφορες ανθρωπογενείς δραστηριότητες όπως η αλιεία, οι υδατοκαλλιέργειες, ο τουρισμός και η ακτοπλοΐα κυρίως κατά τους θερινούς μήνες. Στο ανατολικό και στο βορειοανατολικό τμήμα του Κόλπου δραστηριοποιούνται επίσης τρεις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας. Στο δυτικό τμήμα του Κόλπου βρίσκεται η πόλη και το λιμάνι του Ληξουρίου. Η ακτογραμμή του τμήματος αυτού έχει ιδιαίτερα έντονη τουριστική δραστηριότητα και οικιστική ανάπτυξη. Η έξοδος του αγωγού

επεξεργασμένων λυμάτων της πόλης του Ληξουρίου βρίσκεται μπροστά από το λιμάνι της πόλης. Στο ανατολικό τμήμα του Κόλπου βρίσκεται η πόλη και το λιμάνι του Αργοστολίου με έντονη τουριστική και ακτοπλοϊκή δραστηριότητα καθώς και οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων της πόλης του Αργοστολίου (Spirinos et al. 2012). Στο νότιο μυχό του Κόλπου βρίσκεται η τεχνητή λιμνοθάλασσα Κουτάβου, ένας μεσοτροφικός και τους θερινούς μήνες ευτροφικός υγροβιότοπος με ιδιαίτερο οικολογικό ενδιαφέρον ο οποίος αλληλεπιδρά με τον υπόλοιπο Κόλπο. Αυτές οι δραστηριότητες καθώς και κάποιες δευτερεύουσες (π.χ γεωργία στις γύρω παράκτιες περιοχές) επηρεάζουν τη σύσταση και την ποιότητα των υδάτων στον Κόλπο. Οι επιπτώσεις των δραστηριοτήτων γύρω από τον Κόλπο του Αργοστολίου φαίνεται πως δεν είναι τόσο σημαντικές όσο σε ανάλογες περιοχές σε άλλα μέρη της Ελλάδας (π.χ Κόλπος Καλλονής Λέσβου, Κόλπος Γέρας Λέσβου). Αυτό γίνεται λόγω των γεωμορφολογικών χαρακτηριστικών του Κόλπου, τον τρόπο διακύμανσης και κίνησης του θερμοκλινούς και το μοντέλο κίνησης του νερού (Κονίδης κ.α. 2006).



Σχήμα 2.4 Χάρτης του Κόλπου Αργοστολίου.

2.2.1.2 Όρμος Κακογκύλου

Στη διάρκεια της μελέτης έγινε επιλογή ιχθυοκαλλεργητικής μονάδας στη περιοχή του Όρμου Κακογκύλου (σχήμα 2.5) για την πραγματοποίηση εμβολιασμών, καταγραφής φυσικοχημικών παραμέτρων, συλλογής δειγμάτων ψαριών, αιμοληψίας ψαριών και προμήθειας ζωντανών ψαριών για την διενέργεια των πειραματικών μολύνσεων. Πραγματοποιήθηκε επίσης η συστηματική καταγραφή και παρακολούθηση των

φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού [θερμοκρασίας T°C, διαλυμένου οξυγόνου D.O. (mg/l) και αλατότητας S‰ (psu)].



Σχήμα 2.5 Όρμος Κακογκύλου

Το άνοιγμα του Όρμου έχει ΒΑ προσανατολισμό, στον άξονα Βορράς-Νότος έχει μέγιστο μήκος 900m και στον άξονα Ανατολή-Δύση έχει μέγιστο μήκος 650m.

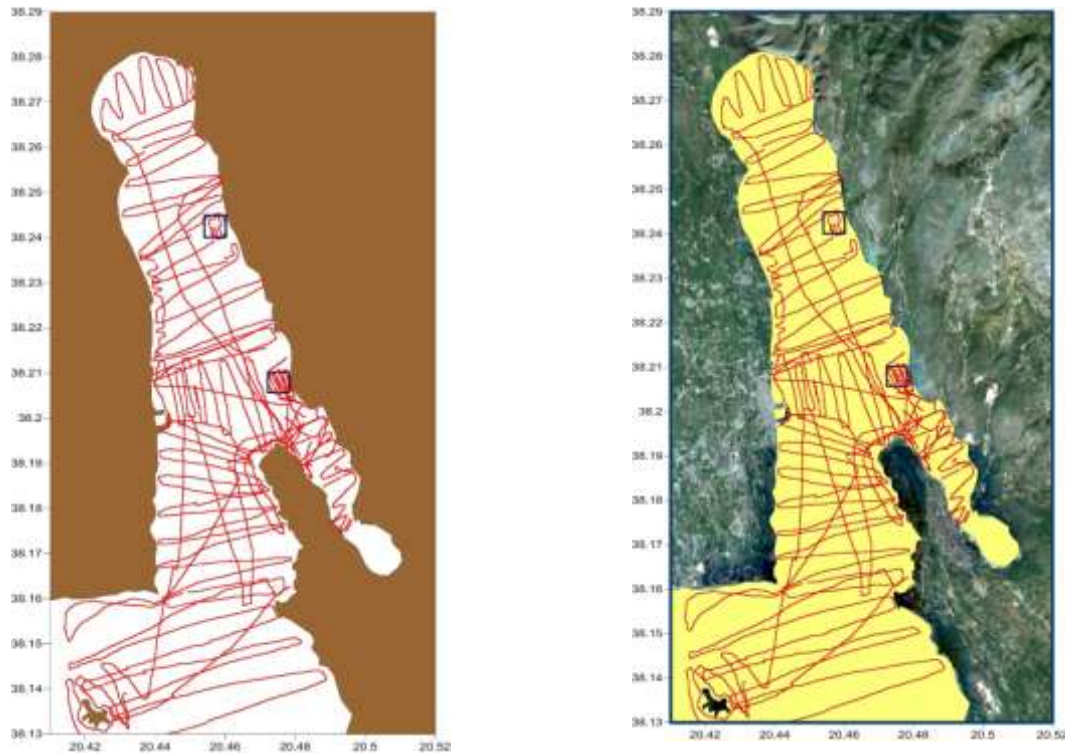
2.2.2 Χαρτογράφηση και αποτύπωση πυθμένα περιοχών μελέτης

2.2.2.1 Χαρτογράφηση και αποτύπωση πυθμένα Κόλπου Αργοστολίου

Σκοπός της χαρτογράφησης και αποτύπωσης του πυθμένα είναι η απόκτηση γνώσης για την περιοχή μελέτης, η απόκτηση δεδομένων της κατανομής της θαλάσσιας βλάστησης και ειδικότερα των λειμώνων των θαλάσσιων φανερόγαμων, για την περαιτέρω ανάλυση της δομής των φυτοκοινωνιών με στόχο την εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης της εν λόγω περιοχής. Επιπλέον, η χαρτογράφηση και η βυθομετρία συνέβαλαν στην επιλογή των σταθμών δειγματοληψίας των περιβαλλοντικών παραμέτρων. Η εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης του Κόλπου Αργοστολίου συνέβαλε στην εκτίμηση των αλληλεπιδράσεων των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας με το περιβάλλον.

Στη διάρκεια της μελέτης πραγματοποιήθηκαν σαρώσεις του πυθμένα με το ηχοβολιστικό σύστημα RoxAnn GD-X (σχήμα 2.6) και οι διαδρομές έγιναν με μέση ταχύτητα 5 κόμβων, ενώ η συχνότητα καταχώρησης των μετρήσεων ρυθμίστηκε στις 30 μετρήσεις/λεπτό. Ο αισθητήρας του ηχοβολιστικού συστήματος RoxAnn GD-X τοποθετήθηκε στο πλάι ενός

σκάφους μήκους 5μ σε βάθος περίπου 1 m, συνδέθηκε με φορητό Η/Υ και το GPS του σκάφους και ρυθμίστηκε στα 200 khz (εικόνα 2.1) (Spinos et al. 2012).



Σχήμα 2.6 Οι σαρώσεις του πυθμένα που πραγματοποιήθηκαν με το ηχοβολιστικό σύστημα RoxAnn GD-X

Η απόσταση μεταξύ των διατομών κυμάνθηκε μεταξύ 100 και 400 m και η επιβεβαίωση αποτύπωσης του πυθμένα πραγματοποιήθηκε σε ολόκληρο τον Κόλπο Αργοστολίου και εξωτερικά του ανοίγματός του (σχήμα 2.7) (Spinos et al. 2012).





Εικόνα 2.1 Το σύστημα RoxAnn GD συνδεδεμένο με φορητό ηλεκτρονικό υπολογιστή, με GPS και τον αισθητήρα ηχοβολισμού (φωτογραφία Ε. Σπίνος).



Εικόνα 2.2 Συρόμενη υποβρύχια κάμερα JW Fishers TOV-1 (φωτογραφία Ε. Σπίνος).

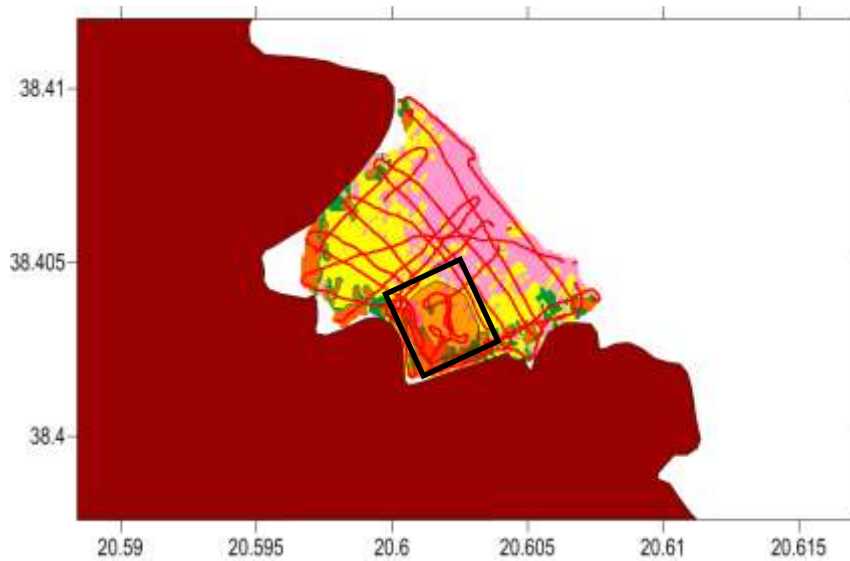


- Σημεία επιβεβαίωσης πυθμένα με βενθολήπτη
- Σημεία επιβεβαίωσης πυθμένα με υποβρύχια λήψη

Σχήμα 2.7 Η περιοχή μελέτης και τα σημεία επιβεβαίωσης αποτύπωσης πυθμένα (Spinós et al. 2012).

2.2.2.2 Χαρτογράφηση και αποτύπωση πυθμένα Όρμου Κακογκύλου

Η περιοχή μελέτης στην οποία πραγματοποιήθηκε η διαδικασία των εμβολιασμών, η εξαλίευση ζωντανών ψαριών για τα πειράματα και η αιμοληψία, οριοθετήθηκε και χαρτογραφήθηκε, με την ίδια μέθοδο που έγινε και η χαρτογράφηση στον Κόλπο Αργοστολίου, για να γίνουν γνωστά απαραίτητα στοιχεία αυτής, όπως η θέση της μελετούμενης μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας, η βυθομετρία και η σύσταση του πυθμένα (σχήμα 2.9). Έτσι, πραγματοποιήθηκαν σαρώσεις του πυθμένα με το ηχοβολιστικό σύστημα RoxAnn GD-X με τις ίδιες ρυθμίσεις όπως και για τον Κόλπο Αργοστολίου, η επιβεβαίωση και ταυτοποίηση των διαφόρων τύπων υποστρώματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υποβρύχιας κάμερας τύπου TOV-1 και βενθολήπτη, η κατηγοριοποίηση του ιζήματος έγινε ανάλογα με την υφή του ιζήματος σε γενικές κατηγορίες και αναγνωρίστηκαν τα είδη φανερόγαμων φυτών.



Σχήμα 2.9 Οριοθέτηση περιοχής μελέτης και χαρτογράφησης της.

Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν επεξεργάστηκαν όπως προηγουμένως περιγράφηκε για τον Κόλπο Αργοστολίου και διατηρήθηκαν 2.779 τιμές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την απεικόνιση των τύπων του υποστρώματος και της βυθομετρίας. Η απεικόνιση του υποατρώματος και της βυθομετρίας έγιναν όπως περιγράφηκε και προηγουμένως.

2.2.3 Τα ρεύματα στις περιοχές μελέτης

2.2.3.1 Κόλπος Αργοστολίου

Ο Κόλπος Αργοστολίου έχει ιδιαίτερα γεωγραφικά και βυθομετρικά χαρακτηριστικά που επιτρέπουν την καλή ανανέωση του νερού στο μεγαλύτερο μέρος του. Από δεδομένα θερμοκρασίας και αλατότητας που συλλέχθηκαν από τον Κόλπο Αργοστολίου, μελετήθηκε η κίνηση του νερού μέσα στον Κόλπο Αργοστολίου με βάση την πυκνότητα του νερού σε επιμέρους σταθμούς.

Σύμφωνα με την Κοινή Υπουργική Απόφαση (Κ.Υ.Α.) του Υπουργείου Περιβάλλοντος Χωροταξίας και Δημοσίων Έργων και του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (2009), η λειτουργία των μονάδων υδατοκαλλιέργειας έχει άμεση σχέση με την βιολογία του

είδους και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του υδάτινου μέσου εκτροφής, τα οποία πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, ώστε να διασφαλίζεται η σωστή διαβίωση-ανάπτυξη των εκτρεφόμενων ειδών καθώς και η αειφορία του περιβάλλοντος των περιοχών λειτουργίας των μονάδων αυτών. Για τις μονάδες εκτροφής θαλάσσιων μεσογειακών ιχθύων σε πλωτούς κλωβούς η ετήσια δυναμικότητα (η οποία επηρεάζει όλα τα παραπάνω) υπολογίζεται ανάλογα με το μέγεθος της θαλάσσιας έκτασης του πάρκου εκτροφής, την απόστασή του από την ακτή, το βάθος αυτής, καθώς και την μορφολογία της περιοχής (ανοικτός ή κλειστός θαλάσσιος Κόλπος). Ο Κόλπος Αργοστολίου είναι ένας κλειστός θαλάσσιος Κόλπος (ορισμός βάσει της Κ.Υ.Α. των Υ.Π.Ε.ΧΩ.Δ.Ε. και Υπ.Α.Α.Τ. 2009) διότι το μήκος του (ο μεγαλύτερος άξονας) είναι μεγαλύτερο από το άνοιγμα του στομίου του και/ή η ταχύτητα των θαλασσίων ρευμάτων είναι $< 3\text{cm/s}$. Η συνολική ετήσια δυναμικότητα (Δ) σε t/h , ανά ιχθυοκαλλιεργητικό πάρκο, υπολογίζεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$\Delta = [150 + 8(E - 10)] \cdot f_A \cdot f_B \cdot f_K$$

όπου:

f_A : συντελεστής που εξαρτάται από την απόσταση του πάρκου εκτροφής από την ακτή

f_B : συντελεστής που εξαρτάται από το βάθος του πάρκου εκτροφής

f_K : συντελεστής κλειστότητας ή ταχύτητας ρευμάτων

E : έκταση σε στρέμματα του πάρκου εκτροφής

Η ταχύτητα των θαλασσίων ρευμάτων για κάθε θέση θα πρέπει να διενεργείται τους καλοκαιρινούς μήνες και προκύπτει από το μέσο όρο τριών (3) τουλάχιστον μετρήσεων με μεταξύ τους χρονικό διάστημα τουλάχιστον πέντε (5) ημερών εντός του διαστήματος 01/06 έως 31/08. Οι μετρήσεις λαμβάνουν χώρα σε βάθη 9-11m από την επιφάνεια της θάλασσας και στο κέντρο του θαλάσσιου πάρκου (Κ.Υ.Α. Υπ.Π.Ε.ΧΩ.Δ.Ε. και Υπ.Α.Α.Τ. 2009).

2.2.3.2 Όρμος Κακογκύλου

Για τον Όρμο Κακογκύλου δεν υπάρχουν στοιχεία ρευματογραφίας. Τα στοιχεία ελήφθησαν για την αποτύπωση μόνο της περιοχής όπου έγιναν τα εμβολιακά πειράματα.

2.2.4 Οι ιχθυοκαλλιέργειες στις περιοχές μελέτης

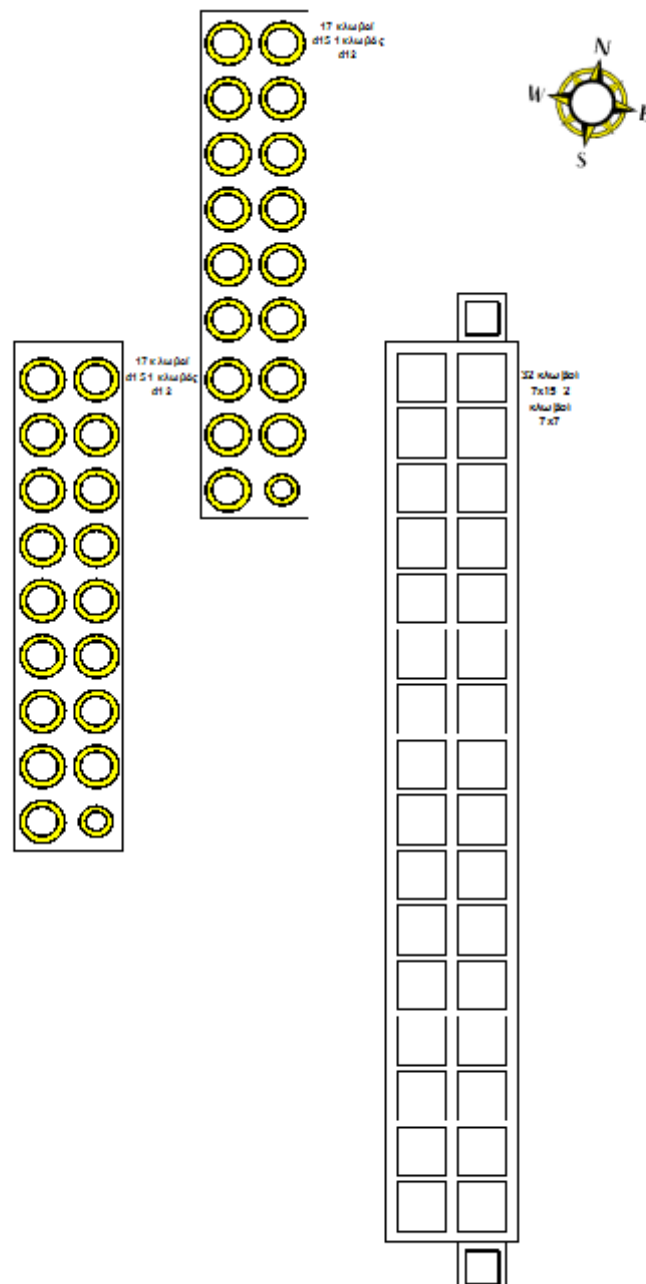
2.2.4.1 Κόλπος Αργοστολίου

Στον Κόλπο Αργοστολίου δραστηριοποιούνται δύο εταιρείες ιχθυοκαλλιέργειας (Ιχθυοκαλλιέργειες Κεφαλονιάς Α.Ε. και Ιχθυοκαλλιέργειες Σάμης Α.Ε.) με 3 συνολικά μονάδες και συστοιχίες ιχθυοκλωβών, τοποθετημένες στο μεσο-ανατολικό τμήμα του Κόλπου.

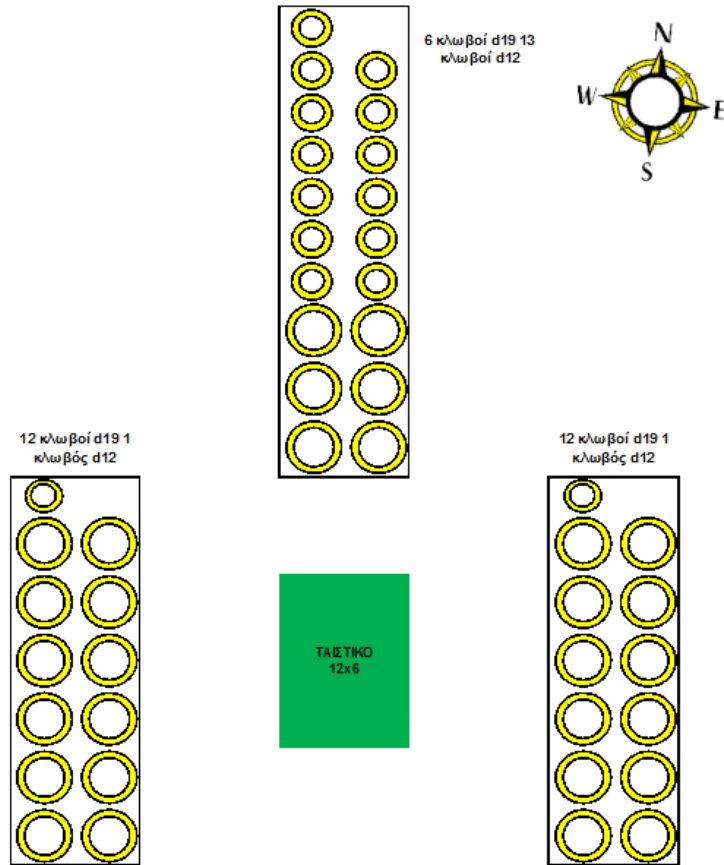
Οι ιχθυοκαλλιέργειες που λειτουργούν στην περιοχή μελέτης (Κόλπος Αργοστολίου), ανήκουν σε δύο επιχειρήσεις εκ των οποίων αυτή που μελετήθηκε είναι καθετοποιημένη. Ανήκουν δηλαδή σ'αυτή και λειτουργούν ένας ιχθυογεννητικός σταθμός, μία μονάδα προπάχυνσης, δύο μονάδες πάχυνσης, ένα συσκευαστήριο και υποστηρικτικές εργαστηριακές και διοικητικές δομές. Η οργάνωσή της συνιστά μια πρότυπη ιχθυοκαλλιέργεια η οποία λειτουργεί ανελλιπώς από το 1983 και τα στοιχεία που υπάρχουν στο αρχείο της

είναι πολύ χρήσιμα μετά από επεξεργασία και ανάλυση για εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων.

Στην περιοχή μελέτης η εταιρεία Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς Α.Ε διαθέτει μονάδες πάχυνσης σε δύο γεωγραφικές θέσεις στον Κόκκινο Βράχο και στο Λιβάδι. Η πρώτη θέση έχει εμβαδό 80 στρέμματα και περιλαμβάνει 3 συστοιχίες (3 πάρκα) αποτελούμενες από 70 κλωβούς (στρογγυλούς και τετράγωνους) στη θέση Κόκκινος Βράχος. Η δεύτερη θέση έχει εμβαδό 60 στρέμματα και περιλαμβάνει 3 συστοιχίες (3 πάρκα) αποτελούμενες από 45 κλωβούς (στρογγυλούς) στη θέση Λιβάδι (Κουρουκλάτα). Στα ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς Α.Ε καλλιεργείται λαβράκι, τσιπούρα και κρانيός (*Argyrosomus regius*). Στα σχήματα 2.10 και 2.11, δίνεται η διάταξη και ο αριθμός των κλωβών στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας που διενεργήθηκε η μελέτη.



Σχήμα 2.10 Σχηματική παράσταση, διάταξη και αριθμός των ιχθυοκλωβών μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας στη θέση Κόκκινος Βράχος του Κόλπου Αργοστολίου.



Σχήμα 2.11 Σχηματική παράσταση, διάταξη και αριθμός των ιχθυοκλωβών μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας στη θέση Λιβάδι του Κόλπου Αργοστολίου.

2.2.4.2 Όρμος Κακογκύλου

Στον Όρμο Κακογκύλου δραστηριοποιείται μία εταιρεία ιχθυοκαλλιέργειας (Ιχθυοκαλλιεργητική Ερύσσου Ε.Π.Ε.) με μία μονάδα πάχυνσης όπου εκτρέφονται κυρίως τσιπούρα και λαβράκι με 6 συστοιχίες ιχθυοκλωβών, τοποθετημένες στο ανατολικό τμήμα του Όρμου, ξεκινώντας από 20-25m και καταλήγοντας βαθύτερα σε 55-60m. Οι τέσσερις συστοιχίες που αποτελούνται από μεγαλύτερους κλωβούς (με μεγαλύτερο βάθος και περίμετρο) είναι τοποθετημένες ημικυκλικά και ο σχηματισμός τους προστατεύει δύο συστοιχίες που βρίσκονται στο κέντρο της μονάδας. Στις συστοιχίες με τους μεγαλύτερους κλωβούς βρίσκονται ψάρια μεγαλύτερου μεγέθους ενώ στις συστοιχίες με τους μικρότερους κλωβούς βρίσκονται ψάρια μικρότερου μεγέθους.

2.2.5 Συλλογή δεδομένων

2.2.5.1 Κόλπος Αργοστολίου

Στην παρούσα μελέτη έγινε συλλογή φυσικοχημικών παραμέτρων και στοιχείων από μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας της εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ που βρίσκονται στον Κόλπο του Αργοστολίου, δεδομένων από παλιότερες μελέτες και δεδομένων που

συλλέγονταν και δεδομένων εμφάνισης ασθενειών (είδος, διάρκεια και συχνότητα).

Καθημερινά καταγράφονταν οι φυσικοχημικές παράμετροι του νερού της περιοχής μελέτης από τον Ιανουάριο 2011 έως τον Δεκέμβριο του 2015. Για την παρακολούθηση της θερμοκρασίας τοποθετήθηκαν αυτόματα αδιάβροχα καταγραφικά (τύπου Hobo) στο κέντρο των πλωτών μονάδων πάχυνσης στις θέσεις Κόκκινος Βράχος και Λιβάδι στον Κόλπο Αργοστολίου, στην επιφάνεια του νερού (σε βάθος 1-2m). Η καταγραφή της θερμοκρασίας γινόταν καθημερινά (ανά 1 ώρα) και συνεχίστηκε σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Η αλατότητα, το διαλυμένο οξυγόνο (D.O.) και η ενεργός οξύτητα (pH) του νερού, καταγράφονταν στην περιοχή μελέτης με φορητά ψηφιακά όργανα θερμόμετρο, αλατόμετρο και οξυγονόμετρο τύπου WTW (εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3 Φορητά ψηφιακά όργανα με τα οποία έγινε η καταγραφή των φυσικοχημικών παραμέτρων. Αριστερά: θερμόμετρο και αλατόμετρο, δεξιά: θερμόμετρο, οξυγονόμετρο (φωτογραφίες Ε. Σπίνος).

Συμπεριλήφθηκαν επίσης αποτελέσματα μετρήσεων φυσικοχημικών παραμέτρων θαλάσσιων υδάτων που πραγματοποιήθηκαν κατά την σύνταξη μελέτης στον Κόλπο Αργοστολίου τους μήνες Ιούνιο, Νοέμβριο και Απρίλιο 1996 (Pitta et. al. 1999) τον Ιούνιο 2006 (Κονίδης κ.α. 2006), αποτελέσματα μετρήσεων σε 5 σταθμούς στην ανατολική περιοχή του Κόλπου στο πλαίσιο συλλογής στοιχείων για την παρούσα μελέτη (Αύγουστος 2013), καθώς και αποτελέσματα χρονοσειρών μετρήσεων, που έχουν πραγματοποιήσει δημόσιοι φορείς, στο πλαίσιο λειτουργίας των πλωτών μονάδων υδατοκαλλιέργειας στην περιοχή της μελέτης.

Στοιχεία για την θνησιμότητα και τα αίτια που την προκάλεσαν, καθώς επίσης και για το είδος και την εμφάνιση των ασθενειών, δόθηκαν από το αρχείο της εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς Α.Ε.

Από τη βιβλιογραφία (Κατσέλης κ.α. 2013) αντλήθηκαν δεδομένα σχετικά με συγκεντρώσεις θρεπτικών στοιχείων και χλωροφύλλης α.

α) σε δυο σταθμούς (εντός και εκτός κλωβών εκτροφής) για τρεις μήνες (Ιούνιο, Νοέμβριο και Απρίλιο 1996)

β) σε έξι σταθμούς (μονάδα εκτροφής, 25m, 50m, 100m, 200m από αυτή και έναν σταθμό

μάρτυρα) τον Ιούλιο του 2006 και

γ) σε 17 σταθμούς στον Κόλπο του Αργοστολίου κατά την περίοδο 15-22 Ιουνίου του 2006 οι οποίες αφορούσαν σε μετρήσεις εκτός θρεπτικών και χλωροφύλλης α και αλατότητας, θερμοκρασίας, διαλυμένου οξυγόνου, pH, θολερότητας και αριθμού κυττάρων φυτοπλαγκτού. Από τους σταθμούς αυτούς οι έξι είναι παράκτιοι (σειρά CO1-CO6), οι τρεις αφορούν στις περιοχές εγκατάστασης μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας (σειρά FARM1-FARM3) και οι οκτώ σταθμοί στον ευρύτερο Κόλπο μέχρι και την είσοδό του (σειρά KEF1-KEF8).

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που αφορούν μέσες μηνιαίες θερμοκρασίες νερού, αλατότητα, διαλυμένο οξυγόνο, και pH (τα οποία προέρχονται από ημερήσιες μετρήσεις) σε βάθος 2 μέτρων σε δυο σταθμούς που αφορούν θέσεις εγκατάστασης μονάδων για το χρονικό διάστημα 1994-2013. Τα στοιχεία αυτά ελήφθησαν από τις μονάδες υδατοκαλλιέργειας. Σε αυτό το αρχείο εντάσσονται στοιχεία παρακολούθησης φυσικοχημικών και μικροβιολογικών δεδομένων (σε 4 σταθμούς στο εγγύς περιβάλλον της εγκατάστασης των ιχθυομονάδων, στην στήλη του νερού και το βένθος), σε τριμηνιαία βάση για το χρονικό διάστημα 2010-2012, τα οποία μετρήθηκαν και αξιολογήθηκαν από διαπιστευμένο φορέα.

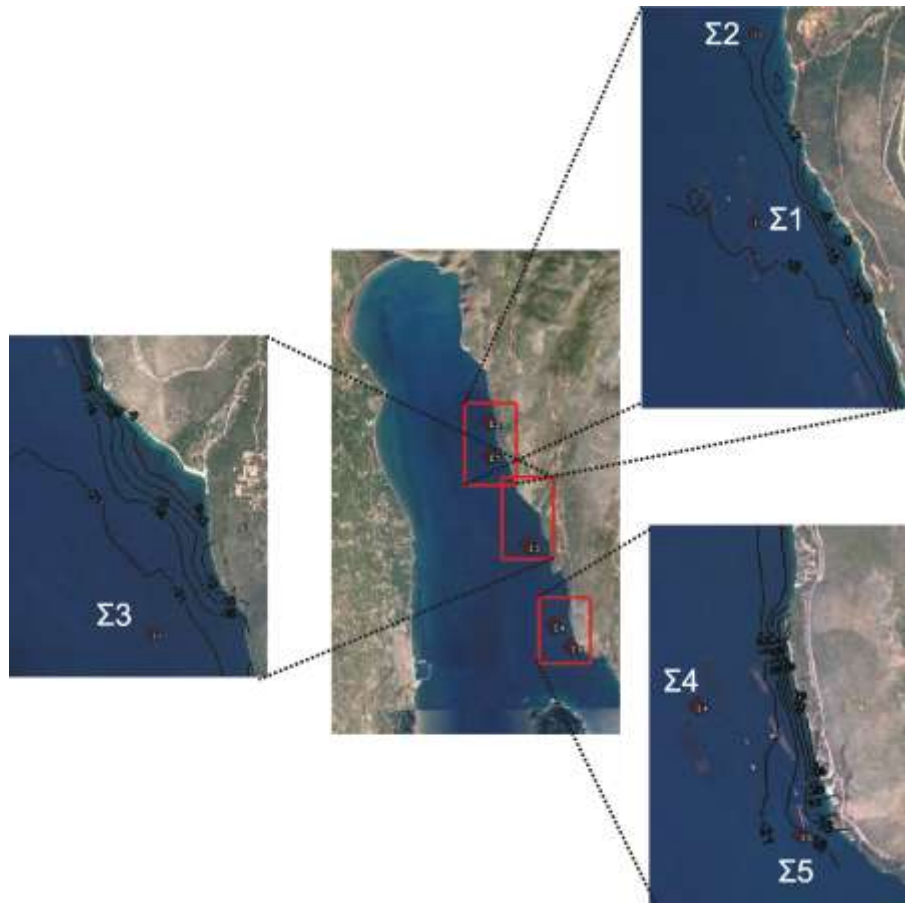
Τέλος από δειγματοληψία που έλαβε χώρα στις 26-28 Ιουλίου του 2013 σε πέντε σταθμούς στο ανατολικό τμήμα του Κόλπου καταγράφηκαν δεδομένα όπως θερμοκρασία, αλατότητα, θρεπτικά και χλωροφύλλη α. Οι δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν τον Ιούλιο του 2013, έγιναν σε ένα δίκτυο πέντε σημείων (σταθμοί) στο βορειοανατολικό τμήμα του Κόλπου Αργοστολίου (σχήμα 2.12). Η επιλογή των σημείων πραγματοποιήθηκε με κριτήρια το βάθος και τη γεινίαση στις υπάρχουσες μονάδες πάχυνσης ψαριών στην περιοχή. Η ακριβής θέση καθώς και συμπληρωματικές πληροφορίες για κάθε σταθμό δειγματοληψίας παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2.

Ο Σταθμός 1 (Σ1) ήταν η θέση δειγματοληψίας μεταξύ των κλωβών της μονάδας στο βόρειο τμήμα του Κόλπου και περίπου 300m απόσταση από την ακτή. Ο Σταθμός 2 (Σ2) ήταν η θέση δειγματοληψίας στο βόρειο τμήμα του Κόλπου και 130m απόσταση από την ακτή. Ο Σταθμός 3 (Σ3) ήταν η θέση δειγματοληψίας μεταξύ των τριών μονάδων πάχυνσης της περιοχής μελέτης, επιλέχθηκε ως σταθμός «μάρτυρας» της περιοχής με απόσταση 1300m από τη βόρεια μονάδα και 1600m από τη νότια μονάδα της περιοχής μελέτης και απόσταση από την ακτή περίπου 450m. Ο Σταθμός 4 (Σ4) ήταν η θέση δειγματοληψίας μεταξύ των κλωβών της μονάδας στο νότιο τμήμα της περιοχής μελέτης, σε απόσταση από την ακτή περίπου 370m. Ο Σταθμός 5 (Σ5), ήταν σημείο δειγματοληψίας στο νότιο τμήμα της περιοχής μελέτης και απόσταση θέσης από την ακτή περίπου 120m.

Πίνακας 2.2 Γεωγραφικό στίγμα και γενική περιγραφή των χαρακτηριστικών των σημείων δειγματοληψίας του 2013 στον Κόλπο Αργοστολίου.

Σταθμός	Γεωγραφικό Πλάτος	Γεωγραφικό Μήκος	Βάθος (m)	Απόσταση από κλωβούς (m)
Σ1	38 ° 14'.536"	20 ° 27'.495"	18	30

Σ2	38 ° 14'.935"	20 ° 27'.500"	14	500
Σ3	38 ° 13'.466"	20 ° 28'.089"	23	1300 από τη βόρεια μονάδα, 1600 από τη νότια μονάδα
Σ4	38 ° 12'.519"	20 ° 28'.472"	23	50
Σ5	38 ° 12'.265"	20 ° 28'.731"	19	250



Σχήμα 2.12 Θέσεις δειγματοληψίας φυσικοχημικών στοιχείων στην περιοχή μελέτης (ΒΑ τμήμα του Κόλπου Αργοστολίου) (στοιχεία μελέτης Π.Ο.Α.Υ από Κατσέλης κ.α. 2013).

Η αξιολόγηση του επιπέδου ευτροφισμού βάση των θρεπτικών στοιχείων έγινε με τον δείκτη ποιότητας παράκτιων υδάτων y (Κατσέλης κ.α. 2013) ο οποίος βασίζεται σε μια κλίμακα -1 έως 1 (ολιγότροφο έως εύτροφο σύστημα):

- Ολιγότροφο όταν y [-1,-0.5]
- Κατώτερο μεσότροφο όταν y [-0.5, 0]
- Ανώτερο μεσότροφο όταν y [0, 0.5]
- Εύτροφο όταν y [0.5, 1].

Η τιμή υπολογίζεται από την συγκέντρωση των θρεπτικών βάση της εξίσωσης:

$$y = \{ [N-NH_4^+] + 0,20[N-NO_2] + 0,016[N-NO_3] + 0,48[P-PO_4^{3-}] - 0,935 \} / 2,175$$

2.2.5.2 Όρμος Κακογκύλου

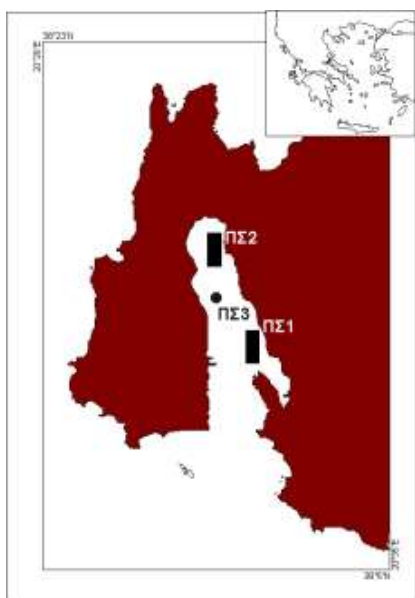
Στην παρούσα μελέτη έγινε συλλογή φυσικοχημικών παραμέτρων που συλλέγονταν από μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας λαβρακιού του Όρμου Κακογκύλου.

Σε όλη την διάρκεια των πειραματικών εμβολιασμών καταγραφόταν, με αδιάβροχα ψηφιακά καταγραφικά (τύπου Hobo), καθημερινά (ανά 1 ώρα) η θερμοκρασία του νερού επιφανείας της περιοχής μελέτης. Κατάγραφονταν επίσης η αλατότητα και το διαλυμένο οξυγόνο του νερού, με ψηφιακά φορητά όργανα, αλλά όχι καθημερινά.

2.2.6 Μικροβιολογικές παράμετροι του νερού

2.2.6.1 Κόλπος Αργοστολίου

Το χρονικό διάστημα 2004-2006 πραγματοποιήθηκε μελέτη των επιπτώσεων από τις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειών του Κόλπου Αργοστολίου στο θαλάσσιο περιβάλλον και έγινε δειγματοληπτικός έλεγχος στις δύο μονάδες της εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς Α.Ε. Στις πλωτές μονάδες, η διαδικασία των δειγματοληψιών, έγινε σε συνεργασία με την Υπηρεσία Αλιείας της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης Κεφαλονιάς.



Σχήμα 2.13 Περιοχή μελέτης και σταθμοί δειγματοληψίας 2004-2006.

Ελέγχθηκαν μεταξύ άλλων και οι μικροβιολογικές παράμετροι του νερού. Επιλέχθηκαν τρεις διαφορετικοί σταθμοί για τις δειγματοληψίες (σχήμα 2.13). Ο πρώτος σταθμός ήταν ο ΠΣ1, και η πρώτη δειγματοληψία έγινε στη θέση «Κόκκινος βράχος», η δεύτερη στη θέση «Λιβιάδι» όπου δόθηκε στον σταθμό η ονομασία ΠΣ2 και τέλος σε ένα σημείο μάρτυρα, μακριά από τις μονάδες πάχυνσης (700m από τη θέση «Λιβιάδι» και 2km από τη θέση «Κόκκινος βράχος»), όπου δόθηκε η ονομασία ΠΣ3. Πραγματοποιήθηκαν στην περιοχή μελέτης 8 δειγματοληψίες, στις 29/6/2004, 15/9/2004, 13/12/2004, 30/3/2005, 31/5/2005, 2/2/2006, 4/5/2006 και στις 19/7/2006 και συλλέχθηκαν δείγματα νερού επιφανείας και από τους 3 σταθμούς για να γίνουν μικροβιολογικές αναλύσεις.

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες γυάλινες φιάλες για τις αναλύσεις. Οι φιάλες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την συλλογή των δειγμάτων ήταν αποστειρωμένες και αμέσως μετά τη δειγματοληψία σφραγίσθηκαν με παραφίλμ. Τα δείγματα συσκευάστηκαν σε φορητό ψυγείο και εστάλησαν για μικροβιολογικές αναλύσεις σε εξειδικευμένο εργαστήριο.

Το έτος 2013, στο πλαίσιο μελέτης για την δημιουργία Περιοχής Οργανωμένης Ανάπτυξης Υδατοκαλλιέργειών (Π.Ο.Α.Υ.) των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειών του Κόλπου Αργοστολίου, μεταξύ άλλων διαδικασιών έγιναν δειγματοληψίες νερού για την επιμέρους μελέτη των μικροβιολογικών παραμέτρων στις συγκεκριμένες μονάδες.

Επιλέχθηκαν 3 σταθμοί δειγματοληψίας, οι Σ1 και Σ3 στις πλωτές μονάδες στις θέσεις Λιβιάδι και Κόκκινος Βράχος αντίστοιχα και ο Σ2 σταθμός μάρτυρας (σχήμα 2.14). Ο σταθμός μάρτυρας είχε τα ίδια χαρακτηριστικά με τους σταθμούς στις μονάδες Σ1 και Σ3, δηλαδή βάθος, απόσταση από την ακτή και βρισκόταν στη μέση της απόστασης των θέσεων που είναι εγκατεστημένες και λειτουργούν οι μονάδες. Στις 9/9/2013 δείγματα νερού ελήφθησαν σε τρεις σταθμούς στην περιοχή μελέτης σε βάθος 1m από την επιφάνεια. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε εργαστήριο όπου έγινε η ανάλυσή τους σύμφωνα με τα πρότυπα πιστοποίησης ποιότητας θαλάσσιου περιβάλλοντος: ISO 7899-2 (εντερόκκοκοι), ISO 9308-1 (ολικά κολοβακτηριοειδή στους 37°C), ISO 6222 (αριθμός αποικιών καλλιιεργήσιμων μικροοργανισμών (ΑΑΚΜ) στους 22 & 37°C) και ISO 9308-1 (ανίχνευση παρουσίας *E. coli*) (ΟΔΗΓΙΑ 98/83/ΕΚ, σχετικά με την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης).



Σχήμα 2.14 Σταθμοί δειγματοληψίας νερού (Σ1 – Σ3) μελέτης της μικροβιακής χλωρίδας στον Κ. Αργοστολίου το 2013. Τα κίτρινα πλαίσια είναι οι περιοχές μονάδων πάχυνσης ιχθύων (στοιχεία μελέτης Π.Ο.Α.Υ από Κατσέλης κ.Α. 2013).

2.2.6.2 Όρμος Κακογκύλου

Στον Όρμο Κακογκύλου δεν γινόταν καταγραφή των μικροβιολογικών παραμέτρων του νερού στην περιοχή μελέτης. Ελήφθησαν στοιχεία μόνο για την αποτύπωση της περιοχής όπου έγιναν τα εμβολιακά πειράματα.

2.2.7 Στοιχεία διαχείρισης των μονάδων πάχυνσης στις περιοχές μελέτης

2.2.7.1 Κόλπος Αργοστολίου

Από το αρχείο της εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς, δόθηκαν στοιχεία διαχείρισης των εκτρεφόμενων πληθυσμών λαβρακιού στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου και στις θέσεις Κόκκινος Βράχος και Λιβιάδι, κυρίως για το χρονικό διάστημα 2011-2015. Τα στοιχεία αυτά ήταν ο αριθμός του γόνου που εισήχθη στις πλωτές μονάδες πάχυνσης, οι χρονικές περίοδοι αλλαγών των δικτυών, οι διαδικασίες πρόληψης και θεραπείας, οι διαλογές σε μεγέθη των ψαριών και η θνησιμότητα.

Από τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν και την επεξεργασία τους, έγινε προσπάθεια συσχέτισής τους με τις ετήσιες απώλειες του συνολικού πληθυσμού λαβρακιού στις συγκεκριμένες μονάδες εκτροφής.

2.2.7.2 Όρμος Κακογκύλου

Δεν συλλέχθηκαν στοιχεία διαχείρισης της μονάδας που μελετήθηκε στον Όρμο Κακογκύλου.

2.2.8 Στατιστική ανάλυση συσχέτισης φυσικοχημικών παραμέτρων με την εμφάνιση ασθενειών

Παρακάτω θα αναφερθούν οι διαδικασίες της πολλαπλής παλινδρόμησης και της πολλαπλής συσχέτισης (αλληλεξάρτησης) μεταξύ τριών ή περισσότερων μεταβλητών. Εάν έχουμε ταυτόχρονες μετρήσεις για περισσότερες από δύο μεταβλητές και μία από τις μεταβλητές θεωρείται ότι εξαρτάται από τις άλλες, τότε έχουμε να κάνουμε με μια πολλαπλή παλινδρόμηση. Προκειμένου να γίνουν δοκιμές υποθέσεων ή να εκφράσουν διαστήματα εμπιστοσύνης, οι παρατηρούμενες τιμές της εξαρτημένης μεταβλητής (Y) υποτίθεται ότι έχουν έρθει τυχαία από μια κανονική κατανομή των Y τιμών που υπάρχουν στον πληθυσμό στον συγκεκριμένο παρατηρούμενο συνδυασμό ανεξάρτητων μεταβλητών. Επιπλέον, όλες αυτές οι κανονικές κατανομές, σε όλους τους συνδυασμούς τιμών για τις εξαρτημένες μεταβλητές, υποτίθεται ότι έχουν την ίδια διακύμανση. Άλλες υποθέσεις είναι ότι οι τιμές του Y είναι ανεξάρτητες η μία από την άλλη και ότι το σφάλμα στη μέτρηση των X είναι μικρό σε σύγκριση με το σφάλμα στη μέτρηση Y.

Εάν καμία από τις μεταβλητές δεν θεωρείται ότι είναι λειτουργικά εξαρτώμενη από οποιαδήποτε άλλη, τότε έχουμε να κάνουμε με πολλαπλές συσχετίσεις, κάτι που απαιτεί την υπόθεση ότι κάθε μία από τις μεταβλητές παρουσιάζει μια κανονική κατανομή σε κάθε συνδυασμό όλων των άλλων μεταβλητών. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου η εξαρτημένη μεταβλητή έχει μόνο δύο πιθανές τιμές (π.χ. αρσενικό ή θηλυκό, νεκρό ή ζωντανό, πράσινο ή κόκκινο, ενήλικα ή ανώριμα). Μια τέτοια μεταβλητή ονομαστικής κλίμακας (η οποία ονομάζεται «διχοτομική» ή «διωνυμική») δεν ακολουθεί κανονική κατανομή (Zar 1999).

Εξετάζοντας -n- παρατηρήσεις των μεταβλητών M (οι μεταβλητές που αναφέρονται ως X1 έως XM), εάν επιθυμούμε να θεωρήσουμε μία από τις μεταβλητές M ως εξαρτημένες από τις άλλες, τότε μπορούμε τελικά να ορίσουμε αυτήν την μεταβλητή ως Y, αλλά θα εκτελεστούν υπολογισμοί απλά κρατώντας όλες τις μεταβλητές M ως αριθμούς 1 έως M του X.

Τα ποσά των παρατηρήσεων κάθε μίας από τις μεταβλητές M υπολογίζονται ως:

$$\begin{array}{ccc} n & n & n \\ \Sigma X_{1j} & \Sigma X_{2j} & \dots \Sigma X_{Mj} \\ j=1 & j=1 & j=1 \end{array}$$

Τα αθροίσματα εκτελούνται πάντοτε σε όλα τα σύνολα -n- δεδομένων. Έτσι, τα ποσά των μεταβλητών μπορούν να χαρακτηριστούν ως:

$$\Sigma X \quad \Sigma X_2 \quad \dots \quad \Sigma X_M$$

Τα ποσά των τετραγώνων και των αθροισμάτων των ενδιάμεσων τιμών υπολογίζονται ακριβώς όπως και για την απλή παλινδρόμηση ή συσχέτιση, για κάθε μια από τις μεταβλητές M. Αυτά τα ποσά, γενικά αναφερόμενα ως ποσά μικρών και μεμονωμένων διασταυρωμένων τιμών, παρουσιάζονται στα αποτελέσματα (Zar 1999).

Μία απλή γραμμική παλινδρόμηση για έναν πληθυσμό μεταβλητών είναι η σχέση:

$$Y_i = \alpha + \beta X_i$$

Σε αυτή τη σχέση, τα Y και X αντιπροσωπεύουν τις εξαρτώμενες και ανεξάρτητες μεταβλητές, αντίστοιχα, β είναι ο συντελεστής παλινδρόμησης στον πληθυσμό, το Y (τομή)

είναι η τιμή όταν X είναι μηδέν.

Σε πολλές περιπτώσεις, ωστόσο, το Y μπορεί να θεωρηθεί ότι εξαρτάται από περισσότερες από μία μεταβλητές. Έτσι:

$$Y_j = \alpha + \beta_1 X_{1j} + \beta_2 X_{2j}$$

μία μεταβλητή (Y) εξαρτάται γραμμικά από μια δεύτερη μεταβλητή (X_1), και Y είναι επίσης γραμμικά εξαρτώμενη από μια τρίτη μεταβλητή (X_2). (Η διπλή συμβολική ένδειξη, X_{ij} , δηλώνει την j στη παρατήρηση των μεταβλητών X_i). Σε αυτό το συγκεκριμένο μοντέλο πολλαπλής παλινδρόμησης έχουμε μία εξαρτώμενη μεταβλητή και δύο ανεξάρτητες μεταβλητές. Οι δύο παράμετροι του πληθυσμού, β_1 και β_2 , ονομάζονται μερικοί συντελεστές παλινδρόμησης, το β_1 εκφράζει πόσο το Y θα αλλάξει για μια αλλαγή μονάδας σε X_1 , αν οι X_2 ήταν σταθερές. Μερικές φορές λέγεται ότι το β_1 είναι ένα μέτρο της σχέσης Y με X_1 μετά τον έλεγχο για το X_2 , δηλαδή είναι ένα μέτρο της έκτασης στην οποία το Y σχετίζεται με το X_1 μετά την αφαίρεση του αποτελέσματος της X_2 . Ομοίως, το β_2 περιγράφει τον ρυθμό μεταβολής του Y ως προς X_2 αλλαγές, με το X_1 να διατηρείται σταθερό. Τότε ονομάζονται μερικοί συντελεστές παλινδρόμησης, επειδή καθένας από αυτούς εκφράζει μόνο ένα μέρος της σχέσης εξάρτησης. Το σημείο παρατήρησης Y , α (μερικές φορές ορίζεται ως β_0) είναι η τιμή του Y όταν τα X_1 και X_2 είναι μηδέν. Η εξίσωση: $Y_j = \alpha + \beta_1 X_{1j} + \beta_2 X_{2j}$ ορίζει ένα επίπεδο (το οποίο μπορεί να γραφεί σε ένα τρισδιάστατο γράφημα). Η παλινδρόμηση με ανεξάρτητες μεταβλητές m ορίζει μια m -επιφάνεια και σε κάποιες περιπτώσεις αναφέρεται ως «επιφάνεια απόκρισης».

Τα δεδομένα πληθυσμού των οποίων η σχέση περιγράφεται από την προαναφερθείσα εξίσωση, πιθανότατα δεν θα βρίσκονται όλα ακριβώς σε ένα επίπεδο, επομένως αυτή η εξίσωση μπορεί να εκφραστεί ως:

$$Y_j = \alpha + \beta_1 X_{1j} + \beta_2 X_{2j} + e_j$$

όπου e_j , το «υπολειπόμενο» ή «λάθος» είναι το ποσό με το οποίο το Y_j διαφέρει από αυτό που προβλέπεται από την εξίσωση: $\alpha + \beta_1 X_{1j} + \beta_2 X_{2j}$, και το άθροισμα όλων των e είναι μηδέν.

Αν δείξουμε τον πληθυσμό που περιέχει τις τρεις μεταβλητές (Y , X_1 και X_2) στην εν λόγω εξίσωση, μπορούμε να υπολογίσουμε τα στατιστικά δείγματα για να υπολογίσουμε τις παραμέτρους του πληθυσμού στο μοντέλο. Η συνάρτηση πολλαπλής παλινδρόμησης που προκύπτει από ένα δείγμα δεδομένων θα είναι:

$$\hat{Y}_j = \alpha + b_1 X_{1j} + b_2 X_{2j},$$

όπου α , b_1 και b_2 είναι εκτιμήσεις των παραμέτρων του πληθυσμού, α , β_1 και β_2 , αντίστοιχα.

Θεωρητικά, δεν υπάρχει όριο στον αριθμό ανεξάρτητων μεταβλητών, X_j , που μπορεί να προταθεί σαν να επηρεάζει τις εξαρτώμενες μεταβλητές, Y . Το μοντέλο του γενικού πληθυσμού, του οποίου η εξίσωση $Y_j = \alpha + \beta_1 X_{1j} + \beta_2 X_{2j}$ είναι μια ειδική περίπτωση, δίνεται ως:

$$Y_j = \alpha + \beta_1 X_{1j} + \beta_2 X_{2j} + \beta_3 X_{3j} + \dots + \beta_m X_{mj} + e_j,$$

ή πιο συνοπτικά

$$m$$

$$Y_j = \alpha + \sum_{i=1}^m \beta_i X_{ij} + \epsilon_j$$

όπου m είναι ο αριθμός των ανεξάρτητων μεταβλητών. Αυτό το μοντέλο είναι πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση λόγω της γραμμικής (δηλ. προσθετικής) διάταξης των παραμέτρων (α και β_i) στο μοντέλο. Η εξίσωση παλινδρόμησης του δείγματος, που περιέχει τα στατιστικά στοιχεία που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των παραμέτρων του πληθυσμού όταν υπάρχουν ανεξάρτητες μεταβλητές, θα είναι:

$$\hat{Y}_j = \alpha + b_1 X_{1j} + b_2 X_{2j} + b_3 X_{3j} + \dots + b_m X_{mj}$$

ή

$$m$$

$$\hat{Y}_j = \alpha + \sum_{i=1}^m b_i X_{ij}$$

Απαιτούνται τουλάχιστον σημεία δεδομένων $m+2$ για την εκτέλεση μιας ανάλυσης πολλαπλής παλινδρόμησης, όπου m είναι ο αριθμός ανεξάρτητων μεταβλητών που καθορίζουν κάθε σημείο δεδομένων.

Το κριτήριο για τον ορισμό της εξίσωσης πολλαπλής παλινδρόμησης «βέλτιστης προσαρμογής» είναι συνήθως εκείνο των ελαχίστων τετραγώνων, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την εξίσωση παλινδρόμησης με το ελάχιστο εναπομένον άθροισμα τετραγώνων, δηλαδή την ελάχιστη τιμή:

$$n$$

$$\Sigma = \sum_{j=1}^n (Y_j - \hat{Y}_j)^2$$

Από την ανάλυση φτάνουμε σε μια παλινδρόμηση που οι συντελεστές παλινδρόμησης όπως το b_1 είναι μια εκτίμηση της σχέσης μεταξύ Y και X_1 μετά την αφαίρεση των αποτελεσμάτων και των δύο X_2 και X_3 . Αν οι ανεξάρτητες μεταβλητές αλληλοσυμπληρώνονται σε μεγάλο βαθμό, τότε η ερμηνεία μερικών συντελεστών παλινδρόμησης καθίσταται αμφισβητήσιμη, όπως συμβαίνει και με τον έλεγχο των υποθέσεων σχετικά με τους συντελεστές (Zar 1999).

Στον πειραματικό σχεδιασμό όλες οι διαδικασίες (t-test, F-test, και η δημιουργία των ορίων εμπιστοσύνης) χρησιμοποιούν το άθροισμα των τετραγώνων, το οποίο συχνά αποκαλείται άθροισμα σφαλμάτων τετραγώνων. Η ποσότητα αυτή θα μπορούσε να βρεθεί υπολογίζοντας για κάθε μεταβλητή την τιμή $(m + t_i + b_j)$ ή $(y = a + b_1 * x_1 + b_2 * x_2 \dots b)$. Θα μπορούσε στη συνέχεια να ληφθεί το άθροισμα των τετραγώνων των διαφορών μεταξύ παρατηρήσεων και προβλεπόμενων τιμών. Αυτή η μέθοδος είναι αργή, και το άθροισμα σφαλμάτων τετραγώνων πολύ πιο γρήγορα υπολογίζεται με μία τεχνική γνωστή ως η ανάλυση διασποράς.

Στο αρχικό μοντέλο, κάθε παρατήρηση αντιπροσωπεύεται ως το άθροισμα των τεσσάρων μεταβλητών, π.χ. του γενικού μέσου, του αποτελέσματος της θεραπείας, της περιβαλλοντικής επίδρασης κ.λπ. Κατά τον ίδιο τρόπο, η ανάλυση διακύμανσης κατακερματίζει το άθροισμα των τετραγώνων των παρατηρήσεων σε τέσσερα αθροίσματα των τετραγώνων, έτσι ώστε να αποδοθεί στον γενικό μέσο, σε διαφορές μεταξύ των εκτιμώμενων αποτελεσμάτων των θεραπειών, στις περιβαλλοντικές επιπτώσεις που εκτιμήθηκε στο πείραμα, και τέλος στο σφάλμα αθροίσματος των τετραγώνων. Στις περισσότερες περιπτώσεις υπολογίζουμε το αρχικό άθροισμα των τετραγώνων και τις πρώτες τρεις μεταβλητές, υπολογίζοντας το

άθροισμα σφαλμάτων τετραγώνων με αφαίρεση.

Η ανάλυση της διακύμανσης δίνει πολύ περισσότερα από μια μέθοδο συντόμευσης της εξασφάλισης του αθροίσματος σφαλμάτων τετραγώνων. Το άθροισμα των τετραγώνων όπως οι θεραπείες είναι η ποσότητα (S22-S12) που απαιτούνται για το F-test της υπόθεσης ότι δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων των θεραπειών. Με μια μικρή προέκταση η ανάλυση επίσης τροφοδοτεί το άθροισμα των τετραγώνων που απαιτούνται για τον έλεγχο της ισότητας των αποτελεσμάτων μιας υποομάδας των θεραπειών. Η μεταβλητή των περιβαλλοντικών επιπτώσεων μας δίνει τη δυνατότητα να εκτιμηθεί κατά πόσο η ακρίβεια του πειράματος έχει αυξηθεί με την εξάλειψη αυτών των επιδράσεων από τις εκτιμήσεις των μέσων τιμών θεραπείας (Cochran et al. 1953).

Τα δεδομένα στα οποία έγινε στατιστική επεξεργασία και ανάλυση αφορούν το χρονικό διάστημα 2011-2015 και η καταγραφή τους πραγματοποιήθηκε σε 2 μονάδες του Κόλπου Αργοστολίου. Οι φυσικοχημικές παράμετροι του νερού είναι η μέση ημερήσια θερμοκρασία (T°C), η ημερήσια αλατότητα (psu), η ημερήσια τιμή του διαλυμένου οξυγόνου (D.O. mg/l) και η ημερήσια τιμή της ενεργού οξύτητας (pH). Η καταγραφή της θερμοκρασίας γινόταν κάθε 1 ώρα και στα αποτελέσματα έχει καταχωρηθεί η μέση ημερήσια τιμή της ενώ η καταγραφή της αλατότητας, του οξυγόνου και της ενεργού οξύτητας γινόταν μία φορά την ημέρα. Τα στοιχεία, για την εμφάνιση των ασθενειών στο λαβράκι και στην τσιπούρα καθώς και η ταυτοποίηση της κάθε νόσου, δόθηκαν από τους υπεύθυνους των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας που μελετήθηκαν. Οι ασθένειες του λαβρακιού που μελετήθηκαν είναι η δονακίωση, η φωτοβακτηριδίαση, η ιογενής εγκεφαλοπάθεια-αμφιβληστροειδοπάθεια και το «Χειμερινό σύνδρομο» η ασθένεια που προσβάλλει κυρίως την τσιπούρα. Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού και εμφάνισης ασθενειών του λαβρακιού και της τσιπούρας χρησιμοποιήθηκε η πολυμεταβλητή παλινδρόμηση (multi regression analysis).

Παρακάτω επεξηγούνται οι μεταβλητές οι οποίες παρήχθησαν και χρησίμευσαν στην στατιστική επεξεργασία και ανάλυση προκειμένου γίνει συσχέτιση των κυριότερων φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού με την πιθανότητα εμφάνισης τεσσάρων ασθενειών σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου. Για την συσχέτιση χρησιμοποιήθηκε πολυπαραγοντική παλινδρόμηση (Multi Regression Analysis). Στους πίνακες δεδομένων για κάθε πραγματική τιμή των φυσικοχημικών παραμέτρων (θερμοκρασίας, αλατότητας, οξυγόνου και pH), υπολογίστηκε η μέση τιμή της 1^{ns} τιμής με την 15^{η} , της 2^{ns} με την 15^{η} κ.λπ. Στη συνέχεια της 2^{ns} τιμής με την 16^{η} , της 3^{ns} τιμής με την 16^{η} κ.λπ. Έτσι φτιάχτηκε πίνακας με νέα δεδομένα όπου TEM_At, TEM_SDt, S_At, S_SDt, O_At, O_SDt, Ph_At, Ph_SDt, είναι η θερμοκρασία, η τυπική απόκλιση θερμοκρασίας, η αλατότητα, η τυπική απόκλιση αλατότητας, το οξυγόνο, η τυπική απόκλιση οξυγόνου, το pH, η τυπική απόκλιση του pH του νερού αντίστοιχα την ημέρα t, μέση τιμή των ημερήσιων τιμών του διαστήματος t [-7,7] ημερών. Τα LAG(TEM_At), LAG(TEM_SDt), LAG(S_At), LAG(S_SDt), LAG(O_At), LAG(O_SDt), LAG(Ph_At), LAG(Ph_SDt) 10, 20, 30, 40 αντιστοιχούν σε μέσες τιμές: της θερμοκρασίας (TEM_At), της τυπικής απόκλισης της θερμοκρασίας (TEM_SDt), της αλατότητας (S_At), της τυπικής απόκλισης της αλατότητας (S_SDt), του οξυγόνου (O_At), της τυπικής απόκλισης του οξυγόνου (O_SDt), του pH (Ph_At), της τυπικής απόκλισης του pH (Ph_SDt) 10, 20, 30, 40 ημέρες πριν την εμφάνιση της ασθένειας. Η μέθοδος με την οποία υπολογίστηκε η θερμοκρασία του νερού την ημέρα t, είναι η μέση τιμή των ημερήσιων

τιμών του διαστήματος $t \in [-7, 7]$ ημερών Η T_t είναι κινούμενη μέση θερμοκρασία (T) του χρονικού διαστήματος από $t=-7$ ημέρες έως $t=7$ ημέρες από την ημέρα t . Δίνεται επίσης η τυπική απόκλιση τιμών της θερμοκρασίας όπως ορίστηκε. Αντίστοιχα δίνονται και οι υπόλοιπες παράμετροι.

Οι τιμές της μέσης ημερήσιας θερμοκρασίας, της αλατότητας, του διαλυμένου οξυγόνου και της ενεργού οξύτητας του νερού, τοποθετήθηκαν σε αντίστοιχες στήλες σε πίνακες με την σειρά που προαναφέρθηκαν και αποτέλεσαν τις ανεξάρτητες μεταβλητές που χρησίμευσαν για την στατιστική ανάλυση. Δίπλα σε κάθε στήλη των εν λόγω μεταβλητών μπήκαν οι τιμές της τυπικής τους απόκλισης. Στη συνέχεια φτιάχτηκαν στήλες με τις μεταβλητές που αφορούσαν στη θνησιμότητα που οφειλόταν στις ασθένειες 1. Δονακίωση, 2. Φωτοβακτηριδίαση, 3. Ιογενής Εγκεφαλοπάθεια-Αμφιβληστροειδοπάθεια, 4. Χειμερινό Σύνδρομο, λαμβάνοντας τις τιμές 0 ή 1 ανάλογα με το αν εμφανιζόταν κάποια από τις 4 ασθένειες ή όχι. Οι τιμές αφορούν στην πιθανότητα εμφάνισης μιας ασθένειας και είναι καταγραφές σε διχοτομική κλίμακα δηλ. παρουσία-απουσία των αναγνωριστικών συμπτωμάτων της κάθε ασθένειας. Τα αναγνωριστικά συμπτώματα αφορούν σε όρια διάκρισης μιας συνεχούς φυσιολογικής διεργασίας σε σχέση με την επίδραση μιας παραμέτρου(-ων), όπου η συνάρτηση της πιθανότητας εμφάνισης των συμπτωμάτων μιας ασθένειας με την επίδραση μιας παραμέτρου(-ων), μπορεί να θεωρηθεί ότι μπορεί να περιγραφεί με το μοντέλο της σιγμοειδούς καμπύλης, το πρότυπο της οποίας δίνεται ακολούθως:

$$P=1/(1+e^{-y})$$

Όπου: P η πιθανότητα εμφάνισης της ασθένειας και y η συνάρτηση που περιγράφει το άθροισμα της επίδρασης των εξεταζόμενων παραμέτρων $y= a+\sum b_i X_i$, a και b σταθερές υπολογισμένες με πολυγραμμική παλινδρόμηση, X_i είναι η ανεξάρτητη μεταβλητή i , όπου $i = 1^{\text{η}}, 2^{\text{η}}, 3^{\text{η}} \dots n^{\text{η}}$ ανεξάρτητη μεταβλητή η οποία συνδέεται με την πιθανότητα εμφάνισης των εξεταζόμενων ασθενειών, ύστερα από τον κάτωθι μετασχηματισμό των παρατηρούμενων τιμών:

$$y=-\ln[(1-P)/P]= a+\sum b_i X_i$$

Οι στατιστικά σημαντικές ($p < 0.05$) ανεξάρτητες μεταβλητές για κάθε μοντέλο επιλέχθηκαν με την εφαρμογή μιας μεθόδου βηματικής επιλογής (backward stepwise selection). Η σημαντικότητα της επίδρασης της κάθε ανεξάρτητης μεταβλητής στην εξαρτημένη εξετάστηκε από την συνεισφορά της στο ποσοστό της επεξηγούμενης μεταβλητότητας της εξαρτημένης μεταβλητής (Explain%Variance).

Πριν την τελική επιλογή των στατιστικά σημαντικών ανεξάρτητων μεταβλητών έγιναν επαναληψεις προσδιορισμού τους με απομάκρυνση των ανεξάρτητων μεταβλητών που παρουσιάζουν συγγραμμικότητα. Ο δείκτης VIF (variance inflation factor) χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί το επίπεδο συγγραμμικότητας των ανεξάρτητων μεταβλητών. Μεγάλες τιμές VIF (variance inflation factor) υποδηλώνουν υψηλό επίπεδο συγγραμμικότητας, ενώ η τιμή $VIF=1$ υποδηλώνει ότι οι μεταβλητές είναι ασυσχέτιστες ($r=0$). Μέχρι του όριου $VIF = 10$ οι ανεξάρτητες μεταβλητές που συμμετέχουν στο μοντέλο μπορεί να θεωρηθεί ότι δεν παρουσιάζουν συγγραμμικότητα που να επηρεάζει την αξιοπιστία του μοντέλου (Hair et al., 1998).

2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από την συλλογή, ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων, με σκοπό την εκτίμηση της επίδρασης των περιβαλλοντικών παραμέτρων στην εμφάνιση ασθενειών σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου όπου εκτρέφεται το μεσογειακό είδος λαβράκι και τσιπούρα, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα.

2.3.1 Αποτύπωση πυθμένα περιοχών μελέτης

2.3.1.1 Κόλπος Αργοστολίου-Χαρακτηριστικά και σύσταση του πυθμένα

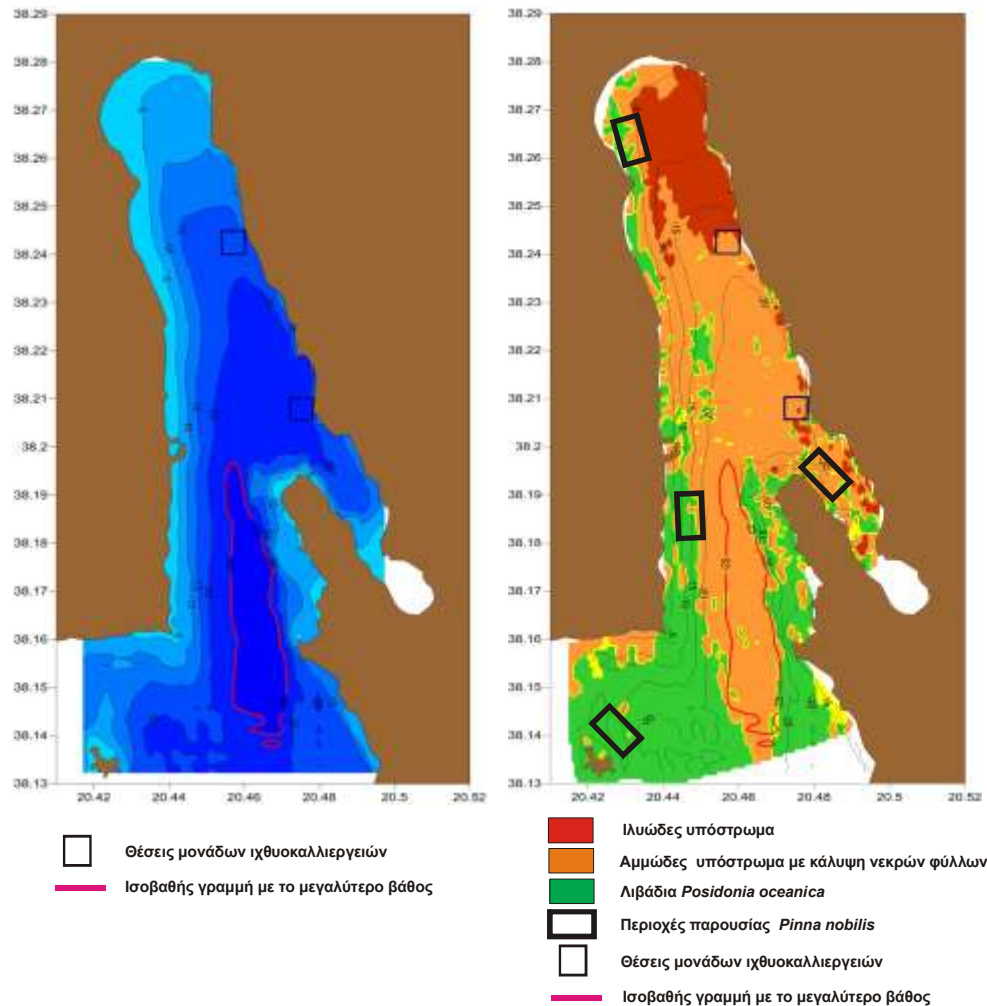
Η περιοχή μελέτης καλύπτεται σχεδόν ολόκληρη από μαλακό αμμώδες υπόστρωμα (σχήμα 2.15) Από όλες τις δειγματοληψίες και τις οπτικές παρατηρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, ταυτοποιήθηκε ένα είδος θαλάσσιου φανερόγαμου το *P. oceanica*. Μικρές συστάδες σε αραιή διάταξη του είδους *Cymodocea nodosa* παρατηρήθηκαν κοντά στα λιμάνια Αργοστολίου και Ληξουρίου. Στην ΒΑ περιοχή του Κόλπου η αποτύπωση του πυθμένα και η επιβεβαίωσή του έδειξε ότι ήταν κυρίως ιλυώδης, αφού πιθανόν λόγω των κινήσεων των θαλασσιών μαζών (Κονίδης κ.ά. 2006) καταλήγουν εκεί αιωρούμενα σωματίδια, οργανικά και ανόργανα υλικά, από όλη την περιοχή και πιθανόν επιβαρύνεται από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες.

Η παρουσία λιβαδιών του είδους *P. oceanica* στην περιοχή περιορίστηκε κυρίως στη δυτική πλευρά, υπάρχουν μικρές συστάδες ανατολικά και καταγράφηκαν συνεχόμενα λιβάδια και εκτεταμένες συστάδες στο άνοιγμα του Κόλπου, σε μια περιοχή που αρχίζει βόρεια από τον φάρο των Αγίων Θεοδώρων και επεκτείνεται νότια μέχρι τις ανατολικές ακτές και δυτικά στις νησίδες Βαρδιάνους (σχήμα 2.15).

Στις υποβρύχιες λήψεις με κάμερα προκειμένου να γίνει επιβεβαίωση του σήματος του ηχοβολιστικού οργάνου, παρατηρήθηκαν διάσπαρτα πολυάριθμα εχινόδερμα κυρίως ολοθουροειδή και αχινοί σε όλο τον πυθμένα της περιοχής μελέτης και σε τέσσερις περιοχές του Κόλπου και σε βάθος μεγαλύτερο των 2 m, μικροί πληθυσμοί του δίθυρου μαλακίου *Pinna nobilis*. Οι περιοχές αυτές είναι ΒΔ του Κόλπου, νότια του λιμανιού Ληξουρίου, στο λιμάνι Αργοστολίου και λίγο βορειότερα κοντά στις ακτές και σε μικρό βάθος και ανατολικά των νησίδων Βαρδιάνων (Spirinos et al. 2012).

Επιπλέον, έχει βρεθεί από παλαιότερες μελέτες ότι η σημαντικότερη επιβάρυνση από τη λειτουργία των μονάδων φαίνεται να εστιάζεται στον πυθμένα κάτω από τους κλωβούς πάχυνσης και σε ακτίνα 150m περιμετρικά αυτών. Η πιο εμφανής επίδραση είναι αυτή της προσθήκης οργανικού φορτίου και θρεπτικών στο θαλάσσιο περιβάλλον που προέρχονται από τις τροφές και τις απεκκρίσεις των ψαριών (Grigorakis & Rigos 2011). Τα στερεά υπολείμματα βυθίζονται σχετικά γρήγορα και επικάθονται στον πυθμένα κάτω από τα κλουβιά όπου προκαλούν σημαντική υποβάθμιση των βενθικών βιοκοινωνιών (Karakasis & Hatzigianni 2000). Αντίθετα, στην υδάτινη στήλη, τα θρεπτικά συστατικά που προέρχονται από το μεταβολισμό και τις τροφές των ψαριών φαίνεται να αραιώνονται πολύ γρήγορα από τα υπάρχοντα ρεύματα και να μην επιδρούν σημαντικά στην πρωτογενή παραγωγή της περιοχής. Γενικά, σύμφωνα με την εικόνα των βιοκοινωνιών κατά μήκος της ακτογραμμής της περιοχής μελέτης αποκαλύπτεται μια περιοχή με γενικά ενδιάμεσο προς καλό επίπεδο οικολογικής ποιότητας. Σύμφωνα με το μοντέλο ρύπανσης ιχθυοτροφείων (Conides et al.

1993), η ολική παραγωγή πρωτεϊνών από ιχθυοτροφεία τσιπούρας και λαυρακιού είναι 0,031 φορές την ολική ποσότητα τροφής που χρησιμοποιείται στα ψάρια ετησίως. Η ολική ποσότητα αζώτου, που περιέχεται στην ποσότητα αυτή των πρωτεϊνών, και με την παραδοχή ότι όλη η ποσότητα των πρωτεϊνών αποικοδομείται στο περιβάλλον τελείως, είναι ίση με 17%. Η πηγή του φωσφόρου (P) είναι μόνο οι απώλειες τροφής. Αυτό σε κανονικές συνθήκες δεν μπορεί να ξεπερνάει το 1-2% καθώς μια τέτοια απώλεια ισούται με 37,4 τόνους ετησίως.



Σχήμα 2.15 Βυθομετρία και αποτύπωση πυθμένα του Κόλπου Αργοστολίου (Spinos et al., 2012).

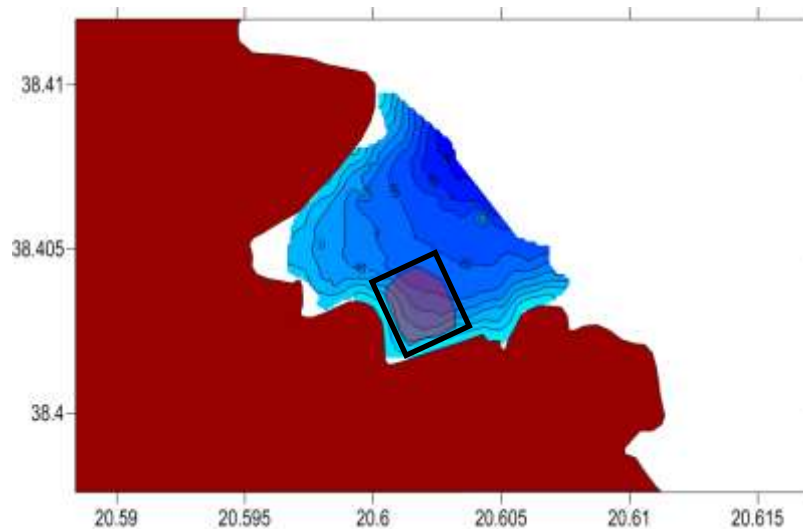
Στοιχεία σχετικά με τους τύπους του υποστρώματος σε ολόκληρο τον Κόλπο του Αργοστολίου αναφέρονται από τους Spinos et al. (2012). Η μελέτη αυτή, είχε ως κύριο στόχο την αποτύπωση των λιβαδιών του φυτού *P. oceanica* σε όλο το Κόλπο του Αργοστολίου. Συνολικά λοιπόν, φαίνεται ότι στον Κόλπο του Αργοστολίου, το είδος *P. oceanica* έχει ευρύτατη εξάπλωση στο νότιο τμήμα του Κόλπου όπου σχηματίζει εκτεταμένα λιβάδια μήκους αρκετών χιλιομέτρων από την ακτή έως και τα 25m βάθος στο ανατολικό τμήμα και έως τα 18m βάθος στο δυτικό τμήμα. Η εξάπλωση του είδους είναι πιο περιορισμένη στο εσωτερικό τμήμα του Κόλπου όπου βρίσκεται κυρίως στο δυτικό τμήμα μεταξύ της ακτής και της ισοβαθούς των 5m ενώ στο ανατολικό τμήμα (περιοχή ενδιαφέροντος της παρούσης

μελέτης) έχει ελάχιστη παρουσία με τη μορφή περιορισμένων συστάδων κοντά στην ακτογραμμή.

Από τη συνολική εικόνα που προκύπτει για την περιοχή φαίνεται ότι ο πυθμένας του Κόλπου του Αργοστολίου καλύπτεται από λεπτόκοκκο λασπώδες υπόστρωμα στο βόρειο τμήμα του ενώ σταδιακά προς το νότιο τμήμα το υπόστρωμα είναι λασποαμμώδες. Όσον αφορά σε προστατευόμενα ενδιαιτήματα (φανερόγαμο *Posidonia oceanica*, ασβεστολιθικά ροδοφύκη), στην ευρύτερη περιοχή του Κόλπου εντοπίζεται μόνο το *P. oceanica*. Το είδος αυτό σχηματίζει εκτεταμένα λιβάδια στην είσοδο του Κόλπου όπου οι συνθήκες ευνοούν την εξάπλωση του μέχρι τα 20m βάθος (Spinos et al. 2012) σε απόσταση μεγαλύτερη των 6km από την περιοχή ενδιαφέροντος. Αντίθετα, στο εσωτερικό τμήμα του Κόλπου και ιδιαίτερα στη ανατολική πλευρά (περιοχή ενδιαφέροντος της παρούσας μελέτης), η παρουσία του είδους είναι ιδιαίτερα περιορισμένη πιθανώς λόγω έντονης κλίσης του πυθμένα.

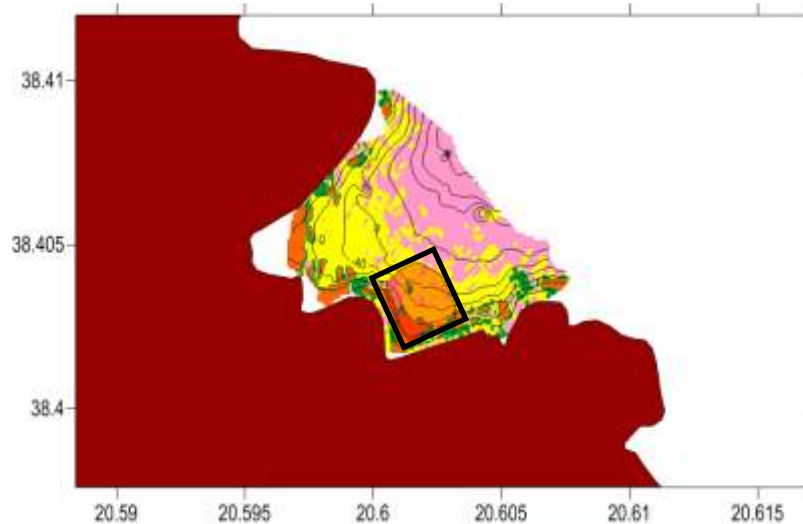
2.3.1.2 Όρμος Κακογκύλου-Χαρακτηριστικά και σύσταση του πυθμένα

Στην περιοχή μελέτης στην οποία βρίσκεται η μονάδα (τετράγωνο σχήματος 2.16). που μελετήθηκε, πραγματοποιήθηκε η βυθομετρία της και βρέθηκε ότι καλύπτεται κυρίως από μαλακό αμμώδες υπόστρωμα.



Σχήμα 2.16 Βυθομέτρηση της περιοχής μελέτης.

Από τη βυθομετρία (σχήμα 2.16) που έγινε φαίνεται ότι υπάρχει απότομη κλίση του πυθμένα από τις ακτές προς τα ανοιχτά του Όρμου και η μονάδα που μελετήθηκε βρίσκεται σε θέση όπου υπάρχει μεγάλη ανανέωση των υδάτων λόγω ρευμάτων. Εξηγούνται έτσι τα λίγα προβλήματα που έχει η μονάδα από ασθένειες (σύμφωνα με τον ιδιοκτήτη της μονάδας) από την στιγμή που τέθηκε σε λειτουργία μέχρι σήμερα.



- Συστάδες *Posidonia oceanica*
- Σχηματισμοί τραγάνας (ροδόλιθων)
- Αμμώδες υπόστρωμα
- Περιοχή μελετούμενης μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας
- Βραχώδες υπόστρωμα

Σχήμα 2.17 Αποτύπωση της σύστασης του πυθμένα της περιοχής μελέτης.

Η παρουσία συστάδων του είδους *P. oceanica* περιορίστηκε κυρίως στη ΝΔ και ΒΔ περιοχή και μικρότερες συστάδες στα ΝΑ. Από όλες τις δειγματοληψίες και τις οπτικές παρατηρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, ταυτοποιήθηκε μόνο το προαναφερόμενο είδος θαλάσσιου φανερόγαμου, σε μικρές συστάδες σε αραιή διάταξη, σχηματισμοί τραγάνας (ροδόλιθων), αμμώδες και βραχώδες υπόστρωμα (σχήμα 2.17). Στην περιοχή που μελετήθηκε δεν έχει ξαναγίνει χαρτογράφηση και αποτύπωση του πυθμένα.

2.3.2 Φυσικοχημικές παράμετροι του νερού του Κόλπου Αργοστολίου

Τα ευρήματα για τις φυσικοχημικές παραμέτρους του νερού της περιοχής μελέτης, τη ρευματογραφία, τη θερμοκρασία (T°C), την αλατότητα (ρsu, ‰), το διαλυμένο οξυγόνο (D.O. mg/l), την ενεργό οξύτητα (pH), τα θρεπτικά άλατα και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά καθώς και τη χλωροφύλλη-α (chl-a) του νερού, δίνονται παρακάτω.

2.3.2.1 Ρεύματα

Ο Κόλπος Αργοστολίου έχει ιδιαίτερα γεωγραφικά και βυθομετρικά χαρακτηριστικά που επιτρέπουν την καλή ανανέωση του νερού στο μεγαλύτερο μέρος του. Από δεδομένα θερμοκρασίας και αλατότητας που συλλέχθηκαν από τον Κόλπο Αργοστολίου, οργανώθηκε το διάγραμμα T-S-σθ με το οποίο μελετήθηκε η κίνηση του νερού μέσα στον Κόλπο Αργοστολίου με βάση την πυκνότητα του νερού σε επιμέρους σταθμούς (σχήμα 2.18)

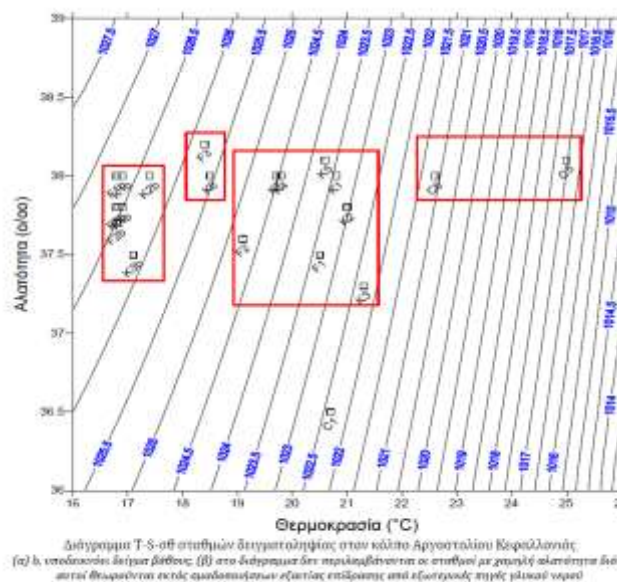
(Κονίδης κ.α., 2006).

Σύμφωνα με ωκεανογραφικά δεδομένα των Κονίδης κ.α (2006) και συγκεκριμένα μελέτη της ρευματογραφίας (σχήμα 2.19) του Κόλπου Αργοστολίου, αναφέρεται ότι το ρεύμα εισόδου κινείται ανατολικά περνώντας από το ακρωτήριο Αγίων Θεοδώρων Αργοστολίου και ακολουθεί την ανατολική ακτογραμμή περνάει δηλαδή κατά μήκος των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας. Φαίνεται έτσι ότι το ρεύμα εισόδου ακολουθεί τα βαθύτερα σημεία του Κόλπου, προφανώς επειδή στα σημεία αυτά βυθίζεται κάτω από το ζεστότερο επιφανειακό στρώμα. Αντίθετα στις ρηχές δυτικές περιοχές, ακολουθεί σχεδόν ευθύγραμμη κίνηση λόγω ανάμιξης των νερών από τον κυματισμό. Ο όγκος του νερού του Κόλπου είναι περίπου 550km³ και η μέση τιμή της ανανέωσης του νερού είναι 4,2km³/ημέρα, ποσότητα που φτάνει το 0,76% (Κονίδης κ.α. 2006).

Η ταχύτητα των θαλασσιών ρευμάτων μετρήθηκε στη θέση Κόκκινος Βράχος στο κέντρο της μονάδας στις 4/8/2009, 9/8/2009 και 14/8/2009 και η μέση ημερήσια ταχύτητα ρεύματος ήταν 5,97cm.s⁻¹, 4,36cm.s⁻¹ και 4,21cm.s⁻¹ αντίστοιχα.

Συνολικά η μέση τιμή της ταχύτητας του ρεύματος ήταν 4,85cm.s⁻¹. Η ταχύτητα των θαλασσιών ρευμάτων μετρήθηκε επίσης στη θέση Λιβάδι στο κέντρο της μονάδας στις 5/8/2009, 10/8/2009 και 15/8/2009 και η μέση ημερήσια ταχύτητα ρεύματος ήταν 4,74cm.s⁻¹, 3,38cm.s⁻¹ και 5,59cm.s⁻¹ αντίστοιχα. Συνολικά η μέση τιμή της ταχύτητας του ρεύματος ήταν 4,57cm.s⁻¹ (Αρχείο εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ).

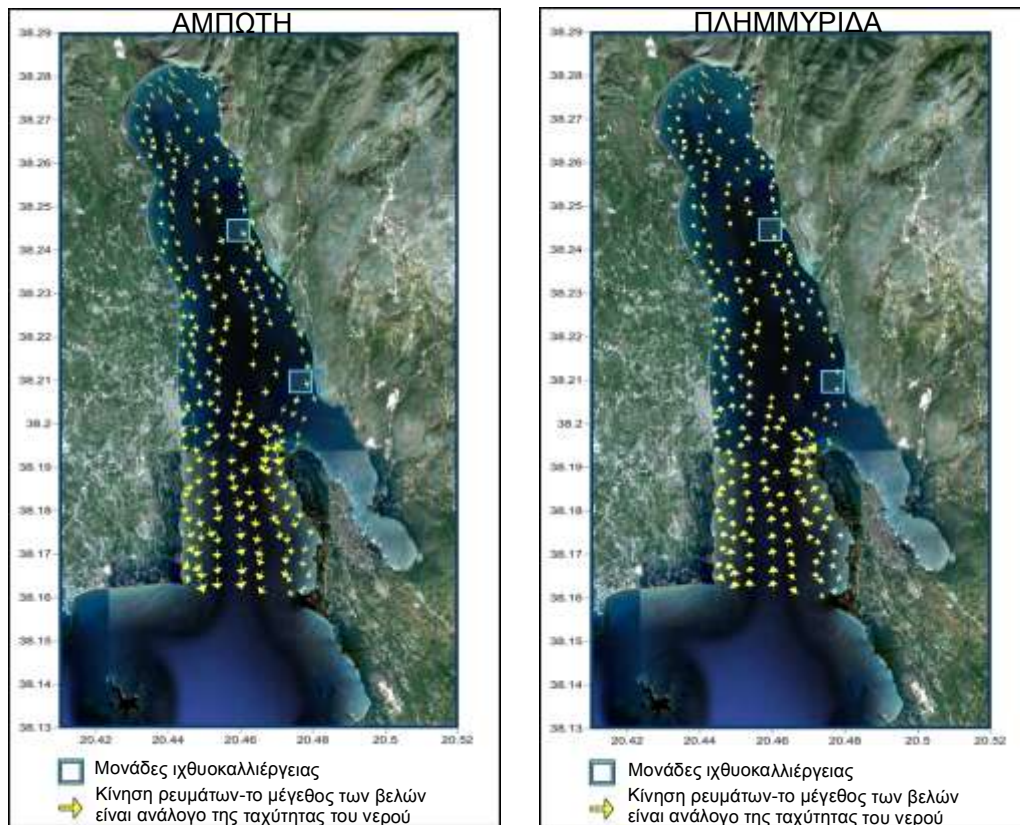
Σύμφωνα με το διάγραμμα (σχήμα 2.18), φαίνονται 4 κύριες ομάδες σταθμών. Στην πρώτη ομάδα εντάσσονται όλοι οι σταθμοί βάθους ανεξαιρέτως θέσης και αυτό αποδεικνύει ότι ανήκουν σε μια ενιαία και ομοειδή μάζα νερού. Αυτό αποδεικνύει ότι υφίσταται ένα πυκνό ρεύμα νερού υψηλής αλατότητας (38‰) και μέτριας θερμοκρασίας (16,5-17,5°C) το οποίο εισέρχεται στον Κόλπο σε αρκετό βάθος (>20m) και στη συνέχεια το ρεύμα αυτό θερμαίνεται και ανέρχεται στην επιφάνεια στη βορειότερη μονάδα της εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς Α.Ε. (θέση Λιβάδι). Από εκεί επιφανειακά και ανάλογα με την παλίρροια, κινείται βορειότερα όπου γίνεται σταδιακή ανάμιξη με γλυκά νερά και θερμαίνεται λόγω μικρών βαθών, καθώς και προς τα νότια μέχρι την έξοδο του Κόλπου. Η ύπαρξη αυτού του ρεύματος είναι ιδιαίτερα σημαντική γιατί η κίνησή του σε σχέση με τις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας είναι ευεργετική για την ανανέωση των στρωμάτων νερού κάτω από τις μονάδες με θετικά αποτελέσματα τόσο για το βενθικό περιβάλλον όσο και για την λειτουργία των μονάδων. Επιπρόσθετα, το θερμοκλινές δεν σχηματίζεται κανονικά στον Κόλπο Αργοστολίου και αυτό αποδεικνύει εμμέσως την ύπαρξη ενός τέτοιου ρεύματος. Το ρεύμα εισόδου ακολουθεί την ανατολική



Σχήμα 2.18 Διάγραμμα θερμοκρασίας και αλατότητας Κόλπου Αργοστολίου (στοιχεία από μελέτη Κονίδης κ.α., 2006).

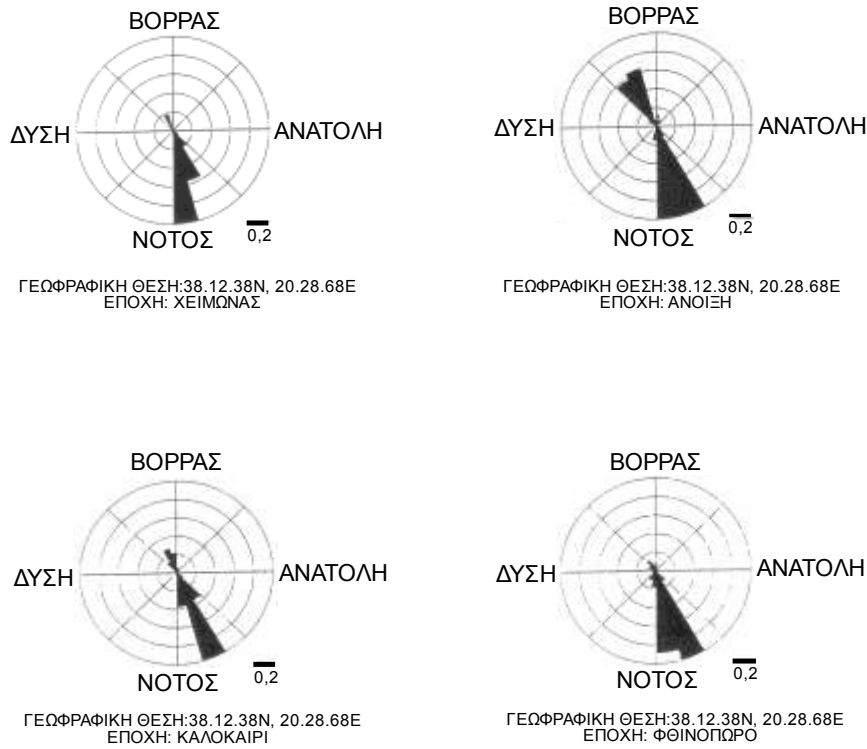
ακτογραμμή δηλαδή περνάει κατά μήκος των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας. Αυτό είναι ένα σημαντικό γεγονός διότι σημαίνει ότι το νερό στις περιοχές των ιχθυοκλωβών βρίσκεται κατά μήκος ρεύματος νερού και επομένως η ανανέωσή του είναι καλύτερη από άλλες περιοχές. Αντίθετα στις ρηχές δυτικές περιοχές, ακολουθεί σχεδόν ευθύγραμμη κίνηση λόγω ανάμιξης των νερών από τον κυματισμό (Karakasis & Hatzigianni 2000).

Παράλληλα, ο μόνος άνεμος που επηρεάζει ουσιαστικά την ανταλλαγή νερού της ανοικτής θάλασσας με τον Κόλπο Αργοστολίου είναι ο νοτιοδυτικός που «βλέπει» απευθείας την ανατολική ακτογραμμή της εισόδου και δημιουργεί ανοδικό ρεύμα παράλληλα με την ανατολική ακτή του Κόλπου.



Σχήμα 2.19 Ρευματογραφία του Κόλπου Αργοστολίου (στοιχεία από μελέτη Κονίδης κ.α., 2006).

Οι Καρακάσης κ.α. (1998), κατέγραψαν στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου τη μέση ετήσια ταχύτητα ρεύματος στα $2,4 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ με απόκλιση $2,4 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ενδεικτικό της μεταβλητότητας των ταχυτήτων και μέγιστη ετήσια ταχύτητα στα $17 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$. Στην περιοχή των κλωβών του Κόλπου Αργοστολίου τα ρεύματα έχουν διεύθυνση περίπου 160° (ΒΔ-ΝΑ). Με εξαίρεση την άνοιξη τα ρεύματα έχουν νοτιοανατολική κατεύθυνση. Την άνοιξη η πιθανότητα για βορειοδυτικά ρεύματα είναι αυξημένη. Η παραμένουσα κυκλοφορία είναι πιο ισχυρή τον χειμώνα, η δε διεύθυνσή της είναι νότια-νοτιοανατολική.

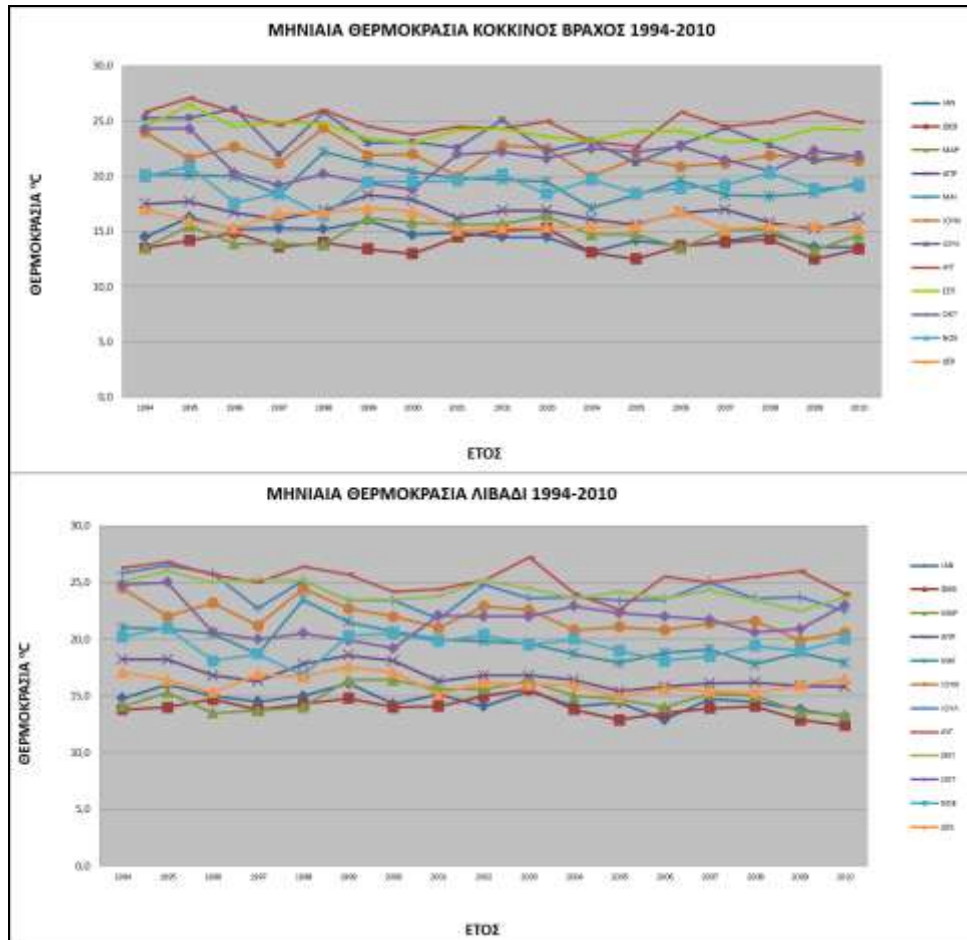


Σχήμα 2.20 Εποχικά ροδογράμματα ρευματομετρήσεων (διεύθυνση ρευμάτων) στην περιοχή του Κόλπου Αργοστολίου Κεφαλονιάς (στοιχεία από μελέτη Καρακάσης κ.α. 1998).

Παραπάνω στο σχήμα 2.20, αποτυπώνονται σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές (Καρακάσης κ.α. 1998) οι εποχικές ρευματομετρήσεις και η διεύθυνση των ρευμάτων στον Κόλπο Αργοστολίου.

2.3.2.2 Θερμοκρασία

Η μέση θερμοκρασία νερού στον Κόλπο Αργοστολίου εκτιμάται στους 19,4°C, η μέση ελάχιστη στους 11,9°C και η μέση μέγιστη στους 27,5°C και στις δύο θέσεις των μονάδων, στις οποίες γινόταν καταγραφή της θερμοκρασίας και δεν παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις. Στα γραφήματα του σχήματος 2.21, δίνονται οι χρονοσειρές της μηνιαίας θερμοκρασίας από το 1994-2010 και η μέση μηνιαία θερμοκρασία το χρονικό διάστημα 1994-2010 που καταγράφηκε στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου στις θέσεις Κόκκινος Βράχος και Λιβάδι. Από την καταγραφή της μέσης μηνιαίας θερμοκρασίας παρατηρείται η υψηλότερη τον Αύγουστο (25,0°C) και η χαμηλότερη τον Φεβρουάριο (13,7°C).

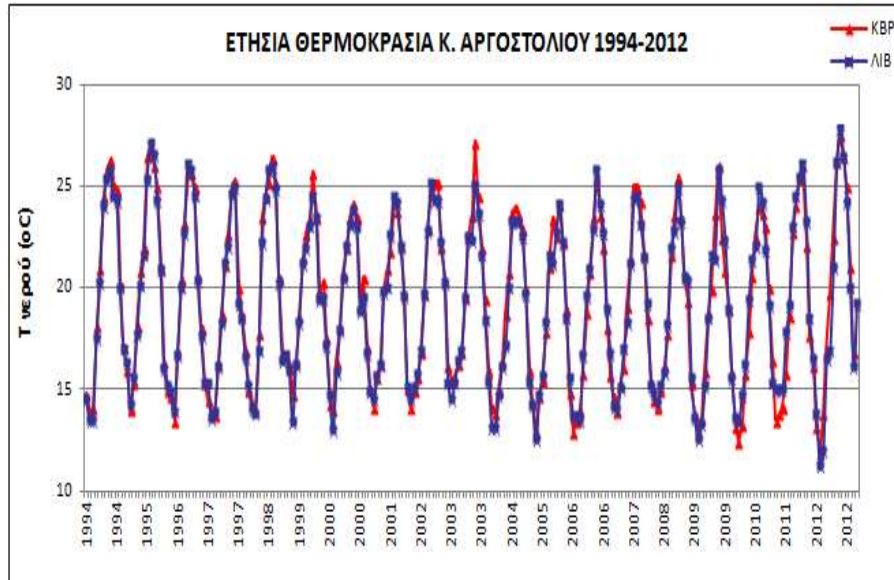


Σχήμα 2.21 Χρονοσειρά της μηνιαίας θερμοκρασίας από το 1994-2010 που καταγράφηκε στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου (Αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ, στοιχεία από παλαιότερη μελέτη).



Σχήμα 2.22 Μέση μηνιαία θερμοκρασία από το 1994-2010 που καταγράφηκε στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου (Αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ, στοιχεία από παλαιότερη μελέτη).

Στα σχήματα 2.22 και 2.23 δίνονται η χρονοσειρά μέσης μηνιαίας θερμοκρασίας του νερού, για το χρονικό διάστημα 1994-2012, καθώς και οι χρονοσειρές μέσης μηνιαίας θερμοκρασίας του θαλασσινού νερού στις θέσεις Κόκκινος Βράχος (ΚΒΡ) και Λιβάδι (ΛΙΒ) των μονάδων ιχθυοκαλλιεργειών του Κόλπου Αργοστολίου. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η θερμοκρασία του νερού παρουσιάζει την τυπική εποχιακή διακύμανση των εύκρατων θαλάσσιων περιοχών του βορείου ημισφαιρίου, με μέγιστο τον Ιούλιο-Αύγουστο και ελάχιστο τον Φεβρουάριο.



Σχήμα 2.23 Χρονοσειρές μέσης μηνιαίας θερμοκρασίας του θαλασσινού νερού στις θέσεις Κόκκινος Βράχος (ΚΒΡ) και Λιβάδι (ΛΙΒ) των μονάδων ιχθυοκαλλιεργειών του Κόλπου Αργοστολίου (Αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ, στοιχεία από παλαιότερη μελέτη).

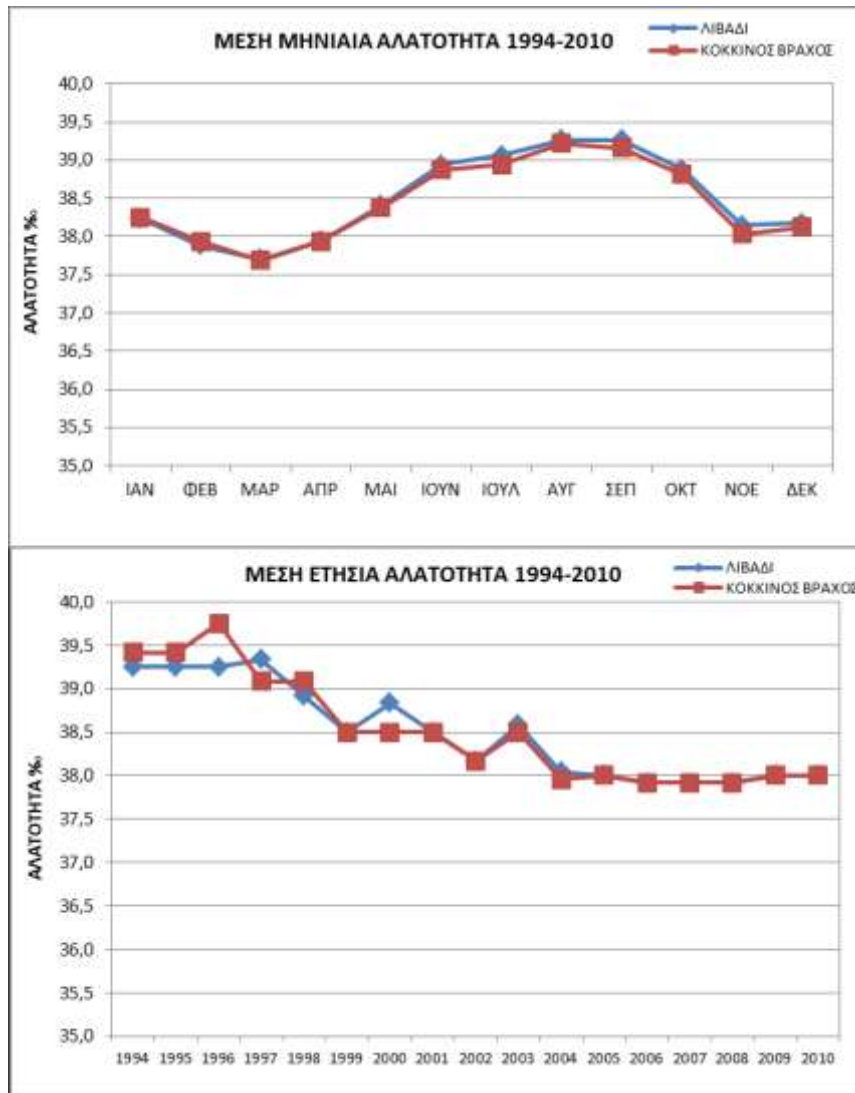
Στο σχήμα 2.24 δίνεται η μέση ημερήσια τιμή της θερμοκρασίας στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου που μελετήθηκαν, το χρονικό διάστημα 2011-2015.



Σχήμα 2.24 Μέση ημερήσια θερμοκρασία που καταγράφηκε στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου που μελετήθηκαν.

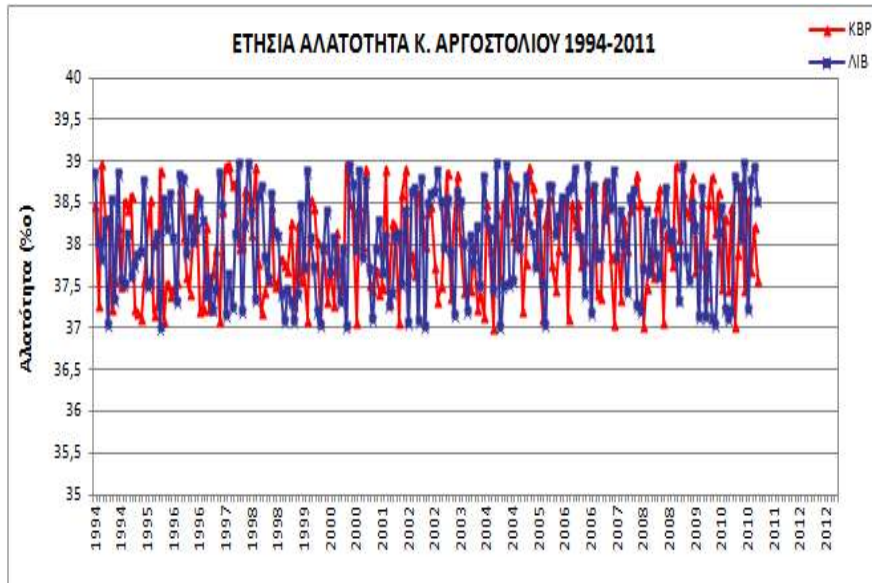
2.3.2.3 Αλατότητα

Στα γραφήματα του σχήματος 2.25, δίνονται οι χρονοσειρές της μέσης μηνιαίας αλατότητας και η μέση ετήσια αλατότητα το χρονικό διάστημα 1994-2010 που καταγράφηκε στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου.



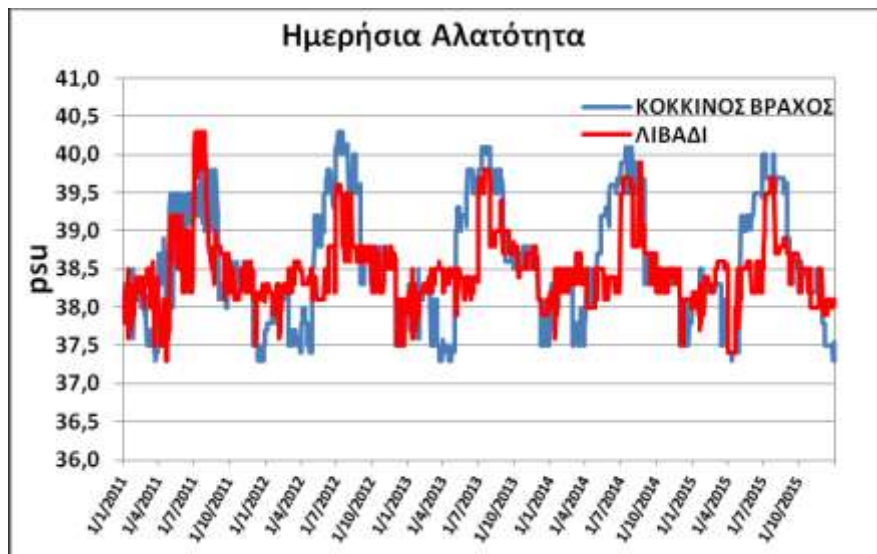
Σχήμα 2.25 Χρονοσειρά της μέσης μηνιαίας αλατότητας και της μέσης μηνιαίας θερμοκρασίας από το 1994-2010 που καταγράφηκε στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου (Αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ, στοιχεία από παλαιότερη μελέτη).

Η αλατότητα στο γράφημα του σχήματος 2.26 στις δυο θέσεις των μονάδων παρουσιάζει μέση τιμή 38,01‰ χωρίς ιδιαίτερες μεταβολές. Αυτή η μέση τιμή της αλατότητας αντιστοιχεί σε βέλτιστες τιμές για την εκτροφή των τυπικών ευρύαλων ειδών ψαριών της μεσογειακής καλλιέργειας όπως είναι το λαβράκι και η τσιπούρα.



Σχήμα 2.26 Χρονοσειρές μέσης μηνιαίας αλατότητας του θαλασσινού νερού στις θέσεις Κόκκινος Βράχος (ΚΒΡ) και Λιβάδι (ΛΙΒ) των μονάδων ιχθυοκαλλιεργειών του Κόλπου Αργοστολίου (Αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ, στοιχεία από παλαιότερη μελέτη).

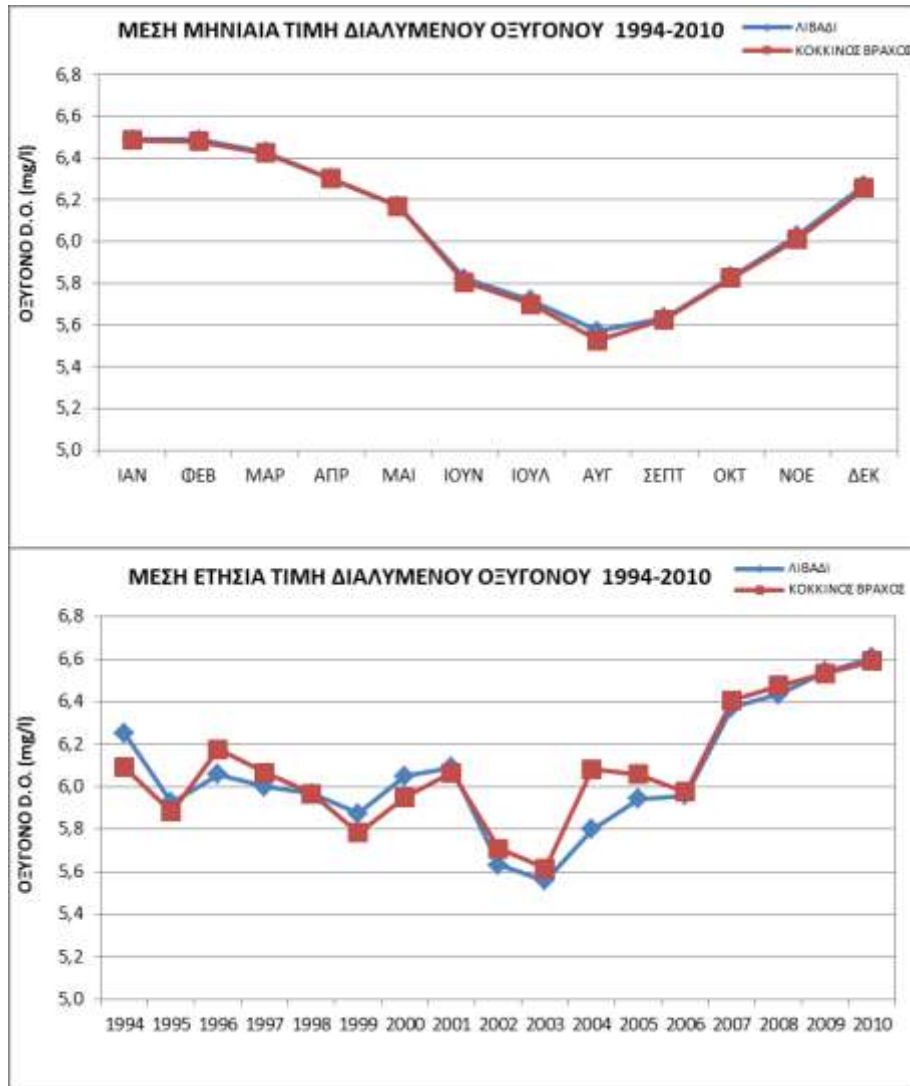
Στο σχήμα 2.27 δίνεται η ημερήσια τιμή της αλατότητας στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου που μελετήθηκαν, το χρονικό διάστημα 2011-2015.



Σχήμα 2.27 Ημερήσια αλατότητα που καταγράφηκε στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου που μελετήθηκαν.

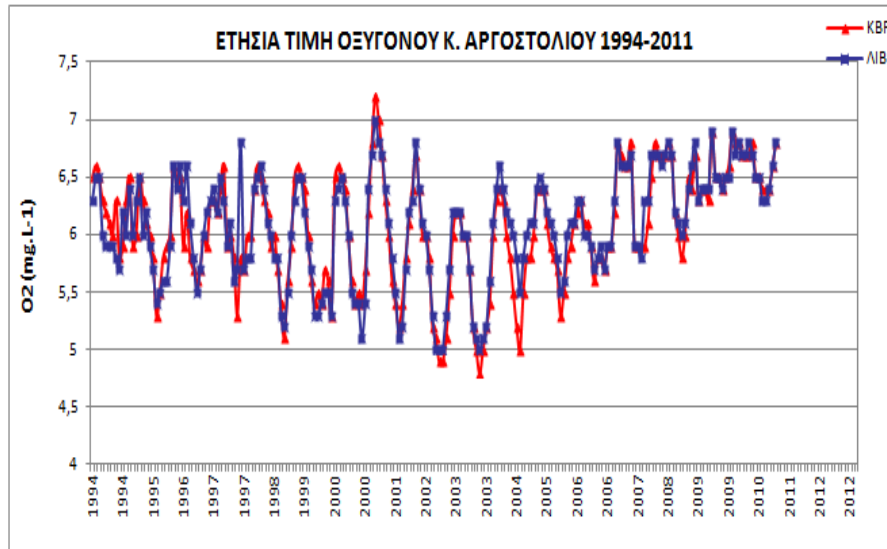
2.3.2.4 Διαλυμένο οξυγόνο (D.O.)

Στα γραφήματα του σχήματος 2.28, δίνονται οι χρονοσειρές της μέσης μηνιαίας και της μέσης ετήσιας τιμής του διαλυμένου οξυγόνου το χρονικό διάστημα 1994-2010 που καταγράφηκε στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου.



Σχήμα 2.28 Χρονοσειρά της μέσης μηνιαίας τιμής διαλυμένου οξυγόνου και της μέσης ετήσιας τιμής διαλυμένου οξυγόνου από το 1994-2010 που καταγράφηκε στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου (αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ, στοιχεία από παλαιότερη μελέτη).

Οι χρονοσειρές (1994-2011) του διαλυμένου οξυγόνου (D.O.) (γράφημα σχήματος 2.29), που καταγράφηκε στις 2 θέσεις των μονάδων του Κόλπου Αργοστολίου (Κόκκινος Βράχος & Λιβάδι), παρουσιάζει εποχική διακύμανση με μέγιστο τον Μάρτιο-Απρίλιο και ελάχιστο τους μήνες Αύγουστο-Σεπτέμβριο. Η μέση τιμή του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό στην περιοχή είναι ίση με 6,06mg/l, και κυμαίνεται εποχιακά από 4,8-7,2mg/l.



Σχήμα 2.29 Χρονοσειρές μέσης μηνιαίας τιμής του οξυγόνου του θαλασσινού νερού στις θέσεις Κόκκινος Βράχος (ΚΒΡ) και Λιβάδι (ΛΙΒ) των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειών του Κόλπου Αργοστολίου (αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ, στοιχεία από παλαιότερη μελέτη).

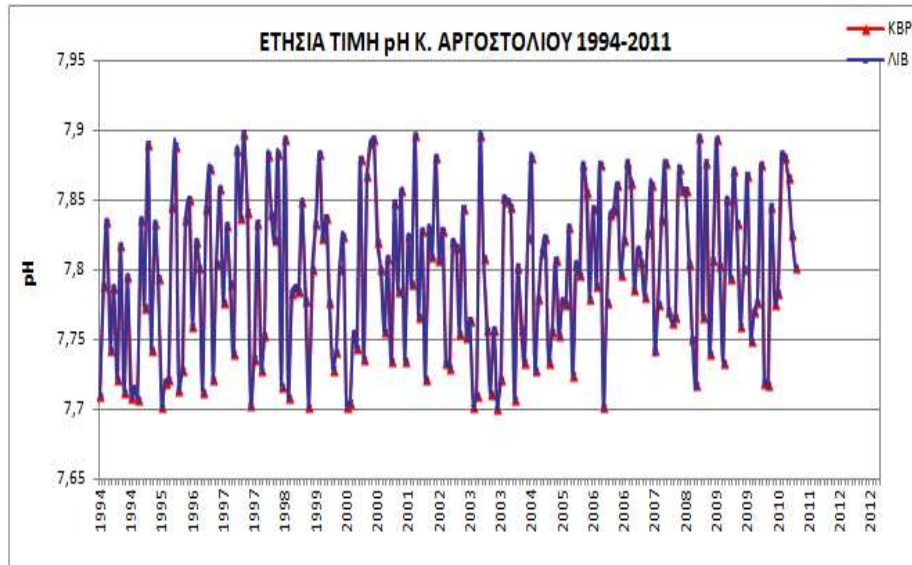
Στο σχήμα 2.30 δίνεται η ημερήσια τιμή του διαλυμένου οξυγόνου στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου που μελετήθηκαν το χρονικό διάστημα 2011-2015.



Σχήμα 2.30 Ημερήσια τιμή διαλυμένου οξυγόνου που καταγράφηκε στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου που μελετήθηκαν.

2.3.2.5 Ενεργός οξύτητα του νερού (pH)

Στο γράφημα του σχήματος 2.31, δίνονται οι χρονοσειρές της μέσης τιμής του pH 7,7-7,89 στις δύο θέσεις των μονάδων χωρίς ιδιαίτερες μεταβολές.



Σχήμα 2.31 Χρονοσειρές μέσης μηνιαίας τιμής του pH του θαλασσινού νερού στις θέσεις Κόκκινος Βράχος (KBP) και Λιβάδι (LIB) των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειών του Κόλπου Αργοστολίου (αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ, στοιχεία από παλαιότερη μελέτη).

Οι παραπάνω τιμές αντιστοιχούν στις βέλτιστες τιμές για την εκτροφή των τυπικών ευρύαλων ειδών ψαριών της μεσογειακής καλλιέργειας (Αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ).

Στο σχήμα 2.32 δίνεται η ημερήσια τιμή της ενεργού οξύτητας (pH) στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου που μελετήθηκαν το χρονικό διάστημα 2011-2015. Παρατηρείται μία μικρή πτώση και των ανώτερων και των κατώτερων τιμών σε σχέση με τα δεδομένα της περιόδου 1991-2010.



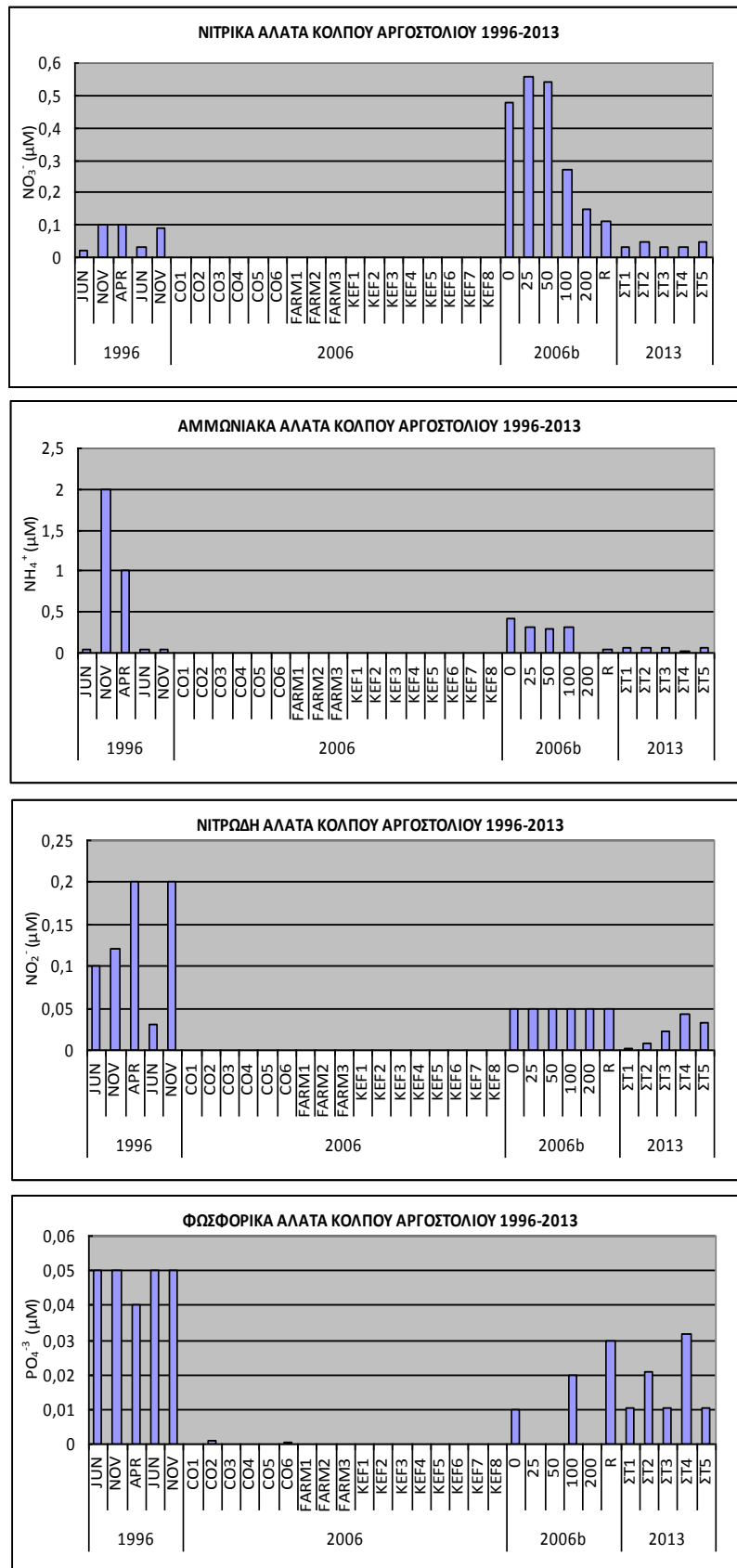
Σχήμα 2.32 Ημερήσια τιμή ενεργού οξύτητας (pH) που καταγράφηκε στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου που μελετήθηκαν.

2.3.2.6 Θρεπτικά άλατα

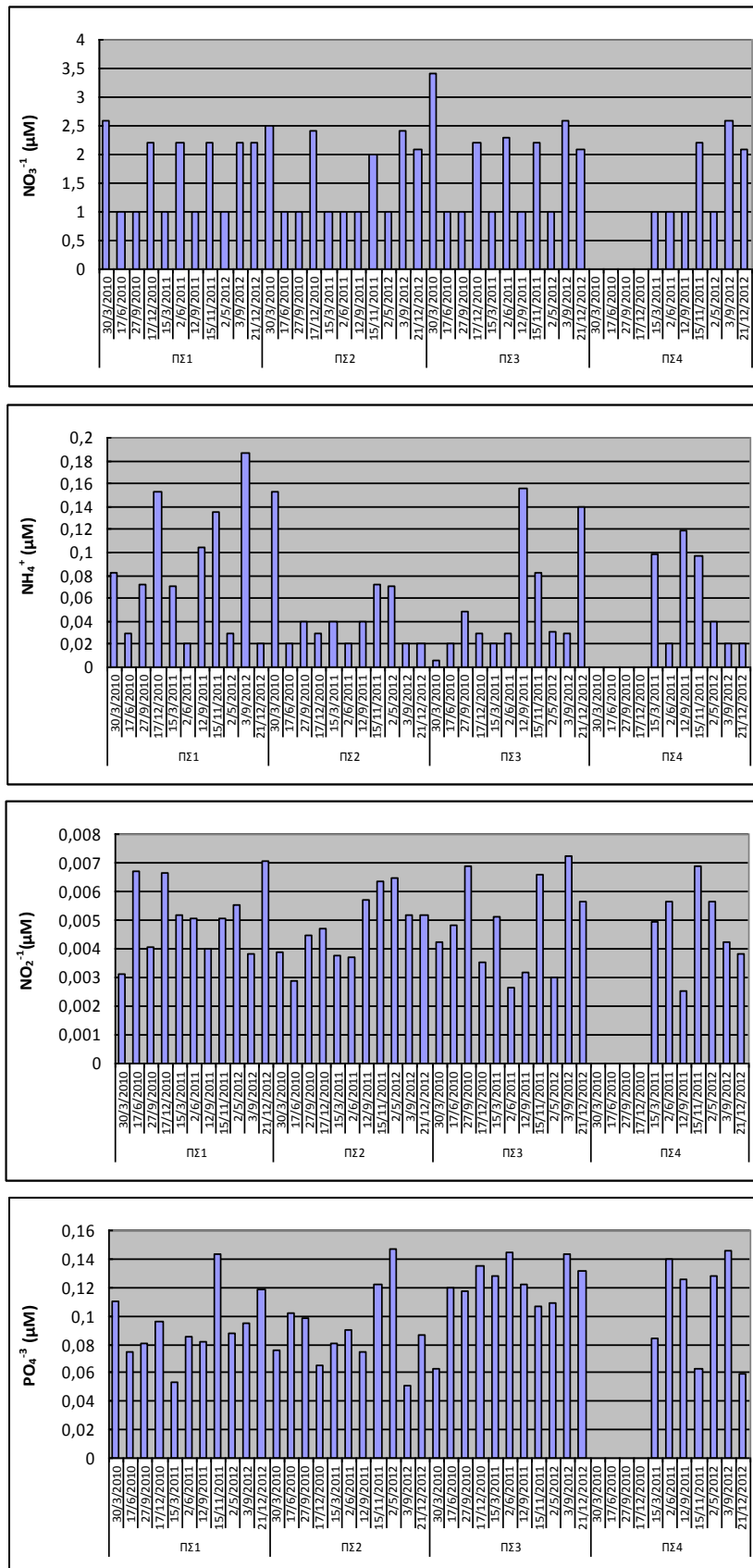
Στο σχήμα 2.33 φαίνεται η χρονολογική αποτύπωση των συγκεντρώσεων των θρεπτικών αλάτων. Οι συγκεντρώσεις των νιτρικών (NO_3^-) στις 2 θέσεις κυμαίνονται από 0,0019-0,56 μM (μέση τιμή 0,080 μM) με τις μεγαλύτερες τιμές να καταγράφονται σε απόσταση από 0-50m από τη μονάδα εκτροφής (δειγματοληψία Ιουλίου 2006). Οι συγκεντρώσεις των νιτρωδών (NO_2^-) κυμαίνονται από 0,00013-0,2 μM με τις μεγαλύτερες τιμές να καταγράφονται εντός της μονάδας εκτροφής αλλά και στον σταθμό μάρτυρα (δειγματοληψίες Απριλίου και Νοεμβρίου 1996 αντίστοιχα). Οι συγκεντρώσεις των αμμωνιακών (NH_4^+) κυμαίνονται από 0,0006-2 μM (μέση τιμή 0,146 μM) με τις μεγαλύτερες τιμές να καταγράφονται εντός της μονάδας εκτροφής (δειγματοληψία Νοεμβρίου 1996). Οι συγκεντρώσεις φωσφορικών (PO_4^{3-}) κυμαίνονται από 0,0006-0,05 μM (μέση τιμή 0,011 μM) με τις μεγαλύτερες τιμές να καταγράφονται σε σταθμούς εντός και εκτός μονάδας εκτροφής του 1996.

Στο σχήμα 2.34 δίνονται οι συγκεντρώσεις θρεπτικών αλάτων που αφορούν σε τριμηνιαίες δειγματοληψίες σε 4 σταθμούς εντός των θέσεων εγκατάστασης των υφιστάμενων μονάδων εκτροφής. Οι συγκεντρώσεις των νιτρικών (NO_3^-) κυμαίνονται από 1-3,4 μM (μέση τιμή 1,66 μM), οι συγκεντρώσεις των νιτρωδών (NO_2^-) κυμαίνονται από 0,0029-0,074 μM (μέση τιμή 0,05 μM), οι συγκεντρώσεις των αμμωνιακών (NH_4^+) κυμαίνονται από 0,0055-0,18 μM (μέση τιμή 0,60 μM) και οι συγκεντρώσεις των φωσφορικών (PO_4^{3-}) κυμαίνονται από 0,054-0,148 μM (μέση τιμή 0,099 μM). Οι διακυμάνσεις είναι σχετικά μικρές χωρίς να είναι ξεκάθαρο το εποχικό πρότυπο.

Το τροφικό καθεστώς του Κόλπου είναι σταθερό και τον κατατάσσει σε μεσοτροφικό σύστημα (Κατσέλης κ.α. 2013, αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ).



Σχήμα 2.33 Συγκεντρώσεις θρεπτικών από βιβλιογραφικές πηγές (Κατσέλης κ.α. 2013). (CO1-CO6: παράκτιοι σταθμοί, FARM1-FARM3: σταθμοί στις περιοχές εγκατάστασης μονάδων υδατοκαλλιέργειας, KEF1-KEF8: σταθμοί στον ευρύτερο κόλπο μέχρι και την είσοδό του, ΣΤ1-ΣΤ5:σταθμοί της μελέτης ΠΟΑΥ, R: σταθμός μάρτυρας) (Αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ, στοιχεία από παλαιότερη μελέτη).

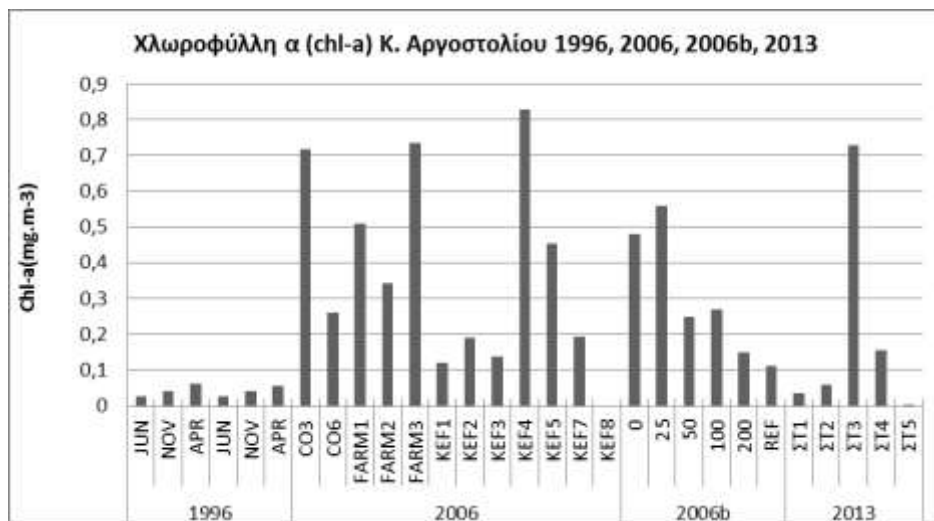


Σχήμα 2.34 Εποχικές συγκεντρώσεις θρεπτικών για τα έτη 2010-2012 σε 4 σταθμούς εντός της περιοχής μελέτης (αρχείο εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ) (ΠΣ1-ΠΣ4 σταθμοί στις περιοχές εγκατάστασης μονάδων υδατοκαλλιέργειας) (Αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ, στοιχεία από παλαιότερη μελέτη).

2.3.2.7 Χλωροφύλλη (chl-a)

Οι συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης α (chl-a) κυμαίνονται από 0,0021-0,82μg.m⁻³ (μέση ημερήσια τιμή 0,26 μg.m⁻³) με τις μεγαλύτερες τιμές να καταγράφονται τόσο κοντά όσο και εντός των μονάδων εκτροφής, ή και σε διάφορες θέσεις του Κόλπου Αργοστολίου (σχήμα 2.35).

Βάση της κλίμακας του πίνακα 2.4 οι παραπάνω τιμές αντιστοιχούν το 32% σε ολιγοτροφικό σύστημα, το 39% σε κάτω μεσοτροφικό σύστημα, το 14% σε άνω μεσοτροφικό και το υπόλοιπο 14% σε ευτροφικό σύστημα. Το 71% των δειγμάτων αφορούν μέχρι σε κάτω μεσοτροφικά (οικολογική ποιότητα υδάτων υψηλή έως καλή). Αξίζει να σημειωθεί ότι στους 4 από τους 5 σταθμούς στις δειγματοληψίες του Ιουλίου 2013 οι οποίες αφορούσαν την περιοχή όπου ασκείται ιχθυοκαλλιεργητική δραστηριότητα, κατατάσσονται σε ολιγοτροφικά (οικολογική ποιότητα υδάτων υψηλή) (σχήμα 2.36) (Κατσέλης κ.α. 2013).



Σχήμα 2.35 Συγκεντρώσεις χλωροφύλλης α (chl-a) (CO1-CO6: παράκτιοι σταθμοί, FARM1-FARM3: σταθμοί στις περιοχές εγκατάστασης μονάδων υδατοκαλλιέργειας, KEF1-KEF8:σταθμοί στον ευρύτερο κόλπο μέχρι και την είσοδό του, ΣΤ1-ΣΤ5: σταθμοί της μελέτης ΠΟΑΥ, REF: σταθμός μάρτυρας) (στοιχεία από αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ και μελέτη Κατσέλης κ.α. 2013).

2.3.2.8 Ποιότητα υδάτων Κόλπου Αργοστολίου

Για την εκτίμηση του επιπέδου ευτροφισμού και της οικολογικής ποιότητας των υδάτων βάση της συγκέντρωσης χλωροφύλλης α, χρησιμοποιήθηκαν οι κλίμακες ευτροφισμού και οικολογικής ποιότητας υδάτων που σχετίζονται με τα επίπεδα συγκέντρωσης χλωροφύλλης α και προτείνεται για τις Μεσογειακές περιοχές (πίνακας 2.4) (Κατσέλης κ.α. 2013).

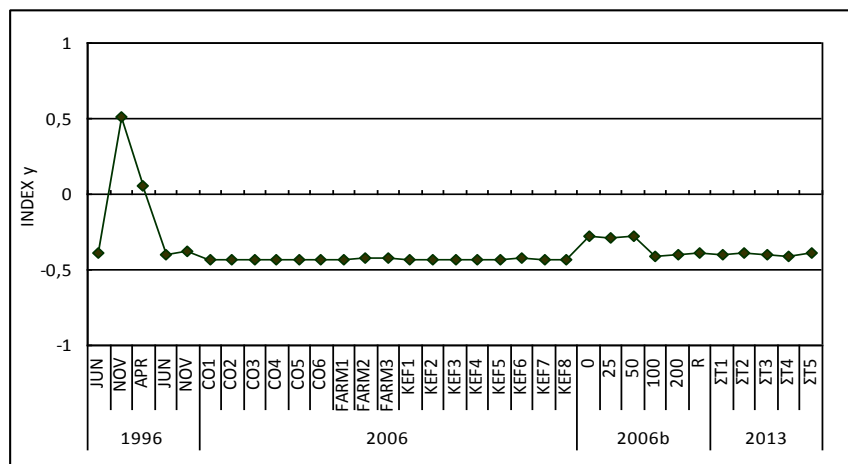
Πίνακας 2.4 Διαβάθμιση ευτροφισμού και οικολογικής ποιότητας υδάτων σε σχέση με τα επίπεδα συγκέντρωσης της χλωροφύλλης α στον Κόλπο Αργοστολίου.

Συγκέντρωση Chl-a (mg.m-3)	Κλίμακα Ευτροφισμού υδάτων	Κλίμακα οικολογικής ποιότητας υδάτων
<0,1	Ολιγοτροφικά	Υψηλή

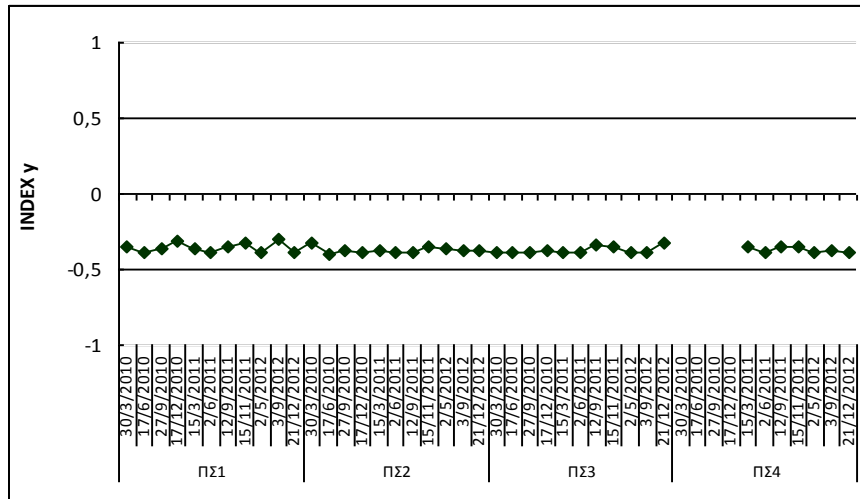
0,1-0,4	Κάτω μεσοτροφικά	Καλή
0,4-0,6	Κάτω μεσοτροφικά	Μεσαία
0,6-2,21	Πάνω μεσοτροφικά	Κακή
>2,21	Ευτροφικά	Πολύ κακή

Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν τοποθετήθηκαν στη συνέχεια σε πίνακες, χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο λογισμικό πρόγραμμα και ακολούθησε η δημιουργία γραφημάτων από τα οποία εξήχθησαν τα αποτελέσματα, η συζήτηση και τα συμπεράσματα.

Ο δείκτης y ποιότητας παράκτιων υδάτων της περιοχής μελέτης για τις συγκεντρώσεις θρεπτικών στοιχείων που αφορούν στις χρονοσειρές (σχήμα 2.36), κυμαίνεται από $-0,42 < y < 0,51$. Από τις 33 διαθέσιμες καταγραφές στις 31 η τιμή του y είναι $-0,5 < y < 0$ και 2 τιμές του y είναι μεγαλύτερες του 0 (σχήμα 2.36). Ο υπολογισμός του δείκτη y για τις εποχικές συγκεντρώσεις θρεπτικών δείχνει ότι το y κυμαίνεται μεταξύ του $-0,39$ και $-0,30$ (σχήμα 2.37).



Σχήμα 2.36 Δείκτης ποιότητας υδάτων y για τα διαθέσιμα δεδομένα θρεπτικών αλάτων για το χρονικό διάστημα 1996-2013 (CO1-CO6: παράκτιοι σταθμοί, FARM1-FARM3: σταθμοί στις περιοχές εγκατάστασης μονάδων υδατοκαλλιέργειας, KEF1-KEF8: σταθμοί στον ευρύτερο Κόλπο μέχρι και την είσοδό του, ΣΤ1-ΣΤ5: σταθμοί της μελέτης ΠΟΑΥ, R: σταθμός μάρτυρας) (στοιχεία από αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ και μελέτη Κατσέλης κ.α. 2013).

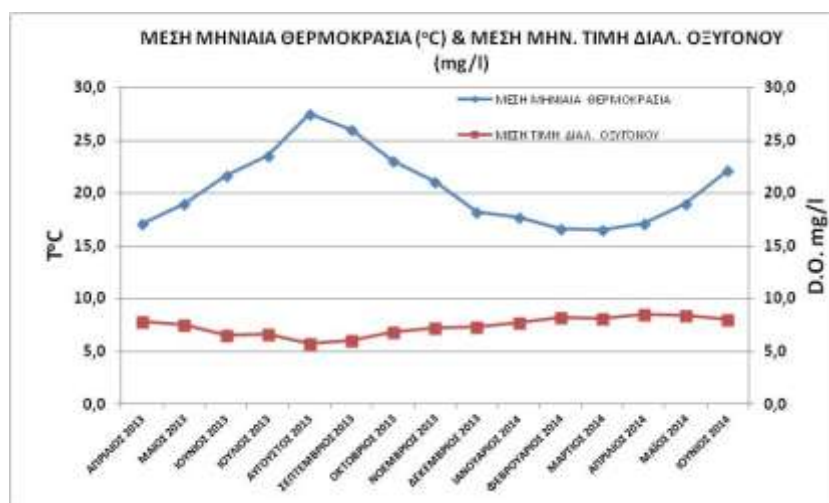


Σχήμα 2.37 Δείκτης ποιότητας υδάτων γ για τα διαθέσιμα δεδομένα θρεπτικών αλάτων για το χρονικό διάστημα 2010-2012 (σταθμοί: ΠΣ1-μονάδα Κόκκινος Βράχος, ΠΣ2-μονάδα Λιβάδι, ΠΣ3-μάρτυρας και ΠΣ4-αγωγός Ιχθυογεννητικού Σταθμού) (στοιχεία από αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ και μελέτη Κατσέλης κ.α. 2013).

Οι τιμές αυτές του δείκτη γ αντιστοιχούν στη κατηγορία «κατώτερο μεσοτροφικό». Η παραπάνω κατάταξη είναι σε συμφωνία με αυτήν που αναφέρεται σε άλλες πηγές και όπου η οικολογική κατάσταση εκτιμήθηκε με άλλους δείκτες (Κατσέλης κ.α. 2013).

2.3.3 Φυσικοχημικές παράμετροι του θαλασσινού νερού στον Όρμο Κακογκύλου

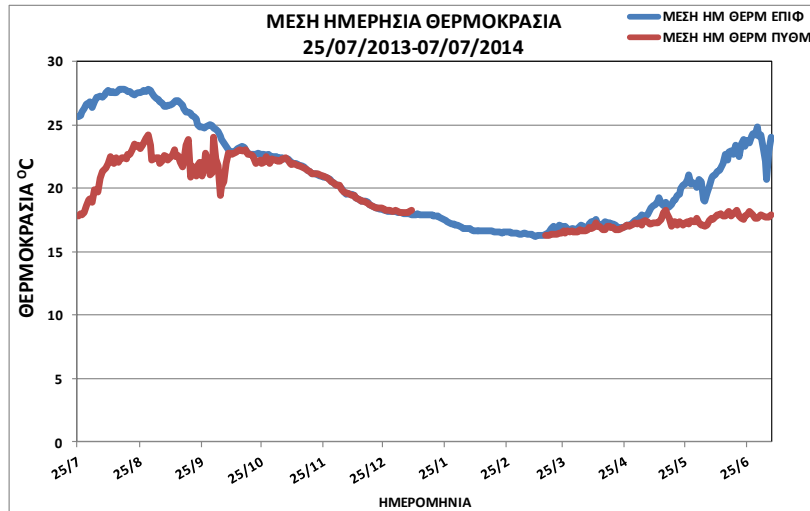
Τα δεδομένα της καταγραφής φυσικοχημικών παραμέτρων του θαλασσινού νερού στην περιοχή μελέτης (Όρμος Κακογκύλου) δίνονται στα ακόλουθα σχήματα 2.38 και 2.39. Στο σχήμα 2.38 δίνεται η μέση μηνιαία θερμοκρασία ($^{\circ}\text{C}$) επιφανειακού θαλασσινού νερού και το διαλυμένο οξυγόνο (D.O.) από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο του επόμενου έτους στη μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας που μελετήθηκε.



Σχήμα 2.38 Μέση μηνιαία θερμοκρασία ($^{\circ}\text{C}$) και διαλυμένου οξυγόνου (D.O.) επιφανειακού

θαλασσινού νερού της περιοχής μελέτης.

Στο σχήμα 2.39, δίνεται η μέση ημερήσια θερμοκρασία (T°C) επιφανειακού θαλασσινού νερού η οποία κυμαίνεται από 16,2-27,8°C και η μέση ημερήσια θερμοκρασία (T°C) νερού κοντά στον πυθμένα η οποία κυμαίνεται από 16,3-24,1°C την χρονική περίοδο από 25/7/2013-07/07/2014. Δίνονται επίσης η μέση μηνιαία τιμή της θερμοκρασίας που κυμαίνεται από 16,2-27,1°C και του διαλυμένου οξυγόνου που κυμαίνεται από 5,2-8,2 mg/l για το ίδιο χρονικό διάστημα.



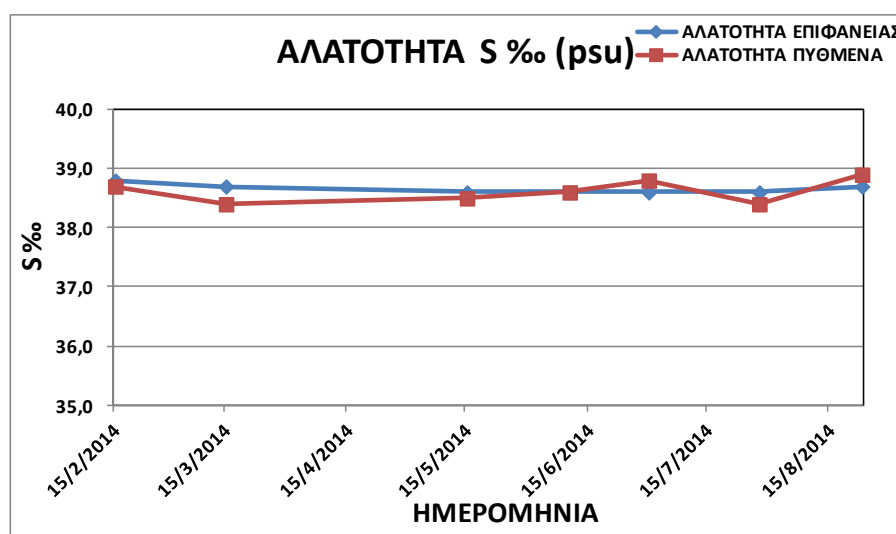
Σχήμα 2.39 Γράφημα της μέσης ημερήσιας θερμοκρασίας (T°C) επιφανειακού θαλασσινού νερού και της μέσης ημερήσιας θερμοκρασίας (T°C) νερού κοντά στον πυθμένα την χρονική περίοδο από 25/07/2013-07/07/2014 στην περιοχή μελέτης.

Σύμφωνα με τους Castro & Huber (1999), όσο μειώνεται η θερμοκρασία του θαλασσινού νερού αυξάνεται η πυκνότητά του. Η πυκνότητα του θαλασσινού νερού ελέγχεται περισσότερο από την θερμοκρασία και λιγότερο από την αλατότητα. Παρατηρείται ότι τους θερμούς μήνες του έτους που η θερμοκρασία της ατμόσφαιρας αυξάνεται, υπάρχει διαφοροποίηση της θερμοκρασίας του επιφανειακού νερού σε σχέση με του πυθμένα και δημιουργείται θερμοκλινές. Στην περίπτωση αυτή το βαρύτερο νερό (μεγαλύτερης πυκνότητας) εγκλωβίζεται κοντά στον πυθμένα, ενώ το πιο ελαφρύ στην επιφάνεια. Στη συνέχεια όταν η θερμοκρασία μειώνεται τους ψυχρούς μήνες του έτους, παρατηρείται ανάμιξη του νερού και έτσι οι τιμές της καμπύλης του επιφανειακού νερού ακολουθούν τις τιμές του νερού του πυθμένα. Τον Ιανουάριο και τον Φεβρουάριο του 2014 οι τιμές της μέσης ημερήσιας θερμοκρασίας του νερού του πυθμένα δεν καταγράφηκαν εξαιτίας βλάβης του καταγραφικού οργάνου.

Στον πίνακα 2.5 και στο γράφημα του σχήματος 2.40 δίνονται στοιχεία για την αλατότητα του επιφανειακού θαλασσινού νερού και νερού κοντά στον πυθμένα, που καταγράφηκαν στη μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας που πραγματοποιήθηκε η μελέτη από τον Φεβρουάριο έως τον Σεπτέμβριο.

Πίνακας 2.5 Δεδομένα αλατότητας επιφανειακού θαλασσινού νερού και νερού κοντά στον πυθμένα της περιοχής μελέτης, τη χρονική περίοδο από 15/02/2014-23/08/2014.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ	ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ ΠΥΘΜΕΝΑ
15/2	38,8	38,7
15/3	38,7	38,4
15/5	38,6	38,5
10/6	38,6	38,6
30/6	38,6	38,8
28/7	38,6	38,4
23/8	38,7	38,9



Σχήμα 2.40 Γραφική παράσταση αλατότητας επιφανειακού θαλασσινού νερού και νερού κοντά στον πυθμένα της περιοχής μελέτης, τη χρονική περίοδο από 15/02/2014-23/08/2014.

Η αλατότητα στην επιφάνεια του νερού κυμαίνεται από 38,6-38,8 και κοντά στον πυθμένα από 38,4-38,9. Οι διακυμάνσεις της αλατότητας του θαλασσινού ήταν πολύ μικρές κάτι το οποίο πιθανώς οφείλεται στα ρεύματα της περιοχής που μελετήθηκε.

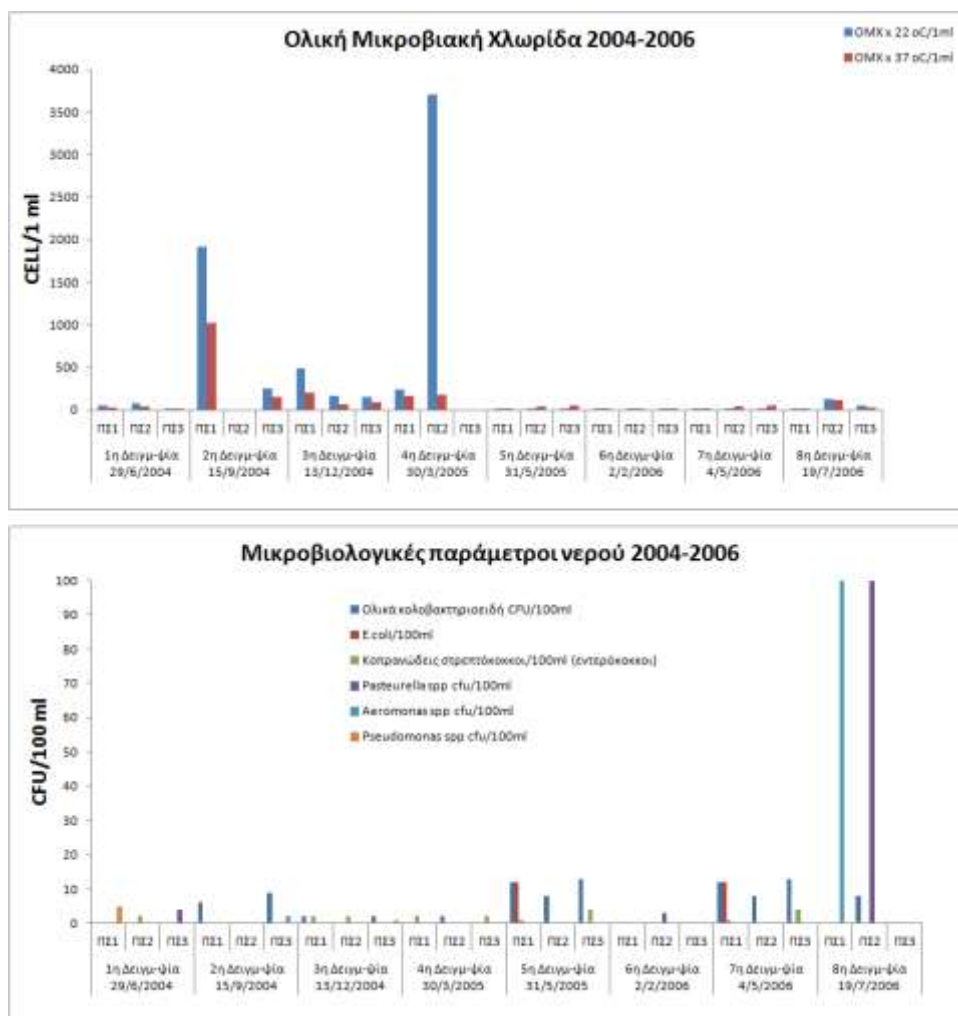
2.3.4 Μικροβιολογικές παράμετροι του νερού Κόλπου Αργοστολίου

Από τις δειγματοληψίες που έγιναν το 2004-2006 για την μελέτη των μικροβιολογικών παραμέτρων στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου και τις αναλύσεις που ακολούθησαν, προέκυψαν τα αποτελέσματα που δίνονται στον πίνακα 2.6 και στα γραφήματα του σχήματος 2.41 (Αρχείο εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ).

Πίνακας 2.6 Μικροβιολογικές παράμετροι του νερού μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας της περιοχής μελέτης (στοιχεία από αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ και μελέτη Κατσέλης κ.α. 2013)).

Σταθμός	1 ^η Δειγματοληψία 29/6/2004			5 ^η Δειγματοληψία 31/5/2005		
	ΠΣ1	ΠΣ2	ΠΣ3	ΠΣ1	ΠΣ2	ΠΣ3
Ολικά κολοβακτηριοειδή CFU/100ml	0	0	0	12	8	13
<i>E.coli</i> /100ml	0	0	0	12	0	0
Κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι/100ml	0	2	0	1	0	4
<i>Pasteurella spp</i> cfu/100ml	0	0	4	0	0	0
<i>Aeromonas spp</i> cfu/100ml	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas spp</i> cfu/100ml	5	0	0	0	0	0
OMX x 22 °C/1ml	50	70	10	8	7	19
OMX x 37 °C/1ml	20	40	10	5	43	48
Σταθμός	2 ^η Δειγματοληψία 15/9/2004			6 ^η Δειγματοληψία 2/2/2006		
	ΠΣ1	ΠΣ2	ΠΣ3	ΠΣ1	ΠΣ2	ΠΣ3
Ολικά κολοβακτηριοειδή CFU/100ml	6	0	9	0	0	0
<i>E.coli</i> /100ml	0	0	0	0	0	0
Κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι/100ml	0	0	0	0	0	0
<i>Pasteurella spp</i> cfu/100ml	0	0	0	0	3	0
<i>Aeromonas spp</i> cfu/100ml	0	0	2	0	0	0
<i>Pseudomonas spp</i> cfu/100ml	0	0	0	0	0	0
OMX x 22 °C/1ml	1920	0	250	4	4	1
OMX x 37 °C/1ml	1025	0	150	13	1	1
Σταθμός	3 ^η Δειγματοληψία 13/12/2004			7 ^η Δειγματοληψία 4/5/2006		
	ΠΣ1	ΠΣ2	ΠΣ3	ΠΣ1	ΠΣ2	ΠΣ3
Ολικά κολοβακτηριοειδή CFU/100ml	2	0	2	12	8	13
<i>E.coli</i> /100ml	0	0	0	12	0	0
Κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι/100ml	2	2	0	1	0	4
<i>Pasteurella spp</i> cfu/100ml	0	0	0	0	0	0
<i>Aeromonas spp</i> cfu/100ml	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas spp</i> cfu/100ml	0	0	1	0	0	0
OMX x 22 °C/1ml	480	160	150	8	7	19
OMX x 37 °C/1ml	200	67	84	5	43	48
Σταθμός	4 ^η Δειγματοληψία 30/3/2005			8 ^η Δειγματοληψία 19/7/2006		
	ΠΣ1	ΠΣ2	ΠΣ3	ΠΣ1	ΠΣ2	ΠΣ3
Ολικά κολοβακτηριοειδή CFU/100ml	0	2	0	0	8	0
<i>E.coli</i> /100ml	0	0	0	0	0	0
Κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι/100ml	2	0	2	0	0	0
<i>Pasteurella spp</i> cfu/100ml	0	0	0	0	100	0
<i>Aeromonas spp</i> cfu/100ml	0	0	0	100	0	0
<i>Pseudomonas spp</i> cfu/100ml	0	0	0	0	0	0

OMX x 22 °C/1ml	235	3700	0	7	130	49
OMX x 37 °C/1ml	158	180	0	5	110	20



Σχήμα 2.41 Γραφήματα που απεικονίζονται η ολική μικροβιακή χλωρίδα και άλλες μικροβιολογικές παράμετροι του νερού του Κόλπου Αργοστολίου το διάστημα 2004-2006 (στοιχεία από αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ και μελέτη Κατσέλης κ.α. 2013).

Η ολική μικροβιακή χλωρίδα (OMX) στο 1^ο γράφημα του σχήματος 2.41, εμφανίζει τις υψηλότερες τιμές τον Σεπτέμβριο 2004 στον σταθμό ΠΣ1 και τον Μάρτιο 2005 στον σταθμό ΠΣ2, ενώ στο 2^ο γράφημα οι υψηλότερες τιμές των ολικών κολοβακτηριδίων εμφανίζονται τον Ιούλιο 2006 στον σταθμό ΠΣ1 και οι υψηλότερες τιμές του *Pasteurella* spp τον ίδιο μήνα στο σταθμό ΠΣ2.

Από τις μικροβιολογικές δειγματοληψίες και αναλύσεις που έγιναν τον Σεπτέμβριο του 2013 στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα. Στον πίνακα 2.7 που ακολουθεί δίνονται αναλυτικά οι κυριότερες μικροβιολογικές παράμετροι που βρέθηκαν.

Πίνακας 2.7 Αναφορά ανάλυσης μικροβιολογικών παραμέτρων. Ημερομηνίες: δειγματοληψίας: 9/9/2013, έναρξης δοκιμής: 9/9/2013, λήξης δοκιμής: 13/9/2013 (στοιχεία από αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ και μελέτη Κατσέλης κ.α. 2013).

Μικροβιολογικές δοκιμές	Μέθοδος	Σ1 cfu/100ml	Σ2 cfu/100ml	Σ3 cfu/100ml
Εντερόκοκκοι	ISO 7899-2 Slanetz & Bartley Agar	-	-	-
Ολικά Κολοβακτηριοειδή	ISO 9308-1 Lactose TTC	80	75	95
ΑΑΚΜ 22 °C	ISO 6222 Plate count Agar	100	200	100
ΑΑΚΜ 37 °C	ISO 6222 Plate count Agar	40	45	50
E. coli	ISO 9308-1 Ανίχνευση ινδόλης	+	+	+

Λόγω έλλειψης νομοθεσίας που να καθορίζει τα όρια των μικροβιολογικών παραμέτρων στην στήλη νερού ιχθυοκαλλιεργητικής χρήσης στην θάλασσα, συγκρίθηκαν τα παραπάνω ευρήματα με τα επιθυμητά όρια που δίνονται για νερό πόσιμο, κολύμβησης και καλλιέργειας οστράκων, όπως αυτά ορίζονται στην νομοθεσία (ΚΥΑ 46399/1352/1986, ΦΕΚ 438/1986, τΒ) (πίνακας 2.8)

Πίνακας 2.8 Επιθυμητές τιμές μικροβιολογικών παραμέτρων σε πόσιμο νερό, νερό κολύμβησης και καλλιέργειας οστράκων, σύμφωνα με την ΚΥΑ 46399/1352/1986, ΦΕΚ 438/1986, τΒ, και τιμές της παρούσας μελέτης (στοιχεία από αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ και μελέτη Κατσέλης κ.α. 2013).

Μικροβιολογικές παράμετροι	Πόσιμου**	Κολύμβησης**	Καλλιέργεια οστράκων**	Παρούσα μελέτη
ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ	<20*	<100		0
ΟΛΙΚΑ ΚΟΛΟΒΑΚΤΗΡΙΟΕΙΔΗ (37 °C)	<50*	500-10000	70-700	75-90
O.M.X. 22 °C				100-200
O.M.X. 37 °C				40-50
E.coli	<20*	100-500		<75-90

* επιθυμητές τιμές σε νερά για κατηγορία υδάτων (1) (ελαχίστης ανοχής).

** επιθυμητές τιμές (cfu/100 ml) σε νερό πόσιμο, κολύμβησης και καλλιέργειας οστράκων σύμφωνα με την ΚΥΑ 46399/1352/1986, ΦΕΚ 438/1986, τΒ.

2.3.5 Στοιχεία διαχείρισης μονάδων ιχθυοκαλλιεργειών του Κόλπου Αργοστολίου

Για την καλύτερη κατανόηση των παραγόντων που συμβάλλουν και σχετίζονται με την εμφάνιση ασθενειών στο εκτρεφόμενο λαβράκι, έχουν συλλεγεί, για τον Κόλπο Αργοστολίου,

στοιχεία (Αρχείο Ιχθυοτροφείων Κεφαλονιάς Α.Ε.) που αφορούν στη διαχείριση, τις θεραπείες και τους εμβολιασμούς σε μονάδες στις θέσεις Κόκκινος Βράχος και Λιβάδι, το χρονικό διάστημα 2011-2015.

Οι αλλαγές δικτυών στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας προκειμένου να καθαριστούν από προσκολλημένους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς και να ξαναχρησιμοποιηθούν, είναι μία πολύ σημαντική διαχειριστική διαδικασία. Οι θέσεις των μονάδων του Κόλπου Αργοστολίου για τις οποίες μετρήθηκαν οι αλλαγές δικτυών είναι ο Κόκκινος Βράχος και Λιβάδι και ο συνολικός αριθμός δικτυών για κάθε θέση είναι 70 και 45 αντίστοιχα. Τα ψάρια όταν γίνονται αλλαγές δικτυών καταπονούνται, δεν τρέφονται σωστά και εμφανίζονται μικρά ποσοστά θνησιμότητας. Στον πίνακα 2.9 δίνονται οι αλλαγές δικτυών το χρονικό διάστημα 2011-2015 (Αρχείο εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ).

Πίνακας 2.9 Αλλαγές δικτυών το διάστημα 2011-2015 στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου (Αρχείο εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ).

ΕΤΟΣ	ΜΗΝΑΣ	ΚΟΚΚΙΝΟΣ ΒΡΑΧΟΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ %/70 Κλωβούς	ΛΙΒΑΔΙ	ΠΟΣΟΣΤΟ %/45 Κλωβούς
2011	ΙΑΝ	16	22,8	4	8,9
	ΦΕΒ	7	10	7	15,6
	ΜΑΡ	9	12,9	3	6,7
	ΑΠΡ	9	12,9	17	37,8
	ΜΑΙ	19	27,1	8	17,8
	ΙΟΥΝ	12	17,1	12	26,7
	ΙΟΥΛ	16	22,8	4	8,9
	ΑΥΓ	13	18,6	8	17,8
	ΣΕΠ	16	22,8	7	15,6
	ΟΚΤ	9	12,9	5	11,1
	ΝΟΕ	16	22,8	5	11,1
	ΔΕΚ	5	7,1	11	24,4
ΣΥΝΟΛΟ		147		91	
2012	ΙΑΝ	6	8,6	12	26,7
	ΦΕΒ	5	7,1	4	8,9
	ΜΑΡ	14	20	7	15,6
	ΑΠΡ	12	17,1	1	2,2
	ΜΑΙ	7	10	15	33,3
	ΙΟΥΝ	24	34,3	3	6,7
	ΙΟΥΛ	7	10	15	33,3
	ΑΥΓ	23	32,9	7	15,6
	ΣΕΠ	8	11,4	2	4,4
	ΟΚΤ	4	5,7	3	6,7
	ΝΟΕ	10	14,2	6	13,3
	ΔΕΚ	2	2,9	7	15,6
ΣΥΝΟΛΟ		89		82	
2013	ΙΑΝ	20	28,6	2	4,4
	ΦΕΒ	7	10	7	15,6
	ΜΑΡ	12	17,1	9	20
	ΑΠΡ	21	30	6	13,3
	ΜΑΙ	14	20	10	22,2
	ΙΟΥΝ	15	21,4	11	24,4
	ΙΟΥΛ	18	25,7	6	13,3
	ΑΥΓ	16	22,9	6	13,3
	ΣΕΠ	12	17,1	0	0
	ΟΚΤ	0	0	0	0
	ΝΟΕ	9	12,9	7	15,6
	ΔΕΚ	23	32,9	4	8,9
ΣΥΝΟΛΟ		167		68	
2014	ΙΑΝ	13	18,6	14	31,1

ΦΕΒ	12	17,1	12	26,7	
ΜΑΡ	24	34,3	2	4,4	
ΑΠΡ	7	10	12	26,7	
ΜΑΙ	21	30	9	20	
ΙΟΥΝ	29	41,4	10	22,2	
ΙΟΥΛ	23	32,9	10	22,2	
ΑΥΓ	14	20	6	13,3	
ΣΕΠ	11	15,7	10	22,2	
ΟΚΤ	7	10	6	13,3	
ΝΟΕ	11	15,7	2	4,4	
ΔΕΚ	14	20	9	20	
ΣΥΝΟΛΟ	186		102		
2015	ΙΑΝ	6	8,6	9	20
	ΦΕΒ	11	15,7	7	15,6
	ΜΑΡ	5	7,1	6	13,3
	ΑΠΡ	25	35,7	8	17,8
	ΜΑΙ	23	32,9	9	20
	ΙΟΥΝ	18	25,7	14	31,1
	ΙΟΥΛ	12	17,1	21	46,7
	ΑΥΓ	8	11,4	9	20
	ΣΕΠ	14	20	3	6,7
	ΟΚΤ	6	8,6	5	11,1
	ΝΟΕ	12	17,1	5	11,1
	ΔΕΚ	16	22,9	3	6,7
ΣΥΝΟΛΟ	156		99		

Στους πίνακες 2.10 και 2.11 δίνονται στοιχεία των εμβολιασμών που διενεργήθηκαν στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας που μελετήθηκαν το διάστημα 2011-2015. Τα εμβόλια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το μονοδύναμο έναντι του βακτηρίου *Vibrio anguillarum*, το διδύναμο έναντι των βακτηρίων *V. anguillarum-Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Pasteurella-Phdp), εμβόλιο Noda έναντι του Nodavirus και διάφοροι συνδυασμοί τους Noda-Vibrio, Noda-Vibrio-Pasteurella. Τα ψάρια όταν γίνονται εμβολιασμοί καταπονούνται, δεν τρέφονται σωστά και εμφανίζεται θνησιμότητα (Αρχείο εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ).

Πίνακας 2.10 Εμβολιασμοί το διάστημα 2011-2015 στη θέση Κόκκινος Βράχος μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου (Αρχείο εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ).

Θέση Κόκκινος Βράχος	
Ημερομηνία εμβολιασμού	Εμβόλιο
ΕΤΟΣ 2011	
16-26/7/2011	Vibrio-Pasteurella
27/7-8/8/2011	Vibrio
10-25/8/2011	Vibrio-Pasteurella
26/8-21/9/2011	Vibrio
22/9-5/10/2011	Vibrio-Pasteurella
26/10-3/11/2011	Vibrio
7-14/11/2011	Vibrio
16-18/11/2011	Vibrio
21/11-8/12/2011	Vibrio
ΕΤΟΣ 2012	
6-18/7/2012	Vibrio
6/8-17/9/2012	Vibrio
16-24/10/2012	Vibrio
19/11/2012	Vibrio
21/11/2012	Vibrio
17-20/11/2012	Vibrio-Pasteurella
27/11-6/12/2012	Vibrio
7-29/12/2012	Vibrio-Pasteurella

ΕΤΟΣ 2013	
2-23/1/2013	Vibrio
5/1/2013	Vibrio-Pasteurella
24/1/2013	Vibrio-Pasteurella
31/1/2013	Vibrio-Pasteurella
11/2/2013	Vibrio-Pasteurella
15/2/2013	Noda
26/1-4/2/2013	Vibrio
20/3/2013	Vibrio-Pasteurella
29/3/2013	Vibrio-Pasteurella
24/6-7/7/2013	Noda-Vibrio
15/7-2/8/2013	Vibrio
6-7/8/2013	Vibrio
22/8/2013	Noda-Vibrio
23/8/2013	Noda-Vibrio
11/10/2013	Noda
14/10/2013	Noda
12/11/2013	Vibrio-Pasteurella
21/11/2013	Vibrio
29/11/2013	Vibrio
28/11/2013	Vibrio
6/12/2013	Noda-Vibrio
10/12/2013	Noda-Vibrio
ΕΤΟΣ 2014	
18/1-30/1/2014	Noda
10-21/2/2014	Noda
21-28/2/2014	Vibrio
5-7/3/2014	Vibrio-Pasteurella
17-20/3/2014	Vibrio
11-22/4/2014	Vibrio
24/4-2/6/2014	Vibrio
11-24/6/2014	Noda
5-10/6/2014	Noda-Vibrio-Pasteurella
25-30/6/2014	Noda-Vibrio-Pasteurella
7-17/7/2014	Noda
29/7-1/8/2014	Vibrio
8-11/12/2014	Vibrio
ΕΤΟΣ 2015	
13-21/1/2015	Vibrio-Pasteurella
24-27/2/2015	Noda
5-10/3/2015	Vibrio
20-21/3/2015	Noda-Vibrio-Pasteurella
26-30/3/2015	Vibrio-Pasteurella
18-19/3/2015	Noda
23-24/3/2015	Noda
2-6/4/2015	Noda-Vibrio-Pasteurella
6-9/4/2015	Vibrio
15-16/4/2015	Noda-Vibrio-Pasteurella
29/4/2015	Vibrio
5/5/2015	Noda
13-14/5/2015	Vibrio
14-23/5/2015	Noda-Vibrio-Pasteurella
29/5-9/6/2015	Noda-Vibrio-Pasteurella
27-28/7/2015	Vibrio
18/10/2015	Noda-Vibrio-Pasteurella
20/10/2015	Noda-Vibrio-Pasteurella
21/10/2015	Noda-Vibrio-Pasteurella
27/10/2015	Noda-Vibrio-Pasteurella
31/10/2015	Noda-Vibrio-Pasteurella
1/11/2015	Noda-Vibrio-Pasteurella
5/11/2015	Vibrio-Pasteurella
3/12/2015	Vibrio
7/12/2015	Vibrio
9/12/2015	Vibrio

Πίνακας 2.11 Εμβολιασμοί το διάστημα 2011-2015 στη θέση Λιβάδι μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου (Αρχείο εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ).

Θέση Λιβάδι	
Ημερομηνία εμβολιασμού	Εμβόλιο
ΕΤΟΣ 2011	
7/10-12/10/2011	Vibrio
21/12-24/12/2011	Vibrio
ΕΤΟΣ 2012	
27/12/2011-5/1/2012	Vibrio
9/11/2012	Vibrio-Pasteurella
27/11-6/12/2012	Vibrio
21/12-29/12/2012	Vibrio-Pasteurella
ΕΤΟΣ 2013	
26/1-29/1/2013	Vibrio
30-31/7/2013	Vibrio
6-7/8/2013	Vibrio
ΕΤΟΣ 2014	
21-25/2/2014	Vibrio
29/7-1/8/2014	Vibrio
ΕΤΟΣ 2015	
31/3-1/4/2015	Noda-Vibrio-Pasteurella
2-6/4/2015	Noda-Vibrio-Pasteurella
29/4/2015	Vibrio
13-14/5/2015	Vibrio
14-22/5/2015	Noda-Vibrio-Pasteurella
3-4/6/2015	Noda-Vibrio-Pasteurella

Στους πίνακες 2.12 και 2.13 δίνονται στοιχεία της εισαγωγής γόνου στις μονάδες πάχυνσης στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας που μελετήθηκαν το διάστημα 2011-2015. Η εισαγωγή γόνου χρησίμευσε στην επεξεργασία και την ανάλυση της θνησιμότητας από τις απώλειες που παρατηρήθηκαν (Αρχείο εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ).

Πίνακας 2.12 Εισαγωγή γόνου λαβρακιού στην πάχυνση το διάστημα 2011-2015 στη θέση Κόκκινος Βράχος μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου (Αρχείο εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ).

ΚΟΚΚΙΝΟΣ ΒΡΑΧΟΣ		
Ημερομηνία εισαγωγής σε πάχυνση	Αριθμός ψαριών ανά κλωβό	M. B. (g)
ΕΤΟΣ 2011		
4/5/2011	135.289	2,7
4/5/2011	135.289	2,7
11/5/2011	140.571	3,1
11/5/2011	90.166	3,2
11/5/2011	90.166	3,2
16/5/2011	90.000	2,2
16/5/2011	90.000	2,2
24/5/2011	90.000	2,7
24/5/2011	90.000	2,4
26/5/2011	90.000	3,3
30/5/2011	95.800	3,8
25/5/2011	90.000	2,5
25/5/2011	90.000	2,0
3/6/2011	90.000	3,8
4/6/2011	90.000	3,8
1/6/2011	100.000	3,8
3/6/2011	96.000	3,8
7/6/2011	90.000	3,8
7/6/2011	90.000	3,8
8/6/2011	90.000	3,8

Dicentrarchus labrax, L. 1758 και πρόληψη των ασθενειών αυτών

9/6/2011	90.000	3,8
13/7/2011	110.000	4,3
4/7/2011	110.000	9,0
30/6/2011	130.000	3,0
7/7/2011	90.000	4,7
5/8/2011	90.000	2,9
5/9/2011	115.000	15,0
ΣΥΝΟΛΟ	2.698.281	
ΕΤΟΣ 2012		
23/4/2012	146.300	2,0
23/4/2012	135.500	2,0
30/4/2012	135.050	2,3
30/4/2012	135.050	2,3
7/5/2012	136.185	2,1
7/5/2012	136.185	2,1
14/5/2012	135.238	3,4
14/5/2012	135.238	3,4
21/5/2012	134.967	2,6
21/5/2012	134.967	2,6
5/6/2012	135.295	3,5
11/6/2012	135.295	3,5
12/6/2012	135.000	4,0
18/6/2012	135.000	4,0
11/9/2012	101.800	2,3
12/9/2012	90.000	4,0
3/11/2012	100.099	6,4
5/11/2012	87.282	10,1
29/11/2012	83.445	14,8
3/12/2012	56.500	10,0
12/12/2012	56.500	10,0
3/1/2013	57.651	10,0
3/1/2013	56.895	11,2
23/1/2013	56.500	16,9
29/1/2013	56.516	8,7
4/2/2013	91.010	12,8
20/2/2013	86.581	11,0
12/3/2013	73.794	14,2
4/4/2013	91.763	15,0
16/4/2013	77.717	20,0
3/6/2013	95.802	5,0
3/6/2013	95.802	5,0
25/7/2013	86.292	10,0
22/7/2013	82.884	10,0
ΣΥΝΟΛΟ	3.490.103	
ΕΤΟΣ 2013		
30/7/13	79.372	13,0
23/7/13	88.486	7,0
1/8/13	70.402	11,7
6/8/13	65.329	15,3
8/8/13	74.995	14,8
21/8/13	87.041	15,6
27/8/13	38.975	13,5
14/8/13	75.389	12,3
19/9/13	80.282	30,0
19/9/13	65.368	25,0
30/10/13	80.619	7,0
25/11/13	85.339	11,0
9/12/13	85.080	8,5
2/12/13	85.069	9,8
12/12/13	75.133	8,0
11/12/13	118.838	8,0
18/12/13	133.270	2,8
14/12/2013	105.000	6,2
14/12/2013	120.000	5,0
17/12/2013	90.316	7,5

Dicentrarchus labrax, L. 1758 και πρόληψη των ασθενειών αυτών

7/1/2013	44.383	12,5
21/1/2014	55.173	6,7
23/1/2014	75.000	6,9
23/1/2014	75.000	6,9
27/1/2014	62.863	2,7
ΣΥΝΟΛΟ	2.016.722	
ΕΤΟΣ 2014		
27/1/2014	126.110	4,5
27/1/2014	145.900	4,9
14/12/2013	105.000	4,8
15/4/2014	69.930	6,0
6/4/2014	118.500	6,0
14/4/2014	146.000	1,9
24/4/2014	155.000	1,9
4/8/2014	135.000	16,0
24/9/2014	115.000	15,0
28/1/2015	64.868	8,5
28/1/2015	72.090	8,5
3/2/2015	58.686	7,6
17/3/2015	65.980	6,0
17/3/2015	65.980	6,0
31/3/2015	68.775	7,2
14/4/2015	68.221	7,0
22/4/2015	68.998	7,0
22/4/2015	71.295	7,3
22/4/2015	71.295	7,3
15/4/2015	100.077	7,7
20/4/2015	101.182	7,7
4/5/2015	114.171	7,6
5/5/2015	77.599	9,7
ΣΥΝΟΛΟ	2.185.657	
ΕΤΟΣ 2015		
12/05/15	95.451	8,0
22/05/15	101.129	8,0
28/05/15	102.084	7,5
29/05/15	100.382	9,0
02/06/15	75.850	9,0
03/06/15	75.735	9,0
08/06/15	75.000	8,0
11/06/15	75.000	8,0
17/06/15	97.354	8,1
04/08/15	82.449	11,6
04/11/15	75.107	12,2
05/11/15	75.288	9,5
11/11/15	75.012	11,8
17/11/15	75.479	13,3
18/11/15	80.998	8,3
01/12/15	75.024	9,7
02/12/15	60.987	12,0
14/12/15	73.655	8,4
15/12/15	79.168	7,9
29/12/15	85.482	8,4
19/12/15	107.000	4,7
19/12/15	107.000	4,7
21/01/16	93.500	8,9
21/01/16	106.500	8,9
ΣΥΝΟΛΟ	2.050.634	

Πίνακας 2.13 Εισαγωγή γόνου λαβρακιού στην πάχυνση το διάστημα 2011-2015 στη θέση Λιβάδι μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου (Αρχείο εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ).

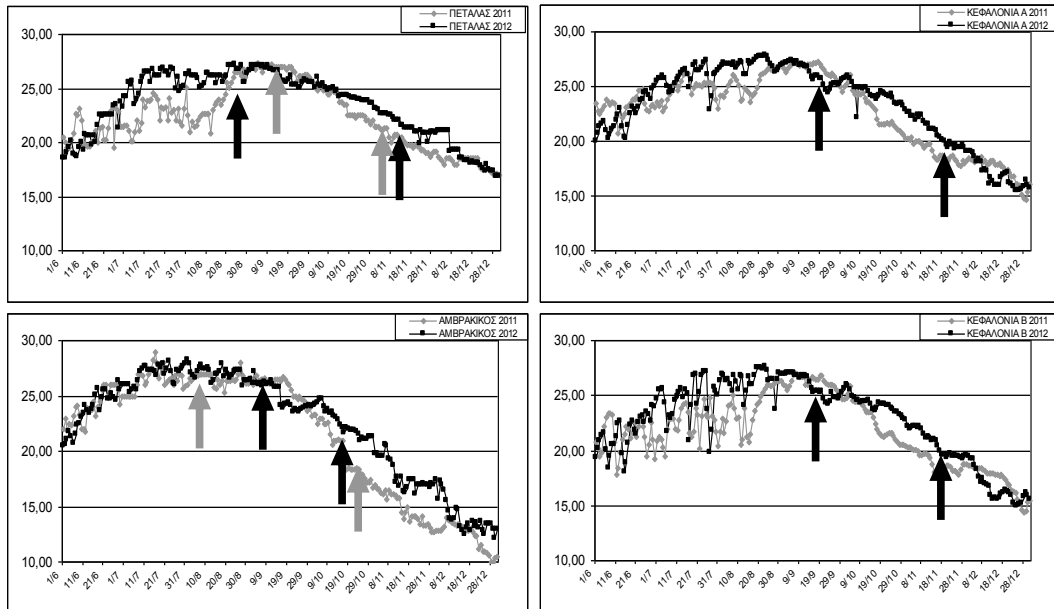
ΛΙΒΑΔΙ		
Ημερομηνία εισαγωγής σε πάχυνση	Αριθμός ψαριών ανά κλωβό	M. B. (g)
ΕΤΟΣ 2011		
18/5/2011	147.000	1,9
27/10/2011	135.000	6,0
5/12/2011	135.000	10,0
ΣΥΝΟΛΟ	417.000	
ΕΤΟΣ 2012		
11/6/2012	135.295	3,5
12/6/2012	135.000	4,0
18/6/2012	135.000	4,0
27/11/2012	105.593	10,7
ΣΥΝΟΛΟ	510.888	
ΕΤΟΣ 2013		
21/8/13	87.041	15,6
27/8/13	38.975	13,5
ΣΥΝΟΛΟ	126.016	
ΕΤΟΣ 2014		
14/12/2013	105.000	4,8
4/8/2014	135.000	16,0
15/4/2015	100.077	7,7
20/4/2015	101.182	7,7
4/5/2015	114.171	7,6
ΣΥΝΟΛΟ	555.430	
ΕΤΟΣ 2015		
22/05/15	101.129	8,0
28/05/15	102.084	7,5
29/05/15	100.382	9,0
17/06/15	97.354	8,1
04/08/15	82.449	11,6
ΣΥΝΟΛΟ	483.398	

2.3.6 Εμφάνιση ασθενειών σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε τα έτη 2011 και 2012 σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας, στον Κόλπο Αργοστολίου, στις ακτές Αιτωλοακαρνανίας και στον Αμβρακικό Κόλπο, έγινε συσχέτιση της θερμοκρασίας των επιφανειακών υδάτων και της επίδρασης της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστροειδοπάθειας σε εκτρεφόμενα λαβράκια. Η ασθένεια παρατηρήθηκε σε όλες τις υπό μελέτη μονάδες, όταν η θερμοκρασία του νερού μειώθηκε, μετά από ένα σχετικά ζεστό καλοκαίρι με πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Ο ιός της εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστροειδοπάθειας (b-nodavirus) πλήττει κυρίως τα εκτρεφόμενα λαβράκια, οδηγώντας σε αυξημένη θνησιμότητα. Από τις καμπύλες της θερμοκρασίας που δίνονται στα γραφήματα του σχήματος 2.42 φαίνεται ότι σε μονάδες στη νήσο Πεταλά και του Αμβρακικού Κόλπου, υπάρχουν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας και στα δύο έτη της μελέτης. Παρ' όλο που η θερμοκρασία είναι υψηλότερη το έτος 2012 καταγράφηκε μικρότερη θνησιμότητα, κάτι το οποίο πιθανώς οφείλεται στην λήψη διαχειριστικών μέτρων από τις ιδιοκτήτριες εταιρείες των μονάδων ιχθυοκαλλιεργειών και πιθανή ανοσία των ψαριών που είχαν έρθει σε επαφή με τον ιό το έτος 2011. Στις μονάδες του Κόλπου Αργοστολίου Κεφαλονιάς το 2011 δεν καταγράφηκε θνησιμότητα εξαιτίας του ιού της εγκεφαλοπάθειας, ούτε υπάρχουν στοιχεία για τους άγριους πληθυσμούς με κλινικά συμπτώματα του ιού που να καταδεικνύουν κάτι τέτοιο. Το έτος 2012 λόγω της παρατεταμένης υψηλής θερμοκρασίας που έφτασε τους 26-27°C, από το τέλος του καλοκαιριού μέχρι τα μέσα του φθινοπώρου,

δημιουργήθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες για την εμφάνιση του ιού. Η έναρξη των θνησιμοτήτων συνέβη όταν άρχισε να μειώνεται η θερμοκρασία του νερού κάτω από τους 26-27°C και λόγω της προσβολής των ψαριών από τον ιό η οποία διήρκησε τόσο (από την έναρξη των συμπτωμάτων) ώστε να οδηγήσει στην κατάρρευση του οργανισμού τους (Spinós et al. 2013).

Στο σχήμα 2.42 στη μονάδα της περιοχής Κεφαλονιά Α (Κόκκινος Βράχος) η θνησιμότητα που εμφανίζεται είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την θνησιμότητα της μονάδας της περιοχής



Σχήμα 2.42 Διαγράμματα θερμοκρασίας από μονάδες ιχθυοκαλλιέργειών τεσσάρων περιοχών της δυτικής Ελλάδας. Τα γκρι βέλη δείχνουν την εμφάνιση της θνησιμότητας το 2011 και τα μαύρα βέλη το 2012 (Spinós et al. 2013).

Κεφαλονιά Β (Λιβάδι), παρ'όλο που οι μονάδες αυτές βρίσκονται στην ίδια θαλάσσια περιοχή σε μεγάλη όμως απόσταση μεταξύ τους (περίπου 2,5km). Δεδομένου ότι οι μονάδες πάχυνσης προμηθεύονταν γόνο από τον ίδιο ιχθυογεννητικό σταθμό, αυτό μπορεί να οφείλεται στη μικρότερη ημερήσια θερμοκρασία που καταγράφηκε στη συγκεκριμένη περιοχή και μπορεί να σχετίζεται με το διαφορετικό βάθος, τη ρευματογραφία της περιοχής και με το ότι στην εν λόγω μονάδα υπήρχαν ψάρια μεγαλύτερης ηλικίας (1-3 ετών) τα οποία είναι πιο ανθεκτικά στον ιό (Spinós et al. 2013).

Σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα 2.14, η περίοδος εμφάνισης και εκδήλωσης συγκεκριμένων ασθενειών στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου, έχει μια εποχική περιοδικότητα. Το χειμερινό σύνδρομο (Winter syndrome) (Gallardo et al. 2003) κάνει την εμφάνισή του τους μήνες Ιανουάριο, Φεβρουάριο και Μάρτιο, οι λοιμώξεις από *V. anguillarum* και *Rhdp* εμφανίζονται τους καλοκαιρινούς μήνες, ενώ η εγκεφαλοπάθεια-αμφιβληστροειδοπάθεια εμφανίζεται και εκδηλώνεται έπειτα από το καλοκαίρι και μετά από παρατεταμένες υψηλές τιμές της θερμοκρασίας όταν μειώνεται στις αρχές με μέσα του φθινοπώρου (Spinós et al. 2013).

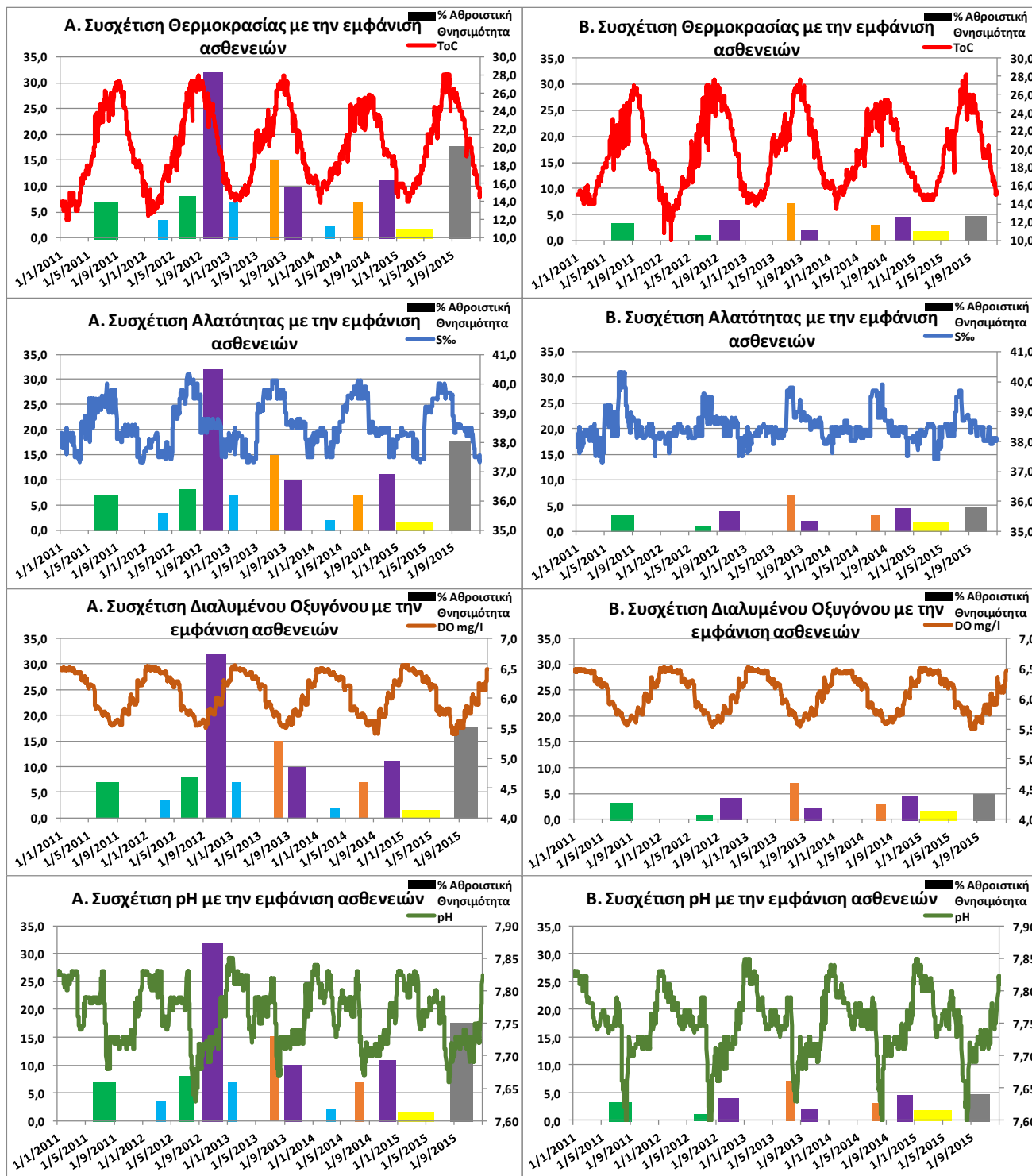
Πίνακας 2.14 Εμφάνιση ασθενειών σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας στις θέσεις Κόκκινος Βράχος και Λιβάδι του Κόλπου Αργοστολίου (Αρχείο εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ).

Ημερομηνία	Ασθένεια	% Θνησιμότητα (Κόκκινος Βράχος)	% Θνησιμότητα (Λιβάδι)
Ιουν-Αυγ 2011	Φωτοβακτηριδίαση	7,0	3,3
Μαρ 2012	Χειμερινό Σύνδρομο	3,5	0,05
Ιουν-Ιουλ 2012	Φωτοβακτηριδίαση	8,0	1,0
13/9-30/11/2012	Ιογενής εγκεφαλοπάθεια	32,0	4,0
01-31/01/2013	Χειμερινό Σύνδρομο	7,0	0,07
01-31/07/2013	Φωτοβακτηριδίαση/ Δονακίωση	15,0	7,0
01/09-07/11/2013	Ιογενής εγκεφαλοπάθεια	10,0	2,0
01-31/03/2014	Χειμερινό Σύνδρομο	2,0	0,03
01-31/07/2014	Φωτοβακτηριδίαση/ Δονακίωση	7,0	3,0
17/10-15/12/2014	Ιογενής εγκεφαλοπάθεια	11,0	4,5
1/1-31/5/2015	Δονακίωση	1,5	1,8
14/8-9/11/2015	Ιογενής εγκεφαλοπάθεια/ Φωτοβακτηριδίαση	17,7	4,8

Σχετικά με τα ποσοστά θνησιμότητας των ψαριών εξαιτίας ασθενειών στις δύο θέσεις που λειτουργούν μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας, φαίνεται ότι στη θέση Λιβάδι είναι χαμηλότερα σε σχέση με τη θέση της μονάδας στη θέση Κόκκινος Βράχος.

2.3.7 Συσχέτιση της θνησιμότητας εξαιτίας εμφάνισης ασθενειών με τις φυσικοχημικές παραμέτρους και τα διαχειριστικά μέτρα σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου

Στο σχήμα 2.43 δίνονται στοιχεία συσχέτισης της θνησιμότητας εξαιτίας εμφάνισης ασθενειών με τις φυσικοχημικές παραμέτρους και συγκεκριμένα τη θερμοκρασία, την αλατότητα, το διαλυμένο οξυγόνο και το pH.

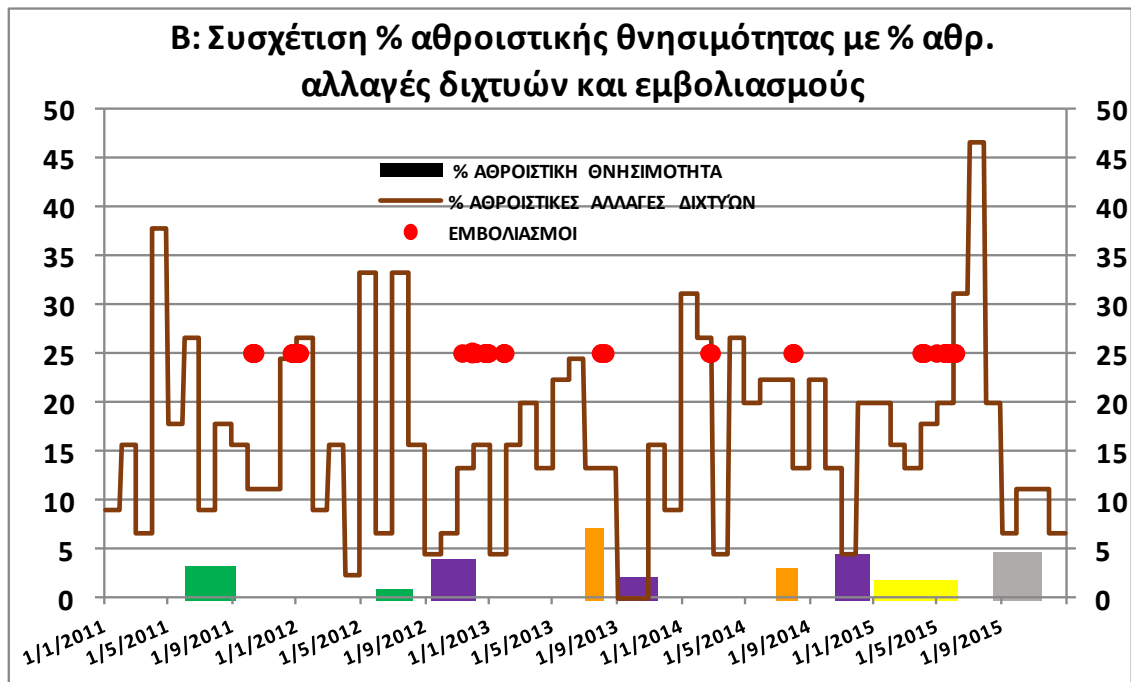
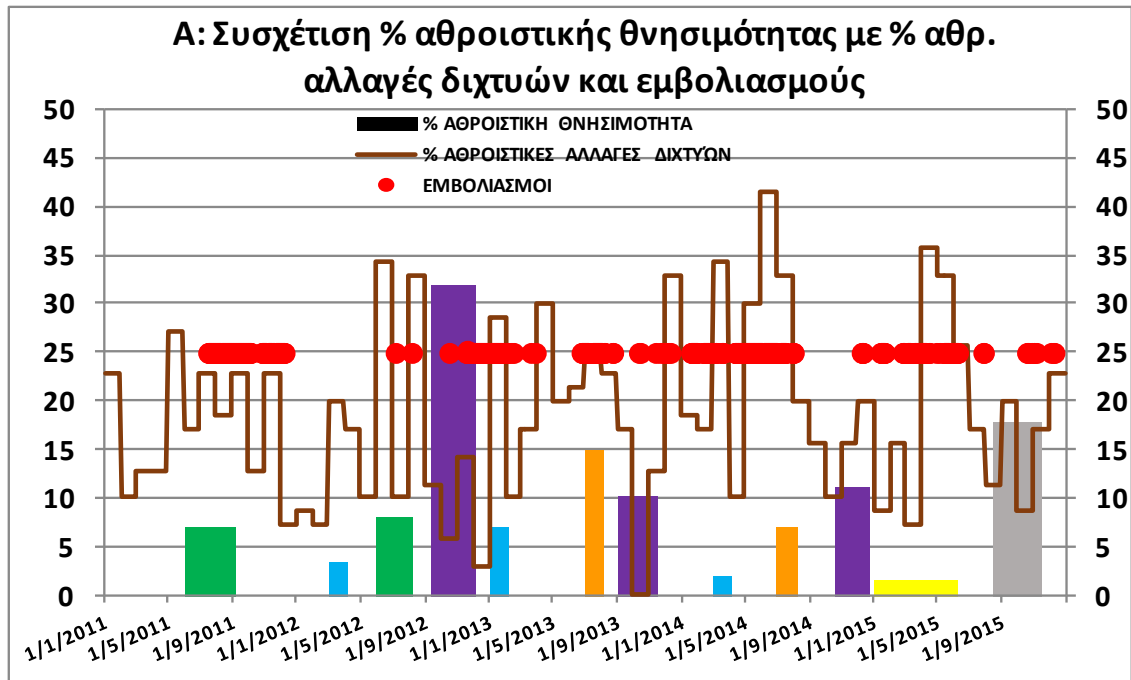


- % Αθροιστική θνησιμότητα εξαιτίας φωτοβακτηριδίασης
- % Αθροιστική θνησιμότητα εξαιτίας χειμερινού συνδρόμου
- % Αθροιστική θνησιμότητα εξαιτίας ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστροειδοπάθειας
- % Αθροιστική θνησιμότητα εξαιτίας φωτοβακτηριδίασης και δονακίωσης
- % Αθροιστική θνησιμότητα εξαιτίας δονακίωσης
- % Αθροιστική θνησιμότητα εξαιτίας ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστροειδοπάθειας και φωτοβακτηριδίασης

Σχήμα 2.43 Αντιπαραβολή χρονοσειρών φυσικοχημικών παραμέτρων με την εμφάνιση ασθενειών σε 2 μονάδες ιχθυοκαλλιεργειών (Α: Κόκκινος Βράχος, Β: Λιβάδι) του Κόλπου Αργοστολίου.

Τα γραφήματα στο αριστερό μέρος του σχήματος 2.43 δείχνουν τη συσχέτιση της θερμοκρασίας, της αλατότητας, του διαλυμένου οξυγόνου και της ενεργού οξύτητας με την εμφάνιση ασθενειών, στη μονάδα Α. Από αυτά τα γραφήματα φαίνεται ότι όταν αυξάνεται η θερμοκρασία εμφανίζεται θνησιμότητα εξαιτίας των ασθενειών δονακίωσης και φωτοβακτηριδίασης, όταν μειώνεται η θερμοκρασία μετά από ένα πολύ ζεστό καλοκαίρι εμφανίζεται η ιογενής εγκεφαλοπάθεια-αμφιβληστροειδοπάθεια και όταν η θερμοκρασία μειώνεται εμφανίζεται το χειμερινό σύνδρομο. Η μικρή αύξηση της αλατότητας ευνοεί την εμφάνιση όλων των ασθενειών εκτός από την ιογενή εγκεφαλοπάθεια. Οι μειωμένες τιμές του διαλυμένου οξυγόνου ευνοούν την εμφάνιση όλων των ασθενειών με εξαίρεση την ιογενή εγκεφαλοπάθεια-αμφιβληστροειδοπάθεια που εμφανίζεται όταν αυξάνεται αυτό μετά από μείωση. Τέλος, οι χαμηλές τιμές της ενεργού οξύτητας ευνοεί την εμφάνιση όλων των ασθενειών. Τα γραφήματα στο δεξιό μέρος δείχνουν τη συσχέτιση της θερμοκρασίας, της αλατότητας, του διαλυμένου οξυγόνου και της ενεργού οξύτητας με την εμφάνιση ασθενειών, στη μονάδα Β. Η συγκεκριμένη συσχέτιση φαίνεται να ακολουθεί το ίδιο πρότυπο με την διαφορά όμως ότι η θνησιμότητα εξαιτίας των ίδιων ασθενειών που εμφανίζονται στον ίδιο χρόνο είναι μικρότερης έντασης. Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι στη μονάδα στη θέση Β εμφανίζεται ελάχιστα το χειμερινό σύνδρομο.

Στη διάρκεια της παρούσας διατριβής έγινε η συσχέτιση της % αθροιστικής θνησιμότητας εξαιτίας εμφάνισης ασθενειών με τις % αθροιστικές αλλαγές διχτύων και τους προληπτικούς εμβολιασμούς σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου στις θέσεις Κόκκινος Βράχος και Λιβιάδι (σχήμα 2.44).



- % Αθροιστική θνησιμότητα εξαιτίας φωτοβακτηριδίασης
- % Αθροιστική θνησιμότητα εξαιτίας χειμερινού συνδρόμου
- % Αθροιστική θνησιμότητα εξαιτίας ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστροειδοπάθειας
- % Αθροιστική θνησιμότητα εξαιτίας φωτοβακτηριδίασης και δονακίωσης
- % Αθροιστική θνησιμότητα εξαιτίας δονακίωσης
- % Αθροιστική θνησιμότητα εξαιτίας ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστροειδοπάθειας και φωτοβακτηριδίασης

Σχήμα 2.44 Χρονοσειρές εμφάνισης γεγονότων (% αθροιστικές αλλαγές δικτύων, προληπτικοί εμβολιασμοί, % θνησιμότητα εξαιτίας εμφάνισης ασθενειών) σε 2 μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου.

Οι εμβολιασμοί τα έτη 2011-2013 πραγματοποιήθηκαν κυρίως μετά την εμφάνιση ασθενειών με διδύναμα εμβόλια έναντι της δονακίωσης και της φωτοβακτηριδίασης (*Vibrio-Pasteurella*), ενώ τα έτη 2014-2015 έγιναν εμβολιασμοί με εμβόλια έναντι της ιογενούς αμφιβληστροειδοπάθειας-εγκεφαλοπάθειας και με εμβόλια έναντι της δονακίωσης και της φωτοβακτηριδίασης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι και στις δύο θέσεις υπάρχει μία τάση να εμφανίζεται θνησιμότητα μετά από αρκετές αλλαγές διχτυών ακόμη και σε περιόδους χαμηλής θερμοκρασίας (χειμερινές περιόδους).

2.3.8 Στατιστική ανάλυση συσχέτισης φυσικοχημικών παραμέτρων με την εμφάνιση ασθενειών σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου

Στους πίνακες 2.15, 2.17, 2.19 και 2.21 δίνονται οι μεταβλητές (φυσικοχημικές παράμετροι), οι παράμετροι των μεταβλητών, η τυπική απόκλιση των μεταβλητών, οι τιμές t-test και P, καθώς και η πολυπαραγοντική παλινδρόμηση (multi regression analysis) για κάθε ασθένεια. Τα διαστήματα που υπολογίζονται οι κινούμενες μέσες τιμές και η διασπορά τους είναι απολογιστικές δηλαδή αφορούν το δεκαπενθήμερο που πέρασε. Έτσι εάν μια μέση τιμή έχει θερμοκρασία πχ. Tt°C την χρονική στιγμή t (=ημέρα) αυτή αφορά στη μέση τιμή των θερμοκρασιών από t=-7 έως t=+7 ημέρες και ανάλογα υπολογίζεται η τυπική απόκλιση. Ανάλογα υπολογίζονται οι τιμές και για τις άλλες παραμέτρους. Από το σύνολο των τιμών που προέκυψαν για λόγους οικονομίας χώρου, έχουν αφαιρεθεί οι τιμές μεταβλητών που δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Έτσι, στους πίνακες 2.16, 2.18, 2.20 και 2.22 δίνονται οι στατιστικά σημαντικές παράμετροι για την πιθανότητα εμφάνισης κάθε ασθένειας (αυτές που είναι στατιστικά σημαντικές είναι σκιασμένες με γκρι χρώμα).

Από την στατιστική ανάλυση της συσχέτισης των φυσικοχημικών παραμέτρων με την πιθανότητα εμφάνισης της δονακίωσης, της φωτοβακτηριδίασης, της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστοειδοπάθειας και του χειμερινού συνδρόμου, παρατηρούνται τα παρακάτω. Στους πίνακες 2.16, 2.18, 2.20 και 2.22 φαίνονται οι στατιστικά σημαντικές ανεξάρτητες μεταβλητές σε σχέση με την εξαρτημένη οι οποίες παρουσιάζουν μικρό επίπεδο συγγραμικότητας (τιμές VIF <3.5), αποδεκτό για την αξιοπιστία του μοντέλου. Οι ανεξάρτητες μεταβλητές με Explain%Variance>0,90 (ποσοστό %) (σκιασμένες γραμμές), είναι οι TEM_SDt, Ph_At, LAG(TEM_At-40), LAG(TEM_SDt-10), LAG(TEM_SDt-20), LAG(O_At-30), LAG(O_At-40) LAG(Ph_SDt-20) και LAG(Ph_SDt-30) για τη δονακίωση, οι TEM_SDt, O_At, LAG(TEM_At-40), LAG(TEM_SDt-10) και LAG(Ph_At-10) για τη φωτοβακτηριδίαση, οι TEM_At, TEM_SDt, S_At, S_SDt, Ph_At, LAG(TEM_At-10) και LAG(S_SDt-10) για την ιογενή εγκεφαλοπάθεια-αμφιβληστοειδοπάθεια και οι TEM_At, LAG(TEM_At-40), LAG(TEM_SDt-30), LAG(TEM_SDt-40) και LAG(Ph_At-40) για το χειμερινό σύνδρομο.

Πίνακας 2.15 Πολυπαραγοντική παλινδρόμηση (multi regression analysis) για τη δονακίωση.

Ανεξάρτητη μεταβλητή (Φ/Χ παράμετρος)	Εξαρτημένη μεταβλητή (ασθένεια)	Τυπική απόκλιση (SD)	t-test	P-Τιμή
	a			
	19,18	13,00	1,48	0,1401
	bi			
TEM_SDt	-0,52	0,15	-3,45	0,0006
Ph_At	5,57	1,44	3,88	0,0001

LAG(TEM_At-10)	-0,33	0,03	-9,83	0
LAG(TEM_At-40)	-0,30	0,04	-6,81	0
LAG(TEM_SDt-10)	-0,85	0,16	-5,34	0
LAG(TEM_SDt-20)	-0,97	0,16	-6,10	0
LAG(TEM_SDt-30)	-0,87	0,16	-5,49	0
LAG(TEM_SDt-40)	-1,20	0,15	-7,91	0
LAG(O_At-30)	-4,55	0,74	-6,16	0
LAG(O_At-40)	-5,72	0,65	-8,82	0
LAG(O_SDt-10)	-2,23	0,90	-2,48	0,0133
LAG(Ph_At-10)	4,13	1,42	2,91	0,0036
LAG(Ph_SDt-20)	71,73	11,21	6,40	0
LAG(Ph_SDt-30)	70,75	11,22	6,31	0

Πίνακας 2.16 Δεδομένα των στατιστικά σημαντικών παραμέτρων πιθανότητας εμφάνισης της δονακίωσης.

Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων (SS)	Df	Μέση τιμή τετραγώνου (MS)	F-ratio	P-Τιμή	Explain%Variance
TEM_SDt	401,48	1	401,48	54,61	0	1,23
Ph_At	1718,94	1	1718,94	233,83	0	5,28
LAG(TEM_At-10)	40,65	1	40,65	5,53	0,0187	0,12
LAG(TEM_At-40)	303,61	1	303,61	41,3	0	0,93
LAG(TEM_SDt-10)	376,17	1	376,17	51,17	0	1,16
LAG(TEM_SDt-20)	334,88	1	334,88	45,55	0	1,03
LAG(TEM_SDt-30)	270,90	1	270,90	36,85	0	0,83
LAG(TEM_SDt-40)	238,63	1	238,63	32,46	0	0,73
LAG(O_At-30)	1024,50	1	1024,50	139,36	0	3,15
LAG(O_At-40)	636,35	1	636,35	86,56	0	1,96
LAG(O_SDt-10)	59,28	1	59,28	8,06	0,0045	0,18
LAG(Ph_At-10)	98,11	1	98,11	13,35	0,0003	0,30
LAG(Ph_SDt-20)	292,53	1	292,53	39,79	0	0,90
LAG(Ph_SDt-30)	292,32	1	292,32	39,76	0	0,90
Model (SS)	6088,35	14				18,71
TOTAL (SS)	32540,20					

Πίνακας 2.17 Πολυπαραγοντική παλινδρόμηση (multi regression analysis) για την φωτοβακτηριδίαση.

Ανεξάρτητη μεταβλητή (Φ/Χ παραμέτρος)	Εξαρτημένη μεταβλητή (ασθένεια)	Τυπική απόκλιση (SD)	t-test	P-Τιμή
	a			
	-23,28	15,07	-1,55	0,1224
	bi			
TEM_SDt	1,02	0,15	6,62	0
O_At	-2,88	0,62	-4,61	0
O_SDt	2,66	0,99	2,68	0,0074
LAG(TEM_At-20)	-0,36	0,06	-6,35	0
LAG(TEM_At-40)	0,36	0,05	7,44	0
LAG(TEM_SDt-10)	1,18	0,16	7,31	0
LAG(TEM_SDt-20)	0,87	0,16	5,31	0
LAG(TEM_SDt-30)	0,32	0,15	2,06	0,0392
LAG(S_At-10)	0,58	0,13	4,48	0
LAG(O_At-40)	2,46	0,64	3,87	0,0001

LAG(O_SDt-30)	-2,31	0,96	-2,41	0,0158
LAG(Ph_At-10)	5,21	1,57	3,32	0,0009
LAG(Ph_At-40)	-8,08	1,31	-6,17	0
LAG(Ph_SDt-20)	51,57	11,46	4,50	0
LAG(Ph_SDt-30)	30,57	11,52	2,65	0,008

Πίνακας 2.18 Δεδομένα των στατιστικά σημαντικών παραμέτρων πιθανότητας εμφάνισης της φωτοβακτηριδίασης.

Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων (SS)	Df	Μέση τιμή τετραγώνου (MS)	F-ratio	P-Τιμή	Explain%Variance
TEM_SDt	4968,10	1	4968,10	651,82	0	12,52
O_At	2898,51	1	2898,51	380,29	0	7,30
O_SDt	0,50	1	0,50	0,07	0,7975	0,00
LAG(TEM_At-20)	182,18	1	182,18	23,90	0	0,46
LAG(TEM_At-40)	1914,71	1	1914,71	251,21	0	4,82
LAG(TEM_SDt-10)	687,29	1	687,29	90,17	0	1,73
LAG(TEM_SDt-20)	328,43	1	328,43	43,09	0	0,83
LAG(TEM_SDt-30)	25,61	1	25,61	3,36	0,0668	0,06
LAG(S_At-10)	258,12	1	258,12	33,87	0	0,65
LAG(O_At-40)	49,76	1	49,76	6,53	0,0106	0,13
LAG(O_SDt-30)	30,97	1	30,97	4,06	0,0438	0,08
LAG(Ph_At-10)	360,10	1	360,10	47,25	0	0,91
LAG(Ph_At-40)	350,66	1	350,66	46,01	0	0,88
LAG(Ph_SDt-20)	152,02	1	152,02	19,94	0	0,38
LAG(Ph_SDt-30)	53,69	1	53,69	7,04	0,008	0,14
Model (SS)	12260,64	15				30,90
TOTAL (SS)	39685,10					

Πίνακας 2.19 Πολυπαραγοντική παλινδρόμηση (multi regression analysis) για την ιογενή εγκεφαλοπάθεια-αμφιβληστροειδοπάθεια.

Ανεξάρτητη μεταβλητή (Φ/Χ παράμετρος)	Εξαρτημένη μεταβλητή (ασθένεια)	Τυπική απόκλιση (SD)	t-test	P-Τιμή
	a			
	51,55	14,03	3,67	0,0002
	bi			
TEM_At	0,95	0,07	14,06	0
TEM_SDt	-0,39	0,14	-2,77	0,0057
S_At	-0,51	0,13	-3,96	0,0001
S_SDt	-2,85	0,36	-8,02	0
Ph_At	-5,43	1,26	-4,32	0
LAG(TEM_At-10)	-0,41	0,09	-4,77	0
LAG(TEM_At-30)	0,22	0,05	4,14	0
LAG(S_SDt-10)	-2,20	0,35	-6,22	0
LAG(S_SDt-20)	-1,51	0,35	-4,33	0
LAG(O_At-20)	3,72	0,67	5,58	0
LAG(O_At-40)	3,10	0,52	6,01	0
LAG(O_SDt-10)	2,47	0,91	2,70	0,0069
LAG(O_SDt-20)	4,49	0,90	4,97	0
LAG(O_SDt-30)	4,45	0,90	4,95	0
LAG(O_SDt-40)	5,49	0,97	5,68	0
LAG(Ph_At-20)	-5,82	1,17	-4,98	0

Πίνακας 2.20 Δεδομένα των στατιστικά σημαντικών παραμέτρων πιθανότητας εμφάνισης της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστροειδοπάθειας.

Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων (SS)	Df	Μέση τιμή τετραγώνου (MS)	F-ratio	P-Τιμή	Explain%Variance
TEM_At	8350,36	1	8350,36	1211,71	0	19,40
TEM_SDt	1554,76	1	1554,76	225,61	0	3,60
S_At	2906,75	1	2906,75	421,79	0	6,70
S_SDt	1593,38	1	1593,38	231,21	0	3,70
Ph_At	559,55	1	559,55	81,20	0	1,30
LAG(TEM_At-10)	1419,63	1	1419,63	206,00	0	3,30
LAG(TEM_At-30)	145,30	1	145,30	21,08	0	0,30
LAG(S_SDt-10)	372,21	1	372,21	54,01	0	0,90
LAG(S_SDt-20)	167,14	1	167,14	24,25	0	0,40
LAG(O_At-20)	298,67	1	298,67	43,34	0	0,70
LAG(O_At-40)	196,80	1	196,80	28,56	0	0,50
LAG(O_SDt-10)	88,46	1	88,46	12,84	0,0003	0,20
LAG(O_SDt-20)	146,64	1	146,64	21,28	0	0,30
LAG(O_SDt-30)	174,05	1	174,05	25,26	0	0,40
LAG(O_SDt-40)	202,83	1	202,83	29,43	0	0,50
LAG(Ph_At-20)	171,10	1	171,10	24,83	0	0,40
Model (SS)	18347,62	16				42,55
TOTAL (SS)	43123					

Πίνακας 2.21 Πολυπαραγοντική παλινδρόμηση (multi regression analysis) για το χειμερινό σύνδρομο.

Ανεξάρτητη μεταβλητή (Φ/Χ παράμετρος)	Εξαρτημένη μεταβλητή (ασθένεια)	Τυπική απόκλιση (SD)	t-test	P-Τιμή
	a			
CONSTANT	23,98	6,07	3,95	0,0001
	bi			
TEM_At	-0,14	0,02	-5,73	0
LAG(TEM_At-40)	-0,15	0,04	-3,82	0,0001
LAG(TEM_SDt-30)	-0,38	0,09	-4,16	0
LAG(TEM_SDt-40)	-0,64	0,09	-7,12	0
LAG(S_SDt-40)	-0,64	0,21	-3,11	0,0019
LAG(O_At-10)	1,65	0,35	4,78	0
LAG(O_SDt-40)	-1,95	0,54	-3,63	0,0003
LAG(Ph_At-40)	-4,32	0,71	-6,12	0

Πίνακας 2.22 Δεδομένα των στατιστικά σημαντικών παραμέτρων πιθανότητας εμφάνισης του χειμερινού συνδρόμου.

Πηγή	Άθροισμα Τετραγώνων (SS)	Df	Μέση τιμή τετραγώνου (MS)	F-ratio	P-Τιμή	Explain%Variance
TEM_At	848,26	1	848,26	314,57	0	7,60
LAG(TEM_At-40)	98,78	1	98,78	36,63	0	0,90
LAG(TEM_SDt-30)	166,01	1	166,01	61,56	0	1,50
LAG(TEM_SDt-40)	140,08	1	140,08	51,95	0	1,30
LAG(S_SDt-40)	28,67	1	28,67	10,63	0,0011	0,30
LAG(O_At-10)	50,88	1	50,88	18,87	0	0,50
LAG(O_SDt-40)	29,41	1	29,41	10,91	0,001	0,30
LAG(Ph_At-40)	96,02	1	96,02	35,61	0	0,90
Model (SS)	1458,10	8				13,04
TOTAL (SS)	11180,80					

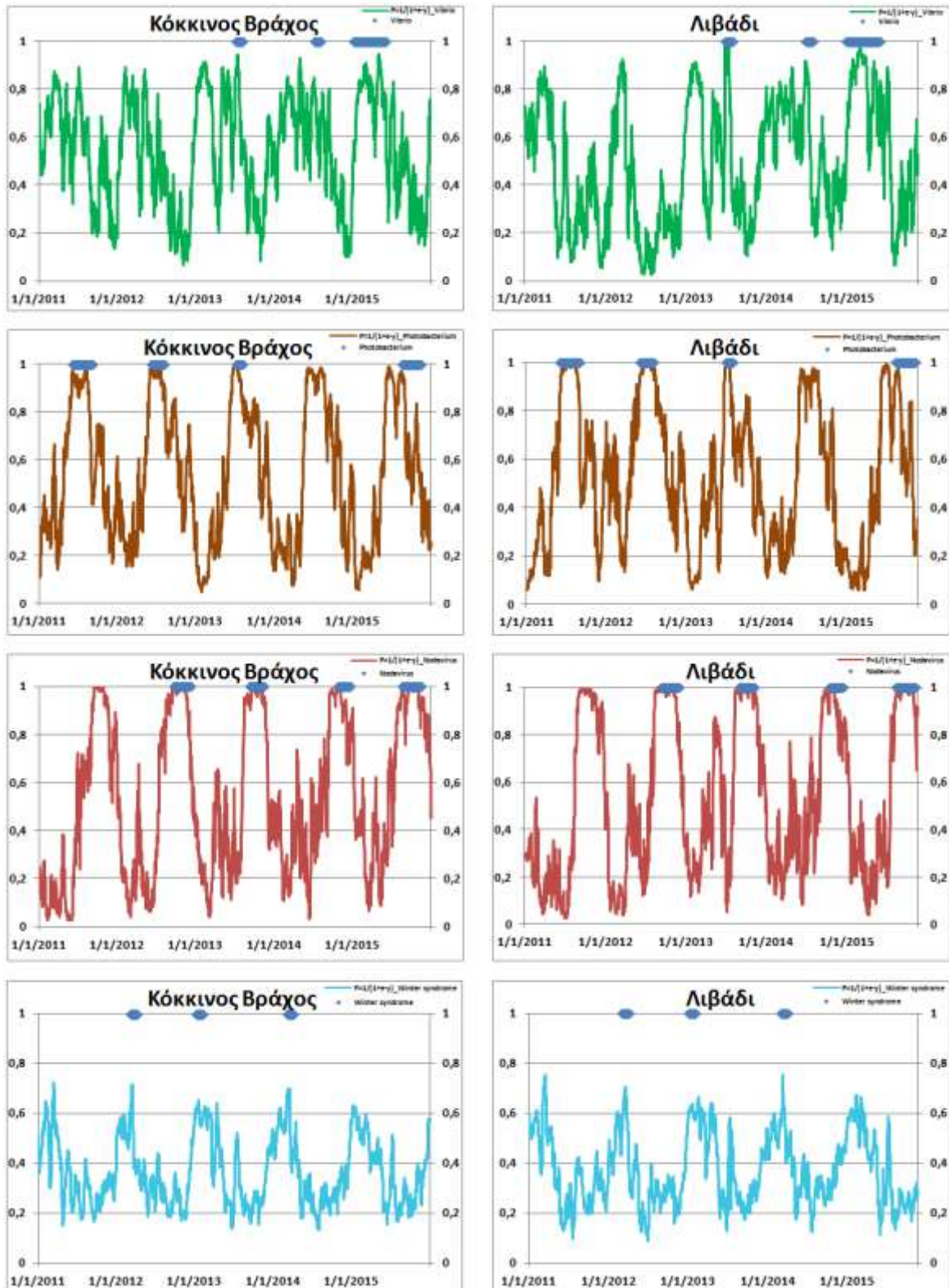
Για την εμφάνιση της δονακίωσης σημαντική στατιστικά είναι η μεταβλητή της ενεργού οξύτητας με τιμή 5,28, της τυπικής διακύμανσης της θερμοκρασίας με τιμή 1,23, της θερμοκρασίας 40 ημέρες πριν την εμφάνιση της ασθένειας με τιμή 0,93, της τυπικής απόκλισης της θερμοκρασίας 10 και 20 ημέρες πριν την εμφάνιση της ασθένειας με τιμές 1,16 και 1,03 αντίστοιχα και τέλος του οξυγόνου 30 και 40 ημέρες πριν την εμφάνιση της ασθένειας με τιμές 3,15 και 1,96 αντίστοιχα.

Για την εμφάνιση της φωτοβακτηριδίασης σημαντική στατιστικά είναι η μεταβλητή της τυπικής απόκλισης της θερμοκρασίας με τιμή 12,52, του οξυγόνου με τιμή 7,30, της θερμοκρασίας 40 ημέρες πριν την εμφάνιση της ασθένειας με τιμή 4,82 και τέλος της τυπικής απόκλισης της θερμοκρασίας 10 ημέρες πριν την εμφάνιση της ασθένειας με τιμή 1,73.

Για την εμφάνιση της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστοειδοπάθειας σημαντική στατιστικά είναι η μεταβλητή της θερμοκρασίας με τιμή 19,4, της τυπικής απόκλισης της θερμοκρασίας με τιμή 3,6, της αλατότητας με τιμή 6,7, της τυπικής απόκλισης της αλατότητας με τιμή 3,7, της ενεργού οξύτητας με τιμή 1,3 και τέλος της θερμοκρασίας 10 ημέρες πριν την εμφάνιση της νόσου με τιμή 3,3.

Για την εμφάνιση του χειμερινού συνδρόμου της τσιπούρας σημαντική στατιστικά είναι η μεταβλητή της θερμοκρασίας με τιμή 7,6, της θερμοκρασίας 40 ημέρες πριν την εμφάνιση της νόσου με τιμή 0,9, της τυπικής απόκλισης της θερμοκρασίας 30 και 40 ημέρες πριν την εμφάνιση της ασθένειας με τιμές 1,5 και 1,3 αντίστοιχα και τέλος της ενεργού οξύτητας 40 ημέρες πριν την εμφάνιση της ασθένειας με τιμή 0,9.

Στο σχήμα 2.45 δίνονται γραφήματα που αφορούν τη συσχέτιση των φυσικοχημικών παραμέτρων και συγκεκριμένα της μέσης ημερήσιας θερμοκρασίας, της ημερήσιας αλατότητας, της ημερήσιας τιμής οξυγόνου και της ημερήσιας τιμής pH του νερού, με την εμφάνιση 4 ασθενειών (δονακίωσης, φωτοβακτηριδίασης, ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβλητροειδοπάθειας και χειμερινού συνδρόμου) σε 2 μονάδες ιχθυοκαλλιέργειών του Κόλπου Αργοστολίου Κεφαλονιάς.



Σχήμα 2.45 Γραφήματα προβλεπόμενων τιμών μοντέλου πιθανότητας εμφάνισης ασθενειών (συνεχής γραμμή) ανά ημέρα και παρατηρούμενων πιθανοτήτων εμφανίσεων ασθενειών (σημεία) σε 2 μονάδες ιχθυοκαλλιεργειών του Κόλπου Αργοστολίου για τις τέσσερις ασθένειες.

Από τα γραφήματα του σχήματος 2.45 παρατηρείται ότι οι καμπύλες ταιριάζουν και στις 2 μονάδες που μελετήθηκαν (θέσεις Κόκκινος Βράχος και Λιβάδι). Οι 4 ασθένειες αποτυπώθηκαν στα γραφήματα με την εμφάνισή τους (με τον αριθμό 1) σε σχέση με τον

χρόνο που διήρκησε η μελέτη (1/1/2011-31/12/2015). Η πιθανότητα εμφάνισης της δονακίωσης σε συνάρτηση με το άθροισμα των φυσικοχημικών παραμέτρων παρατηρείται τα τρία τελευταία έτη της μελέτης (2013-2015) και έχει μεγαλύτερη διάρκεια το έτος 2015. Η πιθανότητα εμφάνισης της φωτοβακτηριδίασης παρατηρείται τα έτη 2011, 2012, 2013 και 2015. Η πιθανότητα εμφάνισης της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας παρατηρείται από το 2012-2015, ενώ η πιθανότητα εμφάνισης του χειμερινού συνδρόμου τα έτη 2012, 2013 και 2014.

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι από το πρότυπο (μοντέλο) και το πειραματικό σκέλος προκύπτει ότι υπάρχει συσχέτιση με την εμφάνιση των ασθενειών που μελετήθηκαν. Οι κορυφές των γραμμών της συνάρτησης της πιθανότητας εμφάνισης κάθε ασθένειας στα γραφήματα του σχήματος 2.45, συμπίπτουν με τα πραγματικά περιστατικά εμφάνισης ασθενειών που δίνονται στα γραφήματα του σχήματος 2.43.

2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Για την υλοποίηση του δεύτερου μέρους της διατριβής, χαρτογραφήθηκε και αποτυπώθηκε η σύσταση του πυθμένα του Κόλπου Αργοστολίου και του Όρμου Κακογκύλου. Συλλέχθηκαν δεδομένα το διάστημα 2011-2015 από περιβαλλοντικές παραμέτρους, με στόχο να διευρευνηθεί ποιες από αυτές επηρεάζουν και σχετίζονται με την εμφάνιση ασθενειών στο λαβράκι και στην τσιπούρα σε δύο μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας της Κεφαλονιάς και συγκεκριμένα με την εμφάνιση της δονακίωσης, της φωτοβακτηριδίασης, της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστροειδοπάθειας και του χειμερινού συνδρόμου. Συλλέχθηκαν επίσης δεδομένα για την διαχείριση των μονάδων ιχθυοκαλλιεργειών, όπως για τις αλλαγές των διχτυών, τους εμβολιασμούς και την εισαγωγή γόνου. Τέλος, καταγράφηκαν δεδομένα που αφορούσαν στο τροφικό επίπεδο και μικροβιολογικές παράμετροι του νερού του Κόλπου Αργοστολίου.

Περιοχές μελέτης

Το οργανικό φορτίο που εναποτίθεται απευθείας κάτω από τους κλωβούς, υποβαθμίζει τοπικά το θαλάσσιο περιβάλλον. Οι περισσότερες μονάδες εκτροφής σολομού στη Νορβηγία έχουν μεταφερθεί σε περιοχές με ισχυρότερα ρεύματα, βαθύτερα νερά και πιο κατάλληλη τοπογραφία του θαλάσσιου βυθού, μειώνοντας σημαντικά τη συσσώρευση αποβλήτων-ιζημάτων, την εμφάνιση ασθενειών και γενικά αρνητικών επιπτώσεων στην παραγωγή (Sigbjørn 2002). Σε περιπτώσεις που ούτε το βάθος ούτε η ταχύτητα των ρευμάτων συμβάλλουν στην βελτίωση της διαχείρισης μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας, προτείνεται η αποκατάσταση των περιοχών εκτροφής με περιοδική εγκατάλειψή τους (υδρανάπαυση). Αυτό είναι ένα από τα καλύτερα εργαλεία διαχείρισης για βιώσιμη εκτροφή ψαριών (Carroll et al. 2003).

Ο Κόλπος Αργοστολίου καλύπτεται σχεδόν ολόκληρος από μαλακό αμμώδες υπόστρωμα. Στην ΒΑ περιοχή του Κόλπου η αποτύπωση του πυθμένα και η επιβεβαίωσή του έδειξε ότι ήταν κυρίως ιλυώδης, αφού πιθανώς λόγω των κινήσεων των θαλασσίων μαζών (Κονίδης κ.α. 2006) καταλήγουν εκεί αιωρούμενα σωματίδια, οργανικά και ανόργανα υλικά, από όλη την περιοχή και επιβαρύνεται από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Η χερσαία περιοχή γύρω από τον Κόλπο είναι τελείως διαφορετική στην ανατολική από τη δυτική πλευρά. Η ανατολική πλευρά χαρακτηρίζεται από χαμηλούς λόφους ύψους 100-120 m σε απόσταση περί τα 2-4 km από την ακτή. Η ανάπτυξη ενός ορισμένου τύπου θαλάσσιας βλάστησης σε ένα βιότοπο είναι αποτέλεσμα ενός συνόλου αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων και η μελέτη και αναλυτική περιγραφή της δομής των βενθικών θαλάσσιων φυτοκοινωνιών σε μία περιοχή αποτελεί πεδίο βασικής έρευνας, με επακόλουθη δυνατότητα αξιοποίησης των αποτελεσμάτων (Lüning 1990) στη διερεύνηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του μελετούμενου οικοσυστήματος. Τα στοιχεία της μελέτης δείχνουν ότι ο πυθμένας στην περιοχή ενδιαφέροντος αποτελείται κυρίως από μαλακό υπόστρωμα χωρίς βλάστηση (λασπώδες, λασποαμμώδες) σε βάθη μεγαλύτερα των 10m. Η ζώνη βάθους 0-10m, η οποία έχει ιδιαίτερα περιορισμένο πλάτος (<100m) λόγω της έντονης κλίσης του πυθμένα, αποτελείται από ανάμικτο βραχώδες και λασποαμμώδες υπόστρωμα. Στη ζώνη αυτή (0-10m), εντοπίστηκαν σε περιορισμένη έκταση συστάδες του είδους *P. oceanica* μεταξύ των 4m και 11m βάθους, κυρίως σε περιοχές με ηπιότερη κλίση και όπου υπήρχε μαλακό υπόστρωμα. Από τη σύγκριση της εξάπλωσης του είδους στην ευρύτερη περιοχή, φαίνεται ότι τα υδρογραφικά και τοπογραφικά χαρακτηριστικά της περιοχής μελέτης περιορίζουν την

εξάπλωση του είδους. Τέλος, τόσο στην περιοχή μελέτης όσο και στην ευρύτερη περιοχή του Κόλπου του Αργοστολίου δεν εντοπίστηκε κάποιο από τα ενδιδαιτήματα (κοραλλιογενή ενδιδαιτήματα και ασβεστοφυκικοί βυθοί), τα οποία προστατεύονται σύμφωνα με τον κανονισμό 1967/2006 για την μεσογειακή αλιεία. Οι μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου, λειτουργούν περισσότερο από τρεις δεκαετίες και το αποτύπωμά τους στον πυθμένα δεν δείχνει να είναι ιδιαίτερα έντονο κάτω από τις μονάδες και στην ευρύτερη περιοχή, το οικοσύστημα όμως χρήζει παρακολούθησης και περαιτέρω μελέτης όλων των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων.

Τα χαρακτηριστικά της δεύτερης περιοχής μελέτης, του Όρμου Κακογκύλου (ΒΑ Κεφαλονιά), δείχνουν ότι είναι κατάλληλη για την λειτουργία της υφιστάμενης μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας. Από την βυθομετρία της περιοχής, στην οποία βρίσκεται η μονάδα, φαίνεται ότι υπάρχει απότομη κλίση του πυθμένα από τις ακτές προς τα ανοιχτά του Όρμου (θέση μονάδας). Η μονάδα βρίσκεται σε απομονωμένη θέση (δεν υπάρχουν άλλες μονάδες στην περιοχή), υπάρχει μεγάλη ανανέωση των υδάτων λόγω ρευμάτων, με αποτέλεσμα να υπάρχουν ελάχιστα προβλήματα από ασθένειες από την στιγμή που τέθηκε σε λειτουργία μέχρι σήμερα. Τα ισχυρά ρεύματα αυξάνουν τη διαθεσιμότητα οξυγόνου, που απαιτείται για την αποσύνθεση της οργανικής ύλης και συμβάλλουν στη διασκόρπισή της σε μεγάλη έκταση. Από τη θέση που είναι εγκατεστημένη η μονάδα που μελετήθηκε προκύπτουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά. Από τη βυθομετρία της περιοχής που πραγματοποιήθηκε φαίνεται ότι το βάθος είναι ιδανικό για τη λειτουργία μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας. Ο πυθμένας καλύπτεται κυρίως από μαλακό αμμώδες υπόστρωμα, υπάρχει η παρουσία συστάδων του είδους *P. oceanica* που περιορίστηκε κυρίως στη ΝΔ και ΒΔ περιοχή και μικρότερες συστάδες στα ΝΑ. Από όλες τις δειγματοληψίες και τις οπτικές παρατηρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, ταυτοποιήθηκε ένα μόνο είδος θαλάσσιου φανερόγαμου, το *P. oceanica*, σε μικρές συστάδες σε αραιή διάταξη, σχηματισμοί τραγάνας (ροδόλιθων) στα ανατολικά (άνοιγμα του Όρμου) και βραχώδες υπόστρωμα στις περιοχές με μικρό βάθος. Στην περιοχή που μελετήθηκε δεν έχει ξαναγίνει βυθομετρία, χαρτογράφηση και τόσο λεπτομερής αποτύπωση του πυθμένα.

Φυσικοχημικές παράμετροι

Στην παρούσα εργασία έγινε επίσης καταγραφή των περιβαλλοντικών παραμέτρων στον Κόλπο Αργοστολίου. Οι παράμετροι αυτές είναι η θερμοκρασία, η αλατότητα, το διαλυμένο οξυγόνο, η ενεργός οξύτητα (pH), η αμμωνία, τα αμμωνιακά, τα νιτρικά και τα νιτρώδη συστατικά, τα θρεπτικά άλατα, η χλωροφύλλη α και οι μικροβιολογικές παράμετροι του νερού. Από την καταγραφή και μελέτη των περιβαλλοντικών παραμέτρων διαπιστώθηκαν ότι οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, της αλατότητας και του pH δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες μεταβολές κατά τη διάρκεια του έτους.

Η αύξηση της θερμοκρασίας του νερού, συμβάλλει στην μείωση της περιεκτικότητάς του σε οξυγόνο, τόσο λόγω της μειωμένης διαλυτότητας του οξυγόνου, όσο και λόγω της αύξησης του ρυθμού των βιολογικών διεργασιών που συμβαίνουν στο νερό από τις οποίες καταναλώνεται περισσότερο οξυγόνο. Η επίδραση της θερμοκρασίας στην τιμή του pH των σωματικών υγρών (αίμα, κυτταρόπλασμα) παίζει σημαντικό ρόλο στη θερμική βιολογία ενός οργανισμού. Σε ποικιλόθερμους οργανισμούς (όπως είναι τα ψάρια) οι αλλαγές της θερμοκρασίας του σώματος συνοδεύονται από αλλαγές στο pH. Για την πλειοψηφία των οργανισμών, οι τιμές του pH στα εξωτερικά και ενδοκυτταρικά υγρά μειώνονται με την

αύξηση της θερμοκρασίας. Το pH είναι ένα από τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος για την επιβίωση, τον μεταβολισμό, τη φυσιολογία, την ανάπτυξη των υδρόβιων οργανισμών και των χημικών διεργασιών. Η αλατότητα είναι σημαντική οικολογική μεταβλητή και είναι σημαντική σε ορισμένες βασικές χημικές διεργασίες. Η αυξημένη αλατότητα μειώνει τη διαλυτότητα του οξυγόνου στο νερό. Η αλατότητα του νερού σχετίζεται με τις υδατοκαλλιέργειες μέσω του ελέγχου της ωσμωτικής πίεσης, η οποία μπορεί να επηρεάσει την ισορροπία ιόντων στον εκτρεφόμενο υδρόβιο οργανισμό αλλά και την αυξημένη κατανάλωση ενέργειας (Castro & Huber 1999).

Από πρόσφατη μελέτη στις ιχθυοκαλλιέργειες του Κόλπου Αργοστολίου (Κατσέλης κ.α 2013) πρόέκυψε ότι στις μονάδες στις θέσεις Κόκκινος Βράχος και Λιβάδι η θερμοκρασία του νερού παρουσιάζει τη τυπική εποχιακή διακύμανση, με μέγιστο τον Ιούλιο-Αύγουστο και ελάχιστο τον Φεβρουάριο. Η μέση θερμοκρασία του νερού στην περιοχή εκτιμάται στους 19,4°C, η μέση ελάχιστη στους 11,9°C και η μέση μέγιστη στους 27,5°C. Επίσης δεν καταγράφεται στατιστικά σημαντική τάση (αύξηση ή μείωση). Σύμφωνα με τα δεδομένα της παρούσας μελέτης η θερμοκρασία κυμαίνεται από 13,7°C (Φεβρουάριο) έως 25,0°C (Αύγουστο), σύμφωνα με το αναμενόμενο εποχικό πρότυπο των μεσογειακών (εύκρατων) παράκτιων οικοσυστημάτων (Κατσέλης κ.α 2013).

Η τιμή του pH (7,70-7,89) και της αλατότητας (μ.ο. 38,01‰) κυμαίνονται κοντά στις φυσιολογικές τιμές (8,00 και 38,50-39,50‰ αντίστοιχα) του θαλασσινού νερού, παράμετροι που συμβάλλουν θετικά ώστε να επιτυγχάνονται καλοί ρυθμοί αναπαραγωγής, ανάπτυξης, αύξησης, ευζωίας αλλά και στη χαμηλή θνησιμότητα των εκτρεφόμενων ψαριών. Το pH και η αλατότητα είναι απαραίτητα για την επιβίωση, τον μεταβολισμό, τη φυσιολογία και την ανάπτυξη των υδρόβιων οργανισμών και των χημικών διεργασιών (Φυτιάνος, 1996). Οι τιμές της θερμοκρασίας και της αλατότητας επηρεάζουν και την ορμόνη μελατονίνη (Mel) που παράγεται στην επίφυση του λαβρακιού η οποία επηρεάζει με τη σειρά της την πρόσληψη τροφής, την κινητική δραστηριότητα, τον μεταβολισμό και την αναπαραγωγή (López-Olmeda et al. 2009).

Η μέση τιμή του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό στην περιοχή είναι 6,06mg/l, και κυμαίνεται εποχιακά από 4,8-7,2mg/l. Το διαλυμένο οξυγόνο που αποτελεί ένδειξη της ποιότητας του νερού των παράκτιων υδάτων δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη διαβίωση των ψαριών, στις μονάδες όμως εντατικής εκτροφής κάτω από τις συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή μελέτης μπορεί να γίνει περιοριστικό. Μόνο η αύξηση της παροχής οξυγόνου επιτρέπει υψηλότερες πυκνότητες πληθυσμού. Συμπερασματικά, το διαλυμένο οξυγόνο είναι ο πιο σημαντικός περιοριστικός παράγοντας στην εντατική εκτροφή ψαριών. Οι παλιρροιακές διακυμάνσεις, οι έντονες βροχοπτώσεις ή η αυξημένη εισροή γλυκού νερού, η ένταση και η κατεύθυνση του αέρα, καθώς και οι ημερήσιες διακυμάνσεις της θερμοκρασίας ημέρας/νύχτας συμβαίνουν συχνά και μπορούν να ενεργούν ως περιοριστικοί παράγοντες για τον μεταβολισμό των νεαρών ατόμων του λαβρακιού (Dalla Via et al. 1998).

Συσχέτιση φυσικοχημικών παραμέτρων και διαχείρισης των μελετούμενων μονάδων με την εμφάνιση ασθενειών

Τα δεδομένα από τη συσχέτιση των περιβαλλοντικών παραμέτρων και της διαχείρισης των μελετούμενων μονάδων με την εμφάνιση ασθενειών που έγινε έδειξαν τα παρακάτω. Η παράμετρος με την οποία υπάρχει μία πιο εμφανής τάση συσχέτισης με την εμφάνιση

ασθενειών στις υδατοκαλλιέργειες του Κόλπου Αργοστολίου είναι η θερμοκρασία, ιδιαίτερα για την ιογενή εγκεφαλοπάθεια, ακολουθούμενη από την φωτοβακτηριδίαση, την δονακίωση και το χειμερινό σύνδρομο. Η θερμοκρασία παρουσιάζει μέσο ελάχιστο τον Φεβρουάριο με 11,9°C και μέσο μέγιστο τον Αύγουστο με 27,5°C. Η εν λόγω παράμετρος λειτουργώντας συνεργιστικά με άλλους παράγοντες, όπως είναι τα ρεύματα, το βάθος στο οποίο βρίσκονται οι ιχθυοκλωβοί, γλυκό νερό που αναβλύζει στην ανατολική περιοχή του Κόλπου Αργοστολίου, τη διαχείριση από τους ιχθυοκαλλιεργητές κατά την διάρκεια εκτροφής αλλά και τις επιδράσεις που προκαλεί πάνω στην φυσιολογική λειτουργία των ψαριών και την λοιμικότητα των μικροοργανισμών, φαίνεται να αποτελεί σημαντικό προδιαθέτονα παράγοντα εποχικής εμφάνισης ασθενειών στο εκτρεφόμενο λαβράκι. Συγκεκριμένα, κατά τους καλοκαιρινούς μήνες όταν η θερμοκρασία είναι υψηλή κάνουν την εμφάνισή τους ασθένειες που οφείλονται στα παθογόνα βακτήρια *Listonella (Vibrio) anguillarum* (δονακίωση) και *Ph. damsela* subsp. *piscicida* (φωτοβακτηριδίαση). Τους φθινοπωρινούς μήνες και τον Δεκέμβριο, εμφανίζεται η ιογενής εγκεφαλοπάθεια που οφείλεται στον ιό *Nodavirus* λόγω της παρατεταμένης υψηλής θερμοκρασίας, από το τέλος του καλοκαιριού μέχρι τα μέσα του φθινοπώρου, όπου δημιουργούνται οι κατάλληλες συνθήκες για την εκδήλωση της ασθένειας στα ήδη μολυσμένα ψάρια. Η έναρξη της συμπτωματολογίας και της θνησιμότητας σε υψηλά ποσοστά συμβαίνει όταν αρχίζει να μειώνεται η θερμοκρασία του νερού κάτω από τους 26-27°C λόγω της προσβολής των ψαριών από τον ιό και της ανάπτυξης του στον ξενιστή κατά την προηγούμενη θερμή περίοδο η οποία διήρκησε τόσο ώστε να οδηγήσει στην κατάρρευση του οργανισμού τους (Spinos et al. 2013). Τέλος, στη διάρκεια του χειμώνα στις πιο χαμηλές θερμοκρασίες εμφανίζεται το χειμερινό σύνδρομο των ψαριών (Winter syndrome) που προκαλείται από διατροφικές δυσλειτουργίες.

Από τα γραφήματα του σχήματος 2.43 συγκρίνοντας τις δύο διαφορετικές θέσεις των μονάδων φαίνεται ότι το ποσοστό αθροιστικής θνησιμότητας εξαιτίας των ασθενειών που προσβάλλουν τα εκτρεφόμενα ψάρια είναι μικρότερο στη θέση Λιβάδι και διαπιστώνεται έτσι ότι είναι λιγότερο έντονο το φαινόμενο. Επιβεβαιώνονται επίσης τα δεδομένα της στατιστικής ανάλυσης. Ότι δηλαδή για την εμφάνιση της δονακίωσης, το pH είναι καθοριστική παράμετρος, ενώ για τις άλλες 3 ασθένειες καθοριστική είναι κυρίως η θερμοκρασία. Επιπλέον, σημαντική παράμετρος για την φωτοβακτηριδίαση είναι το οξυγόνο και για την ιογενή εγκεφαλοπάθεια η αλατότητα. Ερμηνεύοντας τα γραφήματα του σχήματος 2.43 και λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, παρατηρείται ότι και στις δύο θέσεις των μονάδων η εμφάνιση της δονακίωσης συμπίπτει με την μείωση του pH, η εμφάνιση της φωτοβακτηριδίασης συμπίπτει με την αύξηση της θερμοκρασίας και της αλατότητας του νερού, η εμφάνιση της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστροειδοπάθειας συμπίπτει με την μειούμενη τιμή της θερμοκρασίας μετά από την αύξησή της στη μέγιστη τιμή στο τέλος του καλοκαιριού και η εμφάνιση του χειμερινού συνδρόμου (με μεγαλύτερη θνησιμότητα στη μονάδα στη θέση Κόκκινος Βράχος και ελάχιστη στη θέση Λιβάδι) συμπίπτει με χαμηλές θερμοκρασίες. Παράλληλα η μείωση του διαλυμένου οξυγόνου πυροδοτεί την εμφάνιση και των τεσσάρων ασθενειών.

Παρατηρείται επίσης στο σχήμα 2.43 ότι το χειμερινό σύνδρομο εμφανίζεται ελάχιστα στη μονάδα στη θέση Β (Λιβάδι). Αυτό εξηγείται από τα διαφορετικά χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης μονάδας. Στις δύο θέσεις των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου που μελετήθηκαν, στη μονάδα στη θέση Κόκκινος Βράχος το μέσο βάθος είναι

μεγαλύτερο κατά 4m σε σχέση με τη μονάδα στη θέση Λιβάδι, η σύσταση του πυθμένα είναι διαφορετική (Srinios et al. 2012) καθώς και η ρευματογραφία στις δύο περιοχές που λειτουργούν οι μονάδες (Κονίδης κ.α 2006). Επιπλέον, η μονάδα στον Κόκκινο Βράχο επηρεάζεται περισσότερο από ανθρωπογενείς δραστηριότητες λόγω του ότι είναι πιο κοντά στα λιμάνια Αργοστολίου και Ληξουρίου. Στη μονάδα στο Λιβάδι είναι χαμηλότερο το ποσοστό θνησιμότητας εξαιτίας των ασθενειών, σε σχέση με τη μονάδα στον Κόκκινο Βράχο. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι η μονάδα στο Λιβάδι είναι μικρότερης ετήσιας δυναμικότητας (μικρότερη μονάδα), εκτρέφεται μικρότερος αριθμός ψαριών, αλλά τα ψάρια είναι μεγαλύτερου μέσου μεγέθους σε σχέση με τη μονάδα στον Κόκκινο Βράχο οπότε πιο ανθεκτικά σε ασθένειες. Φαίνεται ότι η θερμοκρασία και η αλατότητα του νερού είναι παράμετροι οι οποίες επιδρούν στην εμφάνιση ασθενειών, παράλληλα και στις δύο μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου που μελετήθηκαν αλλά με διαφορές στα ποσοστά θνησιμότητας, με την υψηλή θερμοκρασία να επιδρά σε μεγαλύτερο βαθμό.

Στατιστική ανάλυση

Για την εμφάνιση της δονακίωσης φαίνεται ότι το pH του νερού είναι κύριος καθοριστικός παράγοντας και περιστατικά δονακίωσης σχετίζονται με πτώσεις του pH. Το βακτήριο *L. anguillarum*, το οποίο προκαλεί τη δονακίωση, παρουσιάζει μέγιστους και ελάχιστους πληθυσμούς το καλοκαίρι και το χειμώνα αντίστοιχα (Larsen 1983). Η δονακίωση έχει παρατηρηθεί και κατά τη διάρκεια του χειμώνα σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 15°C (Grisez & Ollevier 1995). Η ασθένεια συνήθως εμφανίζεται όταν η θερμοκρασία του νερού ξεπερνά τους 10-12°C και σημαντικοί παράγοντες που ευνοούν την εμφάνιση της ασθένειας είναι οι αλλαγές της θερμοκρασίας του νερού, η πρόκληση στρες από την διαχείριση των ψαριών στις ιχθυοκαλλιέργειες και η έντονη κακοκαιρία. Η δονακίωση εμφανίζεται πιο συχνά σε περιοχές όπου υπάρχει υπερπληθυσμός ψαριών και η περιβαλλοντική ισορροπία είναι ευαίσθητη (χαμηλό οξυγόνο, διακυμάνσεις του pH, υψηλοί ρυθμοί ταΐσματος, ανεκμετάλλευτη τροφή, διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, παρασιτώσεις) (Ellis 1989b). Οι Olsson et al. (1996, 1998) έδειξαν ότι το *L. anguillarum* μπορεί να επιβιώσει στο στομάχι νεαρών καλκανιών, σε χαμηλό pH, και να πολλαπλασιαστεί στα έντερα και στα κόπρανα. Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του *L. anguillarum* που προκαλεί τη δονακίωση είναι θερμοκρασία 25°C, αλατότητα 20‰ και pH 7 (Larsen 1984). Η συσχέτιση που βρέθηκε σε αυτή την μελέτη μεταξύ πτώσης του pH και εξάρσεων δονακίωσης επιβεβαιώνεται από τις προαναφερθείσες μελέτες που δείχνουν ότι το *L. anguillarum* είναι πιο επιτυχές σε χαμηλότερα pH από τις φυσιολογικές τιμές του θαλασσινού νερού.

Εξάλλου, για την φωτοβακτηριδίαση ο πιο καθοριστικός παράγοντας είναι το οξυγόνο. Η ασθένεια εμφανίζει εποχιακή έξαρση και εμφανίζεται ιδιαίτερα τους καλοκαιρινούς μήνες, όταν η θερμοκρασία υπερβαίνει τους 23°C (Magarinos et al. 1995). Ωστόσο έχουν διαπιστωθεί κρούσματα και σε θερμοκρασίες μέχρι και 15°C. Η τιμή της θερμοκρασίας είναι αντιστρόφως ανάλογη της τιμής του οξυγόνου. Όταν αυξάνεται η θερμοκρασία μειώνεται το οξυγόνο. Το βακτήριο της φωτοβακτηριδίασης επιζεί μέσα στα μακροφάγα των ψαριών και η προστατευτική ανοσία φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με την ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας και της χυμικής ανοσίας (π.χ. παραγωγή αντισωμάτων) έναντι πρωτεϊνικών μορίων, σε αντίθεση με την δονακίωση όπου η χυμική ανοσία κατευθύνεται κυρίως προς το επιφανειακό λιποπολυσακχαρίδιο. Οι διεργασίες για την απόκτηση ανοσίας και προστασίας για τη δονακίωση δεν απαιτούν την πλήρη εμπλοκή πολλών παραγόντων

του ανοσοποιητικού συστήματος (π.χ. τα β-λεμφοκύτταρα μπορούν να διεγερθούν άμεσα από το λιποπολυσακχαρίδιο προς παραγωγή αντισωμάτων χωρίς την εμπλοκή κυττάρων που επεξεργάζονται αντιγόνα) και οι διεργασίες χρειάζονται λιγότερο οξυγόνο σε σχέση με το φωτοβακτήριο όπου οι ανοσολογικές διεργασίες απαιτούν την κατανάλωση ενέργειας και κατά συνέπεια οξυγόνου. Για αυτό ίσως συνδέεται η εμφάνιση της φωτοβακτηριδίασης όταν οι τιμές του οξυγόνου είναι χαμηλές, κάτι το οποίο επίσης καταπονεί τα ψάρια και επηρεάζει πολλές φυσιολογικές λειτουργίες τους.

Στο εκτρεφόμενο λαβράκι για την εμφάνιση της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστροειδοπάθειας κύριοι καθοριστικοί παράγοντες είναι η θερμοκρασία και η αλατότητα. Η εμφάνιση μεγάλης θνησιμότητας σε εκτρεφόμενα ψάρια μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας της δυτικής Ελλάδος, συνέβη έπειτα από παρατεταμένη διάρκεια υψηλών θερμοκρασιών τους καλοκαιρινούς μήνες, επιδρά δε κυρίως στα μέσα του φθινοπώρου όταν η θερμοκρασία αρχίζει να μειώνεται (Spinos et al. 2013). Από τον Le Breton et al. (1997), διαπιστώθηκε ανάλογη εμφάνιση στο εκτρεφόμενο λαβράκι, σε ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες. Το έτος 2012 λόγω της παρατεταμένης υψηλής θερμοκρασίας που έφτασε τους 26-27°C, από το τέλος του καλοκαιριού μέχρι τα μέσα του φθινοπώρου δημιουργήθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες για την εμφάνιση του ιού. Από τους γενότυπους του *noda* που προσβάλλουν το λαβράκι, ο γενότυπος RGNNV εμφανίζει παθογένεια σε θερμοκρασίες από 25°C και άνω, σε αντίθεση με άλλους γενότυπους που εμφανίζουν παθογένεια σε χαμηλές θερμοκρασίες, όπως ο AHNNV. Η συσχέτιση που έγινε αποδεικνύεται ορθή από τον γενότυπο του *noda* που προσβάλλει το λαβράκι στη Μεσόγειο που έχει δείχθει ότι είναι λειτουργικά παθογόνος και προκαλεί επιδημίες όταν η θερμοκρασία είναι >25°C. Η έναρξη της θνησιμότητας συνέβη όταν άρχισε να μειώνεται η θερμοκρασία του νερού κάτω από τους 26-27°C (Spinos et al. 2013). Στο γλυκό νερό φαίνεται να είναι λιγότερο σταθερός και να αδρανοποιείται μετά από έξι μήνες παραμονής του (Flerichs et al. 2000).

Τέλος, για την εμφάνιση του χειμερινού συνδρόμου, κύριος καθοριστικός παράγοντας είναι η θερμοκρασία. Το χειμερινό σύνδρομο είναι μια παθογόνος νόσος που επηρεάζει σχεδόν αποκλειστικά την εκτρεφόμενη τσιπούρα στη Μεσόγειο θάλασσα, που είναι πιο έντονη στις βόρειες περιοχές. Άλλα είδη ψαριών, όπως το λαβράκι, που συχνά εκτρέφονται στις ίδιες εγκαταστάσεις φαίνεται να μην επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό. Το χειμερινό σύνδρομο προκαλεί χρόνια θνησιμότητα κατά τη διάρκεια των πιο κρύων μηνών του έτους και επεισόδια οξείας θνησιμότητας όταν η θερμοκρασία αυξάνεται (Tort et al. 1998a).

Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν δείχνουν ότι η θνησιμότητα είναι υψηλότερη από την ιογενή αμφιβληστροειδοπάθεια-εγκεφαλοπάθεια (Nodavirus) και χαμηλότερη από τις άλλες ασθένειες. Κάτι τέτοιο δείχνει ότι η αντιμετώπιση της συγκεκριμένης ιογενούς ασθένειας είναι δυσκολότερη σε σχέση με τις βακτηριακές (δονακίωση, φωτοβακτηριδίαση) και την ασθένεια που οφείλεται σε διατροφικές δυσλειτουργίες των εκτρεφόμενων πληθυσμών (χειμερινό σύνδρομο). Επιπλέον, στη μία από τις δύο μονάδες που μελετήθηκαν και συγκεκριμένα στη μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας στη θέση λιβάδι εμφανίζεται ελάχιστα το χειμερινό σύνδρομο, κάτι το οποίο οφείλεται στα διαφορετικά υδρολογικά χαρακτηριστικά της εν λόγω μονάδας (βάθος, σύσταση πυθμένα, ρεύματα κ.λπ.) και στη διαφορετική διαχείριση που εφαρμόζεται (δυναμικότητα, ψάρια μεγαλύτερου μέσου βάρους άρα πιο ανθεκτικά στις ασθένειες κ.λπ.). Η εισαγωγή γόνου συμβαίνει κυρίως την Άνοιξη όταν ανεβαίνει η θερμοκρασία και τα δύο τελευταία έτη παρατήρησης έχουν μεγαλύτερη διάρκεια μέχρι τον Ιούλιο. Μετά τις απώλειες

λόγω των ασθενειών που έπληξαν τις μονάδες, γινόταν συστηματικά εισαγωγή γόνου στις μονάδες πάχυνσης. Οι εμβολιασμοί γίνονται εντατικά τα έτη 2011-2013 μετά την εμφάνιση ασθενειών με διδύναμα εμβόλια έναντι της δονακίωσης και της φωτοβακτηριδίασης (*Vibrio-Pasteurella*), ενώ τα έτη 2014-2015 γίνονται εμβολιασμοί με εμβόλια έναντι της ιογενούς αμφιβληστροειδοπάθειας-εγκεφαλοπάθειας (*Nodavirus*) και με εμβόλια έναντι της δονακίωσης και της φωτοβακτηριδίασης. Για τις ετήσιες αλλαγές των δικτύων στους πλωτούς κλωβούς πάχυνσης, παρατηρείται ότι αυξάνονται από το 2011 προς το 2015, διαδικασία που είναι ένα διαχειριστικό μέτρο που συμβάλλει στη μείωση απωλειών. Στη χρονική διάρκεια 2011-2015, έγινε επεξεργασία των στοιχείων της θνησιμότητας λόγω προσβολής των εκτρεφόμενων ψαριών από τέσσερις ασθένειες και της διαχείρισης των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειών που μελετήθηκαν. Η διαχείριση αφορούσε αλλαγές δικτύων και την εφαρμογή εμβολιασμών. Η ανάπτυξη επιφυτικών οργανισμών στα δίκτυα, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των ρευμάτων του νερού στα κλουβιά με την οποία μειώνεται η ανανέωση του νερού στον κλωβό, κάτι που οδηγεί στη μείωση της συγκέντρωσης του διαθέσιμου DO για τα εκτρεφόμενα ψάρια. Η μείωση επίσης της ανανέωσης του νερού των κλωβών οδηγεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και της αμμωνίας (NH₃) εντός του κλωβού, και αυξάνεται η πιθανότητα προσβολής από παθογόνους μικροοργανισμούς λόγω ρύπανσης, η οποία μπορεί να φτάσει στο ανώτατο σημείο της τις πιο ζεστές ημέρες και ώρες του καλοκαιριού. Η χρήση αντιρρυπαντικών παραγόντων είναι κοινές για τη μείωση του προβλήματος, αλλά οι ιχθυοκαλλιεργητές αποφεύγουν γενικά την αντιρρυπαντική προστασία στην περίπτωση πλωτών κλωβών με νεαρά ψάρια, καθώς είναι πιο ευαίσθητα σε τέτοιους παράγοντες. Όταν είναι καθαροί οι ιχθυοκλωβοί που χρησιμοποιούνται για νεαρά ψάρια δεν είναι απαραίτητη η εφαρμογή αντιρρυπαντικών παραγόντων, ειδικά όταν η ιχθυοφόρτιση ανά μονάδα όγκου νερού είναι χαμηλή. Επομένως είναι απαραίτητες οι συχνές αλλαγές των δικτύων των πλωτών κλωβών στις ιχθυοκαλλιέργειες τους πιο ζεστούς μήνες του έτους και κυρίως το καλοκαίρι (Makridis et al. 2017).

Από τη συσχέτιση του ποσοστού θνησιμότητας λόγω εμφάνισης ασθενειών, με το ποσοστό των αλλαγών των δικτύων και τους εμβολιασμούς των ψαριών, διαπιστώθηκαν τα παρακάτω. Φαίνεται ότι είναι υψηλό το ποσοστό των αλλαγών πριν την εμφάνιση των ασθενειών και μειώνεται σταδιακά όταν εμφανίζεται θνησιμότητα, πιθανόν για να μην αυξηθεί η θνησιμότητα και λόγω καταπόνησης των ψαριών. Από την άλλη πλευρά οι εμβολιασμοί γίνονται συστηματικά μετά από θνησιγενή γεγονότα (εμφάνιση ασθενειών) για να ενισχυθεί η αντίσταση των ψαριών στις ασθένειες. Αυτά αφορούν στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας που μελετήθηκαν και στις δύο θέσεις στον Κόλπο Αργοστολίου.

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η άνοδος της θερμοκρασίας σχετίζεται με εξάρσεις δονακίωσης, φωτοβακτηριδίασης και ιογενούς εγκεφαλοπάθειας αμφιβληστροειδοπάθειας ως αποτέλεσμα των επιδράσεων της στο θαλάσσιο περιβάλλον (χαρακτηριστικά για την φωτοβακτηριδίαση η μείωση του διαθέσιμου οξυγόνου), στον μολυσματικό παράγοντα (χαρακτηριστικά για τον γενότυπο RGNNV του *noda*, αλλά και λόγω των υψηλότερων ρυθμών πολλαπλασιασμού των βακτηρίων) και στον ξενιστή (χαρακτηριστικά επηρεάζοντας την φυσιολογική λειτουργία πολλών συστημάτων). Επιπλέον, από τη μελέτη διαπιστώθηκε σαφής συσχέτιση της πτώσης του pH με την εμφάνιση της δονακίωσης. Προηγούμενες μελέτες έχουν περιγράψει την εμπλοκή και άλλων ειδών δονακίων που προκαλούν δονακίωση πέραν του *V. anguillarum*,

όπως *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, ενώ χαρακτηριστική είναι και η εμφάνιση κρουσμάτων από *Ph. damsela* subsp. *damsela* (πρώην *V. damsela*) στην Β. Αφρική (Heenatigala & Fernando 2016). Τα σενάρια για την κλιματική αλλαγή προβλέπουν σημαντική άνοδο της θερμοκρασίας και οξίνιση (μείωση του pH) του θαλασσινού νερού και εάν επιβεβαιωθούν αυτά τότε βάσει των συσχετίσεων που έγιναν σε αυτή τη μελέτη προβλέπεται ότι οι επιδημίες και για τις τρεις (βακτηριακές και ιογενή) ασθένειες (για διαφορετικό λόγο ή συνδυασμό τους για τη καθεμία) θα ενταθούν.

Τροφικό επίπεδο και μικροβιολογικές παράμετροι του Κόλπου Αργοστολίου

Τα στοιχεία από την συγκέντρωση της χλωροφύλλης α (Chl-a) δείχνουν ότι διαχρονικά υπάρχει σταθερότητα στο τροφικό καθεστώς του Κόλπου Αργοστολίου, το οποίο κατατάσσεται από αυτή την άποψη από ολιγότροφο έως μεσοτροφικό οικοσύστημα (Κατσέλης κ.α. 2013).

Στα αποτελέσματα από μικροβιολογικές αναλύσεις του 2004-2006 (παλαιότερη μελέτη) φαίνεται ότι σε όλα τα δείγματα θαλασσινού νερού από τους πλωτούς κλωβούς, ο αριθμός των ολικών κολοβακτηριδίων *E.coli* και κοπρανωδών στρεπτόκοκκων είναι μικρότερος από αυτόν που ορίζεται ως επιθυμητό όριο για να είναι τα νερά κατάλληλα για κολύμβηση. Τα αστικά λύματα, τα κτηνοτροφικά απόβλητα και τα περιττώματα των ζώων και των ανθρώπων που περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς είναι η κύρια πηγή μόλυνσης των υδάτων. Στο νερό (θαλασσινό και γλυκό), βρίσκονται παθογόνοι μικροοργανισμοί σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις και είναι πολύ δύσκολη η ανίχνευσή τους. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ως δείκτες μόλυνσης των υδάτων τα κολοβακτηρίδια, τα οποία γενικά δεν είναι παθογόνα, αλλά εκκρίνονται από τον άνθρωπο με ρυθμούς που κυμαίνονται ανά άτομο από 10^{11} έως 4×10^{11} ημερησίως και καταλήγουν κυρίως στη θάλασσα με τα αστικά λύματα. Τα κολοβακτηρίδια περιπτώματων αναπτύσσονται μόνο στο πεπτικό σύστημα των θηλαστικών και έτσι η παρουσία τους στο νερό δείχνει μόλυνση και τελικά δυνητική παθογένεια. Άλλο χαρακτηριστικό των κολοβακτηριδίων που τα καθιστά κατάλληλο δείκτη για την ύπαρξη πιθανής παθογένειας στο νερό, είναι το γεγονός ότι η απολύμανση του νερού τα καταστρέφει δυσκολότερα (είναι πιο ανθεκτικά) σε σύγκριση με όλα τα άλλα παθογόνα βακτήρια. Έτσι, η εξάλειψη των κολοβακτηριδίων εξασφαλίζει και την παράλληλη εξάλειψη των παθογόνων βακτηρίων. Αυτό όμως δεν ισχύει και για τους ιούς, αφού δεν υπάρχει άμεση και πλήρης συσχέτισή τους με τα κολοβακτηρίδια. Για τον προσδιορισμό των ιών απαιτείται η διενέργεια πιο εξειδικευμένων αναλύσεων (Λοϊζίδου 2006). Οπότε η παρουσία και οι υψηλές τιμές κολοβακτηριδίων σε ένα παράκτιο οικοσύστημα σημαίνει ότι θα υπάρχουν και άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί οι οποίοι δυνητικά μπορεί να προκαλέσουν ασθένειες σε φυσικούς ή εκτρεφόμενους πληθυσμούς ψαριών.

Από τη μελέτη των μικροβιολογικών παραμέτρων που έγινε φάνηκε ότι στο νερό του Κόλπου Αργοστολίου δεν υπάρχει μικροβιακή μόλυνση και είναι κατάλληλα για κολύμβηση ως προς αυτόν τον παράγοντα (αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις των μικροβιολογικών παραμέτρων το 2013 (Κατσέλης κ.α 2013), φαίνεται ότι οι τιμές των εντερόκοκκων βρίσκονται εντός των επιθυμητών ορίων για το πόσιμο νερό, των ολικών κολοβακτηριοειδών είναι ελαφρώς μεγαλύτερες των ορίων του πόσιμου νερού και στα κατώτερα όρια των νερών καλλιέργειας οστράκων, αφού οι τιμές της *E.coli* βρίσκονται στο ελάχιστο όριο των τιμών κολύμβησης και είναι σχετικά μεγαλύτερες από τα όρια του πόσιμου νερού. Φαίνεται επίσης ότι τιμές των μελετούμενων μικροβιολογικών παραμέτρων, εκτός της

περίπτωσης του *E.coli*, είναι συγκρίσιμες με τα επιθυμητικά όρια του πόσιμου νερού, τα οποία αποτελούν και τις μικρότερες τιμές ορίων στις διάφορες χρήσεις του νερού (Κατσέλης κ.α. 2013). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως κολοβακτηρίδια, εντερόκκοκοι και στρεπτόκοκοι, προέρχονται από το πεπτικό σύστημα θηλαστικών (ανθρώπων ή εκτρεφόμενων ζώων παραγωγής) και πιθανώς η παρουσία τους στο νερό του Κόλπου Αργοστολίου οφείλεται σε αστικά λύματα.

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα του 2^{ου} μέρους της παρούσας διατριβής θα πρέπει να τονιστούν τα παρακάτω σημεία:

- Από τη χαρτογράφηση του συνόλου του Κόλπου Αργοστολίου διαπιστώθηκε ότι καλύπτεται σχεδόν ολόκληρος από μαλακό αμμώδες υπόστρωμα, στην ΒΑ περιοχή του είναι κυρίως ιλυώδης, αφού λόγω των ρευμάτων καταλήγουν εκεί αιωρούμενα σωματίδια, οργανικά και ανόργανα υλικά, από όλη την περιοχή και η περιοχή υφίσταται επιβάρυνση από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Το αποτύπωμα στον πυθμένα του Κόλπου Αργοστολίου, από τις υφιστάμενες μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας, δεν φαίνεται να είναι έντονο κάτω από τις μονάδες και στην ευρύτερη περιοχή, είναι όμως απαραίτητη η παρακολούθηση και περαιτέρω μελέτη όλων των δραστηριοτήτων της εν λόγω περιοχής.
- Η χαρτογράφηση της περιοχής που χρησιμοποιήθηκε στο τρίτο κεφάλαιο της μελέτης (Όρμος Κακογκύλου) έδειξε ότι είναι κατάλληλη για τη λειτουργία μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας, υπάρχει απότομη κλίση του πυθμένα από τις ακτές προς τα ανοιχτά του Όρμου (θέση μονάδας), υπάρχει μεγάλη ανανέωση των υδάτων λόγω ρευμάτων και η μονάδα βρίσκεται σε απομονωμένη θέση, με αποτέλεσμα να υπάρχουν ελάχιστα προβλήματα από ασθένειες από την στιγμή που τέθηκε σε λειτουργία μέχρι σήμερα.
- Συγκρίνοντας τις δύο διαφορετικές θέσεις των μελετούμενων μονάδων φαίνεται ότι η θνησιμότητα εξαιτίας των ασθενειών των ψαριών είναι χαμηλότερη στη θέση Λιβάδι λόγω διαφορετικών χαρακτηριστικών της συγκεκριμένης μονάδας. Από τα δεδομένα της στατιστικής ανάλυσης και τα δεδομένα των πραγματικών τιμών συσχέτισης της εμφάνισης ασθενειών με την επίδραση των φυσικοχημικών παραμέτρων, παρατηρείται ότι η θνησιμότητα εξαιτίας της δονακίωσης σχετίζεται και με τη μείωση του pH του νερού, η θνησιμότητα εξαιτίας της φωτοβακτηριδίασης σχετίζεται και με την αύξηση της θερμοκρασίας και της αλατότητας του νερού, η θνησιμότητα από την ιογενή εγκεφαλοπάθεια-αμφιβληστροειδοπάθεια σχετίζεται με ένα καθεστώς μειούμενης θερμοκρασία μετά από την αύξησή της στη μέγιστη τιμή και η θνησιμότητα από το χειμερινό σύνδρομο (κυρίως στη μονάδα στη θέση Κόκκινος Βράχος λόγω διαφορετικών χαρακτηριστικών) συμπίπτει με χαμηλές θερμοκρασίες. Εξάλλου, η μείωση του διαλυμένου οξυγόνου φαίνεται να λειτουργεί συνεργιστικά με τις άλλες παραμέτρους και πυροδοτεί την εμφάνιση και των τεσσάρων ασθενειών.
- Το οικοσύστημα του Κόλπου Αργοστολίου κατατάσσεται από ολιγότροφο έως μεσοτροφικό όταν η θερμοκρασία είναι χαμηλή ή υψηλή αντίστοιχα.
- Υπάρχει σχετικά έντονη παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών όπως κολοβακτηρίδια, εντερόκκοκοι και στρεπτόκοκοι και η παρουσία τους στο νερό του Κόλπου Αργοστολίου οφείλεται κυρίως σε αστικά λύματα. Οι υψηλές τιμές κολοβακτηριδίων σ' αυτό το παράκτιο

οικοσύστημα δείχνουν ότι θα υπάρχουν και άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί οι οποίοι δυνητικά μπορεί να δημιουργήσουν κατάλληλες συνθήκες και να προκαλέσουν ασθένειες στα ψάρια.

- Λόγω του μικρού μέσου βάθους που έχει ο Κόλπος Αργοστολίου και την σχετικά μικρή ανανέωση του νερού ευνοούνται μεγάλες διακυμάνσεις των περιβαλλοντικών παραμέτρων και τελικά η ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών που μπορούν να πλήξουν τις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας.
- Θεωρείται απαραίτητη η συνεχής παρακολούθηση (monitoring) των περιβαλλοντικών παραγόντων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, η δημιουργία χρονοσειρών και η σύγκριση με άλλες περιοχές της Ελλάδας για να γίνει καλύτερη τεκμηρίωση και να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα για το συγκεκριμένο ζήτημα το οποίο είναι πολύ σημαντικό για το μέλλον των ιχθυοκαλλιεργειών.
- Λαμβάνοντας υπόψη τα στοιχεία που προέκυψαν, είναι σημαντικό οι ιχθυοκαλλιεργητές να προβαίνουν σε διαχειριστικά (μικρή ιχθυοφόρτιση, τήρηση κανόνων υγιεινής, συχνή αλλαγή και καθαρισμός διχτυών, υδρανάπαυση) και προληπτικά μέτρα (εμβολιασμοί) στις εντατικές ιχθυοκαλλιέργειες στις πλωτές μονάδες στη θάλασσα, έτσι ώστε να προλαμβάνονται αρνητικές επιπτώσεις από την αναμενόμενη εμφάνιση των ασθενειών που μελετήθηκαν και επηρεάζονται από τις φυσικοχημικές παραμέτρους του νερού.
- Εφαρμόζοντας προληπτικά προγράμματα με τους κατάλληλους εμβολιασμούς πριν το προβλεπόμενο διάστημα προσβολής των ψαριών από τις ασθένειες που προαναφέρθηκαν και λαμβάνοντας υπόψη τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και την σχετική περιοδικότητά τους θα μπορούσαν να περιοριστούν πολλά προβλήματα στις ιχθυοκαλλιέργειες κατά τη διάρκεια όλου του έτους.
- Ωστόσο, αν και οι εμβολιασμοί των ψαριών στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας είναι απαραίτητοι, απαιτείται υψηλό κόστος εργασίας, έχουν μεγάλη διάρκεια και προκαλούνται απώλειες ψαριών λόγω στρες και τραυματισμών (Kusuda & Hamaguchi, 1987) και δεν είναι πάντοτε αποτελεσματικοί στο πεδίο παρόλο που υπάρχουν πολύ καλά αποτελέσματα σε εργαστηριακές συνθήκες. Αρκετά επιτυχημένοι και αποτελεσματικοί θεωρούνται οι εμβολιασμοί κατά βακτηριακών ασθενειών και λιγότερο αποτελεσματικοί οι εμβολιασμοί αντιμετώπισης ιογενών ασθενειών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

«Πρόληψη των ασθενειών του εκτρεφόμενου λαβρακιού *Dicentrarchus labrax*, L. 1758»

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εκτροφή του λαβρακιού ασκείται εντατικά σε χερσαίες εγκαταστάσεις (εκκολαπτήρια και προ-πάχυνση) και σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς (πάχυνση). Η εντατικοποίηση της εκτροφής υδρόβιων οργανισμών έχει οδηγήσει στην εμφάνιση νέων παθογόνων μικροοργανισμών των ψαριών και στην πρόκληση διαφόρων ιογενών, βακτηριακών και παρασιτικών ασθενειών. Οι πιο σημαντικές βακτηριακές ασθένειες είναι η δονακίωση και η φωτοβακτηριδίαση που προκαλούνται από τα βακτήρια *Listonella (Vibrio) anguillarum* και *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, αντίστοιχα. Από την πρώτη περιγραφή τους σε προσβεβλημένα ψάρια και τα δύο παθογόνα έχουν γίνει ενδημικά στο θαλάσσιο περιβάλλον και επηρεάζουν τόσο άγρια όσο και εκτρεφόμενα ψάρια, κάνοντας αδύνατη την εφαρμογή οποιουδήποτε προγράμματος εξάλειψης. Από τα εκτρεφόμενα ψάρια, κυρίως το λαβράκι φαίνεται να είναι πολύ πιο ευαίσθητο από την τσιπούρα και στα δύο παθογόνα, προστατεύεται δε σε κάποιο βαθμό με τον εμβολιασμό και γενικά με τη λήψη μέτρων υγιεινής και ορθολογική διαχείριση (Athanosopoulou & Bitchava 2010).

3.1.1 Βακτηριακές νόσοι, εμβόλια και προβιοτικά βακτήρια

Όταν οι λειτουργίες ικανού αριθμού κυττάρων ενός οργανισμού αλλοιωθούν ή υποβαθμιστούν με αποτέλεσμα να επηρεαστεί ο οργανισμός στο σύνολό του, προκαλείται νόσος. Λοιμώδης νόσος ξεσπά όταν παθογόνοι οργανισμοί (π.χ. βακτήρια, μύκητες) ή ιοί ξένοι προς έναν οργανισμό εισβάλλουν και παρενοχλούν με τις δράσεις τους τις φυσιολογικές λειτουργίες πολλών κυττάρων του οργανισμού, με αποτέλεσμα να εμφανιστούν συμπτώματα μιας νόσου. Αυτό συμβαίνει όταν ο παθογόνος παράγοντας πολλαπλασιαστεί μέσα στον οργανισμό και καταστρέψει αρκετά κύτταρα ή εκκρίνει αρκετές τοξίνες. Στη φύση παρατηρείται ποικιλομορφία στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων οργανισμών και παθογόνων παραγόντων που εκδηλώνεται με τα διαφορετικά νοσήματα και την αντίστοιχη συμπτωματολογία τους. Για να εκδηλωθεί μια βακτηριακή λοιμώδης νόσος πρέπει το ψάρι να μολυνθεί από ικανό αριθμό μικροοργανισμών που συνιστούν τη μολυσματική δόση. Όσο μεγαλύτερη είναι η παθογόνος ικανότητα του βακτηρίου στο συγκεκριμένο είδος ψαριού τόσο μικρότερη μολυσματική δόση απαιτείται για να προκληθεί νόσος.

Όταν ένα είδος βακτηρίου που μολύνει ένα υγιές και όχι κάτω από καταπόνηση ψάρι προκαλεί πάντα τη νόσο που το χαρακτηρίζει, τότε θεωρείται υποχρεωτικώς ή πρωτογενώς παθογόνο. Αντίθετα, υπάρχουν και είδη βακτηρίων που συνυπάρχουν στο περιβάλλον των ψαριών ή επάνω στο δέρμα, στα βράγχια ή μέσα στο έντερό τους χωρίς να δημιουργούν πρόβλημα εφ' όσον η υγιεινή κατάσταση των ψαριών είναι καλή και δεν καταπονούνται. Προκαλούν νόσο όταν το περιβάλλον, η διαχείριση, η χορήγηση τροφής κ.λπ. στην μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας γίνονται με πλημμελείς τρόπους. Τα βακτήρια αυτά θεωρούνται δυνητικώς ή δευτερογενώς παθογόνα. Το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού των ψαριών μπορεί με τα ειδικά κύτταρά του να αποτυπώνει τμήματα από ορισμένες πρωτεΐνες των

βακτηριακών κυττάρων (αντιγόνα) και να παρασκευάζει ειδικές αντι-πρωτεΐνες (αντισώματα) που καταστρέφουν τα βακτήρια όταν τα ξανασυναντήσουν (ανοσία). Αυτή την φυσιολογική λειτουργία εκμεταλλεύεται ο ιχθυοκαλλιεργητής με τον εμβολιασμό.

Εμβόλιο είναι το υγρό εναιώρημα ζωντανών ή νεκρών παθογόνων μικροοργανισμών μετά από ειδική επεξεργασία, που όταν προσλαμβάνεται από τον οργανισμό των ψαριών διεγείρει το ανοσοποιητικό τους σύστημα και προκαλεί ανοσία απέναντι στους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς. Το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών χαρακτηρίζεται από την έμφυτη, φυσική ή μη ειδική άμυνα και την επίκτητη ή ειδική άμυνα. Η μη ειδική άμυνα που διαθέτουν τα ψάρια εκ γενετής απαρτίζεται από κυτταρικά και χυμικά συστατικά (κυτταρική και χυμική ανοσία), ενώ η ειδική άμυνα σχετίζεται με την παραγωγή αντισωμάτων μέσω μιας ειδικής αναγνώρισης των διαφόρων αντιγόνων και περιλαμβάνει και ορισμένα κυτταρικά στοιχεία. Η σημασία αυτών των δυο συστημάτων μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την ηλικία των ψαριών και επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Το ανοσοποιητικό σύστημα στα ψάρια συντίθεται από υπο-ομάδες λευκοκυττάρων, που περιλαμβάνουν τα Β και Τ λεμφοκύτταρα, τα κοκκιοκύτταρα, τα θρομβοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα μη ειδικά κυτταροτοξικά κύτταρα (Papadopoulos et al. 2008).

Κύρια χαρακτηριστικά των νεκρών βακτηριακών εμβολίων (bacterins) και της χρήσης τους είναι (Δαμάσκου & Καμπόλης 1998):

- Το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών πρέπει να είναι ώριμο για να μπορέσει να αντιδράσει (λαβράκι βάρους 1,5-2g).
- Απαιτούνται περίπου 2 εβδομάδες από τον εμβολιασμό για τη δημιουργία ανοσίας.
- Η ανοσία διαρκεί αρκετούς μήνες μέχρι και περισσότερο από έναν χρόνο.
- Είναι ακίνδυνα για τα ψάρια αφού δεν περιέχουν ζωντανά κύτταρα.
- Είναι στείρα και συνεπώς ασφαλή για το περιβάλλον.

Ο εμβολιασμός εκατομμυρίων ψαριών σε μονάδες υδατοκαλλιέργειας είναι μια πολύπλοκη και χρονοβόρα διαδικασία που συνεπάγεται υψηλό κόστος εργασίας, με αξιοσημείωτες απώλειες ψαριών λόγω του στρες και των τραυματισμών, ειδικά όταν χορηγούνται μεμονωμένα ενέσιμα εμβόλια. Συνήθως ο πρώτος εμβολιασμός πραγματοποιείται μέσω εμβάπτισης σε διάλυμα του εμβολίου όταν το μέγεθος των ψαριών είναι 1-2g και ο δεύτερος ενδοπεριτοναϊκός (ip) εμβολιασμός πραγματοποιείται όταν τα ψάρια φθάσουν 20-25g. Τροποποιήσεις του βασικού αυτού πρωτοκόλλου παρατηρούνται σε διάφορες επιχειρήσεις και σχετίζονται με το διαχειριστικό σχέδιο που εφαρμόζεται. Ο εμβολιασμός με εμβάπτιση οδηγεί στην ανάπτυξη κατά κύριο λόγο τοπικής ανοσίας στα επιθήλια (Thornton et al. 1994, Kusuda & Hamaguchi 1987), σε αντίθεση με τον ενδοπεριτοναϊκό εμβολιασμό που οδηγεί στην ανάπτυξη συστηματικής ανοσίας (Hjeltnes et al. 1989, Bakopoulos et al. 2003) και προστασία έναντι συστηματικής λοίμωξης. Εμπορικά εμβόλια έναντι είτε της δονακίωσης ή της φωτοβακτηριδίασης (που αποτελούνται από αδραντοποιημένα βακτηριακά κύτταρα) είναι διαθέσιμα εδώ και αρκετό καιρό με καλή προστασία που παρέχεται έναντι της δονακίωσης (Woo & Bruno 1999) και ποικίλα αποτελέσματα όσον αφορά την φωτοβακτηριδίαση, (Nakai et al. 1992, Le Breton 1999). Τα διδύναμα εμβόλια, που περιέχουν αντιγόνα δύο διαφορετικών παθογόνων οργανισμών, δεν διαφέρουν ποιοτικά από τα μονοδύναμα (αντιγόνα ενός παθογόνου οργανισμού), επειδή όμως πραγματοποιείται μια εφαρμογή αποφεύγονται το στρες και οι τραυματισμοί των ψαριών και κοστίζουν λιγότερο στις

επιχειρήσεις του κλάδου των ιχθυοκαλλιέργειών (λιγότερες ώρες εργασίας, μικρότερες απώλειες κ.λπ.).

Μία προτεινόμενη εναλλακτική λύση (αντί των αντιμικροβιακών και των εμβολίων) για τον έλεγχο της δονακίωσης είναι η χρήση προβιοτικών βακτηρίων ως παραγόντων μικροβιακού ελέγχου. Σύμφωνα με το Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων Αγροτικής Προέλευσης FAO/WHO (2009), τα προβιοτικά είναι: «ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες προσδίδουν ένα όφελος υγείας στο ξενιστή». Οι Fuller (1989) και Rolf (2000) καθόρισαν τα προβιοτικά ως ζωντανά μικροβιακά συμπληρώματα της τροφής τα οποία επιδρούν ωφελιμιστικά στο ζώο ξενιστή μέσω βελτίωσης της εντερικής ισορροπίας και του ανοσοποιητικού συστήματος, διεγείροντας τη σύνθεση βιταμινών του συμπλέγματος Β, προλαμβάνοντας την εισβολή ζημιογόνων μικροοργανισμών, παρέχοντας πεπτικά ένζυμα και αυξάνοντας τη παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων. Σύμφωνα με τον Metchnikoff (1907), τα προβιοτικά επιδρούν στον ξενιστή μέσω βελτίωσης της ισορροπίας των εντερικών μικροβίων, αναστέλλοντας έτσι παθογόνα και τοξινοπαραγωγά βακτήρια.

Η χρήση προβιοτικών στην υδατοκαλλιέργεια είναι αρκετά διαδεδομένη. Χρησιμοποιούνται κυρίως για να βελτιώσουν την υγεία των ψαριών και να ενδυναμώσουν το ανοσοποιητικό τους σύστημα και όχι για να δράσουν απευθείας πάνω σε ένα συγκεκριμένο παθογόνο. Σε πρόσφατες μελέτες τα προβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί για την ενδυνάμωση της εντερικής μικροχλωρίδας των ψαριών και για να προάγουν τον αμυντικό φραγμό ενάντια στις ασθένειες (Merrifield et al. 2010, Dimitroglou et al. 2011). Οι Gram et al. (1999) πέτυχαν κατά 46% μείωση της αθροιστικής θνησιμότητας μετά από πειραματική μόλυνση με *L. anguillarum* της ιριδιζουσας πέστροφας η οποία προηγουμένως είχε εμβαπτισθεί σε διάλυμα που περιείχε το αντιβακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* AH2. Στην ίδια μελέτη, εργαστηριακά πειράματα έδειξαν την ανταγωνιστική επίδραση του *P. fluorescens* πάνω στον διαθέσιμο σίδηρο στο υπόστρωμα, ο οποίος αποτελεί ένα βασικό συστατικό για την ανάπτυξη των *Vibrio*.

3.1.2 Μέθοδοι εμβολιασμού

Τα εμβόλια χορηγούνται στα ψάρια με διάφορες μεθόδους, από τις οποίες οι κυριότερες είναι με χορήγηση από το στόμα, με εμβάπτιση ή με ενδοπεριτοναϊκή ένεση. Κατά την εφαρμογή των εμβολιασμών οι μέθοδοι αυτές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την καταπόνηση και τους χειρισμούς που υφίστανται τα ψάρια, καθώς και ως προς τον χρόνο και την εργασία που απαιτείται για την εφαρμογή τους.

Η χορήγηση των εμβολίων από το στόμα, γίνεται με αντιγόνο που ενσωματώνεται στην τροφή, μέθοδος η οποία θα ήταν η ιδανική για τον εμβολιασμό των ψαριών, αλλά έχει το μειονέκτημα ότι ο βαθμός προστασίας που επιτυγχάνεται είναι μικρός και η ενσωμάτωση του εμβολίου στην τροφή είναι ακριβή και καταναλώνεται μεγαλύτερη ποσότητα εμβολίου σε σχέση με τις μεθόδους της εμβάπτισης και της ενδοπεριτοναϊκής ένεσης. Για να είναι επιτυχής αυτή η μέθοδος χρειάζεται συνήθως και αναμνηστική δόση. Για την προστασία του εμβολίου από τη δράση των οξέων της πεπτικής οδού και την αποφυγή υποβάθμισής του έχουν εφαρμοστεί διάφορες τεχνικές, όπως η εγκύστωση του αντιγόνου μέσα σε λιπосώματα ή αλγινικά σωματίδια, η ουδετεροποίηση των γαστρικών εκκρίσεων ή η εφαρμογή εμβολίων biofilm (Papadopoulos et al. 2008).

Η εμβάπτιση, είναι μια καθιερωμένη πρακτική στις υδατοκαλλιέργειες και χρησιμοποιείται για παράδειγμα σε εμπορικά εμβόλια για παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως *Vibrio* spp. και *Photobacterium damsela* spp. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ χρήσιμη για μαζικούς εμβολιασμούς ψαριών και ειδικότερα ψαριών μικρού μεγέθους. Τα ψάρια βυθίζονται για 20-30 δευτερόλεπτα σε δεξαμενή που περιέχει το διαλυμένο εμβόλιο και κατά συνέπεια ο χρόνος που διαρκεί ο εμβολιασμός είναι μικρός και ελαχιστοποιεί την καταπόνηση που υφίστανται τα ψάρια. Το εμβόλιο εφαρμόζεται εξωτερικά στα ψάρια χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές, που περιλαμβάνουν τον ψεκάσμο και την άμεση εμβάπτιση. Το αντιγόνο στη συνέχεια εισέρχεται στο σώμα των ψαριών μέσω του δέρματος ή των βραγχίων. Η συγκέντρωση του εμβολίου στη δεξαμενή και η διάρκεια της έκθεσης των ψαριών είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες, που επηρεάζουν την τελική ανοσία. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της εμβάπτισης είναι ότι η είσοδος του εμβολίου στον οργανισμό των ψαριών γίνεται από τις ίδιες οδούς που χρησιμοποιούν πολλοί παθογόνοι παράγοντες, ενεργοποιώντας έτσι και την τοπική ειδική ανοσία της βλέννας, όπου για παράδειγμα, είναι πολύ πιθανή η συνάντηση με έναν παθογόνο παράγοντα. Η μέθοδος αυτή εμφανίζει και κάποια μειονεκτήματα καθώς χρησιμοποιείται μεγαλύτερη ποσότητα εμβολίου και η διάθεση, στη συνέχεια του εμβολίου που περισσεύει δημιουργεί πρόβλημα. Η συστημική ανοσολογική ανταπόκριση που επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της εμβάπτισης είναι γενικά λιγότερο έντονη και μικρότερης διάρκειας σε σχέση με αυτήν που επιτυγχάνεται μέσω του εμβολιασμού με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση. Η διαδικασία του εμβολιασμού με άμεση εμβάπτιση περιλαμβάνει τον διαχωρισμό και περιορισμό μεγάλων ομάδων ψαριών με τη βοήθεια σάκων μέσα στους οποίους προστίθεται η κατάλληλη δόση διαλυμένου αναισθητικού, ενώ ταυτόχρονα γίνεται συνεχώς παροχή οξυγόνου ή αέρα για να αποφευχθεί τυχόν ανοξία, στη συνέχεια υπολογίζεται, με βάση την εκτιμώμενη βιομάζα των ψαριών, η ποσότητα του κατάλληλου εμβολίου (συνήθως για 100 kg ψαριών χρειάζεται 1 λίτρο εμβολίου) και διαλύεται σε νερό, σε αναλογία 1 προς 10, μέσα σε κατάλληλο δοχείο στο οποίο παρέχεται πάλι οξυγόνο για να περιοριστεί η καταπόνηση των ψαριών. Τα αναισθητοποιημένα ψάρια μεταφέρονται κατόπιν διαλογής κατά μέγεθος πίσω στις δεξαμενές τους, όπου υπάρχει κατάλληλη οξυγόνωση (Papadopoulos et al. 2008).

Με τον εμβολιασμό με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση διασφαλίζεται καλύτερη και μεγαλύτερη σε διάρκεια προστασία. Ο εμβολιασμός με αυτήν τη μέθοδο έχει το πλεονέκτημα ότι εξασφαλίζει τη χορήγηση της σωστής δόσης εμβολιακού αντιγόνου σε κάθε ψάρι. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί λιγότερη ποσότητα εμβολίου σε σχέση με τις άλλες μεθόδους (μειώνονται έτσι οι απώλειες του εμβολίου), ωστόσο είναι κατάλληλη για εφαρμογή μόνο σε ψάρια μεγέθους άνω των 6-7 g. Απαιτεί εντατική εργασία, είναι ακριβή μέθοδος και επειδή χρησιμοποιούνται πηκτά ελαιώδη έκδοχα μπορεί να προκληθούν συμφύσεις στα ψάρια (στο σημείο που εγχύεται) αν δεν χορηγηθεί σωστά. Κατά τη διαδικασία του εμβολιασμού με ενδοπεριτοναϊκή ένεση, ομάδες ψαριών διαχωρίζονται και απομονώνονται από τα υπόλοιπα ψάρια του κλωβού, όπως ακριβώς και κατά τη διαδικασία της εμβάπτισης, αλλά λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους, χρειάζεται πολύ μεγάλη φροντίδα κατά τη διάρκεια της χορήγησης των αναισθητικών, καθώς όσο μεγαλύτερο είναι το ψάρι τόσο αυξάνεται ο κίνδυνος τραυματισμών λόγω της καταπόνησης. Μετά την αναισθητοποίηση, μικρές ομάδες ψαριών συλλαμβάνονται και τοποθετούνται σε δεξαμενή που περιέχει διάλυμα αναισθητικού, αλλά σε υψηλότερη δόση, μέχρι να ακινητοποιηθούν τελείως. Τα αναισθητοποιημένα ψάρια μεταφέρονται στη συνέχεια σε ειδικό «τραπέζι εμβολιασμού», που αποτελείται από μια ή

περισσότερες λεκάνες γεμάτες με νερό όπου τα αναισθητοποιημένα ψάρια χειρίζονται από τα άτομα που κάνουν τον εμβολιασμό. Μια συγκεκριμένη δόση εμβολίου, ανάλογα με το μέγεθος των ψαριών, εγχέεται στην κοιλιακή περιοχή κάθε ψαριού, και χρησιμοποιούνται ειδικά αυτόματα πιστόλια εμβολιασμού για την αποφυγή τραυματισμών. Στη συνέχεια, τα εμβολιασμένα ψάρια ελευθερώνονται πίσω στις δεξαμενές τους (πραγματοποιείται παράλληλα διαλογή μεγέθους) όπου γίνεται ανάνηψη από την αναισθησία μέσα σε λίγα λεπτά. Συνήθως το τραπέζι εμβολιασμού είναι κατασκευασμένο με τέτοιο τρόπο, ώστε να επιτρέπει την ταυτόχρονη ταξινόμηση των ψαριών σε ομάδες με βάση το μέγεθος τους και στη συνέχεια την απελευθέρωση τους σε ξεχωριστά κανάλια μέσα στα οποία αντλείται νερό που παρασύρει τα ψάρια κατά μήκος σωλήνων που τα οδηγούν σε διαφορετικά κλουβιά. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχει και η μέθοδος εμβολιασμού με ενδομυϊκή ένεση, αλλά χρησιμοποιείται σπάνια (Paradopoulos et al. 2008).

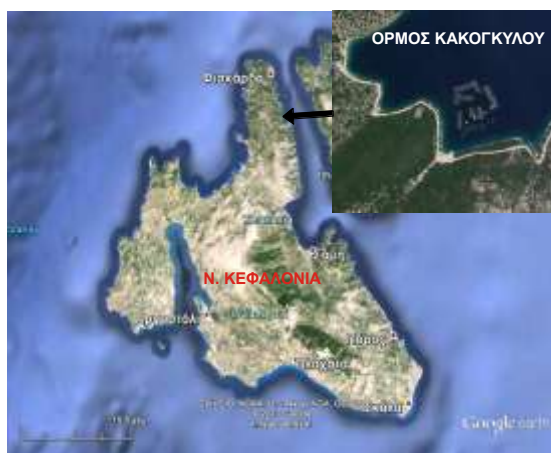
3.1.3 Σύνοψη-Σκοπός

Σκοπός του τρίτου μέρους είναι η πρόληψη των ασθενειών του εκτρεφόμενου λαβρακιού που προκαλούνται από το βακτήριο *Listonella anguillarum* (κυρίως ορότυπος O1) και Phdp, μέσω εφαρμογής εμβολιασμών και σύγκρισης της αποτελεσματικότητας δύο ενέσιμων διδύναμων (*Vibrio* - *Photobacterium*) εμπορικών εμβολίων σε πραγματικές συνθήκες. Στόχος αυτού του τμήματος της μελέτης είναι να αξιολογήσει σε πραγματικές και σε πειραματικές συνθήκες δύο ενέσιμα διδύναμα (έναντι των *Vibrio* και *Photobacterium*) εμπορικά διαθέσιμα εμβόλια στην Ελλάδα, έναντι των αντίστοιχων ασθενειών στο λαβράκι, όσον αφορά την προστασία από φυσικές και πειραματικές λοιμώξεις, την ανοσοαπόκριση των ψαριών, την ανάπτυξη τοπικών αντιδράσεων στην κοιλιακή κοιλότητα στο σημείο της έγχυσης και την ανάπτυξη των ψαριών.

3.2 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Περιοχή μελέτης (ΒΑ Κεφαλονιά-Όρμος Κακογκύλου)

Η μελέτη των πειραματικών εμβολιασμών βασίστηκε σε συγκεκριμένη παρτίδα εκτρεφόμενου λαβρακιού, μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας η οποία λειτουργεί στον Όρμο Κακογκύλου στη ΒΑ Κεφαλονιά (σχήμα 3.1) και σε πληθυσμό με εμβολιασμένα (με 2 διδύναμα εμπορικά εμβόλια) ψάρια και μη εμβολιασμένα. Διήρκεσε από τον Ιούλιο του 2013 έως το καλοκαίρι του 2014.



Σχήμα 3.1 Περιοχή μελέτης.

Η μονάδα στην οποία πραγματοποιήθηκε η μελέτη (σχήμα 3.1), ιδρύθηκε το 1991 και έκτοτε λειτουργεί ανελλιπώς. Δραστηριοποιείται σε μισθωμένη θαλάσσια έκταση 22,5 στρεμμάτων και η ετήσια δυναμικότητά της είναι 320 τόνοι. Στην εν λόγω μονάδα εκτρέφονται κυρίως λαβράκι και τσιπούρα, αλλά και σε μικρότερη κλίμακα άλλα μεσογειακά ψάρια. Η μονάδα είναι θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια πάχυνσης ψαριών και

προμηθεύεται γόνο για τις ανάγκες της από ιχθυογεννητικούς σταθμούς που δραστηριοποιούνται στην Ελλάδα, αλλά και από το εξωτερικό (μεσογειακές χώρες). Τα ψάρια που παράγονται συσκευάζονται σε ιδιόκτητο συσκευαστήριο και το μεγαλύτερο ποσοστό της παραγωγής εξάγεται σε χώρες του εξωτερικού.

3.2.2 Χορηγούμενη τροφή

Η τροφή που χορηγείτο στα ψάρια ήταν σε μορφή συμπήκτων (peletts) και οι κατηγορίες μεγέθους της τροφής ήταν σε συνάρτηση με το μέγεθος των ψαριών. Όλα τα ψάρια της μονάδας ταιΐζονταν καθημερινά. Η ιχθυοτροφή ήταν επώνυμης εταιρείας παραγωγής ιχθυοτροφών.

Στον παρακάτω πίνακα (3.1) δίνονται στοιχεία για την χορηγούμενη τροφή σε 5 διαφορετικές κλάσεις βάρους ψαριών.

Πίνακας 3.1 Χορηγούμενη τροφή σε 5 κλάσεις βάρους ψαριών στην υπό μελέτη μονάδα.

Κλάση βάρους ψαριών	Χορηγούμενη τροφή
2-10 g	PERLA 0 (1,2-1,7 XIL)
10-20 g	PERLA-T (1,9 XIL)
20-100 g	OPTIBASS 1P (2,5 XIL)
100-200 g	OPTIBASS 2P (4 XIL)
200-500 g	OPTIBASS 3P (6 XIL)

3.2.3 Εμπορικά εμβόλια

Τα δύο διδύναμα εμπορικά εμβόλια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη είναι τα Alphaject 2000 και Aquanac, τα οποία έχουν τα χαρακτηριστικά που αναφέρονται παρακάτω. Και τα δύο εμβόλια είναι διδύναμα, δηλαδή περιέχουν αντιγόνα από δύο διαφορετικούς παθογόνους μικροοργανισμούς το *L. anguillarum* (ορότυπος O1) και το Phdp και κατά συνέπεια αυτά τα εμβόλια χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση δύο παθογόνων μικροοργανισμών συμβάλλοντας στην ενεργητική προστασία των ψαριών, στην περίπτωση μας, της δονακίωσης και της φωτοβακτηριδίασης που προκαλούνται από αυτούς τους μικροοργανισμούς.

ALPHA JECT™ 2000

Το εμβόλιο Alphaject 2000, είναι μία νέα σύνθεση εμβολίου για ενδοπεριτοναϊκό (ip) εμβολιασμό, το οποίο περιέχει αδρανοποιημένα βακτήρια με φορμόλη του είδους *L. anguillarum* (ορότυπος O1) και Phdp σε ποσότητα 2×10^9 κύτταρα/ml συνολικά και περιέχει ως ανοσοενισχυτικό ορυκτό έλαιο. Η συνιστώμενη δόση ενέσιμου διαλύματος ανά άτομο είναι 100μl ή 0,1ml.

Σύμφωνα με την παρασκευάστρια εταιρεία, το εμβόλιο έχει μορφή γαλακτώματος (νερό σε λάδι) κρεμμώδους χρώματος. Οι φαρμακολογικές ιδιότητες του εμβολίου είναι ότι διεγείρει την ενεργητική ανοσία ενάντια στο *L. anguillarum* (ορότυπος O1) και στο Phdp. Τα λαβράκια

εμβολιάζονται σε μέγεθος 15 g και μεγαλύτερα. Το εμβόλιο αυτό προλαμβάνει τη θνησιμότητα και τα κλινικά συμπτώματα που προκαλούνται από τα δύο αυτά βακτήρια. Εξαιτίας της καταπόνησης από τους χειρισμούς, μετά τον εμβολιασμό μπορεί να ακολουθήσει πρόσκαιρη μείωση της όρεξης που είναι δυνατόν να οδηγήσει σε παροδική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται κατά τον εμβολιασμό πρέπει να απολυμαίνεται πριν τη χρήση και να μην χορηγείται αυτό το προϊόν σε ψάρια που έχουν ήδη εμβολιαστεί. Ψάρια με κλινικά συμπτώματα ασθένειας δεν πρέπει να εμβολιάζονται. Σε κάθε πληθυσμό θα υπάρχει και ένας μικρός αριθμός ατόμων, που θα αποτυγχάνει να ανταποκριθεί στον εμβολιασμό. Περιστασιακή θνησιμότητα μπορεί να παρατηρηθεί σε ιχθύδια τα οποία απέτυχαν να ανταποκριθούν ή το ανοσοποιητικό τους σύστημα έχει κατασταλεί από άλλες ταυτόχρονες μολύνσεις, φτωχό επίπεδο θρέψης, γενετικούς παράγοντες ή άλλες στρεσογόνες περιβαλλοντικές συνθήκες. Δεν υπάρχει καμία γνωστή αλληλεπίδραση με άλλα κτηνιατρικά φαρμακευτικά προϊόντα και άλλες μορφές αλληλεπίδρασης. Δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα στην παράλληλη χρήση του εμβολίου με άλλα προϊόντα. Συστήνεται όμως κανένα άλλο εμβόλιο να μην χορηγείται για διάστημα 14 ημερών πριν ή μετά τον εμβολιασμό με αυτό το προϊόν (Λασπά 2013).

Συστήνεται το ακόλουθο εμβολιακό πρόγραμμα. Ο πρώτος και ο δεύτερος εμβολιασμός να διενεργούνται με εμβάπτιση (Alpha Dip 2000) σε ψάρια με μέσο βάρος 1 και 5 g περίπου. Ο τρίτος εμβολιασμός διενεργείται με ένεση (AlphaJect 2000) σε ψάρια με ελάχιστο βάρος 15 g. Συστήνεται η διακοπή χορήγησης τροφής για τουλάχιστον 24 ώρες και τα ψάρια πρέπει να αναισθητοποιούνται πριν από την ένεση. Το εμβόλιο πρέπει να αφήνεται να φτάσει σε θερμοκρασία 15-20°C και να ανακινείται καλά πριν τη χρήση. Είναι σημαντικό ολόκληρη η δόση να εναποτεθεί στη κοιλιακή κοιλότητα. Το συνολικό μήκος της βελόνας θα πρέπει να εισαχθεί στη μέση γραμμή, περίπου ένα με ενάμισι μήκος κοιλιακού πτερυγίου, εμπρός από τη βάση των κοιλιακών πτερυγίων. Η βελόνα πρέπει να διαπεράσει το κοιλιακό τοίχωμα κατά 1-2mm. Δεν είναι γνωστή καμία υπερδοσολογία, και δεν υπάρχουν ειδικές προειδοποιήσεις για κάθε είδος - στόχο. Ο χρόνος αναμονής είναι μηδέν ημέρες. Δεν πρέπει να αναμιγνύεται με άλλα προϊόντα. Η διάρκεια ζωής του εμβολίου είναι 2 έτη, όμως μετά το άνοιγμα του περιέκτη όλο το περιεχόμενο θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια εργάσιμη ημέρα. Το προϊόν πρέπει να φυλάσσεται στους 2-8°C, να μην καταψύχεται και να μην εκτίθεται στο ηλιακό φως. Η μεταφορά πρέπει να διεκπεραιώνεται κάτω από τις συνιστώμενες συνθήκες. Ο περιέκτης είναι φιάλη 500ml από πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HOPE) που σφραγίζεται με ελαστικό πώμα και καπάκι από αλουμίνιο (Λασπά 2013).

AQUA VAC™ *Vibrio-Pasteurella*

Το εμβόλιο Aquavac, είναι ένα υδατικό εναιώρημα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε εμβάπτιση όσο και σε ενδοπεριτοναϊκό (ip) εμβολιασμό. Περιέχει αδρανοποιημένα βακτήρια με φορμόλη του είδους *L. (Vibrio) anguillarum* (ορότυπος 01) και Phdp σε 2×10^9 κύτταρα/ml στο σύνολο και είναι ένα υδατικό διάλυμα χωρίς ανοσοενισχυτικό. Η συνιστώμενη δόση ενέσιμου διαλύματος ανά άτομο είναι 100 μl ή 0,1ml.

Έκδοχο είναι η υπολειμματική φορμαλδεΰδη, όχι περισσότερη από 0,5 mg ανά ml και όχι περισσότερη από 0,05 mg ανά 0,1 ml δόσης. Σύμφωνα με τον παρασκευαστή, το εμβόλιο χρησιμοποιείται για την ενεργητική ανοσοποίηση στο λαβράκι ενάντια στη δονακίωση και στη παστερέλλωση, που προκαλούνται από τους μικροοργανισμούς *L. (Vibrio) anguillarum* και

Phdp και τελικά για τη μείωση της θνησιμότητας στο λαβράκι. Ο χρόνος ανάπτυξης προστατευτικής ανοσίας εξαρτάται από τη θερμοκρασία του νερού. Σε θερμοκρασία νερού 12-15°C, θα πρέπει να επιτραπεί χρόνος τουλάχιστον 28 ημερών μεταξύ του εμβολιασμού και της αναμενόμενης έκθεσης στη λοίμωξη για την ανάπτυξη πλήρους ανοσίας (Λασπά 2013).

Δεν πρέπει να πραγματοποιείται εμβολιασμός σε ψάρια για τα οποία υπάρχει η υποψία πως έχουν ήδη επιμολυνθεί με τους μικροοργανισμούς *V. anguillarum* και Phdp. Το εμβόλιο που βρίσκεται στον περιέκτη πρέπει να ανακινείται καλά πριν τη χρήση και να εμβολιάζονται μόνο υγιή ψάρια. Ως προς τη δοσολογία και τον τρόπο χορήγησης, το εμβόλιο χορηγείται σε λαβράκι με ελάχιστο βάρος 25 g και η δόση είναι 0,1 ml. Κατά τη χορήγηση τα ψάρια θα πρέπει να αναισθητοποιούνται, πριν από τον εμβολιασμό. Η χορήγηση εφαρμόζεται με ενδοπεριτοναϊκή ένεση σε μήκος μισό με ένα πτερύγιο απόσταση μπροστά από τα πνευτικά πτερύγια. Δεν πρέπει να πραγματοποιείται εμβολιασμός σε ψάρια για τα οποία υπάρχει η υποψία πως έχουν ήδη δονακίωση ή παστερέλλωση. Το προϊόν αποθηκεύεται μεταξύ 2-8°C, δεν πρέπει να καταψύχεται και θα πρέπει να προστατεύεται από το φως. Το εμβόλιο παρέχεται μέσα σε μια φιάλη 500 ml από υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο, με ελαστικό πώμα φαρμακευτικής χρήσης που διατηρείται στη θέση του με στεγανοποιητικό κάλυμμα από πλαστικό και αλουμίνιο (Λασπά 2013).

3.2.4 Εμβολιασμός ομάδων ψαριών μελέτης-Περιγραφή της μεθόδου

Η μελέτη ξεκίνησε στα μέσα της άνοιξης του 2013 με την εισαγωγή στην πάχυνση γόνου λαβρακιού 203.974 ατόμων, με μέσο βάρος 2,3-3,05 g. Το σύνολο του πληθυσμού των ψαριών χωρίστηκε σχεδόν ισομερώς σε 6 κλωβούς. Όλα τα ψάρια ακολούθησαν τη διαδικασία παραγωγής της μονάδας. Στη συνέχεια, στο τέλος Ιουλίου και στις αρχές Αυγούστου έγιναν οι εμβολιασμοί (εικόνα 3.1), αφού χωρίστηκαν οι 6 κλωβοί του



Εικόνα 3.1 Ενδοπεριτοναϊκός (i.p) εμβολιασμός ψαριών (φωτογραφία Ε. Σπίνος).

μελετούμενου πληθυσμού σε δύο παρτίδες μεγέθους ψαριών, αποτελούμενη η κάθε μία από 3 κλωβούς, μεσαίου και μικρού μεγέθους. Δύο κλωβοί εμβολιάστηκαν με το εμπορικό εμβόλιο Alphaject 2000, δύο κλωβοί με το εμπορικό εμβόλιο Aquanac και δύο κλωβοί (με τον ίδιο όπως παραπάνω αριθμό ψαριών) που περιείχαν μη εμβολιασμένα ψάρια χρησίμευσαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Την παρτίδα μεσαίου μεγέθους ψαριών αποτελούσαν κλωβοί με ψάρια εμβολιασμένα με το εμβόλιο Alphaject

2000, με το εμβόλιο Aquanac και ένας κλωβός μάρτυρας και αντίστοιχα την παρτίδα μικρού μεγέθους ψαριών αποτελούσαν κλωβοί με ψάρια εμβολιασμένα με το εμβόλιο Alphaject 2000, με το εμβόλιο Aquanac και ένας κλωβός μάρτυρας.

Έτσι από τον αρχικό πληθυσμό των ψαριών δημιουργήθηκαν 6 ομάδες οι οποίες τοποθετήθηκαν σε αντίστοιχο αριθμό κλωβών (σχήμα 3.2). Η 1^η ομάδα με 19.544 ψάρια (μέσου βάρους 40g) μεσαίου μεγέθους, εμβολιάστηκε με το ελαιώδες εμβόλιο Alphaject 2000 και ονομάστηκε AJ1. Η 2^η ομάδα με 19.435 ψάρια (μέσου βάρους 30g) μικρού μεγέθους, εμβολιάστηκε με το ελαιώδες Alphaject 2000 εμβόλιο και ονομάστηκε AJ2. Η 3^η ομάδα με 21.490 ψάρια (μέσου βάρους 40g) μεσαίου μεγέθους, εμβολιάστηκε με το υδατικό εμβόλιο Aquanac και ονομάστηκε AV1. Η 4^η ομάδα με 21.550 ψάρια (μέσου βάρους 30g) μικρού μεγέθους, εμβολιάστηκε με το υδατικό εμβόλιο Aquanac και ονομάστηκε AV2. Η 5^η ομάδα με 13.172 ψάρια (μέσου βάρους 30g) μεσαίου μεγέθους, δεν εμβολιάστηκε ήταν ομάδα με ψάρια μάρτυρες (Control) και ονομάστηκε AB1. Η 6^η ομάδα με 11.388 ψάρια (μέσου βάρους 30g) μικρού μεγέθους, δεν εμβολιάστηκε ήταν ομάδα με ψάρια μάρτυρες (Control) και ονομάστηκε AB2.

Στον πίνακα 3.2 δίνονται, τα μέσα βάρη των ψαριών και ο αριθμός τους μέχρι τον εμβολιασμό, καθώς και η χορηγηθείσα ποσότητα τροφής. Δίνονται επίσης στοιχεία για τις ομάδες των ψαριών A και B, από τις οποίες προήλθαν 4 υποομάδες (κλωβοί) με ψάρια τα οποία εμβολιάστηκαν. Τα ψάρια εμβολιάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες που δίνονται από τον παρασκευαστή για τα εμβόλια που χρησιμοποιήθηκαν (παρακάτω) στις αρχές Αυγούστου του 2013.



Σχήμα 3.2 Διάταξη κλωβών της Ιχθυοκαλλιέργειας στην ΒΑ Κεφαλονιά. Τα βέλη δείχνουν τους κλωβούς στους οποίους βρίσκονταν τα ψάρια των πειραματικών ομάδων (από αριστερά AJ1, AV1, AJ2, AV2, AB1, AB2).

Πίνακας 3.2 Ομάδες ψαριών, αριθμός ψαριών, μέσα βάρη και καταναλωθείσα τροφή, μέχρι τον εμβολιασμό.

Ομάδα ψαριών	Κλωβοί	Ημερομηνία	Μέσο βάρος (g)	Αριθμός ψαριών	Καταναλωθείσα τροφή (Kg)
A	AJ1 (AlphaJect), AJ2 (AlphaJect), AB1 (Control)			101.835	3.720,00
		10/04	2,30		
		04/05	5,37		
		01/06	12,00		
		06/07	31,00		
		16/07	34,00		
B	AV1 (AquaVac), AV2 (AquaVac), AB2 (Control)			102.139	3.630,00
		28/04	3,05		

04/05	4,14
01/06	10,30
06/07	26,70
16/07	31,00
26/07	39,00

3.2.4.1 Χειμερινός εμβολιασμός

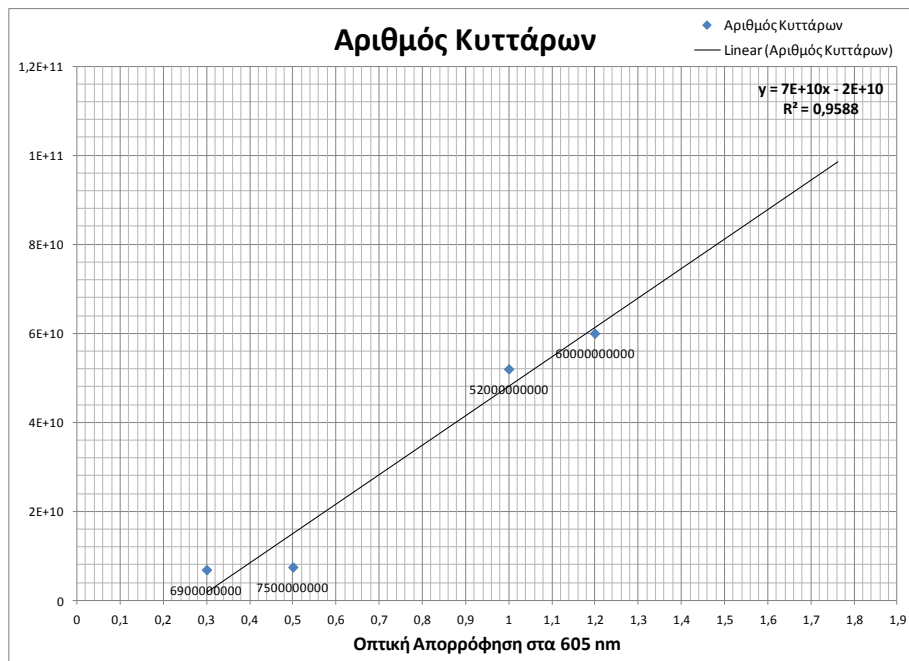
Επιπλέον των παραπάνω εμβολιασμών και προκειμένου μελετηθεί και τεκμηριωθεί η δραστηριότητα των εμβολιασμών όταν αυτοί πραγματοποιούνται το χειμώνα με την θερμοκρασία του νερού σε χαμηλές τιμές, στις 30/1/2014 σε λαβράκια που επρόκειτο να εμβολιαστούν με το εμβόλιο Alphaject 2000 έγινε αιμοληψία (προ-άνοσος ορός – αρνητικό δείγμα). Κατόπιν, μετά τον εμβολιασμό έγιναν 12 αιμοληψίες, στις 5/2/2014 σε 9 ψάρια μέσου βάρους 59,81g, στις 15/2/2014 σε 12 ψάρια μέσου βάρους 73,09g, στις 22/2/2014 σε 12 ψάρια μέσου βάρους 72,89g, στις 15/3/2014 σε 12 ψάρια μέσου βάρους 75,19g, στις 28/4/2014 σε 12 ψάρια μέσου βάρους 84,19g, στις 31/5/2014 σε 12 ψάρια μέσου βάρους 92,13g, στις 28/6/2014 σε 12 ψάρια μέσου βάρους 120,58g, στις 7/7/2014 σε 12 ψάρια μέσου βάρους 108,11g, στις 26/7/2014 σε 12 ψάρια μέσου βάρους 125,95g, στις 30/8/2014 σε 12 ψάρια μέσου βάρους 158,85g, στις 4/10/2014 σε 12 ψάρια μέσου βάρους 209,81g και στις 10/11/2014 σε 12 ψάρια μέσου βάρους 225,89g. Η συγκεκριμένη μελέτη διήρκησε 316 ημέρες και ο εμβολιασμός ονομάστηκε «χειμερινός εμβολιασμός». Ακολούθησε η ανάλυση του ορού του αίματος από την ομάδα ψαριών που προήλθαν από τον χειμερινό εμβολιασμό, με το εμπορικό εμβόλιο Alphaject 2000 και μελετήθηκε η ανοσοαπόκριση των ψαριών σε σχέση με το χρόνο. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για να μελετηθεί κατά πόσο τα ψάρια που εμβολιάζονται τον χειμώνα είναι προστατευμένα από βακτηριακές ασθένειες τους ανοιξιάτικους και καλοκαιρινούς μήνες που αυξάνεται η θερμοκρασία του νερού (μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης ασθενειών), καθώς και η διάρκεια ανοσίας τους.

3.2.5 Βακτήρια

Δύο βακτηριακά είδη χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της μελέτης. Ένα στέλεχος του *L. anguillarum* (ορότυπος O1) που απομονώθηκε από λαβράκι το 2013 στη Δυτική Ελλάδα και ένα στέλεχος του *Phdp* που απομονώθηκε από λαβράκι το 2012 από μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας στο νησί της Εύβοιας. Αμφότερα τα βακτηριακά είδη κατά την άφιξη στο εργαστήριο καλλιεργήθηκαν σε αποστειρωμένο ζωμό καρδιάς εγκεφάλου (BHIB) (Oxoid) με 2% NaCl και σε άγαρ τρυπτόνης σόγιας (Oxoid) 2% NaCl. Τα βακτηριακά είδη επιβεβαιώθηκαν χρησιμοποιώντας το σύστημα API 20E (Biomerieux) ακολουθώντας τις οδηγίες του παρασκευαστή, αλλά χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο 2% NaCl ως αραιωτικό (Bakopoulos et al. 1995a). Τα βακτήρια κατόπιν διατηρήθηκαν στους -85°C χρησιμοποιώντας cryobeads (Protect, UK) σε υπερκαταψύκτη Thermo Scientific HFU B.

Για τις πειραματικές μολύνσεις ένα cryobead τοποθετήθηκε σε 5 ml αποστειρωμένου BHIB 2% NaCl και τα βακτήρια αφέθηκαν να αναπτυχθούν στους 21°C σε επωαστήρα (Labtech, Daihan Ltd, Κορέα) υπό ήπια ανάδευση. Όταν η ανάπτυξη ήταν ορατή, ολόκληρη η επιφάνεια τρυβλίων petri με BIHA 2% NaCl ενοφθαλμίσθηκε και τα βακτήρια αφέθηκαν να

φτάσουν σε μέγιστη ανάπτυξη στις ίδιες συνθήκες για 24-48 ώρες. Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέχθηκαν από την επιφάνεια του μέσου καλλιέργειας χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο 2% NaCl. Η καταμέτρηση των βακτηριακών κυττάρων σε διάλυση διεξήχθη χρησιμοποιώντας την οπτική πυκνότητα (OD) στα 605 nm σε φωτόμετρο (U-2900, Hitachi, Ιαπωνία) χρησιμοποιώντας προηγουμένως κατασκευασμένες πρότυπες καμπύλες που βασίστηκαν στη σχέση της OD_{605} και του αριθμού βακτηριακών κυττάρων που βρίσκονταν σε διάλυση με τη μέθοδο μέτρησης βακτηριακών αποικιών στην επιφάνεια πετρί (σχήμα 3.3) (Spinos & Bakoroulos 2014). Οι επιθυμητοί αριθμοί βακτηριακών κυττάρων/ml σε διάλυμα επιτεύχθηκαν με κατάλληλες αραιώσεις του προϊόντος έκπλυσης Petri με αποστειρωμένο 2% NaCl. Αμέσως μετά, τα βακτηριακά διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές μολύνσεις.



Σχήμα 3.3 Πρότυπη καμπύλη με την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση των βακτηρίων σε εναιώρημα με στείρο NaCl 2% και προσδιορισμός του αριθμού των βακτηρίων.

3.2.6 Μεταφορά ψαριών

Για την πραγματοποίηση της μελέτης σε πειραματικές συνθήκες, μεταφέρονταν ψάρια από τη μονάδα μέσα σε πλαστικά δοχεία (εικόνα 3.2) των 75 l, χωριστά η κάθε ομάδα. Για την ασφαλή μεταφορά των ψαριών διοχετεύονταν αναισθητικό διάλυμα 0,2% φαινοξυαιθανόλης (1ml σε κάθε δοχείο), για την αποφυγή στρες και τραυματισμών κατά την μεταφορά. Σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας στο νερό διοχετεύονταν με αεραντλίες αέρας και γινόταν έλεγχος και καταγραφή της τιμής του διαλυμένου οξυγόνου, έτσι ώστε να μην μειωθεί κάτω από 4,0 mg/l. Στη συνέχεια τα ψάρια μεταφέρονταν σε ειδικά διαμορφωμένο εργαστηριακό χώρο που βρίσκονταν



Εικόνα 3.2 Μεταφορά ψαριών (φωτογραφία Ε. Σπίνος).

γυάλινα ενυδρεία των 250 l. Τα ψάρια παρέμεναν για δυο ημέρες στα δοχεία για εγκλιματισμό μέχρι την έναρξη των πειραματικών μολύνσεων.

3.2.7 Προσδιορισμός του Lethal Dose (LD₅₀₋₇₀)

Επτά (7) ομάδες 16-20 ψαριών από την ομάδα των μαρτύρων, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο κάτω από αναισθησία (0,5% φαινοξυαιθανόλη) και τοποθετήθηκαν σε ενυδρεία χωρητικότητας 250 l (εικόνα 3.4) (Α΄ δοκιμαστική πειραματική μόλυνση). Τα ψάρια εγκλιματίστηκαν επί 2 ημέρες, αναισθητοποιήθηκαν και μολύνθηκαν με 1 ml/ψάρι με διάφορες δόσεις βακτηριακών κυττάρων *L. anguillarum* O1 ($1,033 \times 10^3$, $1,033 \times 10^5$ και $1,033 \times 10^7$ κύτταρα/ml) ή Phdp ($4,083 \times 10^3$, $4,083 \times 10^5$ και $4,083 \times 10^7$ κύτταρα/ml). Στους μάρτυρες έγινε έγχυση 1ml/ψάρι αποστειρωμένου NaCl 2%. Αυτό συνέβη προκειμένου να τυποποιηθεί η πειραματική διαδικασία μόλυνσης και να υπολογιστούν οι μολυσματικές δόσεις για κάθε βακτήριο που να είναι σε θέση να προκαλέσουν θνησιμότητα που να κυμαίνεται μεταξύ 50-70% (LD₅₀₋₇₀) στην ομάδα μαρτύρων (control). Η θερμοκρασία του νερού των ενυδρείων στην Α΄ δοκιμαστική πειραματική μόλυνση κυμάνθηκε στους $23,2 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και κατά την Β΄ δοκιμαστική πειραματική μόλυνση με επτά (7) ομάδες των 8 ψαριών από την ομάδα μαρτύρων. Τα ψάρια μολύνθηκαν με 1 ml/ψάρι με διάφορες δόσεις βακτηριακών κυττάρων *L. anguillarum* O1 ($2,242 \times 10^3$, $2,242 \times 10^5$ και $2,242 \times 10^7$ κύτταρα/ml) ή Phdp ($5,588 \times 10^3$, $5,588 \times 10^5$ και $5,588 \times 10^7$ κύτταρα/ml). Η θερμοκρασία του νερού των ενυδρείων στην Β΄ δοκιμαστική πειραματική μόλυνση κυμάνθηκε στους $19 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Σε διάφορες μελέτες έχει αναφερθεί και για τις δύο ασθένειες την δονακίωση και την φωτοβακτηριδίαση, ότι μπορεί να παρατηρηθούν περιστασιακά σε χαμηλές θερμοκρασίες ακόμη και των $10-12^\circ\text{C}$ (Larsen 1983, Austin & Austin 2007, Angelidis 2014) και προκειμένου να προσομοιωθούν οι συνθήκες πεδίου, η θερμοκρασία του νερού που χρησιμοποιήθηκε, σε όλες τις δοκιμές αποτελεσματικότητας, ήταν η ίδια με αυτή του θαλασσινού νερού στον

εργαστηριακό χώρο (που κυμάνθηκε από 12,7-22,9°C κατά τη διάρκεια της περιόδου των 12 μηνών). Οι μολυσματικές βακτηριακές δόσεις προσαρμόστηκαν για κάθε πειραματική μόλυνση, ανάλογα με το βάρος των ψαριών και την θερμοκρασία του νερού σε φυσικές συνθήκες. Σε όλες τις ομάδες των ψαριών γινόταν καθημερινά παρακολούθηση για την θνησιμότητα και οι πειραματικές δοκιμές έληγαν όταν δεν υπήρχε θνησιμότητα σε καμία ομάδα για δύο συνεχόμενες ημέρες. Η αιτία θνησιμότητας επιβεβαιωνόταν με μικροβιολογική δειγματοληψία από τους νεφρούς και τον σπλήνα από τα νεκρά ψάρια (Spinos et al. 2017).

3.2.8 Συλλογή στοιχείων φυσικής θνησιμότητας στο πεδίο του πειραματικού πληθυσμού

Παράλληλα με την συλλογή άλλων δεδομένων (φυσικοχημικών παραμέτρων, στοιχεία για την χορήγηση τροφής, διαλογές και διαχείριση του υπό μελέτη πληθυσμού ψαριών κ.λπ.) πραγματοποιήθηκε συλλογή δεδομένων σχετικά με τη φυσική θνησιμότητα των μη εμβολιασμένων και των εμβολιασμένων ψαριών στο πεδίο. Τα δεδομένα της θνησιμότητας καταγράφονταν ανά μήνα από την εταιρεία στη μονάδα της οποίας πραγματοποιήθηκε η μελέτη.

3.2.9 Έλεγχος της αποτελεσματικότητας *in vitro* μετά από πειραματικές μολύνσεις

Για την υλοποίηση της μελέτης σε πειραματικές συνθήκες, σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά τον εμβολιασμό, ψάρια από κάθε πειραματική ομάδα μεταφέρθηκαν από την υπό μελέτη μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας και τοποθετήθηκαν σε γυάλινα ενυδρεία χωρητικότητας 250 l το καθένα (εικόνα 3.3). Μετά τον εγκλιματισμό τους, τα ψάρια μολύνθηκαν με έγχυση (ip) με βακτηριακά κύτταρα είτε του *L. anguillarum* O1 ή του Phdp. Μετά το τέλος κάθε πειράματος γινόταν απολύμανση, με αδρανή και φιλικά στο περιβάλλον απολυμαντικά, στα ενυδρεία και στο σύστημα παροχής και αποχέτευσης του νερού.



Εικόνα 3.3 Ενυδρεία στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμές αποτελεσματικότητας και οι πειραματικές μολύνσεις (φωτογραφία Ε. Σπίνος).



Εικόνα 3.4 Διαδικασία δημιουργίας δόσεων με βακτήρια για την επιμόλυνση ψαριών (φωτογραφία Ε. Σπίνος).

Αφού καθορίστηκαν οι δόσεις των μικροοργανισμών που απαιτούνται για την πρόκληση θνησιμότητας (εικόνα 3.4), έγιναν πέντε (5) πειραματικές μολύνσεις με το βακτήριο *Listonella (Vibrio) anguillarum* και τέσσερις (4) με το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, σε όλες τις πειραματικές ομάδες (Alphaject 2000-AJ, Aquanac-AV και Control). Αυτές οι 9 πειραματικές μολύνσεις διενεργήθηκαν από τον Οκτώβριο έως τον Ιούνιο του επόμενου έτους. Στο τέλος της διαδικασίας γινόταν λήψη αίματος και απομόνωση ορού από τα ψάρια που επιβίωναν από την μόλυνση για περαιτέρω βιοχημική ανάλυση.

Εξήντα (60) ψάρια συλλέχθηκαν τυχαία από δύο κλωβούς του πεδίου για κάθε πειραματική ομάδα και μεταφέρθηκαν χωριστά στο εργαστήριο. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ενυδρεία (εικόνα 3.3) και δημιουργήθηκαν τρεις ομάδες των 20 ψαριών ανά εμβόλιο και τρεις ομάδες για τους μάρτυρες (control). Κάθε μία από αυτές τις ομάδες αποτελούνταν από ίσο αριθμό ατόμων (10+10) από κάθε ομάδα βάρους (Α και Β). Τα ψάρια εγκλιματίστηκαν στις δεξαμενές, όπως περιγράφεται παραπάνω. Στη συνέχεια έγιναν 5 πειραματικές μολύνσεις με *L. anguillarum* Ο1 τις ημέρες 54, 96, 163, 230 και 306 μετά τον εμβολιασμό (πίνακας 3.3) και 4 πειραματικές μολύνσεις με Phdp τις ημέρες 82, 142, 209 και 287 μετά τον εμβολιασμό (πίνακας 3.4) (εικόνα 3.5). Κατά την διάρκεια των πειραμάτων γινόταν καθημερινή καταγραφή της θερμοκρασίας του νερού των ενυδρείων και του διαλυμένου οξυγόνου (mg/l) (Spinós et al. 2017).

Πίνακας 3.3 Πειραματικές μολύνσεις (5) με *L. (Vibrio) anguillarum* Ο1 σε 54, 96, 163, 230 και 306 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΗΜΕΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ	Θερμοκρασία °C νερού ενυδρείων
ΠΕΙΡΑΜΑ 1		
<i>L. (Vibrio) anguillarum</i> 8,689X10⁸-δόση 1 ml εναιωρήματος/ψάρι		
23/9	53	22,9

24/9	54	22,5
25/9	55	22,0
26/9	56	24,0
27/9	57	23,5
28/9	58	24,0
ΠΕΙΡΑΜΑ 2		
<i>L. (Vibrio) anguillarum</i> 4,794X10⁸-δόση 1 ml εναιωρήματος/ψάρι		
4/11	95	19,5
5/11	96	19,1
6/11	97	19,0
7/11	98	18,9
8/11	99	18,9
9/11	100	19,2
10/11	101	19,8
11/11	102	18,3
12/11	103	17,8
13/11	104	17,0
ΠΕΙΡΑΜΑ 3		
<i>L. (Vibrio) anguillarum</i> 4,153X10⁸-δόση 1 ml εναιωρήματος/ψάρι		
10/1	163	14,5
11/1	164	14,3
12/1	165	14,5
13/1	166	15,0
14/1	167	15,3
15/1	168	15,5
16/1	169	14,0
ΠΕΙΡΑΜΑ 4		
<i>L. (Vibrio) anguillarum</i> 6,5X10⁸-δόση 1 ml εναιωρήματος/ψάρι		
18/3	230	15,4
19/3	231	15,0
20/3	232	16,3
21/3	233	17,0
22/3	234	16,9
23/3	235	15,5
24/3	236	14,0
25/3	237	13,7

26/3	238	14,6
27/3	239	15,1
ΠΕΙΡΑΜΑ 5		
<i>L. (Vibrio) anguillarum</i> 6,5X10⁷-δόση 1 ml εναιωρήματος/ψάρι για Alphaject 2000 Aquanac και 1,3 ml εναιωρήματος/ψάρι για Control		
2/6	306	20,0
3/6	307	18,6
4/6	308	20,0
5/6	309	20,2
6/6	310	22,5
7/6	311	23,2
8/6	312	22,9

Πίνακας 3.4 Πειραματικές μολύνσεις (4) με Phdp σε 82, 142, 209 και 287 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΗΜΕΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ	Θερμοκρασία °C νερού ενυδρείων
ΠΕΙΡΑΜΑ 1		
Phdp 1,96X10⁸-δόση εναιωρήματος 1 ml/ψάρι		
21/10	81	19,7
22/10	82	19,3
23/10	83	18,9
24/10	84	19,0
25/10	85	18,7
26/10	86	18,6
27/10	87	18,8
ΠΕΙΡΑΜΑ 2		
Phdp 1,80X10⁸-δόση εναιωρήματος 1 ml/ψάρι		
20/12	142	13,2
21/12	143	12,6
22/12	144	12,7
23/12	145	13,0
24/12	146	13,6
25/12	147	14,0
26/12	148	13,6
27/12	149	13,3
28/12	150	14,3

29/12	151	14,2
30/12	152	14,0
31/12	153	13,9
1/1	154	13,2
2/1	155	12,2
3/1	156	12,9
4/1	157	12,4
5/1	158	13,7
6/1	159	13,5
7/1	160	14,0
8/1	161	14,5
ΠΕΙΡΑΜΑ 3		
Phdp 1,79X10⁸-δόση 1,5 ml εναιωρήματος/ψάρι		
25/2	209	12,7
26/2	210	13,6
27/2	211	13,9
28/2	212	12,4
1/3	213	12,8
2/3	214	14,3
3/3	215	12,3
4/3	216	11,9
ΠΕΙΡΑΜΑ 4		
Phdp 1,7X10⁸-δόση 1 ml εναιωρήματος/ψάρι		
14/5	287	18,5
15/5	288	17,0
16/5	289	18,0
17/5	290	17,4
18/5	291	18,0
19/5	292	18,4
20/5	293	19,0
21/5	294	20,5
22/5	295	21,0



Εικόνα 3.5 Μόλυνση ψαριών με βακτήρια (φωτογραφία Ε. Σπίνος).



Εικόνα 3.6 Ανατομία ψαριού και έλεγχος συμφύσεων (φωτογραφία Ε. Σπίνος).

Όλα τα ψάρια μετά την μόλυνση παρακολουθούνταν καθημερινά για την εμφάνιση συμπτωμάτων της κάθε ασθένειας, καταγραφή της θνησιμότητας και των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού. Τα 2/3 περίπου του νερού ανανεώνονταν καθημερινά (όσο διαρκούσαν τα πειράματα) για να αποφευχθεί η συσσώρευση τοξικών ουσιών (π.χ. NH_3) ή η ανάπτυξη παθογόνων μικροβίων στο νερό.



Εικόνα 3.7 Μέτρηση μήκους-βάρους ψαριών (φωτογραφία Ε. Σπίνος).

Σε όλα τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα έγινε ανατομία και μακροσκοπικός έλεγχος ύπαρξης συμφύσεων, κοκκιωμάτων ως αποτέλεσμα του εμβολιασμού και αλοιώσεων εξαιτίας της μόλυνσης (εικόνα 3.6), καθώς επίσης και καταγραφή του βάρους τους για να μελετηθεί η ανάπτυξή τους (εικόνα 3.7).

3.2.10 Μεθοδολογία επεξεργασίας και χρώσης ιστολογικών δειγμάτων και αξιολόγηση παρενεργειών που προκαλούνται στα ψάρια από τα εμβόλια

Σε τακτική βάση επιλέγονταν τυχαία δείγματα ψαριών (N=5) από κάθε πειραματική ομάδα από τους κλωβούς της μονάδας μελέτης και θυσιάζονταν με υπερβολική δόση φαινοξυαιθανόλης. Στα ψάρια αυτά γινόταν ανατομία στην κοιλιακή κοιλότητα (διάνοιξη) και φωτογραφίζονταν. Ιστολογικά δείγματα των εσωτερικών οργάνων απομονώθηκαν και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10% για μονιμοποίηση - συντήρηση και παρέμειναν εκεί μέχρι να ολοκληρωθεί η συλλογή όλων των δειγμάτων.



Εικόνα 3.8 Μικροτόμος τύπου LEICA RM2125 RTS.

Όταν ολοκληρώθηκε η συλλογή δειγμάτων, τα δείγματα παρέμειναν για λίγο σε εξωτερικό χώρο για να στεγνώσουν, στη συνέχεια αφυδατώθηκαν περνώντας από διαλύματα αλκοόλης (70%, 95%, 100%) και τελικά τοποθετήθηκαν σε παραφίνη. Έπειτα κι αφού η παραφίνη σταθεροποιήθηκε, στα δείγματα έγιναν τομές πάχους 0,5μm με τον μικροτόμο τύπου LEICA RM2125 RTS (εικόνα 3.8) και χρώστηκαν με αιματοξυλίνη και εωσίνη.

Η χρώση των δειγμάτων με αιματοξυλίνη και εωσίνη (HEMATOXYLIN & EOSIN), είναι διαδικασία που αποτελεί την πιο συνηθισμένη ιστολογική χρώση. Η αιματοξυλίνη συμπεριφέρεται ως βασική χρωστική, δηλαδή βάφει τα βασεόφιλα συστατικά των ιστών, όπως είναι ο πυρήνας, τα ριβοσώματα και το τραχύ ενδοπλασματικό

δίκτυο και τους προσδίδει κυανό ή κυανό-μωβ χρώμα. Η εωσίνη, η οποία είναι όξινη χρωστική, βάφει τις επικρατέστερες βασικές δομές των κυττάρων ροζ ή κόκκινες. Σε αυτές τις δομές συμπεριλαμβάνονται οι κυτταρικές μεμβράνες. Κατά τη σύνθεση πρωτεϊνών όταν ένα κύτταρο ενεργοποιείται χρωματίζεται βασεοφιλικά, ενώ ένα ανενεργό κύτταρο οξεοφιλικά.

Όλα τα πλακίδια τοποθετήθηκαν σε ένα δοχείο και ξεκίνησε η διαδικασία της χρώσης. Τα βήματα ήταν τα εξής:

- Έγινε εμβάπτιση σε ξυλόλη για 3 λεπτά (x 3 φορές).

Όταν ολοκληρώθηκε ο απαιτούμενος χρόνος, τα πλακίδια καθαρίστηκαν από σωματίδια.

- Ακολούθησε εμβάπτιση σε οινόπνευμα 95° για 5 λεπτά, εμβάπτιση σε οινόπνευμα 80° για 5 λεπτά και εμβάπτιση σε οινόπνευμα 70° για 5 λεπτά.
- Στη συνέχεια έγινε εμβάπτιση σε νερό βρύσης για 2 λεπτά.
- Εμβάπτιση σε αιματοξυλίνη για 10 λεπτά.
- Εμβάπτιση σε νερό βρύσης για 2 λεπτά.
- Εμβάπτιση σε οξινισμένο νερό 2-3 φορές των πλακιδίων.
- Εμβάπτιση σε νερό βρύσης για 2 λεπτά.
- Εμβάπτιση σε εωσίνη για 10 λεπτά.
- Εμβάπτιση σε απόλυτη αλκοόλη για 1 λεπτό (x 3 φορές).



Εικόνα 3.9 Μικροσκόπιο τύπου Nikon ECLIPSE E400.

Αφού ολοκληρώθηκε ο απαιτούμενος χρόνος του 1 λεπτού ανά φορά, τα πλακίδια καθαρίστηκαν από σωματίδια.

- Έγινε εμβάπτιση σε ξυλόλη για 3 λεπτά.
- Τέλος, έγινε επικάλυψη των πλακιδίων.

Τα δείγματα μετά την χρώση παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο Nikon ECLIPSE E400 (εικόνα 3.9).

Αφού ολοκληρώθηκε η παρατήρηση καθώς και η καταγραφή χρήσιμων πληροφοριών για τα παραπάνω, ακολούθησε η διαδικασία της φωτογράφισης των δειγμάτων σε μικροσκόπιο το οποίο, διέθετε ενσωματωμένη φωτογραφική μηχανή τύπου TrueChrome HD (εικόνα 3.10) για καταγραφή (Spinós et al. 2017).



Εικόνα 3.10 Φωτογραφική μηχανή τύπου TrueChrome HD.

Στα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη συλλογή του αίματος (αιμοληψία) και την απομόνωση του ορού, γίνονταν μετρήσεις μήκους-βάρους και γινόταν διάνοιξη της κοιλιακής τους κοιλότητας για μακροσκοπική παρατήρηση και λήψη φωτογραφιών τυχόν κοιλιακών βλαβών (συμφύσεων, παρουσία κοκκιωμάτων) που οφείλονταν στα εμβόλια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.

3.2.11 Συλλογή αίματος-Απομόνωση ορού αίματος

Από τις 6 ομάδες λαμβάνονταν ψάρια για αιμοληψία, στους ορούς αίματος των οποίων έγινε ανοσολογική ανάλυση. Το αίμα συλλέχθηκε (εικόνα 3.11) από όλες τις πειραματικές ομάδες σύμφωνα με τις ακόλουθες ημέρες που δίνονται στον πίνακα 3.5 παρακάτω.

Πίνακας 3.5 Συλλογή αίματος και απομόνωση ορού αίματος από όλες τις υπό μελέτη ομάδες των ψαριών.

ΗΜ/ΝΙΑ	AlphaJect1 AJ1	AlphaJect2 AJ2	AquaVac1 AV1	AquaVac2 AV2	Control1 AB1	Control2 AB2	ΑΡΙΘΜΟΣ ΨΑΡΙΩΝ
24/7	ημέρα 0						30
25/7		ημέρα 0					43
26/7			ημέρα 0				33
1/8		ημέρα 7	ημέρα 7				42
2/8	ημέρα 9			ημέρα 0	ημέρα 0	ημέρα 0	101
7/8	ημέρα 14	ημέρα 13	ημέρα 6	ημέρα 5	ημέρα 5	ημέρα 5	180
17/8			ημέρα 15	ημέρα 14	ημέρα 14		76
24/8	ημέρα 30	ημέρα 29				ημέρα 21	74
31/8			ημέρα 30	ημέρα 29	ημέρα 29		72
11/9	ημέρα 48	ημέρα 47	ημέρα 40	ημέρα 39			105
25/9	ημέρα 58	ημέρα 57	ημέρα 50	ημέρα 49			90
26/10	ημέρα 103	ημέρα 102	ημέρα 95	ημέρα 94			75
6/11	ημέρα 113	ημέρα 112	ημέρα 105	ημέρα 104			75
23/12	ημέρα 163	ημέρα 162	ημέρα 155	ημέρα 154			60
11/1	ημέρα 173	ημέρα 172	ημέρα 165	ημέρα 164			60
5/2	ημέρα 204	ημέρα 203	ημέρα 196	ημέρα 195			45
28/4	ημέρα 286	ημέρα 285	ημέρα 278	ημέρα 277			60
3/5	ημέρα 291	ημέρα 290	ημέρα 283	ημέρα 282			60
28/6	ημέρα 350	ημέρα 349	ημέρα 342	ημέρα 341			60
7/7	ημέρα 357	ημέρα 356	ημέρα 349	ημέρα 348			60
ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΨΑΡΙΩΝ							1401



Εικόνα 3.11 Αιμοληψία ψαριών (φωτογραφία Ε. Σπίνος).

Συλλέχθηκε αίμα επίσης από ομάδα ψαριών που εμβολιάστηκε τον χειμώνα (χειμερινός εμβολιασμός). Στον παρακάτω πίνακα 3.6 δίνεται η ομάδα ψαριών (με βάση το εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε), οι ημερομηνίες συλλογής αίματος και ο αριθμός ψαριών στα οποία έγινε αιμοληψία.

Πίνακας 3.6 Συλλογή αίματος και απομόνωση ορού αίματος από όλες τις υπό μελέτη ομάδες των ψαριών, κατά τον χειμερινό εμβολιασμό.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	AlphaJect AJ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΨΑΡΙΩΝ
30/1	ημέρα 0	0
5/2	ημέρα 7	9
15/2	ημέρα 17	12
22/2	ημέρα 24	12
15/3	ημέρα 45	12
28/4	ημέρα 119	12
31/5	ημέρα 152	12
28/6	ημέρα 180	12
7/7	ημέρα 189	12
26/7	ημέρα 208	12
30/8	ημέρα 242	12
4/10	ημέρα 276	12
10/11	ημέρα 316	12
ΣΥΝΟΛΟ		141

Η επεξεργασία και η μελέτη των δεδομένων από τη συλλογή και την ανάλυση του ορού του αίματος των ψαριών από τις τρεις ομάδες (δύο ομάδες εμβολιασμένων ψαριών και μια ομάδα μάρτυρας), καθώς και από την ομάδα ψαριών που προήλθαν από τον χειμερινό εμβολιασμό, βοήθησε στην εξαγωγή χρήσιμων αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων για τη μελέτη των δύο εμπορικών εμβολίων για τα οποία γίνεται σύγκριση για την ανοσοαπόκριση των ψαριών.



Εικόνα 3.12 Τοποθέτηση του αίματος σε eppendorf 24 ώρες μετά την αιμοληψία ψαριών (φωτογραφία Ε. Σπίνος).

Για τα ψάρια από τα οποία συλλέχθηκε αίμα, καταγράφηκε το βάρος και το μήκος, προκειμένου να αξιολογηθεί η ανάπτυξή τους και να γίνει σύγκριση μεταξύ των τριών διαφορετικών ομάδων (εμβολιασμένα ψάρια με τα δύο εμβόλια και μη εμβολιασμένα). Δεν συνέβη το ίδιο για τα ψάρια του χειμερινού εμβολιασμού. Για τα ψάρια αυτά δεν έγινε κάποια σύγκριση, αλλά μελετήθηκε η ανοσοαπόκρισή τους σε σχέση με το χρόνο.

3.2.12 Ανάλυση της Χυμικής ανοσολογικής αντίδρασης

Ένα αντίσωμα είναι μια πρωτεΐνη που συντίθεται σε έναν ζωικό οργανισμό ως αντίδραση στην ύπαρξη μίας ξένης ουσίας που λέγεται αντιγόνο. Τα αντισώματα (που ονομάζονται και ανοσοσφαιρίνες) έχουν ειδική συγγένεια με τα αντιγόνα που προκάλεσαν τη σύνθεσή τους. Οι πρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες και τα νουκλεϊκά οξέα είναι πολύ αποτελεσματικά αντιγόνα. Τα αντισώματα μπορούν ακόμη να δημιουργηθούν από μικρά μόρια, όπως συνθετικά πεπτιδία, με την προϋπόθεση ότι τα μικρά μόρια δεσμεύονται σε έναν μακρομοριακό φορέα. Η ομάδα που αναγνωρίζεται από ένα αντίσωμα λέγεται αντιγονικός προσδιοριστής (ή επίτοπος). Ένα αντιγόνο λειτουργεί με το να ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό μικρού αριθμού κυττάρων που ήδη φτιάχνουν αντίσωμα συμπληρωματικό προς το αντιγόνο. Ο κύριος τύπος αντισώματος στο πλάσμα του αίματος των ανώτερων ζώων είναι η ανοσοσφαιρίνη G, μία πρωτεΐνη 150 kd που περιέχει δύο ίδιες θέσεις δέσμευσης αντιγόνου (Stryer 1994).

Τα αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εξαιρετικά ειδικά αναλυτικά αντιδραστήρια για να προσδιοριστεί η ποσότητα μίας πρωτεΐνης ή ενός αντιγόνου. Σε ανοσομέτρηση στερεάς φάσης το αντίσωμα το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει σταθεροποιείται σε ένα πολυμερές υπόστρωμα. Μία σταγόνα κυτταρικού εκχυλίσματος ή δείγματος ορού αίματος τοποθετείται πάνω στην επιφάνεια που ξεπλένεται μετά τη δημιουργία ενός συμπλόκου αντισώματος-αντιγόνου. Μετά προστίθεται αντίσωμα ειδικό για μια άλλη θέση του αντιγόνου και η επιφάνεια ξαναξεπλένεται. Το ποσό του δεύτερου αντισώματος που δεσμεύεται στην επιφάνεια είναι ανάλογο με την ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα. Με μία τέτοια μέτρηση που ονομάζεται ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφητική μέτρηση (ELISA), μπορεί να μετρηθεί άμεσα ακόμη και λιγότερο από ένα νανογραμμάριο (10^{-9} g) μίας πρωτεΐνης (Stryer 1994).

Προκειμένου πραγματοποιηθεί η διαδικασία ανάλυσης της χυμικής ανοσολογικής αντίδρασης συλλέχθηκε από ψάρια κάθε ομάδας αίμα (εικόνα 3.11). Η αιμοληψία γινόταν με αποστειρωμένες σύριγγες μιας χρήσης των 2,5 ml (1 σύριγγα για κάθε ψάρι), ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία. Αιχμαλωτίζονταν τυχαία ψάρια από τις ομάδες μελέτης, των οποίων οι αριθμοί και οι ημερομηνίες αναφέρονται στον πίνακα 3.5 και κατόπιν εφαρμογής ελαφριάς δόσης αναισθησίας, γινόταν η λήψη αίματος είτε από την ουραία φλέβα είτε από την καρδιά (εικόνα 3.11). Το αίμα στη συνέχεια τοποθετούνταν σε κωνικά σωληνάκια ασφαλείας (ependorh) για περαιτέρω επεξεργασία.

Η συλλογή αίματος περιελάμβανε τουλάχιστον τρία δείγματα ανά ομάδα ψαριών. Το αίμα αφέθηκε να πήξει για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια όλη τη νύχτα στους 4°C (εικόνα 3.12). Τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στα 1.750 X g για 5 λεπτά (φυγόκεντρος Hettich Zentrifugen D-7200, Tuttlingen, εικόνα 3.13) και οι οροί συλλέχθηκαν και καταψύχθηκαν στους -85°C μέχρι την ανάλυσή τους. Οι οροί από κάθε ομάδα χρησιμοποιήθηκαν σε ανάλυση με την μέθοδο ELISA (Bakoroulos et al. 1997) για τον προσδιορισμό των ειδικών τίτλων ανοσοσφαιρίνης IgM έναντι του *L. anguillarum* O1 και του Phdp.

Παρακάτω περιγράφονται πιο λεπτομερώς τα βήματα της μεθόδου ELISA:

1) Πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 βοθρίων με επίπεδο πυθμένα (Corning) επιστρώθηκαν με



Εικόνα 3.13 Η φυγόκεντρος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση ορού του αίματος (φωτογραφία Ε. Σπίνος).

50 μl / βοθρίο με διάλυμα 0,001% πολυλυσίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού / διπτανθρακικού οξέος, pH 9.6 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (r.t.).

2) Οι πλάκες πλύθηκαν με διάλυμα πλύσης χαμηλής συγκέντρωσης άλατος (LSWB), 3 φορές. (Όλες οι πλύσεις εδώ και στα επόμενα βήματα γίνονταν με 150 μl / βοθρίο)

3) Τα βοθρία επικαλύφθηκαν με διάλυμα (OD: 1 στα 605nm) από τα βακτήρια για τα οποία διερευνήθηκε η ύπαρξη ειδικών αντισωμάτων, 50 μl / βοθρίο για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

4) Κατόπιν προστέθηκαν 25 μl / βοθρίο 0.05% γλουταραλδεΐδης σε 0,02M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (PBS) pH 7,4 για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (r.t.).

5) Οι πλάκες πλύθηκαν με LSBW, 3 φορές.

6) Ο αποκλεισμός θέσεων πρόσδεσης στα βοθρία έγινε με την προσθήκη διαλύματος 15% βόειας αλβουμίνης (BSA) σε LSBW, 100 μl / βοθρίο, όλη τη νύχτα στους 4°C.

7) Οι πλάκες πλύθηκαν με διάλυμα πλύσης υψηλής συγκέντρωσης άλατος (HSWB), 5 φορές, μούλιασαν για 5 λεπτά στο διάλυμα πλύσης και κατόπιν το τελευταίο απομακρύνθηκε.

8) Προσθήκη δειγμάτων ορών ψαριών σε αραιώση 1: 100 σε διάλυμα 0,02M PBS + 0.1%

Tween-20, 50 μl / βοθρίο για 1 ώρα σε r.t. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν βοθρία χωρίς ορό ψαριών.

9) Οι πλάκες πλύθηκαν με HSWB, 5 φορές, αναμονή για 5 λεπτά και αναρρόφηση.

10) Προσθήκη μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού έναντι της ανοσοσφαιρίνης του λαβρακιού (αντι-IgM Mab) (αραίωση 1:55 σε PBS), 50 μl / βοθρίο για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (r.t.).

11) Πλύση πλακών όπως στο βήμα (9).

12) Προσθήκη διαλύματος αντισώματος αίγας έναντι της ανοσοσφαιρίνης του ποντικού συζευγμένο με ένζυμο υπεροξειδάσης (αντι-mouse IgG HRP) αραιωμένου 1: 1.800 σε ορό αίγας 5% σε LSWB, 50 μl / βοθρίο, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (r.t.).

13) Πλύση πλακών όπως στο βήμα (9).

14) Προσθήκη 50 μl / βοθρίο διαλύματος χρωμογόνου (20 ml υποστρώματος + 200 μl πυκνού TMB + 6,7 μl H₂O₂) για 2,30 λεπτά.

15) Διακοπή της αντίδρασης με προσθήκη 25 μl /βοθρίο διαλύματος 2M H₂SO₄.

16) Τα αποτελέσματα αποτυπώθηκαν με συσκευή φωτομετρικής ανάγνωσης μικροπλακών MR-96A (MINDRAY) στα 450nm.

3.2.13 Υπολογισμοί αποτελεσματικότητας εμβολίων, αναπτυξιακών δεικτών και στατιστική επεξεργασία

Η προστασία που παρέχεται από τα εμπορικά σκευάσματα εμβολίων αξιολογήθηκε με υπολογισμό της επί τοις εκατό επιβίωσης (RPS) χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο τύπο (Amend 1981):

$$RPS = \left[1 - \frac{\% \text{ mortality of immunized fish}}{\% \text{ mortality of non immunized fish}} \right] * 100$$

Στις πειραματικές ομάδες ψαριών που γινόταν αιμοληψία μετρήθηκαν και καταγράφηκαν το μήκος και το βάρος τους.

Το μέσο βάρος ψαριών υπολογίσθηκε από τον τύπο:

$$\bar{w}_i = \frac{\sum_{i=1}^n w_i}{N_j}$$

Όπου: \bar{w}_i : μέσο βάρος των ψαριών, i : ο αριθμός της ομάδας.

$$\sum_{i=1}^n w_i \quad : \text{ Το άθροισμα των βαρών όλων των ατόμων.}$$

$$N_j \quad : \text{ Αριθμός των ατόμων.}$$

Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (Specific Growth Rate-SGR) και συντελεστής μετατρεψιμότητας

(Food Conversion Rate-FCR)

Το SGR παρέχει μία ένδειξη του ρυθμού αύξησης βάρους και υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο (Paspatis et al. 1999):

$$SGR = 100 \frac{\ln W_f - \ln W_i}{t}$$

Όπου, W_f και W_i : τελικό και αρχικό μέσο σωματικό βάρος σε γραμμάρια, αντίστοιχα, t : διάρκεια εκτροφής σε ημέρες.

Το FCR παρέχει ένδειξη της μετατροπής τροφής σε σωματικό βάρος, δηλαδή το βάρος της τροφής που απαιτείται για την παραγωγή ενός κιλού σωματικού βάρους. Υπολογίζεται επί ξηρού βάρους από τον ακόλουθο τύπο (Paspatis et al. 1999):

$$FCR = \frac{F}{W_f - W_i}$$

Όπου, F : η συνολική ποσότητα της ξηράς τροφής που χορηγείται, σε γραμμάρια, W_f και W_i : τελικά και αρχικό σωματικό βάρος σε γραμμάρια ξηρού βάρους.

Για τη σύγκριση των καμπυλών αθροιστικής θνησιμότητας για κάθε εμβόλιο και κάθε πείραμα, χρησιμοποιήθηκε η πολυμεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (Multivariate analysis of variance MANOVA). Για τη στατιστική ανάλυση των γραφημάτων του μέσου βάρους των ψαριών μικρού και μεσαίου μεγέθους, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση της συνδιακύμανσης (Analyses of covariance ANCOVA).

Οι αθροιστικές καμπύλες θνησιμότητας για κάθε εμβόλιο και κάθε παθογόνο σε κάθε πείραμα αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας τις καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meyer και χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή χ^2 για τη στατιστική ανάλυση συγκρίνοντας όλα τα ζεύγη των πειραματικών ομάδων και λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά όταν $p < 0.05$. Για τη στατιστική ανάλυση των μέσων βαρών των ψαριών χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση συνδιακύμανσης (ANCOVA) στο πρόγραμμα λογισμικού «Excel 2010». Η ανάλυση ANCOVA είναι ένας συνδυασμός ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και ανάλυσης παλινδρόμησης. Τα αποτελέσματα ANOVA προσαρμόστηκαν σύμφωνα με την γραμμική σχέση μεταξύ της εξαρτημένης μεταβλητής και της συμμεταβλητής. Ως εκ τούτου, έγινε προσπάθεια να μειωθεί η διακύμανση μέσα στις ομάδες (όρος σφάλματος), η οποία οφείλεται στην τυχαία δειγματοληψία, αφαιρώντας την επίδραση των συμμεταβλητών. Τα ερευνητικά ερωτήματα απαντήθηκαν από ANCOVA και είναι τα ίδια με εκείνα της ANOVA (δηλαδή κύρια αποτελέσματα των ανεξάρτητων μεταβλητών επί τον εξαρτώμενο παράγοντα αλληλεπίδρασης), αλλά και λαμβάνοντας υπόψη την γραμμική συσχέτιση μεταξύ του συμπαράγοντα και της εξαρτημένης μεταβλητής (Cochran & Cox 1953, Zar 2010).

Η στατιστική ανάλυση, του επιπέδου ειδικών αντισωμάτων από τον ορό αίματος που συλλέχθηκε από όλες τις εμβολιασμένες ομάδες, διεξήχθη με τη δοκιμή Wilcoxon-Mann-Whitney (Zar 2010). Προκειμένου να εξεταστούν οι παράγοντες που επηρέασαν την επιβίωση των ατόμων στις δοκιμές αποτελεσματικότητας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Cox (1972). Αυτή η μέθοδος είναι ευρέως γνωστή ως ανάλυση παλινδρόμησης ή αναλογικών κινδύνων του Cox. Η ανάλυση παλινδρόμησης Cox είναι παρόμοια με την ανάλυση

πολλαπλής παλινδρόμησης, εκτός του ότι η απάντηση ή η εξαρτημένη μεταβλητή είναι η συνάρτηση κινδύνου σε μια δεδομένη στιγμή.

Η μεταβλητή επικινδυνότητα αντιπροσωπεύει τον κίνδυνο θνησιμότητας σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα μετά από ένα σημαντικό γεγονός, μια δηλαδή δεδομένη χρονική στιγμή. Ως εκ τούτου, μπορεί να ερμηνευθεί ως ο κίνδυνος θνησιμότητας κατά το χρόνο t (Altman 1991). Στην περίπτωση της συγκεκριμένης στατιστικής ανάλυσης, οι ανεξάρτητες μεταβλητές είναι η ομάδα ψαριών coh (ελέγχου-control, AV ή AJ), ο χρόνος μετά τον εμβολιασμό (Time Post Vaccination-TPV), η θερμοκρασία στην οποία έγινε η μελέτη αποτελεσματικότητας (temperature-temp) και ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων με τα οποία έγινε η επιμόλυνση των ψαριών ανά γραμμάριο ιστού ψαριών (αντιπροσωπεύοντας δύο συνδυασμένες μεταβλητές που επηρεάζουν την επιβίωση των ψαριών, η μολυσματική δόση και το βάρος ψαριών) (inf).

Η εξίσωση που εξηγεί την επιβίωση μπορεί να έχει τη μορφή:

$$h(t) = h_0(t) \cdot \exp (b_{cohort} \cdot cohort + b_{age} \cdot age + b_{temp} \cdot temp + b_{dose} \cdot dose)$$

Με τη λήψη των λογαρίθμων των δύο μερών της εξίσωσης, αυτό μετατρέπεται σε:

$$\ln h(t) = \ln h_0(t) \cdot \exp (b_{cohort} \cdot cohort + b_{age} \cdot age + b_{temp} \cdot temp + b_{dose} \cdot dose)$$

Η μεταβλητή $h_0(t)$ είναι η συνάρτηση που αντιστοιχεί στην πιθανότητα θνησιμότητας, όταν όλες οι ανεξάρτητες μεταβλητές είναι μηδέν. Οι συντελεστές παλινδρόμησης b_{cohort} και b_{dose} δίνουν τις αλλαγές που αναμένονται στον κίνδυνο θνησιμότητας και σχετίζονται με αλλαγές στις ερμηνευτικές μεταβλητές. Ο λόγος $h(t) / h_0(t)$ ονομάζεται αναλογία κινδύνου και είναι ο σχετικός κίνδυνος θνησιμότητας που λαμβάνει χώρα σε χρόνο t .

Για την στατιστική επεξεργασία διεξήχθη ανάλυση παλινδρόμησης Cox στο σύνολο των δεδομένων από όλες τις δοκιμές αποτελεσματικότητας για κάθε παθογόνο προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα των δύο εμπορικών εμβολίων για το σύνολο της πειραματικής περιόδου, επειδή υπάρχουν πολλές μεταβλητές οι οποίες επηρεάζουν τη λειτουργία των εμβολίων και δεν επιτρέπουν την άμεση σύγκριση μεταξύ των δοκιμών αποτελεσματικότητας σε διαφορετικό χρόνο μετά τον εμβολιασμό. Η ανάλυση αυτή έγινε κυρίως για να δοθεί απάντηση στο ακόλουθο επιστημονικό ερώτημα: «ποιο από τα δύο εμβόλια παρέχει καλύτερη και μακράς διάρκειας προστασία ενάντια στη δονακίωση και στη φωτοβακτηριδίαση;». Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν σε περιβάλλον R (R Core Team, 2015). Η παλινδρόμηση Cox, διεξήχθη χρησιμοποιώντας την ανάλυση επιβίωσης (Therneau & Grambsch 2000, Therneau 2015).

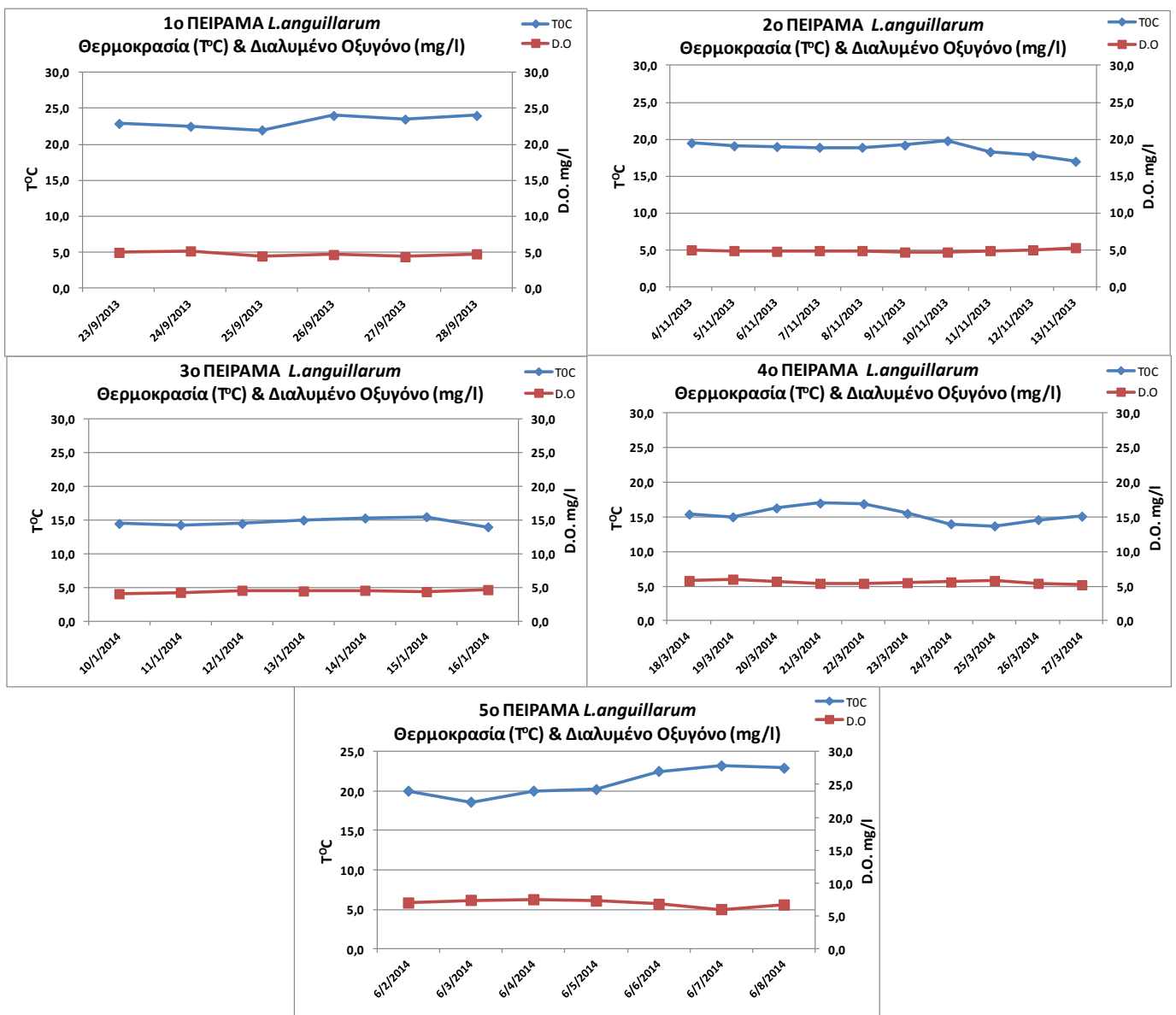
Τέλος, τα δεδομένα των φυσικοχημικών παραμέτρων που καταγράφονταν κατά τη διάρκεια της μελέτης, συγκεντρώθηκαν σε πίνακες και αποτυπώθηκαν σε γραφήματα, αφού έγινε επεξεργασία σε απλά λογιστικά φύλλα (λογισμικό πρόγραμμα Excel).

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

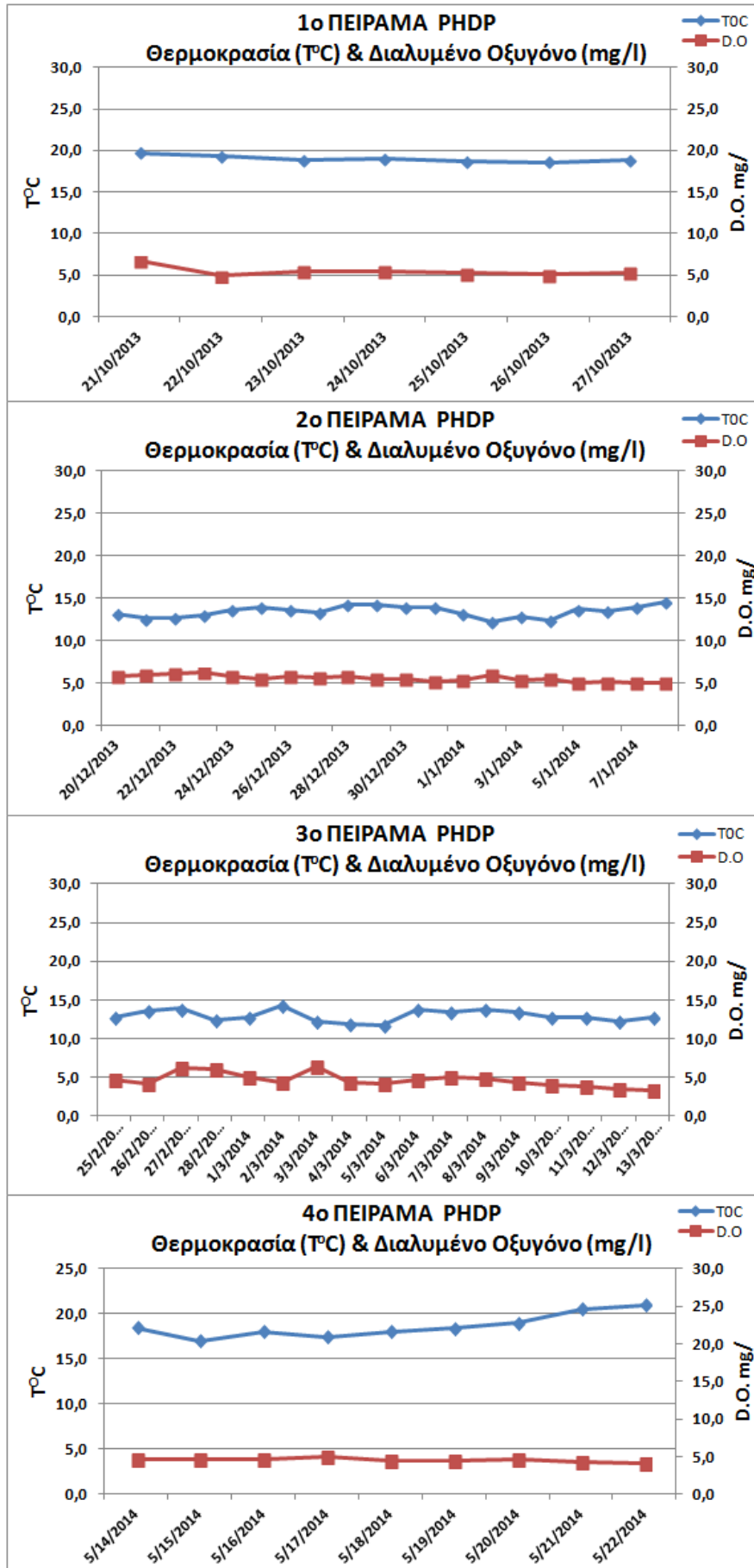
Τα αποτελέσματα βασίζονται σε δεδομένα που συγκεντρώθηκαν από τα τέλη Ιουλίου αρχές Αυγούστου, μέχρι τον Ιούνιο του επόμενου έτους. Η παρακολούθηση του μελετώμενου πληθυσμού (εκτρεφόμενο λαβράκι) ξεκίνησε όταν τα ψάρια είχαν μέσο βάρος γύρω στα 30,0 g και ολοκληρώθηκε όταν τα ψάρια είχαν μέσο βάρος γύρω στα 275,0 g.

3.3.1 Φυσικοχημικές παράμετροι του νερού των ενυδρείων στα οποία πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα

Στα παρακάτω σχήματα 3.4α και 3.4β δίνονται οι γραφικές παραστάσεις της θερμοκρασίας, η οποία ακολουθεί το εποχικό πρότυπο, δίνεται επίσης το διαλυμένο οξυγόνο το οποίο μειώνεται καθώς αυξάνει η θερμοκρασία και αυξάνει καθώς μειώνεται η θερμοκρασία. Αυτά ισχύουν τόσο για το θαλασσινό νερό όσο και για το νερό στα ενυδρεία.



Σχήμα 3.4α Γραφήματα θερμοκρασίας και διαλυμένου οξυγόνου που καταγράφηκαν στα ενυδρεία σε 5 πειραματικές μολύνσεις με *L. anguillarum*.



Σχήμα 3.4β Γραφήματα θερμοκρασίας και διαλυμένου οξυγόνου που καταγράφηκαν στα ενυδρεία σε 4 πειραματικές μολύνσεις με Ρηδρ.

3.3.2 Ανάλυση δεδομένων θνησιμότητας των εμβολιασμένων ψαριών και των μη εμβολιασμένων

Στους πίνακες 3.7, και 3.8, δίνονται στοιχεία του πληθυσμού ψαριών που συμμετείχε στη μελέτη, που έχουν καταγραφεί από την συνεργαζόμενη εταιρεία και αφορούν τον αριθμό ψαριών, το μέσο βάρος των ψαριών, την θνησιμότητα και την καταναλωθείσα τροφή πριν γίνουν οι εμβολιασμοί και αφού έγιναν οι εμβολιασμοί.

Για όλες τις ομάδες ψαριών, η καταναλωθείσα τροφή και η θνησιμότητα που παρατηρήθηκε σε όλη την διάρκεια της μελέτης δίνονται στον πίνακα 3.5. Από την τροφή που καταναλώθηκε, το μέσο βάρος των ψαριών από τα οποία μετρήσεις λαμβάνονταν περίπου κάθε μήνα, προέκυψαν ο συντελεστής μετατρεψιμότητας FCR και ο ειδικός συντελεστής αύξησης SGR.

Πίνακας 3.7 Στοιχεία θνησιμότητας πειραματικών ομάδων, αριθμός ψαριών ανά ομάδα, μέσα βάρη και καταναλωθείσα τροφή πληθυσμών Α και Β.

Ομάδα/Κλωβός/Εμβόλιο	Ημερομηνία	Αριθμός ψαριών (N)	Μέσο βάρος (g)	Θνησιμότητα	Καταναλωθείσα Τροφή (kg)
A/AJ1 (μεσαίο μέγεθος) AlphaJect 2000	Εισαγωγή γόνου-Μάρτιος	19.544	40	-	-
AJ1	1/8	-	40	-	-
AJ1	26/8	-	57	-	-
AJ1	25/9	-	81	-	-
AJ1	26/10	-	95	-	-
AJ1	6/11	-	103	-	-
AJ1	2/12	-	125	-	-
AJ1	10/1	-	145	-	-
AJ1	15/2	-	160	-	-
AJ1	30/3	-	176	-	1.888
AJ1	30/6	-	265	-	1.217
AJ1	30/6	19.062	-	482	3.105
Αριθμός νεκρών ψαριών από αιμοληψία & πειραματικές μολύνσεις				339	-
ΣΥΝΟΛΟ		18.723	265	821	6210
A/AJ2 (μικρό μέγεθος) AlphaJect 2000	Εισαγωγή γόνου-Μάρτιος	19.435	30	-	-
AJ2	1/8	-	32	-	-
AJ2	26/8	-	53,6	-	-
AJ2	25/9	-	70	-	-
AJ2	26/10	-	89	-	-
AJ2	6/11	-	96	-	-
AJ2	2/12	-	113	-	-
AJ2	10/1	-	118	-	-
AJ2	15/2	-	125	-	-
AJ2	30/3	-	138	-	1792
AJ2	30/6	-	220	-	1075

Συσχέτιση περιβαλλοντικών παραμέτρων με την εμφάνιση ασθενειών στο εκτρεφόμενο λαβράκι
Dicentrarchus labrax, L. 1758 και πρόληψη των ασθενειών αυτών

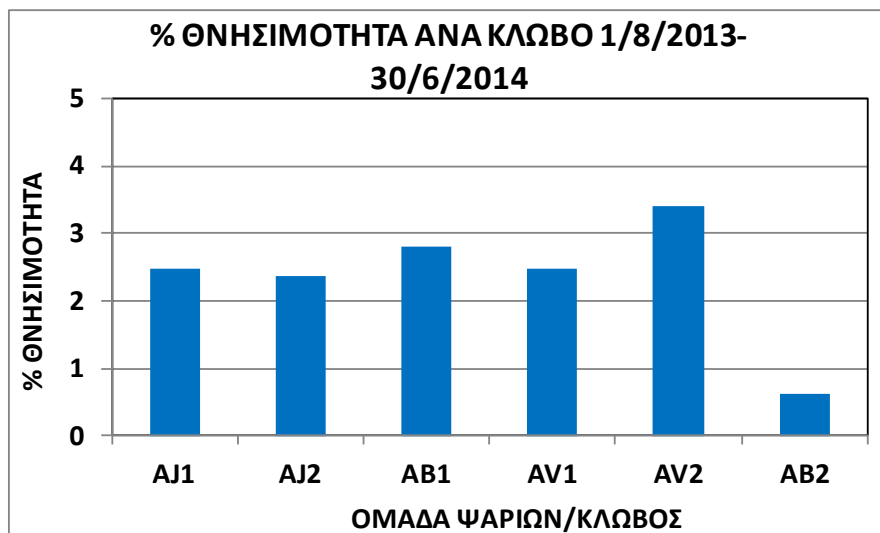
AJ2	30/6	18.975	-	460	2.867
Αριθμός νεκρών ψαριών από αιμοληψία & πειραματικές μολύνσεις				351	-
ΣΥΝΟΛΟ		18.624	220	811	5.734
A/AB1 (μεσαίο μέγεθος)	Εισαγωγή γόνου-Μάρτιος	13.172	30	-	-
Control					
AB1	2/8	-	32	-	-
AB1	21/8	-	40	-	-
AB1	25/9	-	71	-	-
AB1	28/10	-	93,5	-	-
AB1	6/11	-	97,8	-	-
AB1	2/12	-	115	-	-
AB1	10/1	-	130	-	-
AB1	15/2	-	144	-	-
AB1	30/3	-	156	-	1.092
AB1	30/6	-	225	-	724
AB1	30/6	12.805	-	367	1.816
Αριθμός νεκρών ψαριών από αιμοληψία & πειραματικές μολύνσεις				248	-
ΣΥΝΟΛΟ		12.557	225	615	3.632
B/AV1 (μεσαίο μέγεθος)	Εισαγωγή γόνου-Μάρτιος	21.490	40	-	-
AquaVac					
AV1	1/8	-	40	-	-
AV1	26/8	-	52,6	-	-
AV1	25/9	-	76	-	-
AV1	26/10	-	92	-	-
AV1	6/11	-	98,5	-	-
AV1	4/12	-	115	-	-
AV1	10/1	-	135	-	-
AV1	15/2	-	150	-	-
AV1	30/3	-	165	-	1.812
AV1	30/6	-	275	-	1.200
AV1	30/6	20.958	-	532	3.012
Αριθμός νεκρών ψαριών από αιμοληψία & πειραματικές μολύνσεις				364	-
ΣΥΝΟΛΟ		20.594	275	896	6024
B/AV2 (μικρό μέγεθος)	Εισαγωγή γόνου-Μάρτιος	21.550	30	-	-
AquaVac					
AV2	1/8	-	30	-	-
AV2	26/8	-	45,7	-	-
AV2	25/9	-	61,6	-	-
AV2	26/10	-	82	-	-
AV2	6/11	-	88	-	-

Συσχέτιση περιβαλλοντικών παραμέτρων με την εμφάνιση ασθενειών στο εκτρεφόμενο λαβράκι
Dicentrarchus labrax, L. 1758 και πρόληψη των ασθενειών αυτών

AV2	2/12	-	108	-	-
AV2	10/1	-	118	-	-
AV2	15/2	-	132	-	-
AV2	30/3	-	147	-	1.888
AV2	30/6	-	230	-	1.106
AV2	30/6	20.818	-	732	2.994
Αριθμός νεκρών ψαριών από αιμοληψία & πειραματικές μολύνσεις				342	-
ΣΥΝΟΛΟ		20.476	275	896	5.988
B/AB2 (μεσαίο μέγεθος)	Εισαγωγή γόνου-Μάρτιος	11.238	30	-	-
Control					
AB2	1/8	-	30	-	-
AB2	26/8	-	45,7	-	-
AB2	21/9	-	61,6	-	-
AB2	26/10	-	82	-	-
AB2	6/11	-	88	-	-
AB2	2/12	-	108	-	-
AB2	10/1	-	118	-	-
AB2	15/2	-	132	-	-
AB2	30/3	-	147	-	1.055
AB2	30/6	-	230	-	718
AB2	30/6	11.169	-	69	1.773
Αριθμός νεκρών ψαριών από αιμοληψία & πειραματικές μολύνσεις				242	-
ΣΥΝΟΛΟ		10.927	230	311	3.546

Πίνακας 3.8 Συγκεντρωτικά στοιχεία θνησιμότητας,% θνησιμότητα, ημερομηνίες και αριθμός ψαριών ανά ομάδα ψαριών και κλωβό.

Ομάδα / Κλωβός	Ημερομηνία	ΕΜΒΟΛΙΟ	Αριθμός ψαριών (στις 1/8 πρώτου έτους)	Αριθμός ψαριών (στις 30/6 του επόμενου έτους)	Θνησιμότητα % ομάδας ή κλωβού	Θνησιμότητα
A	10/04-01/08	Πριν τον εμβολιασμό	101.835	-	111	-
AJ1	01/08-30/06	ALPHAJECT 2000	19.544	19.205	482	2,47
AJ2	01/08-30/06	ALPHAJECT 2000	19.435	18.975	460	2,37
AB1	02/08-30/06	CONTROL	13.172	12.805	367	2,79
B	29/04-01/08	Πριν τον εμβολιασμό	102.139	-	247	-
AV1	01/08-30/06	AQUAVAC	21.490	20.958	532	2,48
AV2	01/08-30/06	AQUAVAC	21.550	20818	732	3,39
AB2	01/08-30/06	CONTROL	11.238	11.169	69	0,61



Σχήμα 3.5 Ποσοστό % θνησιμότητας στις ομάδες ψαριών (κλωβό) που συμμετείχαν στα πειράματα την χρονική περίοδο 1/8/2013-30/6/2014.

Στον πίνακα 3.8 και στο σχήμα 3.5, δίνεται η % θνησιμότητα από 1/8/2013-30/6/2014 για 6 ομάδες ψαριών οι οποίες συμμετείχαν στα πειράματα. Όπου AJ1, AJ2 είναι οι ομάδες των εμβολιασμένων ψαριών με Alphaject 2000, AV1, AV2 οι ομάδες εμβολιασμένων ψαριών με Aquanas και AB1, AB2 είναι οι ομάδες ανεμβολίαστων ψαριών (Control). Το ποσοστό θνησιμότητας σε όλες τις ομάδες είναι πολύ μικρό (αμελητέο) και στο σχήμα 3.5 παρατηρείται ότι οι ομάδες AJ1, AJ2 και AV1 εμφανίζουν σχεδόν ίδιο ποσοστό, οι ομάδες AB1 και AV2 εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας, ενώ η ομάδα AB2 εμφανίζει το μικρότερο ποσοστό.

3.3.3 Προσδιορισμός του LD₅₀₋₇₀

Από 2 δοκιμαστικές πειραματικές μολύνσεις (13/8/2013 & 22/8/2013) για τον προσδιορισμό του LD₅₀₋₇₀, προέκυψαν οι βέλτιστες δόσεις του αριθμού των μικροοργανισμών για το *L. (Vibrio) anguillarum* και το Phdp αντίστοιχα (πίνακας 3.9).

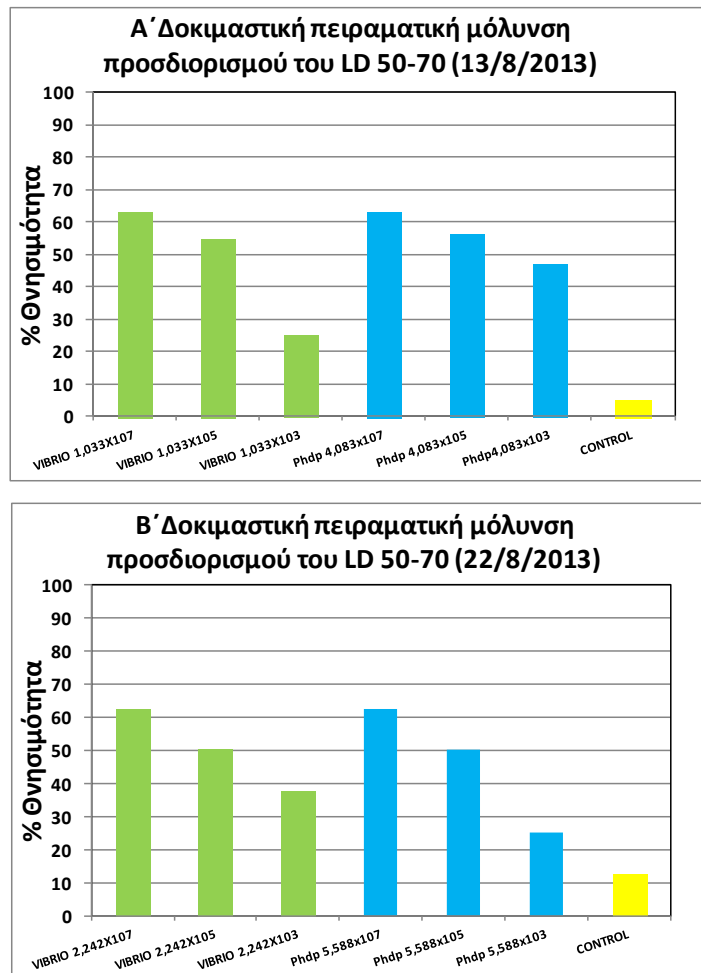
Πίνακας 3.9 Δοκιμαστικές πειραματικές μολύνσεις (A & B), που έγιναν σε λαβράκι στις 13 & 22/8/2013 για τον προσδιορισμό του LD₅₀₋₇₀.

Α΄ δοκιμαστική πειραματική μόλυνση (13/8/2013)								
ΑΡΙΘ. ΨΑΡΙΩΝ ΠΡΟ ΜΟΛΥΝΣΗΣ	19 ΨΑΡΙΑ	20 ΨΑΡΙΑ	20 ΨΑΡΙΑ	19 ΨΑΡΙΑ	16 ΨΑΡΙΑ	17 ΨΑΡΙΑ	20 ΨΑΡΙΑ	Τ°C
	VIBRIO 1,033X10 ⁷	VIBRIO 1,033X10 ⁵	VIBRIO 1,033X10 ³	Phdp 4,083x10 ⁷	Phdp 4,083x10 ⁵	Phdp4,083x10 ³	CONTROL	
ΑΡΙΘ. ΚΥΤΤΑΡΩΝ	1,033X10 ⁷	1,033X10 ⁵	1,033X10 ³	4,083x10 ⁷	4,083x10 ⁵	4,083x10 ³		
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ								
12/8/2013	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΨΑΡΙΩΝ	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΨΑΡΙΩΝ	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΨΑΡΙΩΝ	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΨΑΡΙΩΝ	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΨΑΡΙΩΝ	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΨΑΡΙΩΝ	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΨΑΡΙΩΝ	
13/8/2013	ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ	
14/8/2013	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ (19 ΨΑΡΙΑ)	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ (20 ΨΑΡΙΑ)	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ (20 ΨΑΡΙΑ)	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ (19 ΨΑΡΙΑ)	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ (16 ΨΑΡΙΑ)	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ (17 ΨΑΡΙΑ)	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ (20 ΨΑΡΙΑ)	
15/8/2013	2	1	0	0	0	0	0	28,0

Συσχέτιση περιβαλλοντικών παραμέτρων με την εμφάνιση ασθενειών στο εκτρεφόμενο λαβράκι

Dicentrarchus labrax, L. 1758 και πρόληψη των ασθενειών αυτών

16/8/2013	7	4	1	3	2	4	1	27,5
17/8/2013	3	6	4	9	7	4	0	26,0
ΣΥΝΟΛΟ ΝΕΚΡΑ	12	11	5	12	9	8	1	
ΠΟΣΟΣΤΟ % ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ	63,2	55	25	63,2	56,25	47,1	5	
18/8/2013	ΛΗΞΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ							ΜΟ=27,2
Β΄ δοκιμαστική πειραματική μόλυνση (22/8/2013)								
ΑΡΙΘ. ΨΑΡΙΩΝ ΠΡΟ ΜΟΛΥΝΣΗΣ	8 ΨΑΡΙΑ	8 ΨΑΡΙΑ	8 ΨΑΡΙΑ	8 ΨΑΡΙΑ	8 ΨΑΡΙΑ	8 ΨΑΡΙΑ	8 ΨΑΡΙΑ	Τ°C
	VIBRIO 2,242X10 ⁷	VIBRIO 2,242X10 ⁵	VIBRIO 2,242X10 ³	Phdp 5,588x10 ⁷	Phdp 5,588x10 ⁵	Phdp 5,588x10 ³	CONTROL	
ΑΡΙΘ. ΚΥΤΤΑΡΩΝ	2,242X10⁷	2,242X10⁵	2,242X10³	5,588x10⁷	5,588x10⁵	5,588x10³		
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ								
21/8/2013	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΨΑΡΙΩΝ	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΨΑΡΙΩΝ	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΨΑΡΙΩΝ	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΨΑΡΙΩΝ	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΨΑΡΙΩΝ	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΨΑΡΙΩΝ	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΨΑΡΙΩΝ	
22/8/2013	ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ	
23/8/2013	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ (8 ΨΑΡΙΑ)	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ (8 ΨΑΡΙΑ)	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ (8 ΨΑΡΙΑ)	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ (8 ΨΑΡΙΑ)	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ (8 ΨΑΡΙΑ)	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ (8 ΨΑΡΙΑ)	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ (8 ΨΑΡΙΑ)	
24/8/2013	2	1	2	0	1	1	1	27,0
25/8/2013	1	0	0	0	0	0	0	27,0
26/8/2013	0	1	1	0	1	1	0	26,5
27/8/2013	0	0	0	1	1	0	0	26,9
28/8/2013	0	0	0	1	1	0	0	26,7
29/8/2013	0	0	0	1	0	0	0	25,4
30/8/2013	1	1	0	0	0	0	0	26,0
31/8/2013	1	0	0	2	0	0	0	26,9
1/9/2013	0	1	0	0	0	0	0	26,7
ΣΥΝΟΛΟ ΝΕΚΡΑ	5	4	3	5	4	2	1	
ΠΟΣΟΣΤΟ % ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ	62,5	50	37,5	62,5	50	25	12,5	
2/9/2013	ΛΗΞΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ							ΜΟ=26,6



Σχήμα 3.6 Γραφήματα 2 δοκιμαστικών πειραματικών μολύνσεων (13 & 22/8/2013) προσδιορισμού του LD₅₀₋₇₀.

Στο σχήμα 3.6 δίνονται τα γραφήματα 2 πειραματικών μολύνσεων που έγιναν στις 13/8/2013 και στις 22/8/2013 σε εργαστηριακές συνθήκες, με σκοπό τον προσδιορισμό του LD₅₀₋₇₀.

Από τα γραφήματα φαίνεται ότι κατά τη διάρκεια των προκαταρκτικών δοκιμών μολυσματικότητας για τα δύο παθογόνα, οι LD₅₀₋₇₀ δόσεις με τα καλύτερα αποτελέσματα (ποσοστό θνησιμότητας 62,5%) ήταν: για το *L. anguillarum* O1 2,242x10⁷ βακτηριακά κύτταρα/ml, με μέσο βάρος των ψαριών 61,58g και μέση θερμοκρασία 27,2°C, ενώ για το Phdp 4,083x10⁷ βακτηριακά κύτταρα/ml (ποσοστό θνησιμότητας 62,5%) με μέσο βάρος των ψαριών 67,35g και μέση θερμοκρασία 26,6°C. Καθορίστηκε έτσι η εκτιμώμενη δόση μικροοργανισμών σε σχέση με την θερμοκρασία και το μέσο βάρος των ψαριών.

3.3.4 Πειραματικές μολύνσεις με *L. anguillarum* & *Photobacterium damsela* sbsp. *piscicida* και αξιολόγηση της προστασίας που παρέχεται από τα εμβόλια στις εμβολιασμένες ομάδες ψαριών

A. *Listonella anguillarum*

Στον πίνακα 3.9, δίνονται στοιχεία που αφορούν σε 5 πειραματικές μολύνσεις με το παθογόνο βακτήριο *L. anguillarum* με το οποίο έγινε η μόλυνση, οι ημερομηνίες εφαρμογής των πειραματικών μολύνσεων, οι ημέρες από τον εμβολιασμό ανά πείραμα, οι αριθμοί των

ψαριών και η ομάδα των ψαριών που χρησιμοποιούνται σε κάθε ημερομηνία, η % αθροιστική θνησιμότητα και η τυπική απόκλιση (STDEV), και τέλος η δόση που χρησιμοποιήθηκε ανά ψάρι.

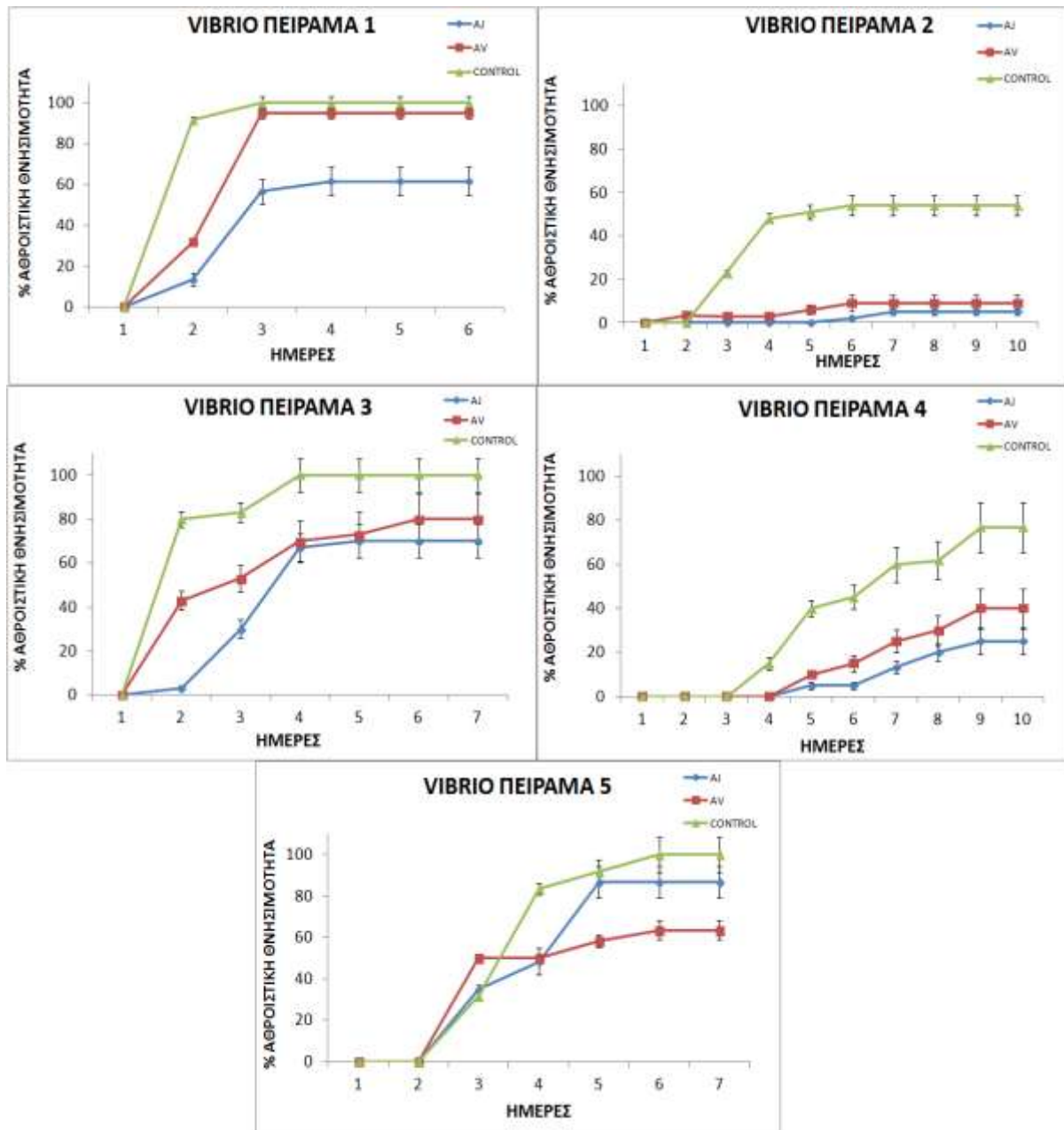
Το 1^ο πείραμα έγινε το Σεπτέμβριο, είχε διάρκεια 6 ημέρες και η θνησιμότητα στα ψάρια ξεκίνησε την 2^η ημέρα. Το 2^ο πείραμα μόλυνσης έγινε το Νοέμβριο, είχε διάρκεια 10 ημέρες και η θνησιμότητα στα ψάρια ξεκίνησε την 2^η ημέρα. Το 3^ο πείραμα μόλυνσης έγινε τον Ιανουάριο, είχε διάρκεια 7 ημέρες και η θνησιμότητα στα ψάρια ξεκίνησε την 2^η ημέρα. Το 4^ο πείραμα μόλυνσης έγινε το Μάρτιο, είχε διάρκεια 10 ημέρες και η θνησιμότητα στα ψάρια ξεκίνησε την 5^η ημέρα. Το 5^ο πείραμα μόλυνσης έγινε τον Ιούνιο, είχε διάρκεια 7 ημέρες και η θνησιμότητα στα ψάρια ξεκίνησε την 3^η ημέρα. Τα εμβολιασμένα ψάρια ήταν σε όλα τα πειράματα σε καλύτερη κατάσταση από τα μη εμβολιασμένα ψάρια και το νερό των ενυδρείων στα πρώτα ήταν λιγότερο υποβαθμισμένο σε σχέση με των μη εμβολιασμένων που ήταν εμφανώς θολό και με βλέννες. Τα μη εμβολιασμένα ψάρια εμφάνιζαν πιο σύντομα και πιο πολλά έλκη, ερυθρήματα και αλλοιώσεις εξωτερικά στο σώμα τους και στην ουρά. Όλα τα προσβεβλημένα ψάρια, κολυμπούσαν ακανόνιστα και ήταν πολύ νευρικά.

Πίνακας 3.9 Ημερομηνίες εφαρμογής των πειραματικών μολύνσεων με *L. (Vibrio) anguillarum*, ο αριθμός των ψαριών, η ομάδα των ψαριών που χρησιμοποιείται σε κάθε μόλυνση και η δόση που χρησιμοποιείται ανά ψάρι.

ΟΜΑΔΑ ΨΑΡΙΩΝ	Alphaject 2000				Aquavac				Control			
ΑΡΙΘΜΟΣ ΨΑΡΙΩΝ	3Χ20				3Χ20				3Χ20			
ΗΜΕΡΑ	Μ. ΤΙΜΗ ΝΕΚΡΩΝ ΨΑΡΙΩΝ	Μ. ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ	% Μ. ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ (ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΑ)	STDEV (ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΑ)	Μ. ΤΙΜΗ ΝΕΚΡΩΝ ΨΑΡΙΩΝ	Μ. ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ	% Μ. ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ (ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΑ)	STDEV (ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΑ)	Μ. ΤΙΜΗ ΝΕΚΡΩΝ ΨΑΡΙΩΝ	Μ. ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ	% Μ. ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ (ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΑ)	STDEV (ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΑ)
ΠΕΙΡΑΜΑ 1 (53 ημέρες μετά τον εμβολιασμό)												
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	3	13	13	3	6	32	32	2	18	92	92	2
3	9	43	57	6	13	63	95	3	2	8	100	3
4	1	5	62	7	0	0	95	3	0	0	100	3
5	0	0	62	7	0	0	95	3	0	0	100	3
6	0	0	62	7	0	0	95	3	0	0	100	3
ΠΕΙΡΑΜΑ 2 (95 ημέρες μετά τον εμβολιασμό)												
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	1	3	3	1	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	3	1	5	23	23	1
4	0	0	0	0	0	0	3	1	5	25	48	2
5	0	0	0	0	1	3	6	2	1	3	51	3
6	0	2	2	1	1	3	9	3	1	3	54	4
7	1	3	5	2	0	0	9	3	0	0	54	4
8	0	0	5	2	0	0	9	3	0	0	54	4
9	0	0	5	2	0	0	9	3	0	0	54	4
10	0	0	5	2	0	0	9	3	0	0	54	4

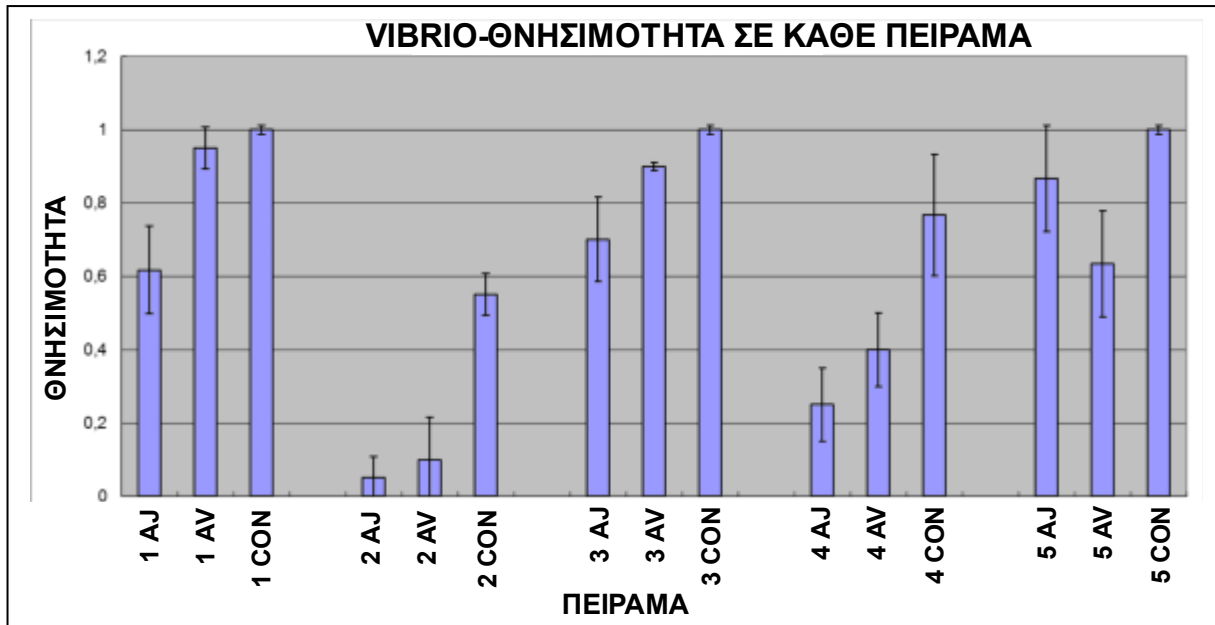
Συσχέτιση περιβαλλοντικών παραμέτρων με την εμφάνιση ασθενειών στο εκτρεφόμενο λαβράκι
Dicentrarchus labrax, L. 1758 και πρόληψη των ασθενειών αυτών

ΠΕΙΡΑΜΑ 3 (163 ημέρες μετά τον εμβολιασμό)												
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	3	3	1	9	43	43	4	16	80	80	3
3	5	27	30	4	4	20	53	6	1	3	83	5
4	7	37	67	7	3	17	70	9	3	17	100	8
5	1	3	70	8	1	3	73	10	0	0	100	8
6	0	0	70	8	1	7	80	12	0	0	100	8
7	0	0	70	8	0	0	80	12	0	0	100	8
ΠΕΙΡΑΜΑ 4 (230 ημέρες μετά τον εμβολιασμό)												
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	3	15	15	3
5	5	5	5	2	2	10	10	2	5	25	40	4
6	0	0	5	2	1	5	15	3	1	5	45	5
7	8	8	13	3	2	10	25	5	3	15	60	8
8	7	7	20	4	1	5	30	7	0	2	62	9
9	5	5	25	6	2	10	40	9	3	15	77	11
10	0	0	25	6	0	0	40	9	0	0	77	11
ΠΕΙΡΑΜΑ 5 (306 ημέρες μετά τον εμβολιασμό)												
	δόση 1 ml/ψάρι			δόση 1 ml/ψάρι				δόση 1,3 ml/ψάρι				
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	7	35	35	2	10	50	50	0	6	32	32	2
4	3	13	48	6	0	0	50	0	10	52	83	3
5	8	38	87	8	2	8	58	3	2	8	92	6
6	0	0	87	8	1	5	63	5	2	8	100	9
7	0	0	87	8	0	0	63	5	0	0	100	9



Σχήμα 3.7 Γραφήματα % αθροιστικής θνησιμότητας και τυπικής απόκλισης, ανά πειραματική μόλυνση με *Vibrio (Listonella) anguillarum*.

Από τον πίνακα 3.9 και το σχήμα 3.7, από την % αθροιστική θνησιμότητα που δίνεται, φαίνεται ότι το ελαιώδες ανοσοενισχυμένο εμβόλιο AlphaJect 2000 προσφέρει μεγαλύτερη προστασία στα μολυσμένα με *L. anguillarum* ψάρια που εμβολιάστηκαν με αυτό, σε σχέση με τα εμβολιασμένα ψάρια με το υδατοδιαλυτό εμβόλιο AquaVac και σε σχέση με τα ανεμβολίαστα ψάρια (μάρτυρες-control) (Spinós et al. 2017).



Σχήμα 3.8 Γράφημα θνησιμότητας και τυπικής απόκλισης σε 5 πειραματικές μολύνσεις με *Listonella (Vibrio) anguillarum*.

Στο σχήμα 3.8 δίνονται γραφήματα θνησιμότητας στα πειράματα που διεξήχθησαν με τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listonella (Vibrio) anguillarum* με τον οποίο έγινε η μόλυνση. Όπου: AJ=Alphaject 2000, AV=Aquavac, CON=μάρτυρες-Control.

Για τη σύγκριση των καμπυλών αθροιστικής θνησιμότητας για κάθε εμβόλιο και κάθε πείραμα διεξήχθη πολυμεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (multivariate analysis of variance: MANOVA). Οι παράγοντες αυτοί ήταν οι ημέρες (που χρειάζονται για αυτήν την παραλλαγή του παράγοντα λόγω της άθροισης της θνησιμότητας) τα εμβολιασμένα ψάρια και τα ψάρια μάρτυρες. Πριν από την εφαρμογή τα στοιχεία MANOVA μετατράπηκαν (όπως δίνονται σε ποσοστά) σε \sqrt{M} (για την προσέγγιση εξομάλυνσης) (ZAR, 1999). Στη συνέχεια, για να προσδιορισθεί η στατιστικά σημαντική διαφορά χρησιμοποιείται η LSD δοκιμή (τεστ πολλαπλών συγκρίσεων για να εξετασθεί μεταξύ ποιων μεταβλητών υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά) και θα πρέπει για να μην υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά να είναι το $p \leq 0,05$ μεταξύ των παραμέτρων του κάθε παράγοντα.

Οι παράγοντες σε όλες τις ημέρες έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε όλες τις πειραματικές μολύνσεις που διενεργήθηκαν με το *L. anguillarum*. Στον παρακάτω πίνακα 3.10, αναφέρονται τα στατιστικά στοιχεία για τα εμβόλια ως προς τον παράγοντα MANOVA ανά πείραμα.

Πίνακας 3.10 Δείκτες στατιστικής ανάλυσης και στατιστική διαφορά μεταξύ των παρτίδων των ψαριών που συμμετείχαν στη μελέτη (*L. anguillarum*).

Πείραμα	df	F	P	LSD
1	2,46	48.25	0.000	ALPHAJECT<AQUAVAC<CONTROL
2	2,78	74.29	0.000	ALPHAJECT<AQUAVAC<CONTROL

3	2,54	56.18	0.000	ALPHAJECT<AQUAVAC<CONTROL
4	2,78	42.77	0.000	ALPHAJECT<AQUAVAC<CONTROL
5	2,54	10.95	0.001	AQUAVAC<ALPHAJECT<CONTROL

Στον πίνακα 3.11 συνοψίζονται, ο αριθμός των ψαριών που συμμετέχουν στις πειραματικές μολύνσεις με *L. anguillarum*, ο αριθμός των νεκρών ψαριών, η % θνησιμότητα και το ποσοστό σχετικής επιβίωσης RPS.

Πίνακας 3.11 Στοιχεία αριθμού ψαριών, απωλειών, % θνησιμότητα και τιμή ποσοστού σχετικής επιβίωσης RPS ανά ομάδα ψαριών (μόλυνση με *Vibrio anguillarum*).

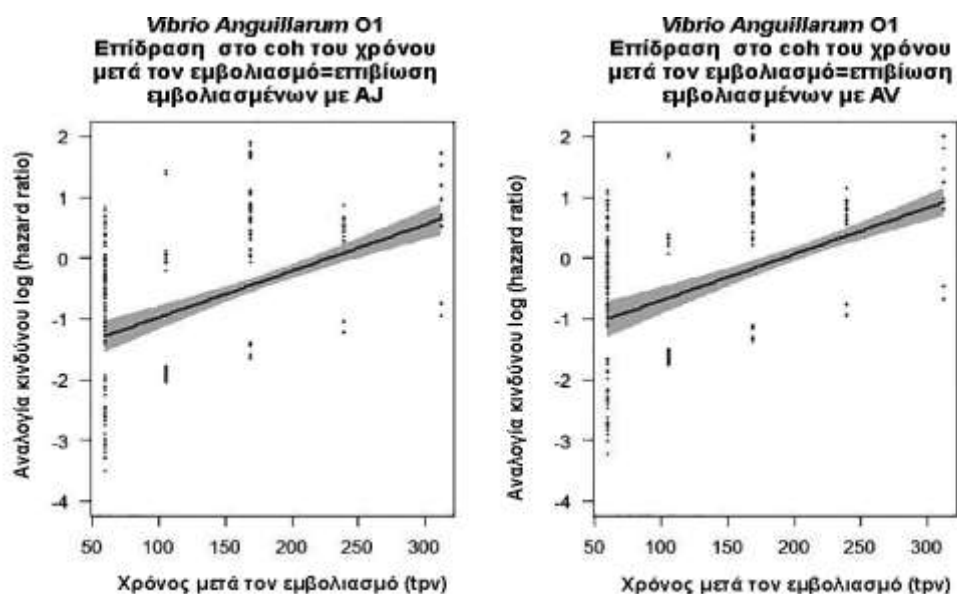
ΠΕΙΡΑΜΑ 1				
Ομάδα ψαριών	Αριθμός ψαριών	Απώλειες	% Θνησιμότητα	Τιμή RPS
Control	60	60	100	-
AlphaJect 2000	60	37	62	38
AquaVac	60	46	77	23
ΠΕΙΡΑΜΑ 2				
Ομάδα ψαριών	Αριθμός ψαριών	Απώλειες	% Θνησιμότητα	Τιμή RPS
Control	60	33	55	-
AlphaJect 2000	60	3	5	90,9
AquaVac	60	6	10	81,8
ΠΕΙΡΑΜΑ 3				
Ομάδα ψαριών	Αριθμός ψαριών	Απώλειες	% Θνησιμότητα	Τιμή RPS
Control	60	60	100	-
AlphaJect 2000	60	42	70	30
AquaVac	60	54	90	10
ΠΕΙΡΑΜΑ 4				
Ομάδα ψαριών	Αριθμός ψαριών	Απώλειες	% Θνησιμότητα	Τιμή RPS
Control	60	46	77	-
AlphaJect 2000	60	15	25	67,6
AquaVac	60	24	40	48,1
ΠΕΙΡΑΜΑ 5				
Ομάδα ψαριών	Αριθμός ψαριών	Απώλειες	% Θνησιμότητα	Τιμή RPS
Control (dose 1 ml)	60	60	100	-
AlphaJect 2000 (dose	60	52	87	13

1 ml)				
AquaVac dose (1,3 ml)	60	38	53	47

3.3.4.1 Ανάλυση δεδομένων πειραματικών μολύνσεων με *L. (Vibrio) anguillarum*

Σε 4 από τις 5 δοκιμές αποτελεσματικότητας που πραγματοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, το εμβόλιο AJ παρείχε μεγάλη προστασία στα ψάρια που μολύνθηκαν με το *L. anguillarum* O1 (εκτός από το 5ο πείραμα αποτελεσματικότητας όπου παρατηρήθηκε μεγαλύτερη προστασία από το εμβόλιο AV). Το επίπεδο προστασίας από το εμβόλιο Alphaject 2000 (όπως υποδεικνύεται από το υπολογισμένο RPS) κυμάνθηκε από 38% κατά τη διάρκεια του 1ου πειράματος (54 ημέρες μετά τον εμβολιασμό - DPV), σε 90,9% κατά τη διάρκεια του 2ου (96 dpv), 30% κατά τη διάρκεια του 3ου (163 DPV), 67,6% κατά τη διάρκεια του 4ου πειράματος (230 dpv) και 13% κατά τη διάρκεια του 5ου (306 DPV). Στο πρώτο, το τρίτο και το πέμπτο πείραμα ασκείται πολύ υψηλή βακτηριακή πίεση στα εμβολιασμένα ψάρια, κάτι που αποδεικνύεται από τη θνησιμότητα 100% που επιτεύχθηκε στις ομάδες ελέγχου (control). Αυτό επηρέασε την απόδοση και των δύο εμβολιασμένων ομάδων, όπως φαίνεται από τις σχετικές χαμηλές τιμές του RPS. Οι τιμές RPS για τα δύο εμβόλια είχαν βελτιωθεί σημαντικά, όταν μετρήθηκε στους μάρτυρες μέσος όρος θνησιμότητας ή χαμηλότερη θνησιμότητα από το 100%, κατά τη διάρκεια του δεύτερου πειράματος (θνησιμότητα ελέγχου 55%) και στο 4ο πείραμα (77% θνησιμότητα στην ομάδα ελέγχου).

Σε όλα τα πειράματα η επιβίωση των εμβολιασμένων ομάδων ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου. Το ανοσοενισχυμένο εμβόλιο είχε καλύτερη απόδοση σε σύγκριση με το υδατικό εμβόλιο και ήταν σημαντική στο 1ο και 3ο πείραμα αποτελεσματικότητας (D54 και D163 pv, $p=3,84 \times 10^{-6}$ $5,92 \times 10^{-5}$ αντίστοιχα), με τις δύο δοκιμές που εκτελούνται υπό υψηλή βακτηριακή πίεση, αλλά αυτό δεν ήταν η περίπτωση για το 2ο, 4ο και 5ο πείραμα (D96, D230 και D306 pv, $p = 0,279, 0,0718$ και $0,0562$, αντίστοιχα).



Σχήμα 3.9 Επίδραση του χρόνου μετά τον εμβολιασμό (TPV) σε αναλογία κινδύνου πειραματικά μολυσμένων ψαριών με *V. anguillarum* O1 που είχαν εμβολιαστεί είτε με AJ ή με AV.

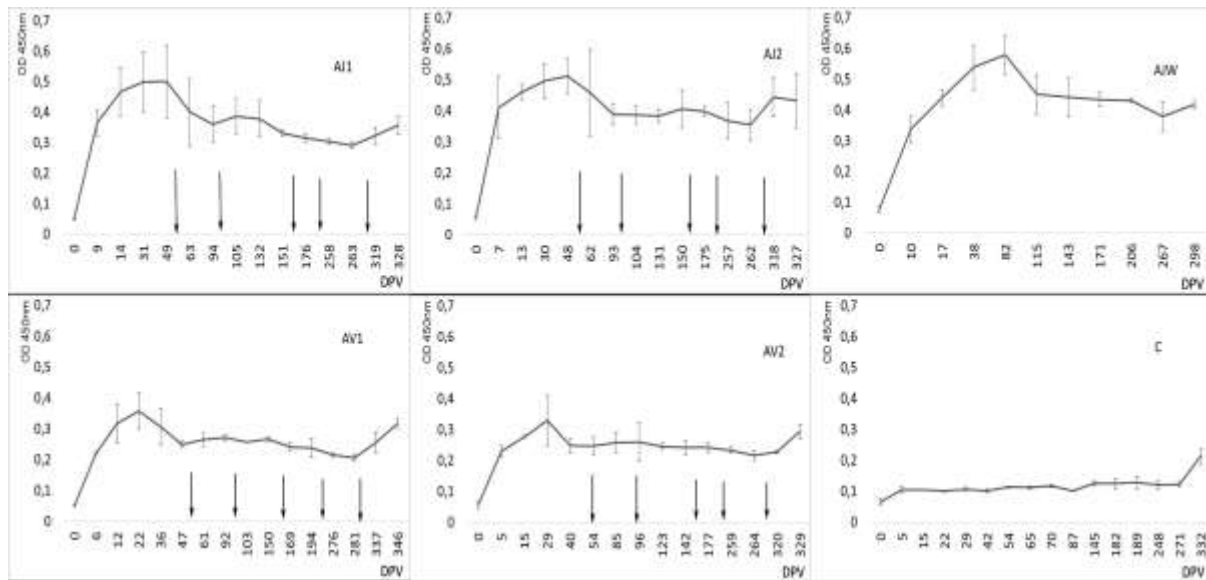
Για να προσδιοριστεί ποιο από τα δύο εμβόλια απέδωσε καλύτερα μακροπρόθεσμα, συλλέχθηκαν τα αποτελέσματα 12 περίπου μηνών που διήρκησαν οι δοκιμές αποτελεσματικότητας έναντι των δύο παθογόνων και αξιολογήθηκαν με ανάλυση παλινδρόμησης του Cox. Οι αξιολογήσεις αυτές είχαν την ακόλουθη έκβαση.

Αναφορικά με τις ανεξάρτητες μεταβλητές που μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα των εμβολίων κατά των μολύνσεων με *L. anguillarum* O1, διαπιστώθηκε ότι όταν έγινε σύγκριση της ομάδας AV με την ομάδα ελέγχου, η μεταβλητή της θερμοκρασίας δεν ήταν σημαντική ($p = 0,13$) και αποκλείστηκε, ενώ όλες οι υπόλοιπες μεταβλητές βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές ($p < 0,001$). Έτσι, η θερμοκρασία δεν ήταν στατιστικά σημαντική στην επιβίωση των ψαριών. Όταν έγινε σύγκριση της ομάδας AJ με την ομάδα ελέγχου, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι μεταβλητές ήταν σημαντικές. Για την μεταβλητή της θερμοκρασίας, το $p = 0,012$ και όλες οι άλλες μεταβλητές είχαν $p < 0,001$. Έτσι, όλες οι μεταβλητές για το εμβόλιο AJ ήταν σημαντικές στην επιβίωση των ψαριών. Η ομάδα των μεταβλητών και για τα δύο εμβόλια ήταν σημαντική, και τα δύο εμβόλια μειώνουν τη θνησιμότητα σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα ψάρια. Όταν συγκρίθηκαν οι ομάδες AV και AJ, η μεταβλητή της θερμοκρασίας βρέθηκε να είναι μη σημαντική ($p = 0,53$), σε αντίθεση με όλες τις άλλες μεταβλητές. Και πάλι, η θερμοκρασία δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των ψαριών. Η μεταβλητή της θερμοκρασίας εξαιρέθηκε από την παλινδρόμηση Cox, η οποία εφαρμόστηκε για τις υπόλοιπες μεταβλητές. Όλοι οι συντελεστές παλινδρόμησης βρέθηκαν θετικοί αλλά εκείνοι των μεταβλητών του TPV και της μόλυνσης ήταν πολύ κοντά στο μηδέν. Σημαντική μεταβλητή ήταν το TPV και το ανοσοενισχυμένο εμβόλιο AJ παρείχε μεγαλύτερη προστασία ($p = 0,013$) σε σύγκριση με το υδατοδιαλυτό εμβόλιο AV. Στα άτομα που είχαν εμβολιαστεί με AV υπήρχε 32% μεγαλύτερη (σε σύγκριση με τα άτομα που εμβολιάστηκαν με AJ) πιθανότητα θνησιμότητας. Αυτό το ποσοστό θνησιμότητας, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.9, αυξανόταν και για τις δύο εμβολιασμένες ομάδες ψαριών με την πάροδο του χρόνου, αλλά ήταν σημαντικά χαμηλότερη για την ομάδα AJ σε σύγκριση με την ομάδα AV.

3.3.4.2 Ειδική ανοσολογική απόκριση (*L. anguillarum*)

Τριπλά δείγματα ορού συλλέγονταν για σχεδόν ένα χρόνο μετά τον εμβολιασμό, από κάθε διπλότυπη πειραματική ομάδα και από την ομάδα που εμβολιάστηκε κατά τη διάρκεια του χειμώνα και χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ELISA έναντι του *L. anguillarum* O1, προκειμένου να μετρηθούν τα επίπεδα ειδικών αντισωμάτων που παράγονται κατά αυτών των παθογόνων.

Οι ειδικοί τίτλοι αντισωμάτων έναντι του *L. anguillarum* O1 δίνονται στο σχήμα 3.10.



Σχήμα 3.10 Επίπεδα ειδικών αντι-*L. anguillarum* αντισωμάτων O1 στην πάροδο του χρόνου μετά τον εμβολιασμό. AJ: ανοσοενισχυμένο εμβόλιο, AV υδατικό εμβόλιο, C: ομάδα ελέγχου, AJW: ομάδα η οποία εμβολιάστηκε κατά τη διάρκεια του χειμώνα. DPV: ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Τα βέλη υποδεικνύουν τις δοκιμές αποτελεσματικότητας έναντι *L. anguillarum* O1 που εκτελέστηκαν κατά την διάρκεια της μελέτης.

Σε όλες τις περιπτώσεις τα ειδικά επίπεδα αντισωμάτων αυξήθηκαν απότομα από την πρώτη εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό και έφτασαν σε ανώτερο σημείο κατά την ημέρα 48-49 μετά τον εμβολιασμό για την ομάδα AJ και την ημέρα 22-29 για την ομάδα AV. Τα ειδικά αντι-*L. anguillarum* O1 αντισώματα στη συνέχεια άρχισαν να μειώνονται και συνέχισαν μειούμενα ομαλά για μεγάλο χρονικό διάστημα μέχρι το τέλος της μελέτης.

Ειδικά επίπεδα αντι-*L. anguillarum* O1 αντισωμάτων προκαλούνται από το εμβόλιο AJ και ήταν καθ' όλη την περίοδο στατιστικά σημαντικά υψηλότερα (p κυμαίνονται μεταξύ $6,094 \times 10^{-12}$ και $2,193 \times 10^{-9}$ για όλες τις συγκρίσεις ζεύγους) από τα επίπεδα των αντισωμάτων που προκαλούνται από το εμβόλιο AV. Τα επίπεδα και για τα δύο εμβόλια ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα (p κυμαίνονται μεταξύ $2,053 \times 10^{-12}$ και $3,087 \times 10^{-13}$) από εκείνες που μετρήθηκαν για τις ομάδες ελέγχου (μάρτυρες). Δεν υπήρχε σημαντική στατιστική διαφορά ($p > 0.05$) μεταξύ των δύο αναλύσεων των ίδιων πειραματικών ομάδων. Ειδικά αντι-*L. anguillarum* O1 τίτλοι αντισωμάτων στους ορούς της εμβολιασμένης χειμερινής ομάδας (AJW) ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με εκείνες των ομάδων AV (p κυμαίνονται μεταξύ 1,275 έως $1,339 \times 10^{-9}$), την ομάδα AJ1 ($p = 0,0012$), αλλά δεν διέφερε σημαντικά από την ομάδα AJ2 ($p = 0,235$).

B. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Στον πίνακα 3.12, δίνονται στοιχεία που αφορούν σε 4 πειραματικές μολύνσεις με το παθογόνο βακτήριο Phdp με το οποίο έγινε η μόλυνση, οι ημερομηνίες εφαρμογής των πειραματικών μολύνσεων, οι ημέρες από τον εμβολιασμό ανά πείραμα, οι αριθμοί των ψαριών και η ομάδα των ψαριών που χρησιμοποιούνται σε κάθε ημερομηνία, η % αθροιστική θνησιμότητα και η τυπική απόκλιση (STDEV), και τέλος η δόση που χρησιμοποιήθηκε ανά ψάρι.

Το 1^ο πείραμα έγινε τον Οκτώβριο, είχε διάρκεια 7 ημέρες και η θνησιμότητα στα ψάρια ξεκίνησε την 3^η ημέρα. Το 2^ο πείραμα μόλυνσης έγινε το Δεκέμβριο, είχε διάρκεια 20 ημέρες

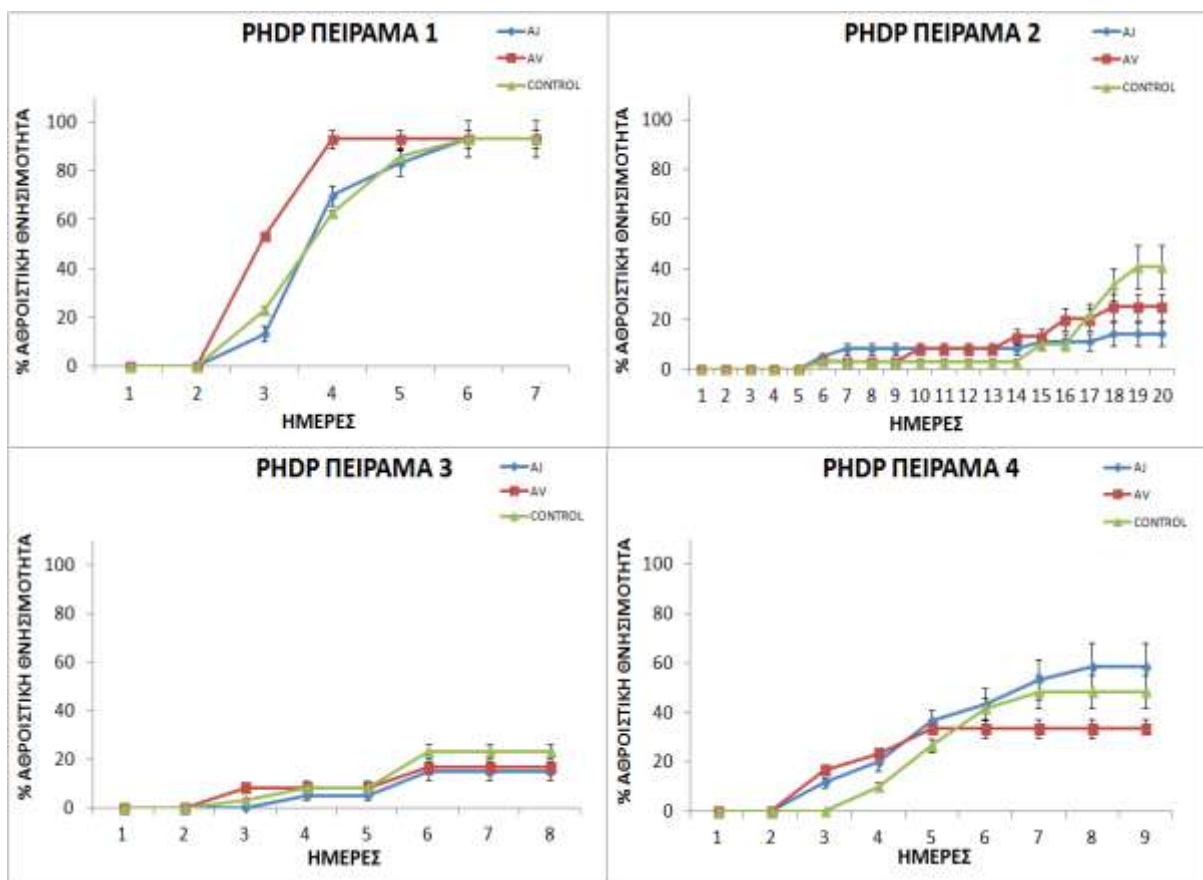
και η θνησιμότητα στα ψάρια ξεκίνησε την 6^η ημέρα. Το 3^ο πείραμα μόλυνσης έγινε το Φεβρουάριο, είχε διάρκεια 8 ημέρες και η θνησιμότητα στα ψάρια ξεκίνησε την 3^η ημέρα. Το 4^ο πείραμα μόλυνσης έγινε το Μάιο, είχε διάρκεια 9 ημέρες και η θνησιμότητα στα ψάρια ξεκίνησε την 3^η ημέρα. Σε όλα τα πειράματα με το Phdr τα ψάρια που συμμετείχαν στη μελέτη και ήταν εμβολιασμένα ήταν σε καλύτερη κατάσταση από τα μη εμβολιασμένα. Το νερό των ενυδρείων των εμβολιασμένων ψαριών ήταν λιγότερο υποβαθμισμένο σε σχέση με των μη εμβολιασμένων. Τα μη εμβολιασμένα ψάρια εμφάνιζαν πιο σύντομα και πιο πολλά ερυθρήματα, έλκη και αλλοιώσεις εξωτερικά στο σώμα τους, καθώς και στην ουρά. Όλα τα προσβεβλημένα ψάρια, εμφάνισαν τα συμπτώματα της προκληθείσας ασθένειας.

Πίνακας 3.12 Ημερομηνίες εφαρμογής των πειραματικών μολύνσεων με Phdr, ο αριθμός των ψαριών, η ομάδα των ψαριών που χρησιμοποιείται σε κάθε μόλυνση και η δόση που χρησιμοποιείται ανά ψάρι.

ΟΜΑΔΑ ΨΑΡΙΩΝ		Alphaject 2000				Aquavac				Control			
ΑΡΙΘΜΟΣ ΨΑΡΙΩΝ		3Χ20				3Χ20				3Χ20			
ΗΜΕΡΑ	Μ. ΤΙΜΗ ΝΕΚΡΩΝ ΨΑΡΙΩΝ	Μ. ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ	% Μ. ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ (ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΑ)	STDEV (ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΑ)	Μ. ΤΙΜΗ ΝΕΚΡΩΝ ΨΑΡΙΩΝ	Μ. ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ	% Μ. ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ (ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΑ)	STDEV (ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΑ)	Μ. ΤΙΜΗ ΝΕΚΡΩΝ ΨΑΡΙΩΝ	Μ. ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ	% Μ. ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ (ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΑ)	STDEV (ΑΘΡΟΙΣΤΙΚΑ)	
ΠΕΙΡΑΜΑ 1 (81 ημέρες μετά τον εμβολιασμό)													
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	3	13	13	3	11	53	53	1	5	23	23	1	
4	11	57	70	4	8	40	93	3	8	40	63	1	
5	3	13	83	5	0	0	93	3	5	23	86	2	
6	2	10	93	7	0	0	93	3	1	7	93	3	
7	0	0	93	7	0	0	93	3	0	0	93	3	
ΠΕΙΡΑΜΑ 2 (142 ημέρες μετά τον εμβολιασμό)													
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	1	5	5	1	1	3	3	1	1	3	3	1	
7	1	3	8	2	0	0	3	1	0	0	3	1	
8	0	0	8	2	0	0	3	1	0	0	3	1	
9	0	0	8	2	0	0	3	1	0	0	3	1	
10	0	0	8	2	1	5	8	2	0	0	3	1	
11	0	0	8	2	0	0	8	2	0	0	3	1	
12	0	0	8	2	0	0	8	2	0	0	3	1	
13	0	0	8	2	0	0	8	2	0	0	3	1	
14	0	0	8	2	1	5	13	3	0	0	3	1	
15	1	3	11	3	0	0	13	3	1	7	10	2	
16	0	0	11	3	1	7	20	4	0	0	10	2	
17	0	0	11	3	0	0	20	4	2	12	22	4	
18	1	3	14	4	1	5	25	5	2	12	34	6	

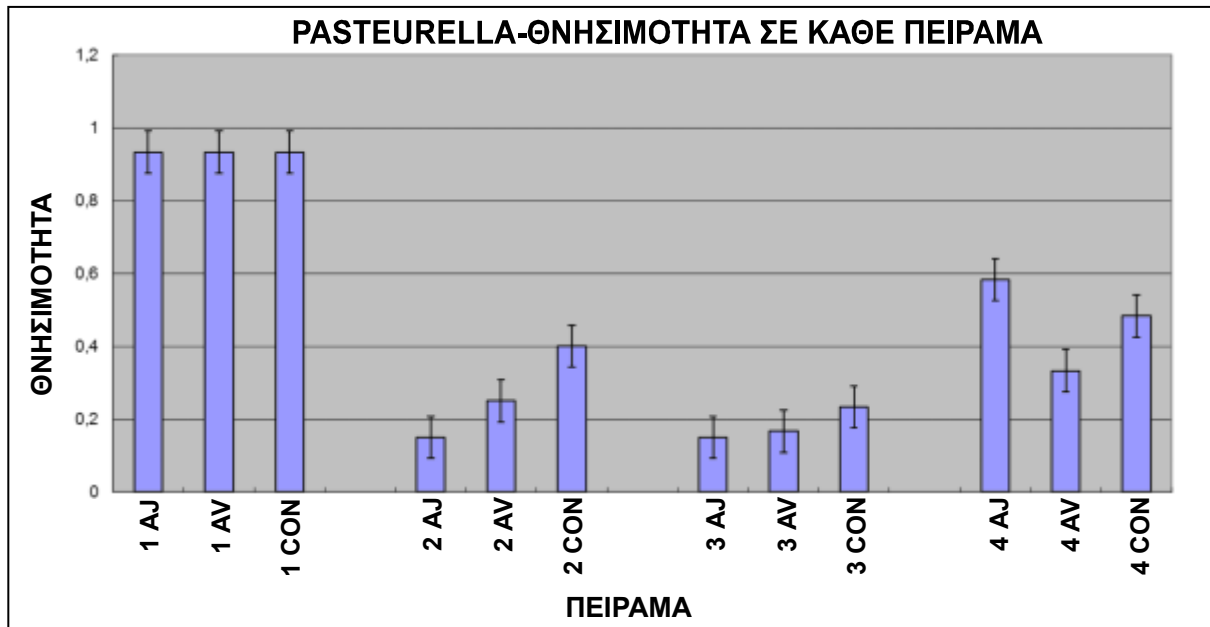
Συσχέτιση περιβαλλοντικών παραμέτρων με την εμφάνιση ασθενειών στο εκτρεφόμενο λαβράκι
Dicentrarchus labrax, L. 1758 και πρόληψη των ασθενειών αυτών

19	0	0	14	4	0	0	25	5	1	7	41	9
20	0	0	14	4	0	0	25	5	0	0	41	9
ΠΕΙΡΑΜΑ 3 (209 ημέρες μετά τον εμβολιασμό)												
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	1	8	8	1	1	3	3	1
4	1	5	5	2	1	0	8	2	1	5	8	3
5	0	0	5	2	0	0	8	2	0	0	8	3
6	2	10	15	3	2	8	17	3	3	15	23	3
7	0	0	15	3	0	0	17	3	0	0	23	3
8	0	0	15	3	0	0	17	3	0	0	23	3
ΠΕΙΡΑΜΑ 4 (287 ημέρες μετά τον εμβολιασμό)												
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2	12	12	2	3	17	17	1	0	0	0	0
4	2	8	20	4	1	7	23	2	2	10	10	2
5	3	17	37	4	2	10	33	4	3	17	27	3
6	1	7	43	6	0	0	33	4	3	15	42	4
7	2	10	53	8	0	0	33	4	1	7	48	7
8	1	5	58	10	0	0	33	4	0	0	48	7
9	0	0	58	10	0	0	33	4	0	0	48	7



Σχήμα 3.11 Γραφήματα % αθροιστικής θνησιμότητας και τυπικής απόκλισης, ανά πειραματική μόλυνση με Rhdp.

Από τον πίνακα 3.12 και το σχήμα 3.11, φαίνεται ότι το εμβόλιο AlphaJect 2000, από την % αθροιστική θνησιμότητα που δίνεται, προσφέρει μεγαλύτερη προστασία στα μολυσμένα με Phdp ψάρια που εμβολιάστηκαν με αυτό, σε σχέση με τα εμβολιασμένα ψάρια με το υδατοδιαλυτό εμβόλιο AquaVac και σε σχέση με τα ανεμβολίαστα ψάρια (μάρτυρες-control) (εκτός του 1^{ου} πειράματος) (Spinós et al. 2017).



Σχήμα 3.12 Γράφημα θνησιμότητας και τυπικής απόκλισης, σε 4 πειραματικές μολύνσεις με *Photobacterium (Pasteurella) damsela* subsp. *piscicida*.

Στο σχήμα 3.12 δίνονται γραφήματα θνησιμότητας από τα πειράματα που διεξήχθησαν με τον παθογόνο μικροοργανισμό Phdp με τον οποίο έγινε η μόλυνση, όπου: AJ=Alphaject 2000, AV=Aquavac, CON=μάρτυρας-Control. Για τη σύγκριση των καμπυλών αθροιστικής θνησιμότητας για κάθε εμβόλιο και κάθε πείραμα διεξήχθη πολυμεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (multivariate analysis of variance: MANOVA). Οι μεταβλητές αυτές ήταν οι ημέρες (που χρειάζονται για αυτήν την παραλλαγή του παράγοντα λόγω της άθροισης της θνησιμότητας) τα εμβολιασμένα ψάρια και τα ψάρια μάρτυρες. Πριν από την εφαρμογή τα στοιχεία MANOVA μετατράπηκαν (όπως δίνονται σε ποσοστά) σε $\sqrt{\ln(M)}$ (για την προσέγγιση εξομάλυνσης) (Zar 1999). Στη συνέχεια, για να προσδιορισθεί η στατιστικά σημαντική διαφορά χρησιμοποιείται η LSD δοκιμή και θα πρέπει για να μην υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά να είναι το $p \leq 0,05$ μεταξύ των μεταβλητών του κάθε παράγοντα. Οι παράγοντες σε όλες τις ημέρες έδειξαν την στατιστικά σημαντική διαφορά σε όλες τις πειραματικές μολύνσεις με το Phdp. Οι παρακάτω πίνακες (3.13 και 3.14) περιέχουν τα στατιστικά στοιχεία για τα εμβόλια ως προς τον παράγοντα MANOVA ανά πείραμα.

Πίνακας 3.13 Δείκτες στατιστικής ανάλυσης και στατιστική διαφορά μεταξύ των παρτίδων των ψαριών που συμμετείχαν στη μελέτη (Phdp).

Πείραμα	df	F	P	LSD
1	2,54	10,32	0,001	ALPHAJECT=AQUAVAC=CONTROL
2	2,158	1,56	0,210	ALPHAJECT=CONTROL<AQUAVAC

3	2,62	3,56	0,034	ALPHAJECT<AQUAVAC<CONTROL
4	2,70	4,3	0,017	CONTROL=AQUAVAC<ALPHAJECT

Όπου για $p \leq 0,05$ δίνεται από τη MANOVA η στατιστική διαφορά και το LSD δίνει την διακύμανση των διαφορετικών παρτίδων ψαριών, για παράδειγμα στο πείραμα 3: το $p = 0,34 < 0,05$, το LSD δείχνει ότι η παρτίδα των εμβολιασμένων ψαριών με το εμβόλιο ALPHAJECT έχουν μικρότερη στατιστικά σημαντική % αθροιστική θνησιμότητα από τα εμβολιασμένα ψάρια με το AQUAVAC και τα ψάρια CONTROL.

Στο σχήμα 3.12, παρατηρείται ότι στα πειράματα 2, 3, και 4 υπάρχει υψηλότερη θνησιμότητα στα μη εμβολιασμένα ψάρια (CONTROL), χαμηλότερη θνησιμότητα στα εμβολιασμένα ψάρια με το εμβόλιο AquaVac και ακόμη μικρότερη στα εμβολιασμένα ψάρια με το εμβόλιο AlphaJect 2000. Στο τελευταίο πείραμα (4^ο) φαίνεται ότι τα εμβολιασμένα ψάρια με το εμβόλιο AquaVac, προστατεύονται καλύτερα σε μόλυνση από το φωτοβακτήριο.

Στον πίνακα 3.14 συνοψίζονται, ο αριθμός των ψαριών που συμμετέχουν στις πειραματικές μολύνσεις με Phdρ, ο αριθμός των νεκρών ψαριών, η % θνησιμότητα και το ποσοστό σχετικής επιβίωσης RPS.

Πίνακας 3.14 Στοιχεία αριθμού ψαριών, απωλειών, % θνησιμότητα και τιμή ποσοστού σχετικής επιβίωσης RPS ανά ομάδα ψαριών (μόλυνση με Phdρ).

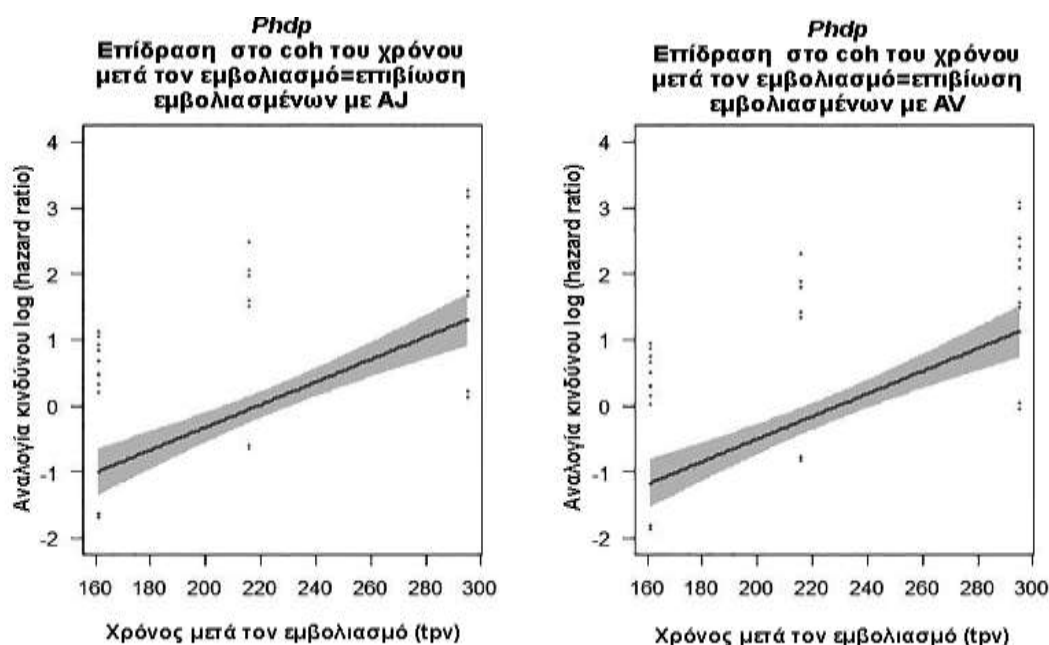
ΠΕΙΡΑΜΑ 1				
Ομάδα ψαριών	Αριθμός ψαριών	Απώλειες	% Θνησιμότητα	Τιμή RPS
Control	60	56	93	-
AlphaJect 2000	60	56	93	0
AquaVac	60	56	93	0
ΠΕΙΡΑΜΑ 2				
Ομάδα ψαριών	Αριθμός ψαριών	Απώλειες	% Θνησιμότητα	Τιμή RPS
Control	60	24	40	-
AlphaJect 2000	60	9	15	62.5
AquaVac	60	15	25	37.5
ΠΕΙΡΑΜΑ 3				
Ομάδα ψαριών	Αριθμός ψαριών	Απώλειες	% Θνησιμότητα	Τιμή RPS
Control	60	14	23	-
AlphaJect 2000	60	9	15	35
AquaVac	60	10	16	26
ΠΕΙΡΑΜΑ 4				
Ομάδα ψαριών	Αριθμός ψαριών	Απώλειες	% Θνησιμότητα	Τιμή RPS

Control	60	29	48	-
AlphaJect 2000	60	35	58	-21
AquaVac	60	20	33	31

3.3.4.3 Ανάλυση δεδομένων πειραματικών μολύνσεων με *Photobacterium damsela* sbsp. *piscicida*

Στην πρώτη δοκιμή αποτελεσματικότητας έναντι του Phdp η αθροιστική θνησιμότητα έφθασε 93% σε όλες τις πειραματικές ομάδες και δεν μπορεί να θεωρηθεί έγκυρη. Ως αποτέλεσμα, αποκλείστηκε από την ανάλυση παλινδρόμησης του Cox. Συνολικά, οι υπόλοιπες 3 δοκιμές αποτελεσματικότητας έναντι του Phdp έγιναν για να επιτευχθεί η επιθυμητή αθροιστική θνησιμότητα στην ομάδα ελέγχου και κυμάνθηκε μεταξύ 23-48%, τοποθετώντας όλες τις πειραματικές ομάδες κάτω από ήπια έως μέση βακτηριακή πίεση. Υπό αυτές τις συνθήκες, το εμπορικό ελαιώδες εμβόλιο προστατεύει τα ψάρια καλύτερα στην μόλυνση με το Phdp κατά τη διάρκεια του 2ου πειράματος (142 dpv, RPS 62,5%), και στο 3ο πείραμα (209 dpv, RPS 35,0%), ενώ στο 4ο (287 DPV), το υδατικό εμβόλιο AV παρέχει μεγαλύτερη προστασία από το ανοσοενισχυμένο εμπορικό εμβόλιο και από την ομάδα ελέγχου.

Η απόδοση των δύο εμπορικών εμβολίων δεν ήταν στατιστικά σημαντική όταν έγινε σύγκριση, εκτός από το τελευταίο πείραμα (2ο πείραμα $p = 0,196$, 3ο πείραμα $p = 0,758$, 4ο πείραμα $p = 0,0261$). Η επιβίωση των εμβολιασμένων ομάδων ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου, αλλά όχι στατιστικά σημαντική σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από την ομάδα του εμβολίου AJ και το 2ο πείραμα ($p = 0,00472$).



Σχήμα 3.13 Επίδραση του χρόνου μετά τον εμβολιασμό (TPV) σε αναλογία κινδύνου πειραματικά μολυσμένων ψαριών με Phdp που είχαν εμβολιαστεί είτε με AJ ή με AV.

Η μικροβιολογική δειγματοληψία από νεκρά ψάρια από όλες τις μολύνσεις οδήγησαν στην απομόνωση σε καθαρή καλλιέργεια του αντίστοιχου μολυσματικού παράγοντα. Για να

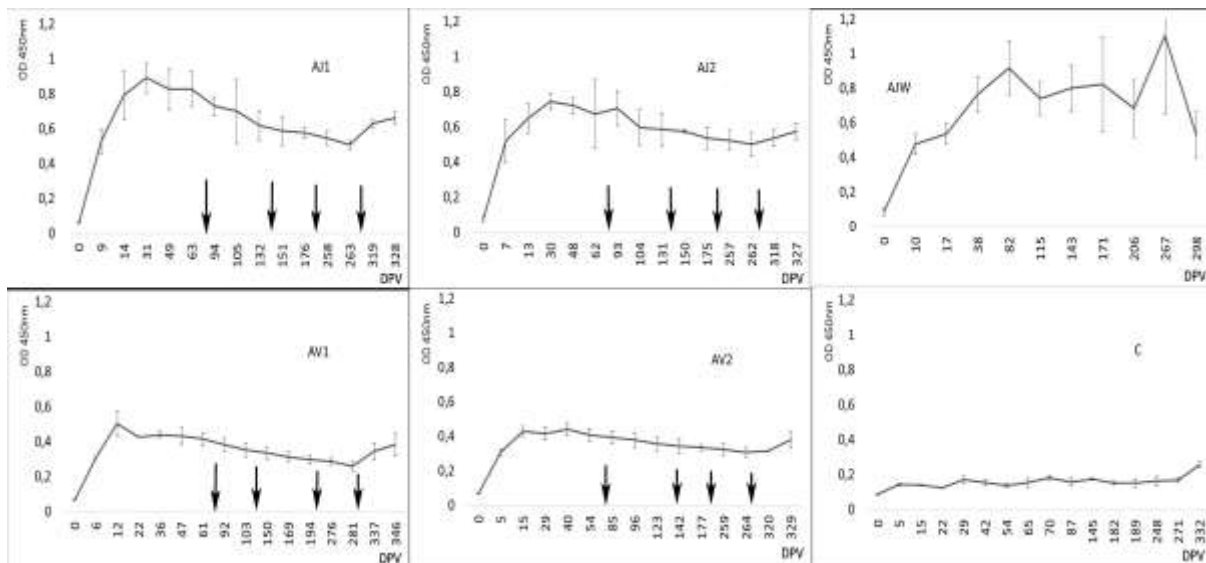
προσδιοριστεί ποιο από τα δύο εμβόλια απέδωσε καλύτερα και μακροπρόθεσμα, συλλέχθηκαν τα αποτελέσματα 12 περίπου μηνών που διήρκησαν οι δοκιμές αποτελεσματικότητας έναντι των δύο παθογόνων και αξιολογήθηκαν με ανάλυση παλινδρόμησης Cox.

Αναφορικά με τις ανεξάρτητες μεταβλητές που μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα των εμβολίων έναντι πειραματικών μολύνσεων με Phdp, βρέθηκε ότι όλες οι μεταβλητές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές όταν ελέγχθηκαν οι δύο ομάδες AJ και AV ως προς την ομάδα ελέγχου ($p = 0,97$ ομάδα AV και $p = 0,17$ ομάδα AJ). Όταν συγκρίθηκαν οι δύο ομάδες των εμβολιασμένων ψαριών, πάλι όλες οι μεταβλητές, εκτός του TPV, δεν ήταν σημαντικές. Μόνο ο χρόνος μετά τον εμβολιασμό επηρεάζει την επιβίωση των ψαριών. Η πιθανότητα θνησιμότητας όπως φαίνεται στο σχήμα 3.13 αυξήθηκε με την πάροδο του χρόνου (μεγαλύτερος κίνδυνος θνησιμότητας).

3.3.4.4 Ειδική ανοσολογική απόκριση (*Photobacterium damsela* sbsp. *piscicida*)

Τριπλά δείγματα ορού συλλέγονταν για σχεδόν ένα χρόνο μετά τον εμβολιασμό, από κάθε διπλότυπη πειραματική ομάδα και από την ομάδα που εμβολιάστηκε κατά τη διάρκεια του χειμώνα και χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ELISA έναντι του Phdp, προκειμένου να μετρηθούν τα επίπεδα ειδικών αντισωμάτων που παράγονται.

Οι ειδικοί τίτλοι αντισωμάτων αντι-*Ph. damsela* sbsp. *piscicida* φαίνονται στο σχήμα 3.14.



Σχήμα 3.14 Επίπεδα ειδικών τίτλων αντισωμάτων αντι-Phdp την πάροδο του χρόνου μετά από τον εμβολιασμό. AJ: ανοσοενισχυμένο εμβόλιο, AV: υδατικό εμβόλιο, C: ομάδα ελέγχου, AJW: ομάδα εμβολιάστηκε κατά τη διάρκεια του χειμώνα, DPV: ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Τα βέλη δείχνουν οι δοκιμές αποτελεσματικότητας έναντι Phdp εκτελέστηκαν κατά την διάρκεια της μελέτης.

Τα επίπεδα ειδικών τίτλων αντισωμάτων για όλες τις πειραματικές ομάδες αυξήθηκαν απότομα από την 1η εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό και έφτασαν στο ανώτερο σημείο κατά την ημέρα 30-

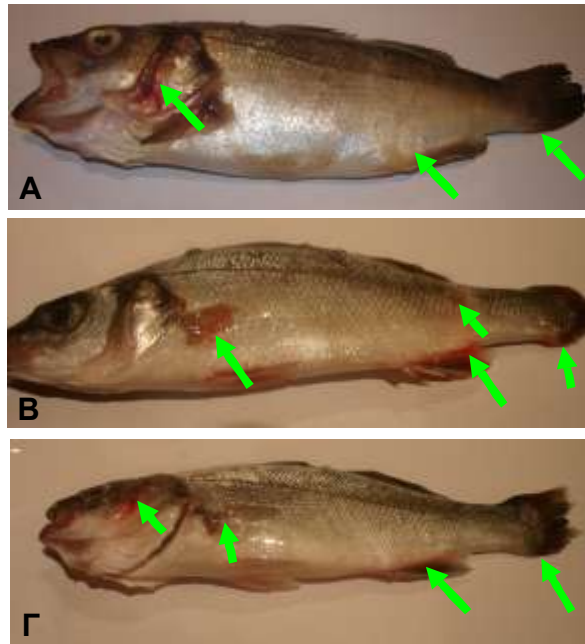
32 μετά τον εμβολιασμό για την ομάδα AJ και νωρίτερα για την ομάδα AV. Τα ειδικά αντι-Phdp αντισώματα στη συνέχεια άρχισαν να μειώνονται και συνέχισαν μειούμενα ομαλά επί μακρό χρονικό διάστημα μέχρι το τέλος της μελέτης.

Οι ειδικοί τίτλοι αντισωμάτων αντι-Phdp που προκλήθηκαν από το εμβόλιο AJ ήταν καθ' όλη την περίοδο σημαντικά υψηλότεροι (p κυμαίνεται από 1,744 έως $5,048 \times 10^{-12}$ για όλες τις συγκρίσεις ζεύγους) από τα επίπεδα των τίτλων αντισωμάτων που προκαλούνται από το εμβόλιο AV. Τα επίπεδα και για τα δύο εμβόλια ήταν σημαντικά υψηλότερα (p κυμαίνεται από $2,024-6,343 \times 10^{-13}$) από εκείνα που μετρήθηκαν για τους μάρτυρες. Δεν υπήρχε σημαντική στατιστική διαφορά (p κυμαίνονται μεταξύ 0,0532 και 0,764 για όλες τις συγκρίσεις) μεταξύ των διπλών δειγμάτων από τις ίδιες πειραματικές ομάδες. Τα επίπεδα των τίτλων αντισωμάτων αντι-Phdp στους ορούς των εμβολιασμένων της χειμερινής ομάδας (AJW) ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με εκείνες των ομάδων AV (p κυμαίνονται μεταξύ $2,4-4,79 \times 10^{-13}$), την ομάδα AJ2 ($p = 0,034$), αλλά δεν τα έκανε να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από την ομάδα AJ1 ($p = 0,463$). Συγκρίνοντας τις πειραματικές ομάδες μεταξύ τους, ως προς τα επίπεδα των ειδικών αντισωμάτων που παράγονται έναντι των *L. anguillarum* O1 και Phdp, και τα δύο εμβόλια προκάλεσαν την παραγωγή υψηλότερων επιπέδων κατά του Phdp σε σχέση με τις ομάδες μάρτυρες και αυτή η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 2,2 \times 10^{-16}$).

3.3.5 Παρενέργειες της μόλυνσης-Μακροσκοπική αξιολόγηση της εξωτερικής κατάστασης και της κοιλιακής κοιλότητας των ψαριών

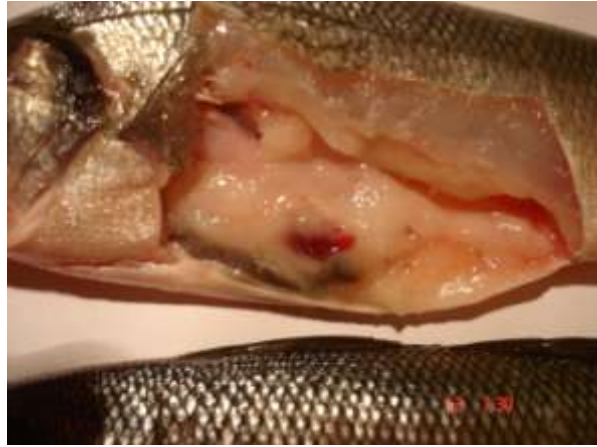
Στα ψάρια που πέθαναν από τις πειραματικές μολύνσεις, τα συμπτώματα που παρατηρήθηκαν ήταν ερυθρότητα του στόματος, έλκη στο σώμα και ερυθρότητα και προοδευτική αλλοίωση του ουραίου πτερυγίου. Εσωτερικά, τα ψάρια που πέθαναν από δονακίωση έδειξαν διόγκωση των οργάνων και αιμορραγίες ενώ παρόμοια διόγκωση και περιστασιακά υπόλευκα οζίδια παρατηρήθηκαν στον σπλήνα των ψαριών που πέθαναν από φωτοβακτηριδίωση. Τα μη εμβολιασμένα ψάρια ήταν σε πολύ χειρότερη κατάσταση από ό,τι τα εμβολιασμένα ψάρια σε όλες τις περιπτώσεις (Srinios & Bakoroulos 2014).

Η μακροσκοπική παρατήρηση της εξωτερικής κατάστασης των εμβολιασμένων και των μη εμβολιασμένων ψαριών, έδειξε τις αντιδράσεις εξωτερικά στο σώμα τους. Οι αντιδράσεις αυτές ήταν ερύθημα, έλκη και αλλοίωση του ουραίου πτερυγίου (εικόνα 3.14).



Εικόνα 3.14 Μακροσκοπική παρατήρηση της εξωτερικής κατάστασης όλων των ομάδων ψαριών που συμμετείχαν στις πειραματικές μολύνσεις (A: AV, B: AJ, Γ: CONTROL). Τα βέλη δείχνουν αλλοιώσεις, ερυθρήματα και έλκη που έχουν δημιουργηθεί στο σώμα, στο ουραίο πτερύγιο και στα υπόλοιπα πτερύγια των ψαριών από τις πειραματικές μολύνσεις (φωτογραφίες Ε. Σπίνος).

Εκτιμήθηκε η κατάσταση της κοιλιακής κοιλότητας των ψαριών κατά τη διάρκεια της μελέτης μακροσκοπικά και ιστολογικά. Παρακάτω δίνονται φωτογραφικά στοιχεία της μακροσκοπικής άποψης των κοιλιακών οργάνων σε σχέση με τον χρόνο μετά τον εμβολιασμό. Η μακροσκοπική παρατήρηση των εσωτερικών οργάνων της κοιλιακής κοιλότητας των εμβολιασμένων ψαριών με το υδατοδιαλυτό εμβόλιο AquaVac δεν έδειξε καθόλου ή έδειξε ήπιες αντιδράσεις στην κοιλιακή κοιλότητα των ψαριών που εμβολιάστηκαν με το συγκεκριμένο εμβόλιο (εικόνα 3.15). Στην κοιλιακή κοιλότητα των ψαριών που εμβολιάστηκαν με το AlphaJect 2000, το οποίο περιέχει ανοσοενισχυτικό ορυκτέλαιο, παρατηρήθηκαν περισσότερο σοβαρές φλεγμονώδεις αντιδράσεις με τη δημιουργία άσηπτων κοκκιωμάτων στο περισπλαχνικό λίπος και συμφύσεις στην κοιλιακή κοιλότητα (εικόνα 3.16).



Εικόνα 3.15 Τα εσωτερικά όργανα της κοιλιακής κοιλότητας των ψαριών που εμβολιάστηκαν με το υδατικό διάλυμα του εμβολίου AquaVac (φωτογραφία Ε. Σπίνος).

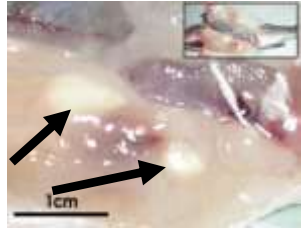
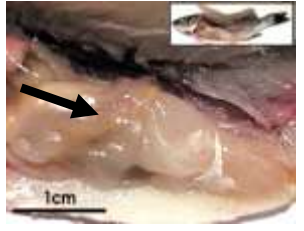
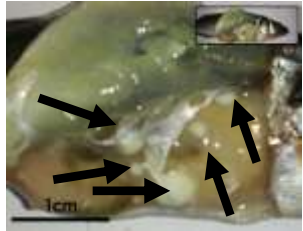
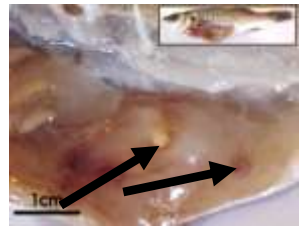
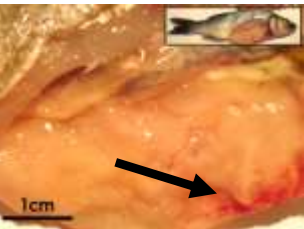
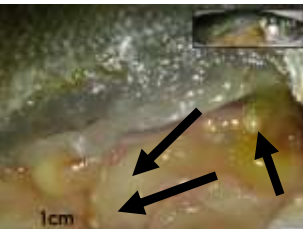







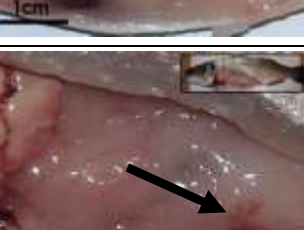
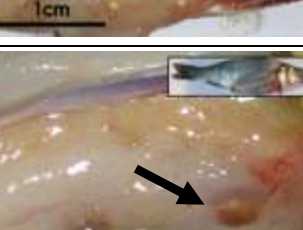


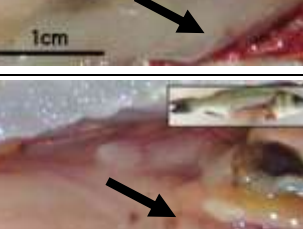


Εικόνα 3.16 Τα εσωτερικά όργανα της κοιλιακής κοιλότητας των ψαριών που εμβολιάστηκαν με το υδατικό διάλυμα του εμβολίου AlphaJect 2000 (φωτογραφία Ε. Σπίνος).

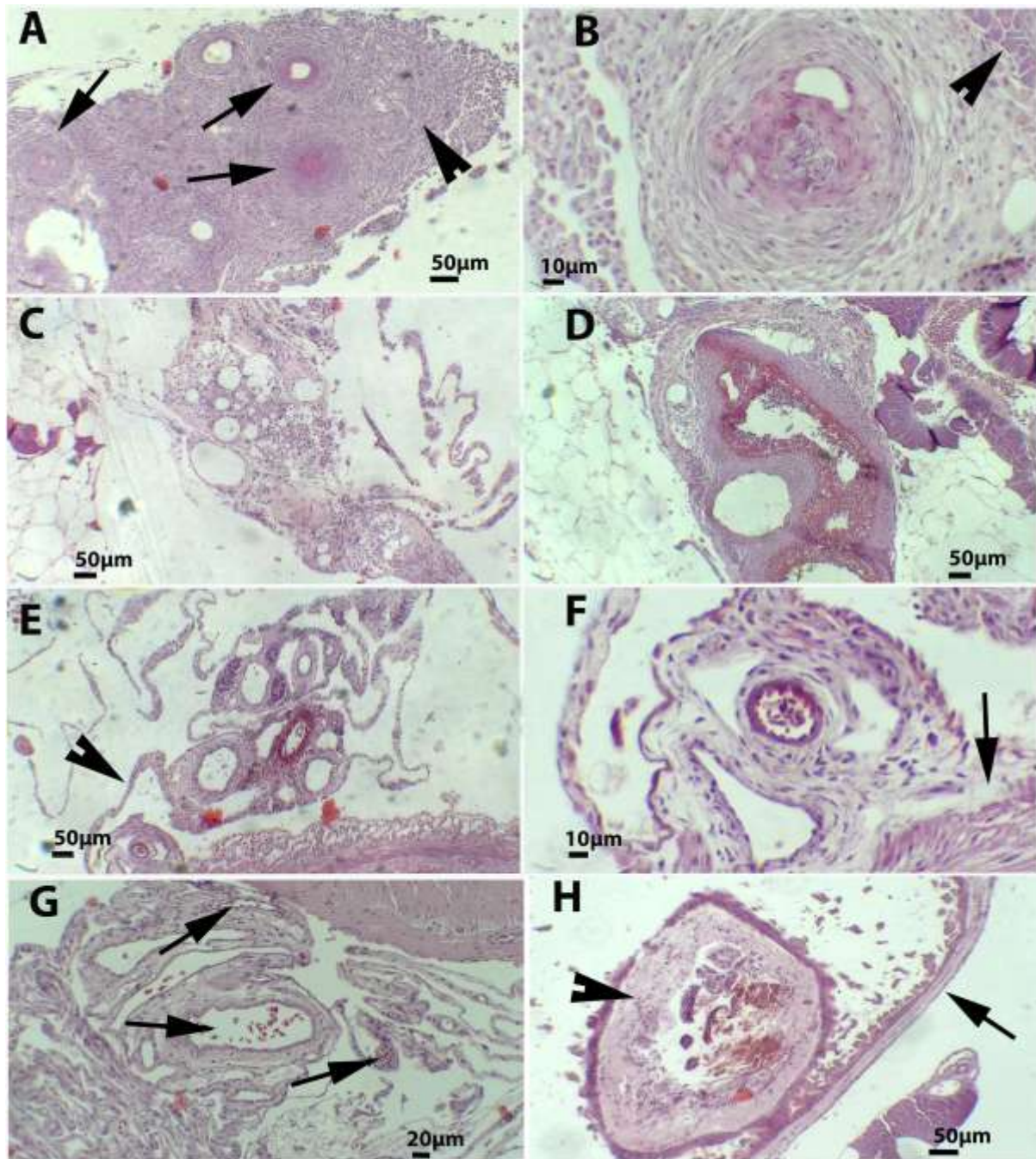
Τα κοκκιώματα ήταν σφαιρικά σε σχήμα, με χρώμα υπόλευκο, κόκκινο, μπεζ ή καφέ, η διάμετρός τους κυμαινόταν μεταξύ 0,3 και 1,2 cm και ήταν στην επιφάνεια του λιπώδους ιστού που περιβάλλει το έντερο. Αυτές οι αλλοιώσεις χαρακτηρίζονται ως άσηπτη φλεγμονώδης αντίδραση κοκκιωματώδους τύπου.

Παρακάτω στον πίνακα 3.15 συγκρίνονται οι αλλοιώσεις που προκλήθηκαν από τον εμβολιασμό στα ψάρια που εμβολιάστηκαν με Alphaject 2000 και Aquavac. Φαίνεται ότι τα ψάρια που έχουν εμβολιαστεί με Alphaject 2000 (θερινός και χειμερινός εμβολιασμός) δείχνουν κοκκιώματα που εμφανίζονται μετά τον εμβολιασμό των ψαριών και εξαπλώνονται σε όλη την κοιλιακή περιοχή (βέλη). Όπως προκύπτει από τις εικόνες στον πίνακα 3.15, τα κοκκιώματα στα ψάρια που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο Alphaject 2000, αφομοιώνονται όσο περνάει ο χρόνος από τον εμβολιασμό.

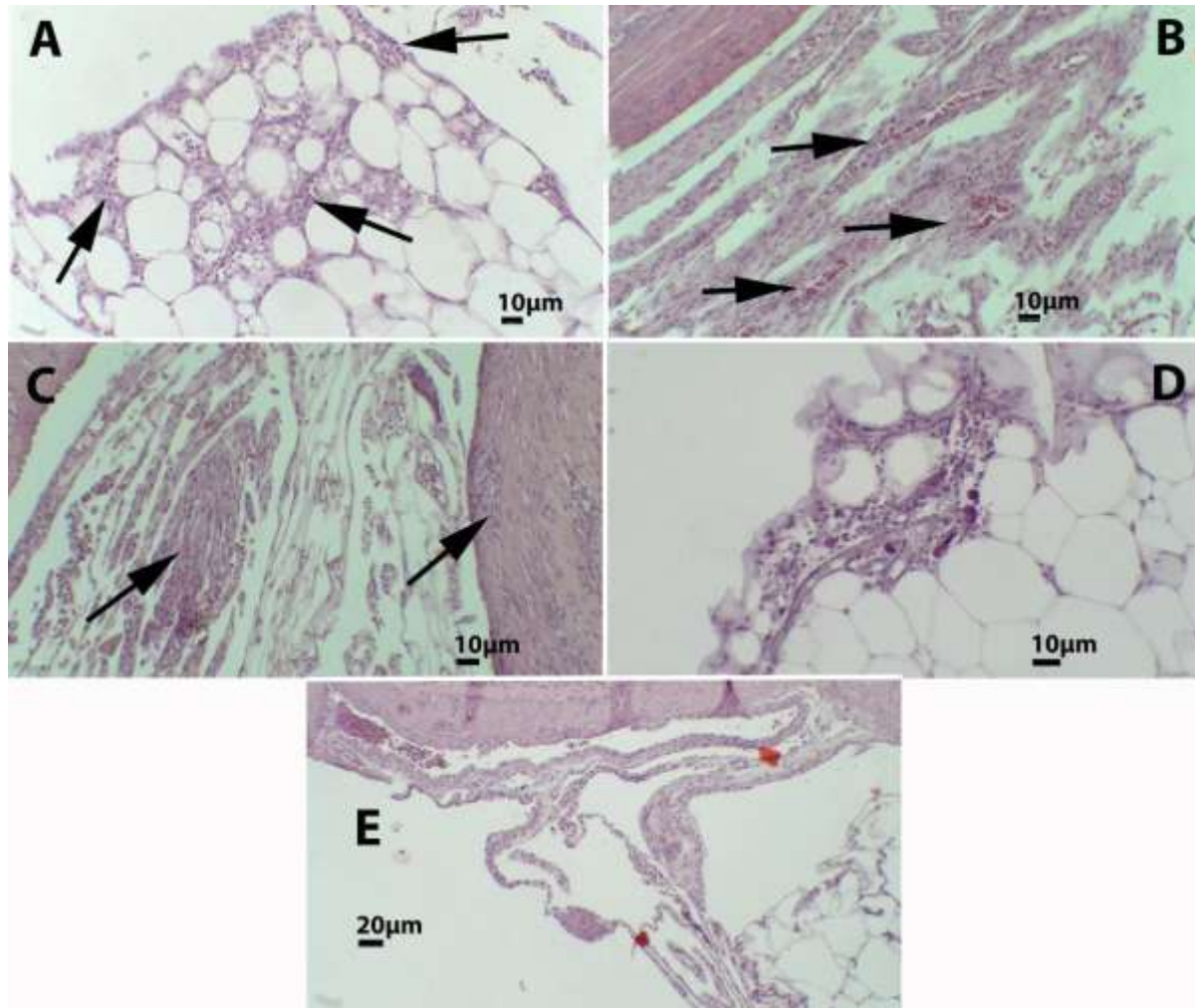
Πίνακας 3.15 Η κατάσταση της κοιλιακής κοιλότητας των ψαριών και οι ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Στήλη 2: εμβολιασμένα ψάρια με AJ, Στήλη 4: εμβολιασμένα ψάρια με AV, Στήλη 6: εμβολιασμένα ψάρια με AJ κατά τον χειμερινό εμβολιασμό. Τα βέλη δείχνουν τις αντιδράσεις στην κοιλιακή περιοχή των ψαριών από τα εμβόλια (φωτογραφίες Ε. Σπίνος).

Ημέρες μετά τον Εμβολιασμό	Εμβόλιο AJ	Ημέρες μετά τον Εμβολιασμό	Εμβόλιο AV	Ημέρες μετά τον Εμβολιασμό	Εμβόλιο AJ
7		7		28	
47		39		42	
112		104		70	
162		154		99	
290		282		127	
356		348		163	

Στα ψάρια που εμβολιάστηκαν με το ανοσοενισχυμένο εμβόλιο, επτά ημέρες μετά τον εμβολιασμό, εμφανίστηκαν υπόλευκα μαλακά κοκκιώματα, στο σημείο της έγχυσης του εμβολίου, με μέγεθος που κυμαίνεται από λίγα χιλιοστά έως 1 cm, καθώς επίσης και εμφανές ερύθημα στο λίπος που περιβάλλει το έντερο. Παρόμοιο ερύθημα παρατηρήθηκε στα ψάρια που εμβολιάστηκαν με το υδατοδιαλυτό εμβόλιο (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Ψάρια που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο AJ, εμφάνισαν σε 47 ημέρες μετά τον εμβολιασμό οζίδια που κυμαίνονται από 1-10mm με χρώμα που κυμαίνεται από μπεζ έως ανοιχτό καφέ στο κοιλιακό λίπος, ενώ τα ψάρια που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο AV εμφάνισαν μόνο ερύθημα. Δείγματα της ομάδας εμβολιασμένων ψαριών με AJ 112 ημέρες μετά τον εμβολιασμό έδειξαν καλά σχηματισμένα οζίδια που κυμαίνονταν σε μέγεθος από μερικά χιλιοστά έως 40 mm, είχαν μπεζ χρώμα και σκληρότερη υφή, ενώ στην ομάδα AV 104 ημέρες μετά τον εμβολιασμό συνεχίστηκε το τοπικό ερύθημα. Δείγματα από τις ημέρες 162 και 290 μετά τον εμβολιασμό της ομάδας εμβολιασμένων ψαριών με AJ έδειξαν επίπεδες επιφάνειες και οζίδια, με την ίδια υφή όπως και προηγουμένως, καστανού χρώματος που κυμαίνονται σε μέγεθος από μερικά χιλιοστά έως 40 mm. Η τελευταία δειγματοληψία 356 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, αποκάλυψε ότι το μεγαλύτερο μέρος των αντιδράσεων του ιστού εξαφανίστηκαν, με τις περιστασιακές 1-2 επίπεδες καφέ περιοχές να έχουν μόλις λίγα χιλιοστά μέγεθος, ενώ παρατηρήθηκαν κατά καιρούς καφέ κοκκιώματα 30 mm, τα οποία είναι απομονωμένα γύρω από τον λιπώδη ιστό. Ήπιες ή καθόλου συμφύσεις παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά σε όλες τις περιπτώσεις στα ψάρια που εμβολιάστηκαν με AJ. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν αντιδράσεις ιστού σε όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τα ψάρια που εμβολιάστηκαν με το υδατοδιαλυτό εμβόλιο AV 162 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.



Εικόνα 3.17 Μικροσκοπικά ευρήματα δειγμάτων ιστού της κοιλιακής κοιλότητα από ψάρια που εμβολιάστηκαν με το ανοσοενισχυμένο εμβόλιο: A & B: 28 ημέρες (D) μετά τον εμβολιασμό (PV), C & D: 70 ημέρες (D) μετά τον εμβολιασμό (PV), E & F: 99 ημέρες (D) μετά τον εμβολιασμό (PV), G: 163 ημέρες (D) μετά τον εμβολιασμό (PV), H: 226 ημέρες (D) μετά τον εμβολιασμό (PV) (φωτογραφίες E. Σπίνος & Β. Μπακόπουλος).



Εικόνα 3.18 Μικροσκοπικά ευρήματα δειγμάτων κοιλιακής κοιλότητας ιστού φαριών που εμβολιάστηκαν με το υδατικό εμβόλιο: A & B: 30 ημέρες (D) μετά τον εμβολιασμό (PV), C: 60 ημέρες (D) μετά τον εμβολιασμό (PV), D: 120 ημέρες (D) μετά τον εμβολιασμό (PV), E: 177 ημέρες (D) μετά τον εμβολιασμό (PV) (φωτογραφίες E. Σπίνος & Β. Μπακόπουλος).

Στην εικόνα 3.17 δίνεται η μικροσκοπική ιστολογική αξιολόγηση των ομάδων που εμβολιάστηκαν με το εμπορικό ανοσοενισχυμένο εμβόλιο AJ σε σχέση με τον χρόνο μετά τον εμβολιασμό.

Παρατηρήθηκε έντονη συσσώρευση λευκοκυττάρων (εικόνα 3.17A, αιχμές βελών) στον κοιλιακό λιπώδη ιστό και σχηματισμός κοκκιωμάτων σε διάφορα στάδια (εικόνα 3.17A, βέλη) σε όλα τα δείγματα. Τα κοκκιώματα είχαν διάφορα μεγέθη και μερικά από αυτά ήταν δίπλα στο εξωτερικό τοίχωμα του εντέρου και του παγκρεατικού ιστού (εικόνα 3.17B, κεφαλή βέλους). Το κοκκίωμα που απεικονίζεται στην εικόνα 3.17B είναι στο πρώιμο στάδιο σχηματισμού με αντιγόνα υπό επεξεργασία από τα λευκοκύτταρα στο κέντρο του σχηματισμού, που ακολουθείται από στρώματα των κυττάρων που μετασχηματίζονται σε ινοβλάστες, ενώ στα εξωτερικά στρώματα χαρακτηριστικοί ινοβλάστες με επίμηκες κυτταρόπλασμα και πυρήνα ήταν προφανείς. Μεγάλοι αριθμοί λευκοκυττάρων φαίνονται στον λιπώδη ιστό και κοκκιώματα παρατηρήθηκαν σε διάφορα μεγέθη και στάδια σχηματισμού (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται) 42 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Περιστασιακά μεγάλα κοκκιώματα παρατηρήθηκαν 70 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, αλλά το

κύριο εύρημα ήταν κοκκιώματα σε διάφορα στάδια σχηματισμού (εικόνα 3.17C) και, επιπλέον, ο σχηματισμός συσσωματωμάτων κοκκιωμάτων (εικόνα 3.17D). Η εικόνα 6E παρέχει ένδειξη σχηματισμού συνδετικού ιστού (κεφαλές βελών) μαζί με κοκκιώματα σε σχέση με το εξωτερικό τοίχωμα του εντέρου, 99 ημέρες μετά τον εμβολιασμό και η εικόνα 3.17F απεικονίζει λεπτομέρεια της σύμφυσης ανάμεσα σε ένα κοκκίωμα και του εξωτερικού τοιχώματος του εντέρου (βέλος), ενώ η γενική άποψη του κοιλιακού λιπώδους ιστού δείχνει ανάπτυξη λευκοκυττάρων. Η γενική κατάσταση της κοιλιακής κοιλότητας 127 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, είναι ένας μικρός αριθμός μεγάλων και ώριμων κοκκιωμάτων και περιστασιακά ή ανάπτυξη μικρών κοκκιωμάτων συνδεδεμένων με τον συνδετικό ιστό που σχηματίζεται στο εσωτερικό του λιπώδους ιστού (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Μικρές καλά καθορισμένες θέσεις με κοκκιώματα παρατηρήθηκαν 163 ημέρες μετά τον εμβολιασμό που συνδέθηκαν μέσω συνδετικού ιστού με το εξωτερικό τοίχωμα του εντέρου. Η εικόνα 3.17G παρουσιάζει αυτά τα ευρήματα (βέλη) στο εσωτερικό του συνδετικού ιστού. Ένα μήνα αργότερα, 191 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, η κατάσταση της κοιλιακής κοιλότητας δεν άλλαξε, με κάποιους παλιούς σχηματισμούς κοκκιωμάτων να παρατηρούνται κατά μήκος με μερικές μικρές διάσπαρτες κοκκιωματώδεις αλλοιώσεις σε καθορισμένες θέσεις (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Την ημέρα 226 μετά τον εμβολιασμό, παρατηρήθηκαν μικρότερα μεμονωμένα κοκκιώματα και υπάρχει μείωση του συνδετικού ιστού, ενώ έχουν σχηματιστεί εντός του λιπώδους ιστού, μεγάλα ώριμα κοκκιώματα. Η εικόνα 3.17H απεικονίζει νεώτερα κοκκιώματα (βέλος) να σχηματίζονται μέσα σε μεγαλύτερα, παλαιότερα κοκκιώματα (βέλος). Η δομή του λιπώδους ιστού που περιβάλλει το έντερο, 251 ημέρες μετά τον εμβολιασμό είχε επιστρέψει στην κανονική κατάσταση, ιστολογικά. Τυχαία μεγάλα, παλαιότερα κοκκιώματα με μικρότερα γειτονικά παρατηρούνται ακόμη (δεν παρουσιάζονται τα δεδομένα), αλλά σε μία ή δύο περιοχές στον λιπώδη ιστό.

Η ιστολογική μικροσκοπική αξιολόγηση των ομάδων που εμβολιάστηκαν με το υδατικό AV εμπορικό εμβόλιο σε αυξανόμενα χρονικά μετά τον εμβολιασμό δίνεται στην εικόνα 3.18. Ένα μήνα μετά τον εμβολιασμό υπήρχαν ενδείξεις μέτριας συνάθροισης λευκοκυττάρων σε ορισμένες περιοχές του λιπώδους ιστού (εικόνα 3.18A, βέλη) που περιβάλλει το έντερο, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.18B (βέλη). Ένα δίκτυο συνδετικού ιστού είναι εμφανές σε όλο το εξωτερικό εντερικό τοίχωμα. Δύο μήνες μετά τον εμβολιασμό, δεν υπάρχει αλλαγή στην κατάσταση του κοιλιακού λίπους με κάποια συσσωματώματα λευκοκυττάρων σε διάφορους τομείς και δίπλα στο εξωτερικό τοίχωμα του εντέρου. Λευκοκύτταρα παρατηρήθηκαν σε συνδετικό ιστό και μέσα στο τοίχωμα του εντέρου, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.18C (βέλη). Έγιναν οι ίδιες διαπιστώσεις όπως και για τις 90 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, ειδικά κοντά στον παγκρεατικό ιστό (δεν παρουσιάζονται τα δεδομένα). Τέσσερις μήνες μετά τον εμβολιασμό υπήρχαν λιγοστές ενδείξεις ορισμένων λευκοκυττάρων στον λιπώδη ιστό. Δεν υπήρχε καμία ένδειξη στον συνδετικό ιστό μεταξύ του εντέρου και του λιπώδους ιστού που περιβάλλει αυτό (εικόνα 3.18D). Πέντε μήνες μετά τον εμβολιασμό σε ιστολογικές τομές δεν παρατηρήθηκε τοπική συνάθροιση λευκοκυττάρων σε ιστό δίπλα στο πάγκρεας (δεν παρουσιάζονται τα δεδομένα). Την ημέρα 177 μετά τον εμβολιασμό η γενική άποψη ήταν λευκοκύτταρα που μόλις και μετά βίας παρατηρήθηκαν. Η εικόνα 3.18E δείχνει τον συνδετικό ιστό μεταξύ του τοιχώματος του εντέρου και του λιπώδους ιστού που φέρει λευκοκύτταρα. Και τα δύο δείγματα κατά τις ημέρες 212 και 237 μετά τον εμβολιασμό δεν παρουσιάζουν στοιχεία για αύξηση του αριθμού των λευκοκυττάρων στον κοιλιακό ιστό (δεν παρουσιάζονται τα δεδομένα).

3.3.6 Ανάλυση δεδομένων ανάπτυξης ψαριών

Στον πίνακα 3.16 δίνεται η ανάπτυξη του βάρους των ψαριών (μέσο βάρος) με το χρόνο, με βάση τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από την μονάδα που μελετήθηκε, ενώ στον πίνακα 3.17 δίνεται το μέσο βάρος των ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν για τη συλλογή αίματος κατά τη διάρκεια ολόκληρης της πειραματικής περιόδου και βασίζεται στα δεδομένα που συλλέχθηκαν από την ερευνητική ομάδα.

Πίνακας 3.16 Μέσο βάρος όλων των ψαριών στις ομάδες μελέτης με βάση τα στοιχεία από την ιχθυοκαλλιέργεια που μελετήθηκε.

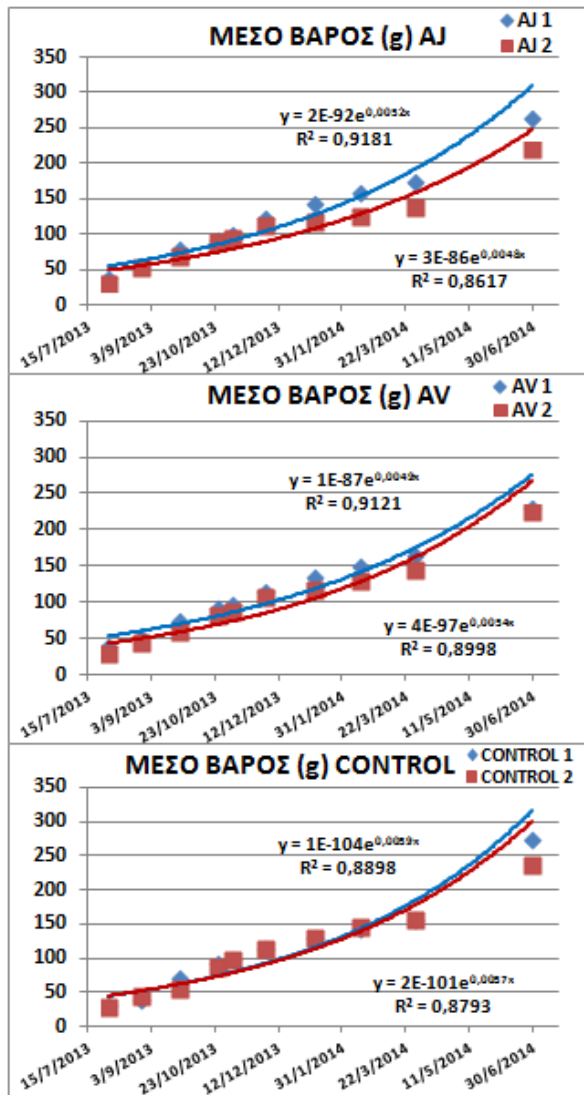
ΜΕΣΟ ΒΑΡΟΣ						
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ALPHAJECT 1	ALPHAJECT 2	AQUAVAC 1	AQUAVAC 2	CONTROL 1	CONTROL 2
1/8	40	32	40	30	32	30
26/8	57	53,6	52,6	45,7	40	48
25/9	81	70	76	61,6	71	58
26/10	95	89	92	82	93,5	89,5
6/11	103	96	98,5	88	97,8	101
2/12	125	113	115	108	115	115
10/1	145	118	135	118	130	133
15/2	160	125	150	132	144	148
30/3	176	138	165	147	156	160
30/6	265	220	275	230	225	240

Πίνακας 3.17 Μέσο βάρος από όλες τις ομάδες των ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν στη συλλογή του αίματος.

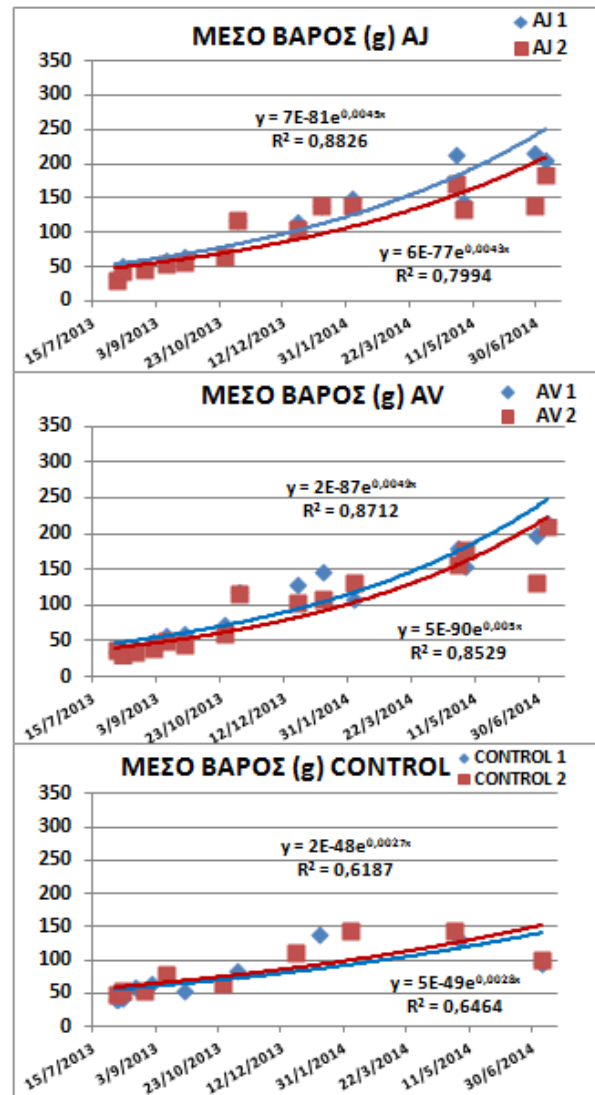
ΟΜΑΔΑ ΨΑΡΙΩΝ ALPHAJECT 1		ΟΜΑΔΑ ΨΑΡΙΩΝ AQUAVAC 1		ΟΜΑΔΑ ΨΑΡΙΩΝ CONTROL 1	
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΜΕΣΟ ΒΑΡΟΣ (g)	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΜΕΣΟ ΒΑΡΟΣ (g)	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΜΕΣΟ ΒΑΡΟΣ (g)
24/7	32,81	26/7	36,64	2/8	42,59
2/8	39,06	1/8	35,38	7/8	46,29
7/8	55,30	7/8	36,95	17/8	61,26
24/8	51,66	17/8	42,94	31/8	68,28
11/9	63,29	31/8	50,71	25/9	56,24
25/9	67,59	11/9	60,19	6/11	86,12
26/10	70,51	25/9	62,95	11/1	142,59
6/11	120,13	26/10	75,30	3/5	133,09
23/12	117,90	6/11	120,35	7/7	97,85
11/1	142,14	23/12	130,04		
5/2	150,89	11/1	148,12		
28/4	216,62	5/2	110,47		
3/5	146,36	28/4	182,20		
28/6	217,20	3/5	154,69		
7/7	207,38	28/6	197,97		
		7/7	215,69		

ΟΜΑΔΑ ΨΑΡΙΩΝ ALPHAJECT 2		ΟΜΑΔΑ ΨΑΡΙΩΝ AQUAVAC 2		ΟΜΑΔΑ ΨΑΡΙΩΝ CONTROL 2	
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΜΕΣΟ ΒΑΡΟΣ (g)	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΜΕΣΟ ΒΑΡΟΣ (g)	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΜΕΣΟ ΒΑΡΟΣ (g)
25/7	38,54	1/8	38,23	2/8	48,98
1/8	30,89	7/8	30,78	7/8	54,45
7/8	44,34	17/8	35,15	24/8	56,39
24/8	48,12	31/8	41,83	11/9	80,28
11/9	56,26	11/9	49,61	26/10	65,33
25/9	57,55	25/9	46,90	23/12	111,96
26/10	66,49	26/10	60,58	5/2	145,57
6/11	119,86	6/11	116,28	28/4	147,16
23/12	106,75	23/12	104,86	28/6	94,11
11/1	140,14	11/1	108,92		
5/2	141,99	5/2	131,96		
28/4	171,60	28/4	157,44		
3/5	136,55	3/5	178,96		
28/6	141,69	28/6	132,14		
7/7	184,58	7/7	209,90		

Τα δεδομένα από τους παραπάνω πίνακες (3.16 & 3.17) απεικονίζονται στα διαγράμματα στα σχήματα 3.15 και 3.16 αντίστοιχα, και αφορούν σε δεδομένα μέσου βάρους που συλλέχθηκαν από την μονάδα που μελετήθηκε και την ερευνητική ομάδα, αντίστοιχα. Σε κάθε γράφημα έγινε σύγκριση του μέσου βάρους ανά εμβόλιο (AlphaJect 1 με AlphaJect 2, AquaVac 1 με AquaVac 2 και Control 1 με Control 2).



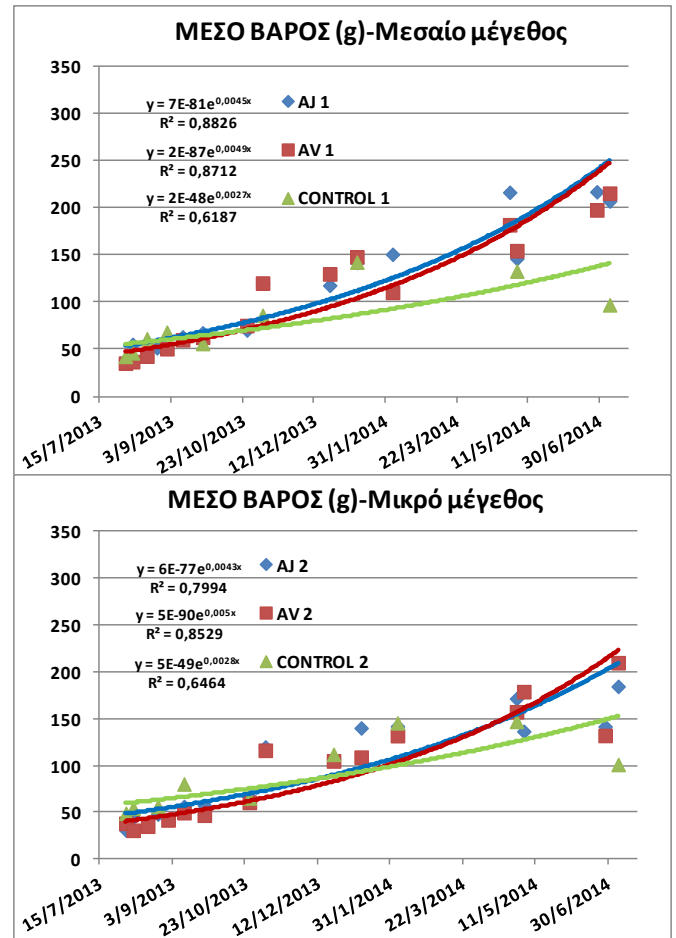
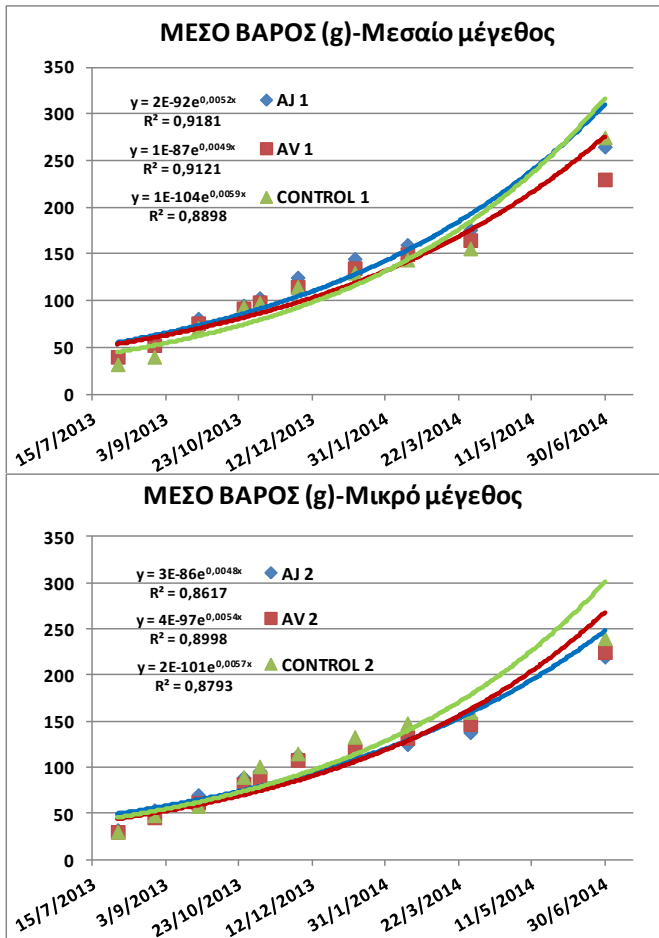
Σχήμα 3.15 Γραφήματα του μέσου βάρους όλων των ομάδων των ψαριών, με βάση τα στοιχεία από τη μονάδα που μελετήθηκε. Όπου AJ1, AV1, CONTROL 1 οι ομάδες ψαριών μεσαίου μεγέθους και AJ2, AV2, CONTROL 2 οι ομάδες ψαριών μικρού μεγέθους.



Σχήμα 3.16 Γραφήματα του μέσου βάρους όλων των ομάδων των ψαριών, με βάση τα στοιχεία των ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν στη συλλογή του αίματος. Όπου AJ1, AV1, CONTROL 1 οι ομάδες ψαριών μεσαίου μεγέθους και AJ2, AV2, CONTROL 2 οι ομάδες ψαριών μικρού μεγέθους.

Στα σχήματα 3.15 και 3.16, οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των μέσων βαρών που βασίζονται στα στοιχεία της μονάδας και τα μέσα βάρη από τα στοιχεία της ερευνητικής ομάδας είναι μικρές, κάτι που πιθανώς οφείλεται στην μεροληψία της δειγματοληψίας.

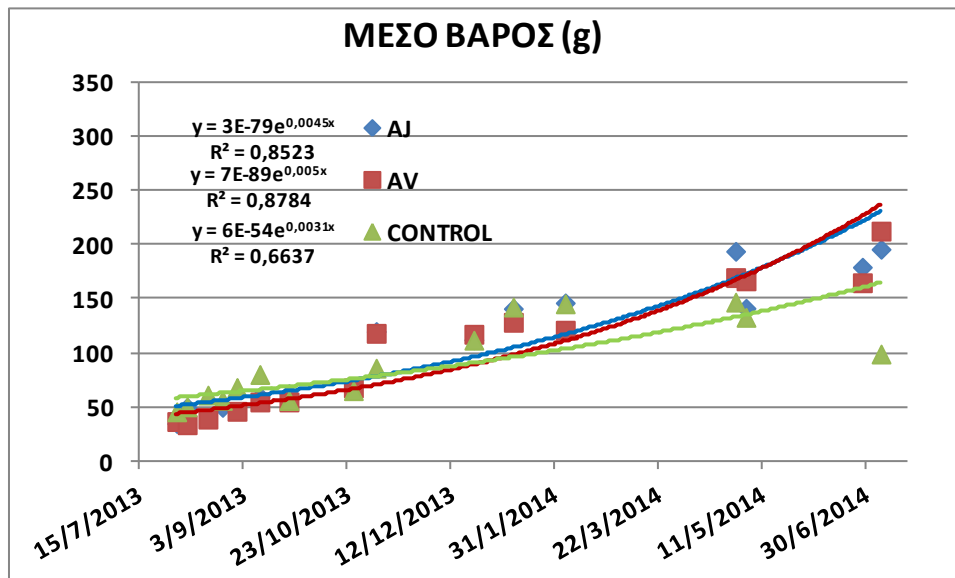
Το σχήμα 3.17, απεικονίζει τα μέσα βάρη των μεσαίων ψαριών για όλες τις ομάδες ψαριών και τα μέσα βάρη των μικρού μεγέθους ψαριών για όλες επίσης τις ομάδες ψαριών, με βάση τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από μονάδα που μελετήθηκε. Δίπλα στο σχήμα 3.18, απεικονίζεται το σχήμα 3.19, στο οποίο δίνονται τα μέσα βάρη των μεσαίων ψαριών για όλες τις ομάδες ψαριών και τα μέσα βάρη των μικρού μεγέθους ψαριών για όλες τις ομάδες, με βάση τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από την ερευνητική ομάδα.



Σχήμα 3.17 Γραφήματα του μέσου βάρους των 2 ομάδων ψαριών (μεσαίου και μικρού μεγέθους), με βάση τα στοιχεία από τη μονάδα που μελετήθηκε.

Σχήμα 3.18 Γραφήματα του μέσου βάρους των 2 ομάδων ψαριών (μεσαίου και μικρού μεγέθους), με βάση τα στοιχεία των ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν στη συλλογή του αίματος.

Είναι εμφανείς οι διαφορές μεταξύ των μέσων βαρών που βασίστηκαν σε στοιχεία της μελέτης που διενεργήθηκε και τα μέσα βάρη που συλλέχθηκαν από την ερευνητική ομάδα. Από τα ψάρια που χρησιμοποιούνται για τη συλλογή αίματος, τόσο στα μικρού όσο και στα μεσαίου μεγέθους, είναι προφανές ότι οι ομάδες μάρτυρας έχουν μειωμένη ανάπτυξη σε σχέση με τα ψάρια των εμβολιασμένων ομάδων.

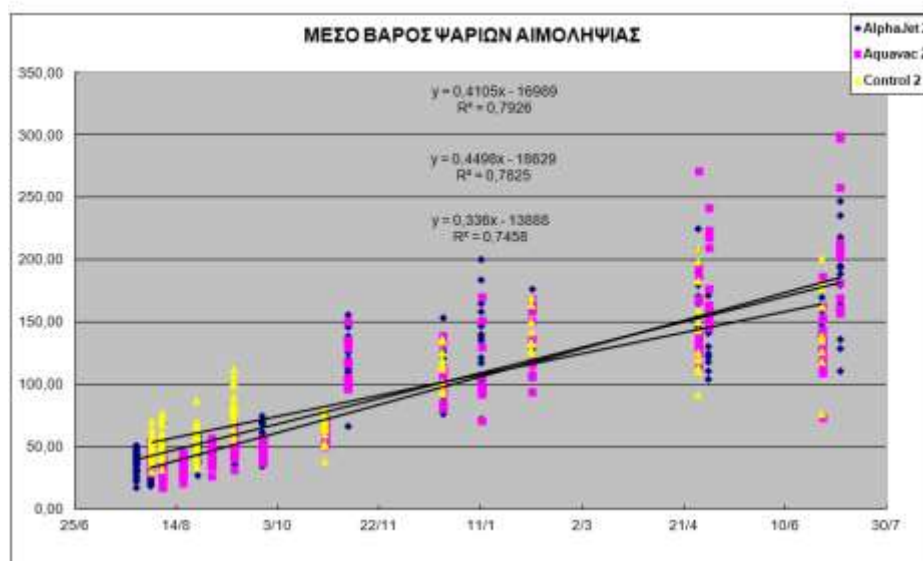
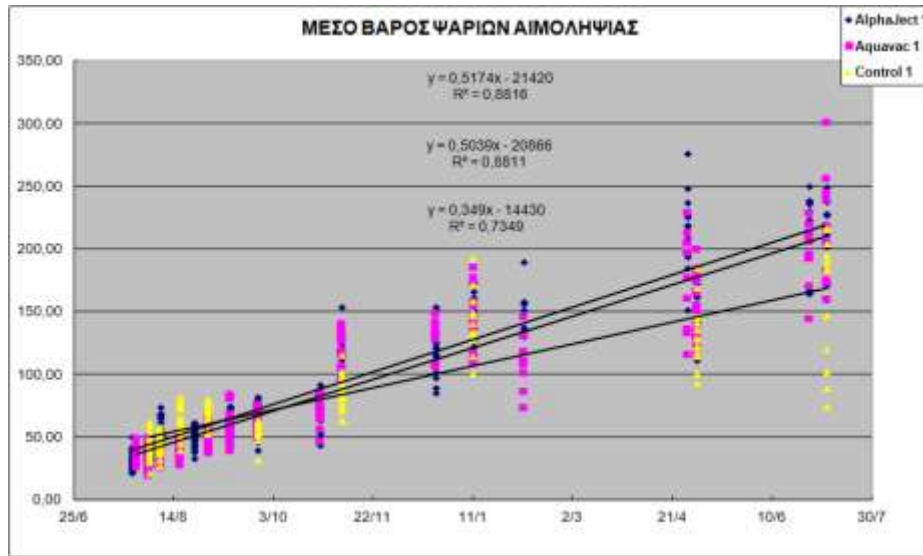


Σχήμα 3.19 Γράφημα του μέσου βάρους όλων των ομάδων των ψαριών, με βάση τα στοιχεία από τη μονάδα που μελετήθηκε.

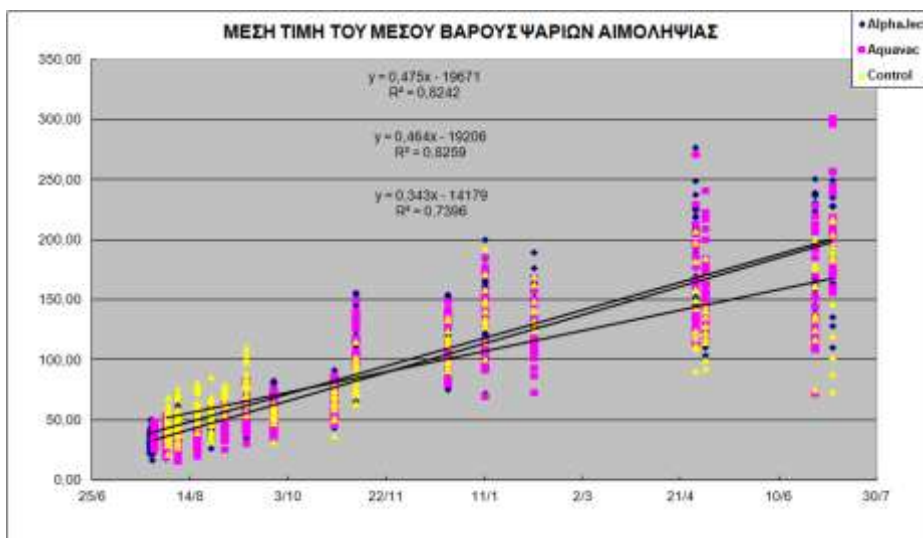
Στο γράφημα του σχήματος 3.19 δίνονται οι διαφορές του μέσου βάρους μεταξύ των εμβολιασμένων και των μη εμβολιασμένων ψαριών που βασίστηκαν σε όλα τα στοιχεία της μελέτης. Είναι προφανές ότι η ομάδα με τους μάρτυρες έχει μειωμένη ανάπτυξη σε σχέση με τα ψάρια των εμβολιασμένων ομάδων.

3.3.6.1 Στατιστική ανάλυση ανάπτυξης ψαριών

Το 1^ο γράφημα του σχήματος 3.20 δείχνει τα ατομικά βάρη όλων των μεσαίου μεγέθους ψαριών, ενώ το 2^ο γράφημα του σχήματος δείχνει τα ατομικά βάρη όλων των μικρού μεγέθους ψαριών που καταγράφηκαν κατά τη συλλογή αίματος από την ερευνητική ομάδα. Η γραφική παράσταση του σχήματος 3.20 ενσωματώνει τα βάρη όλων των ψαριών (μεσαίου και μικρού μεγέθους). Η στατιστική ανάλυση (ANCOVA) πραγματοποιήθηκε μόνο στα δεδομένα που καταγράφηκαν από την ερευνητική ομάδα, σε αντίθεση με τα στοιχεία που διατέθηκαν από την μονάδα που μελετήθηκε, όπου μόνο τα μέσα βάρη ήταν διαθέσιμα.



Σχήμα 3.20 Γραφήματα που βασίστηκαν σε στοιχεία από το μέσο βάρος όλων των ομάδων των ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν στη συλλογή αίματος.



Σχήμα 3.21 Γραφήματα που βασίστηκαν σε στοιχεία από το μέσο βάρος όλων των ομάδων των ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν στη συλλογή αίματος.

Η στατιστική ανάλυση των μέσων βαρών της ομάδας ψαριών μεσαίου μεγέθους [(Alphaject 2000 1, Aquanac 1, Control 1), είναι: (ANCOVA) $df = 5,705$, $F = 894.25$, $p = 0.000$] και έδειξε ότι η κάθε ομάδα των ψαριών είναι διακριτή. Η ίδια στατιστική διαφορά παρατηρήθηκε για τις μικρού μεγέθους ομάδες ψαριών [(Alphaject 2000 2 Aquanac 2, Control 2) και είναι: (ANCOVA), $df = 5,689$, $F = 491.88$, $p = 0,000$]. Τα αποτελέσματα από τη στατιστική ανάλυση όλων των δεδομένων [(Alphaject 2000, Aquanac, Control), είναι: (ANCOVA $df = 5,1400$, $F = 1224$, $p = 0.000$)] και πάλι είχε ως αποτέλεσμα ότι τα βάρη των ψαριών σε κάθε ομάδα ήταν διαφορετικά, με τα ψάρια μάρτυρες να φτάνουν σε μικρότερο βάρος σε σύγκριση με τις εμβολιασμένες ομάδες.

Το Σχήμα 3.21 απεικονίζει τα επιμέρους βάρη όλων των ψαριών του δείγματος κατά τη διάρκεια ολόκληρης της πειραματικής περιόδου. Η στατιστική ανάλυση (ANCOVA) των δεδομένων βάρους έδειξε ότι τα μεμονωμένα βάρη των ψαριών σε κάθε ομάδα ήταν διαφορετική, με τα ψάρια ελέγχου (control) να φθάνει το χαμηλότερο μέσο βάρος ($232,5 \pm 7,5$) σε σύγκριση με τις εμβολιασμένες ομάδες (AJ: $242,5 \pm 22,5$, AV: $252,5 \pm 22,5$).

3.3.7 Ειδικός Ρυθμός Αύξησης (SGR) και Συντελεστής Μετατρεψιμότητας Τροφής (FCR)

Στους πίνακες 3.18 και 3.19 δίνεται ο SGR των ομάδων μεσαίου και μικρού μεγέθους ψαριών και υπολογίζεται για διάφορες περιόδους. Τα δεδομένα προέρχονται από τη μονάδα που μελετήθηκε και από αυτά που συλλέχθηκαν από την ερευνητική ομάδα, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.18 Ειδικός ρυθμός αύξησης (Specific growth rate-SGR) ψαριών μεσαίου μεγέθους.

AJ1 (μεσαίο μέγεθος)	SGR	Wf	lnWf	Wi	lnWi	t
2/8	1.94	39.06	3.67	32.81	3.49	9
7/8	2.48	55.30	4.01	39.06	3.67	14
24/8	-0.22	51.66	3.94	55.30	4.01	31
11/9	0.41	63.29	4.15	51.66	3.94	49
25/9	0.11	67.59	4.21	63.29	4.15	62
26/10	0.04	70.51	4.26	67.59	4.21	94
6/11	0.51	120.13	4.79	70.51	4.26	105
23/12	-0.01	117.90	4.77	120.13	4.79	152
11/1	0.11	142.14	4.96	117.90	4.77	171
5/2	0.03	150.89	5.02	142.14	4.96	196
28/4	0.13	216.62	5.38	150.89	5.02	278
3/5	-0.14	146.36	4.99	216.62	5.38	283
28/6	0.12	217.20	5.38	146.36	4.99	339
7/7	-0.01	207.38	5.33	217.20	5.38	348

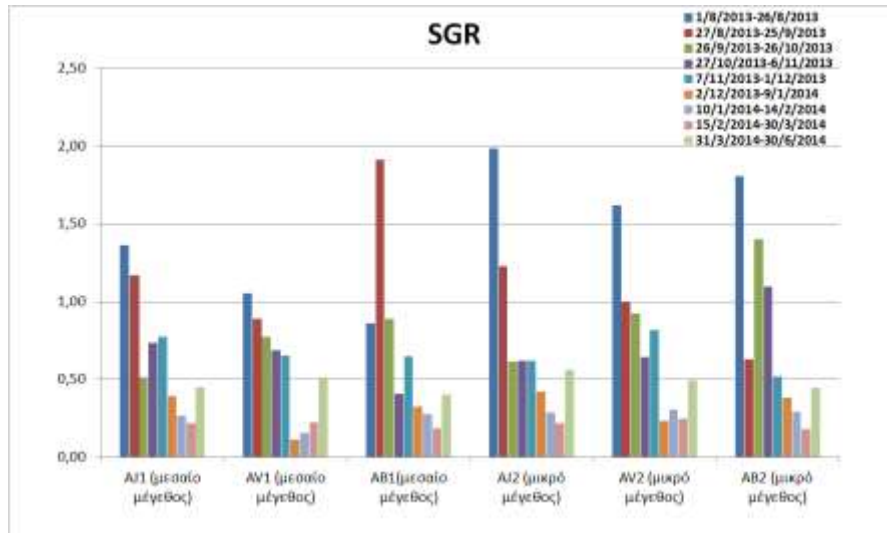
AV1 (μεσαίο μέγεθος)	SGR	Wf	lnWf	Wi	lnWi	t
1/8	-0.58	35.38	3.57	36.64	3.60	6
7/8	0.36	36.95	3.61	35.38	3.57	12
17/8	0.68	42.94	3.76	36.95	3.61	22
31/8	0.46	50.71	3.93	42.94	3.76	36
11/9	0.36	60.19	4.10	50.71	3.93	47
25/9	0.07	62.95	4.14	60.19	4.10	60
26/10	0.19	75.30	4.32	62.95	4.14	92
6/11	0.46	120.35	4.79	75.30	4.32	103
23/12	0.05	130.04	4.87	120.35	4.79	150
11/1	0.08	148.12	5.00	130.04	4.87	169
5/2	-0.15	110.47	4.70	148.12	5.00	194
28/4	0.18	182.20	5.21	110.47	4.70	276
3/5	-0.06	154.69	5.04	182.20	5.21	281
28/6	0.07	197.97	5.29	154.69	5.04	337
7/7	0.02	215.69	5.37	197.97	5.29	346
AB1 (μεσαίο μέγεθος)	SGR	Wf	lnWf	Wi	lnWi	t
7/8	1.67	46.29	3.83	42.59	3.75	5
17/8	1.87	61.26	4.12	46.29	3.83	15
31/8	0.37	68.28	4.22	61.26	4.12	29
25/9	-0.23	56.24	4.03	68.28	4.22	85
6/11	0.30	86.12	4.46	56.24	4.03	143
11/1	0.31	142.59	4.96	86.12	4.46	162
3/5	-0.03	133.09	4.89	142.59	4.96	274
7/7	-0.07	103.99	4.64	133.09	4.89	339

Πίνακας 3.19 Ειδικός ρυθμός αύξησης (Specific growth rate-SGR) ψαριών μικρού μεγέθους.

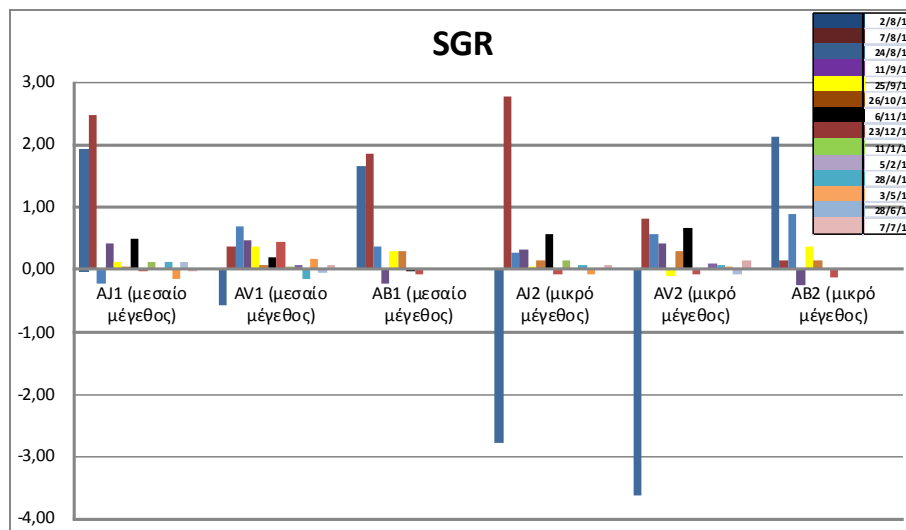
AJ2 (μικρό μέγεθος)	SGR	Wf	lnWf	Wi	lnWi	t
1/8	-3.16	30.89	3.43	38.54	3.65	7
7/8	2.78	44.34	3.79	30.89	3.43	13
24/8	0.27	48.12	3.87	44.34	3.79	30
11/9	0.33	56.26	4.03	48.12	3.87	48
25/9	0.04	57.55	4.05	56.26	4.03	61
26/10	0.16	66.49	4.20	57.55	4.05	93

6/11	0.57	119.86	4.79	66.49	4.20	104
23/12	-0.08	106.75	4.67	119.86	4.79	151
11/1	0.16	140.14	4.94	106.75	4.67	170
5/2	0.01	141.99	4.96	140.14	4.94	195
28/4	0.07	171.60	5.15	141.99	4.96	277
3/5	-0.08	136.55	4.92	171.60	5.15	282
28/6	0.01	141.69	4.95	136.55	4.92	338
7/7	0.08	184.58	5.22	141.69	4.95	347
AV2 (μικρό μέγεθος)	SGR	Wf	lnWf	Wi	lnWi	t
7/8	-3.62	30.78	3.43	38.23	3.64	6
17/8	0.83	35.15	3.56	30.78	3.43	16
31/8	0.58	41.83	3.73	35.15	3.56	30
11/9	0.42	49.61	3.90	41.83	3.73	41
25/9	-0.10	46.90	3.85	49.61	3.90	54
26/10	0.30	60.58	4.10	46.90	3.85	86
6/11	0.67	116.28	4.76	60.58	4.10	97
23/12	-0.07	104.86	4.65	116.28	4.76	144
11/1	0.02	108.92	4.69	104.86	4.65	163
5/2	0.10	131.96	4.88	108.92	4.69	188
28/4	0.07	157.44	5.06	131.96	4.88	270
3/5	0.05	178.96	5.19	157.44	5.06	275
28/6	-0.09	132.14	4.88	178.96	5.19	331
7/7	0.14	209.90	5.35	132.14	4.88	340
AB2 (μικρό μέγεθος)	SGR	Wf	lnWf	Wi	lnWi	t
7/8	2.12	54.45	4.00	48.98	3.89	5
24/8	0.16	56.39	4.03	54.45	4.00	22
11/9	0.88	80.28	4.39	56.39	4.03	40
26/10	-0.24	65.33	4.18	80.28	4.39	85
23/12	0.38	111.96	4.72	65.33	4.18	143
5/2	0.14	145.57	4.98	111.96	4.72	187
28/4	0.00	147.16	4.99	145.57	4.98	269
28/6	-0.12	99.80	4.60	147.16	4.99	330

Τα δεδομένα που αναφέρονται στους παραπάνω πίνακες απεικονίζονται παρακάτω στα διαγράμματα των σχημάτων 3.22 και 3.23.



Σχήμα 3.22 Γράφημα του ειδικού ρυθμού αύξησης (SGR) σε 9 περιόδους με βάση τα στοιχεία που προέρχονται από την μονάδα που μελετήθηκε.



Σχήμα 3.23 Γράφημα του ειδικού ρυθμού αύξησης (SGR) στη διάρκεια της μελέτης με βάση τα στοιχεία που συλλέχθηκαν από την αιμοληψία.

Στον πίνακα 3.20 δίνεται ο συνολικός ειδικός ρυθμός αύξησης (SGR_{total}) για όλη την πειραματική περίοδο, ο οποίος προέκυψε από τα στοιχεία που δόθηκαν από την μονάδα, ενώ στον πίνακα 3.21 δίνεται ο συνολικός ειδικός ρυθμός αύξησης για όλη την πειραματική περίοδο, ο οποίος προέκυψε από τα στοιχεία που συλλέχθηκαν από την ερευνητική ομάδα κατά την διάρκεια της αιμοληψίας.

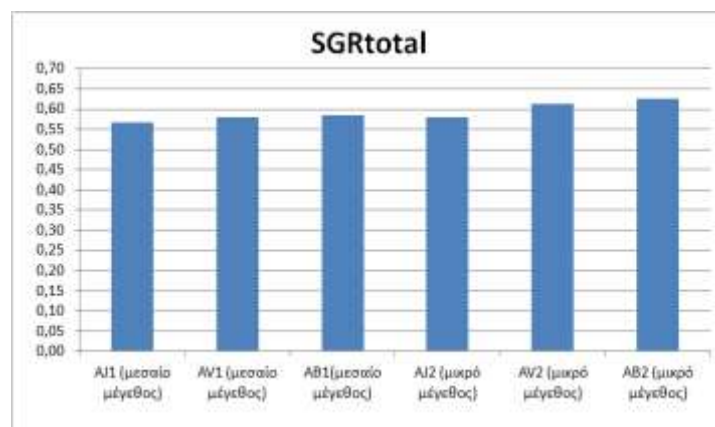
Πίνακας 3.20 Σύνολο ειδικού ρυθμού αύξησης (SGR_{total}) που υπολογίζεται από τα δεδομένα που προέρχονται από τη μονάδα μελέτης.

1/8 (πρώτου έτους)-30/6 (επόμενου έτους)	SGR total	Wf	InWf	Wi	InWi	t
AJ1 (μεσαίο μέγεθος)	0,57	265	5,58	40	3,69	333
AV1 (μεσαίο μέγεθος)	0,58	275	5,62	40	3,69	333
AB1 (μεσαίο μέγεθος)	0,59	225	5,42	32	3,47	333
AJ2 (μικρό μέγεθος)	0,58	220	5,39	32	3,47	333
AV2 (μικρό μέγεθος)	0,61	230	5,44	30	3,40	333
AB2 (μικρό μέγεθος)	0,62	240	5,48	30	3,40	333

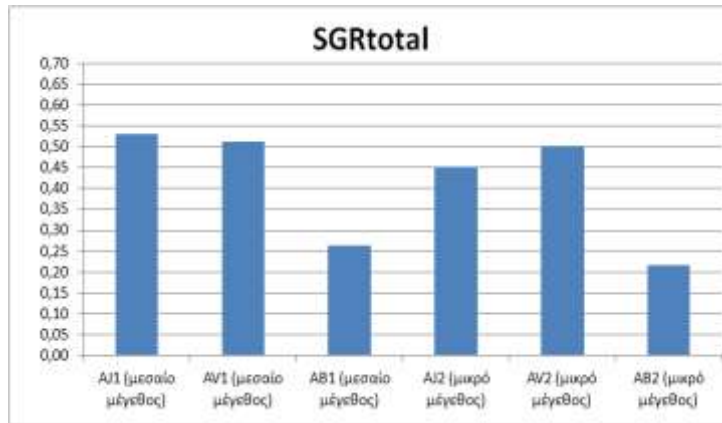
Πίνακας 3.21 Σύνολο ειδικού ρυθμού αύξησης (SGR_{total}) που υπολογίζεται από τα δεδομένα που προέρχονται από την αιμοληψία που έγινε από την ομάδα μελέτης.

24/7 (πρώτου έτους)-7/7 (επόμενου έτους)	SGR total	Wf	InWf	Wi	InWi	t
AJ1 (μεσαίο μέγεθος)	0,53	207,38	5,33	32,81	3,49	348
AV1 (μεσαίο μέγεθος)	0,51	215,69	5,37	36,64	3,60	346
AB1 (μεσαίο μέγεθος)	0,26	103,99	4,64	42,59	3,75	339
AJ2 (μικρό μέγεθος)	0,45	184,58	5,22	38,54	3,65	347
AV2 (μικρό μέγεθος)	0,50	209,9	5,35	38,23	3,64	340
AB2 (μικρό μέγεθος)	0,22	99,8	4,60	48,98	3,89	330

Το σύνολο του ειδικού ρυθμού αύξησης ψαριών SGR και για τις δύο καταστάσεις και κάθε εμβολιασμένη ομάδα απεικονίζεται στα σχήματα 3.24 (με βάση τα στοιχεία από τη μονάδα μελέτης) και 3.25 (με βάση τα στοιχεία αιμοληψίας από την ερευνητική ομάδα).



Σχήμα 3.24 Γράφημα με το σύνολο του ειδικού ρυθμού αύξησης (SGR) βασισμένο σε δεδομένα από τη μονάδα μελέτης.



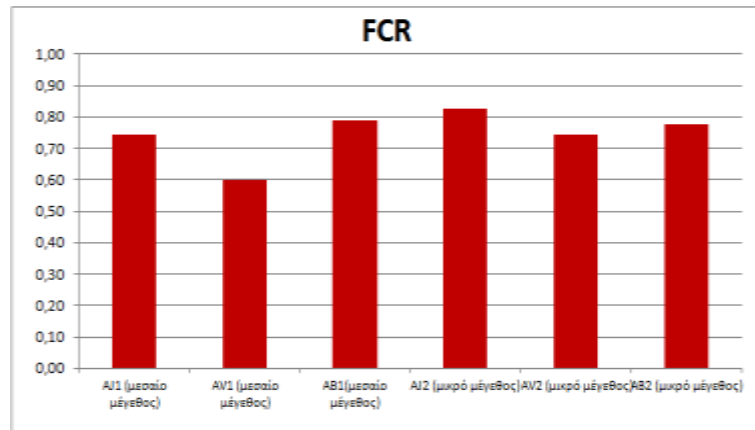
Σχήμα 3.25 Γράφημα με το σύνολο του ειδικού ρυθμού αύξησης (SGR) βασισμένο σε δεδομένα από την αιμοληψία της ομάδας μελέτης.

Σύμφωνα με τα στοιχεία που παρέχονται από τη μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας που μελετήθηκε, το συνολικό SGR για ολόκληρη την πειραματική περίοδο ήταν χαμηλότερο για τα ψάρια μάρτυρες, ανεξάρτητα από το μέγεθος, ακολουθούμενο από το SGR των ψαριών που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο Aquanac και το εμβόλιο Alphaject 2000.

Στον παρακάτω πίνακα 3.22, δίνεται ο FCR ο οποίος έχει υπολογιστεί από τα δεδομένα της μονάδας μελέτης. Τα δεδομένα αυτά είναι το μέσο βάρος (νωπών) ψαριών και η χορηγηθείσα τροφή για το σύνολο της περιόδου παρακολούθησης. Ο FCR για κάθε ομάδα μεγέθους ψαριών απεικονίζεται στο σχήμα 3.26.

Πίνακας 3.22 Συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής (FCR).

1/8 (πρώτου έτους)-30/6 (επόμενου έτους)	FCR	Wf	Wi	F
AJ1 (μεσαίο μέγεθος)	0,74	4962	782	3105
AV1 (μεσαίο μέγεθος)	0,60	5663	645	3012
AB1(μεσαίο μέγεθος)	0,79	2825	527	1816
AJ2 (μικρό μέγεθος)	0,82	4097	622	2867
AV2 (μικρό μέγεθος)	0,74	4709	690	2994
AB2 (μικρό μέγεθος)	0,78	2622	337	1773



Σχήμα 3.26 Γράφημα με τον συντελεστή μετατρεψιμότητας τροφής (FCR).

Το χαμηλότερο FCR υπολογίστηκε για τα μεσαίου μεγέθους ψάρια που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο AquaVac (0,6), ακολουθούμενο από τα μικρού μεγέθους ψάρια τα οποία εμβολιάστηκαν με AquaVac και τα μεσαίου μεγέθους ψάρια που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο Alphaject 2000 (0,74). Υψηλότερες τιμές FCR (η μέγιστη τιμή ήταν 0,82 για τα μικρού μεγέθους ψάρια που εμβολιάστηκαν με Alphaject 2000) βρέθηκαν για τις υπόλοιπες ομάδες ψαριών.

3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε πολλές μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας στην Ελλάδα, εφαρμόζεται η διαδικασία του εμβολιασμού των ψαριών παράλληλα με τη δραστηριότητα διαλογών κατά μέγεθος, όταν το μέγεθος των ψαριών φτάνει 20-30g. Συνήθως εφαρμόζεται μόνο μία φορά, εις βάρος μεγαλύτερης προστασίας που παρέχεται από αναμνηστικούς εμβολιασμούς (Λασπά 2013). Για τον αποτελεσματικό έλεγχο των επιδημιών δονακίωσης, είναι ορθότερο από την άποψη της ωρίμανσης του ανοσοποιητικού τους συστήματος, η έναρξη της ανοσοποίησης να γίνεται με εμβάπτιση, όταν τα ψάρια έχουν σωματικό βάρος 1g και μετά να λαμβάνουν αναμνηστικό εμβολιασμό με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση (ip)-περίπου 45 ημέρες-πριν την αναμενόμενη εποχή εμφάνισης κάποιας επιδημίας. Το εμβολιακό σχήμα πρέπει να καλύπτει με επάρκεια όλες τις ηλικιακές ομάδες των ψαριών στην εκτροφή (Angelidis et al. 2006). Προκειμένου να επιτευχθεί πρόληψη των ασθενειών των ψαριών που προκαλούνται απ τα βακτήρια *L. anguillarum* (ορότυπος O1 ή ορότυπος O1 και O2) και Phdρ, οι εταιρείες παραγωγής εμβολίων έχουν αναπτύξει διδύναμα εμβόλια (κατά των δύο παθογόνων) για εμβολιασμούς στα ψάρια με μία μόνο χορήγηση. Μελέτες έδειξαν ότι η προστασία που παρέχεται μετά τον εμβολιασμό κατά του *L. anguillarum* φαίνεται να είναι αποτελεσματική (Peacock & Bitchava 2010, Galeotti et al. 2013), ενώ η προστασία που παρέχεται μετά τον εμβολιασμό κατά του Phdρ είναι αμφισβητήσιμη (Nakai et al. 1992, Le Breton 1999).

Πειραματικές μολύνσεις

Η μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας στην ΒΑ Κεφαλονιά-όπου πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη-είναι απομονωμένη σε σχέση με άλλες μονάδες και λειτουργεί σε μια περιοχή στην οποία δεν υπάρχουν άλλες ανθρώπινες επιδράσεις. Η θνησιμότητα που καταγράφηκε ήταν πολύ χαμηλή και γενικά η συγκεκριμένη μονάδα δεν είχε ιστορικό έντονων προβλημάτων από ασθένειες. Αυτό, σύμφωνα και με τα δεδομένα που παρατίθενται στο 2^ο Κεφάλαιο της διατριβής, φαίνεται να οφείλεται στις φυσικοχημικές παραμέτρους και στην γεωμορφολογία της θέσης στην οποία είναι τοποθετημένη η μονάδα (βραχώδης κυρίως πυθμένας με απότομη κλίση, μεγάλο βάθος, μεγάλη ανανέωση του νερού λόγω ύπαρξης ρευμάτων). Στη μονάδα έγιναν για πρώτη φορά εμβολιασμοί κατά βακτηριακών ασθενειών την περίοδο που ξεκίνησε η παρούσα διατριβή.

Η μελέτη, διάρκειας ενός περίπου έτους, ξεκίνησε με δοκιμές πεδίου και παράλληλα με πειραματικές μολύνσεις σε ελεγχόμενες συνθήκες (ενυδρεία 250 l), ψαριών που είχαν εμβολιαστεί και διατηρούνταν στο πεδίο. Οι δοκιμές ξεκίνησαν τέλη Ιουλίου του 2013 και ολοκληρώθηκαν τον Ιούνιο του 2014. Αυτό έδωσε τη δυνατότητα, εκτός από τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας, να καταγραφούν τυχόν μακροπρόθεσμες επιδράσεις του εμβολιασμού από τα δύο εμπορικά εμβόλια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των ψαριών. Πραγματοποιήθηκαν 5 πειράματα σύγκρισης της αποτελεσματικότητας 2 εμπορικών εμβολίων έναντι της δονακίωσης και 4 πειράματα κατά της φωτοβακτηριδίασης, σε εκτρεφόμενο λαβράκι, μέσω καταγραφής των ποσοστών θνησιμότητας στο πεδίο και μετά από πειραματικές μολύνσεις σε ελεγχόμενες συνθήκες, καθώς και ανάλυσης των ειδικών τίτλων αντισωμάτων με τη μέθοδο ELISA.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων γινόταν παρακολούθηση της αλατότητας, της θερμοκρασίας και του διαλυμένου οξυγόνου του νερού στην περιοχή μελέτης (συνθήκες φυσικού περιβάλλοντος) και της θερμοκρασίας και του διαλυμένου οξυγόνου στα ενυδρεία.

Από την καταγραφή της αλατότητας του επιφανειακού θαλασσινού νερού και νερού κοντά στον πυθμένα, που καταγράφηκαν στη μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας που πραγματοποιήθηκε η μελέτη από τον Φεβρουάριο έως τον Αύγουστο του 2014, παρατηρήθηκαν πολύ μικρές διακυμάνσεις. Το διαλυμένο οξυγόνο (D.O.) μειώνεται όταν αυξάνεται η θερμοκρασία τους θερμούς μήνες του έτους και αυξάνεται όταν μειώνεται η θερμοκρασία. Αυτά ισχύουν τόσο στο θαλασσινό νερό όσο και στο νερό των ενυδρείων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα πειράματα κατά τους χειμερινούς μήνες είχαν μεγαλύτερη διάρκεια, λόγω της μειωμένης θερμοκρασίας που είχε επιπτώσεις στη φυσιολογία των παθογόνων βακτηρίων από τα οποία είχαν προκληθεί οι λοιμώξεις, με αποτέλεσμα να απαιτείται περισσότερος χρόνος για να αναπτυχθεί η νόσος (Spinós et al. 2017).

Τα πειράματα ελέγχου της αποτελεσματικότητας των εμβολίων που πραγματοποιήθηκαν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες κατά των δύο παθογόνων έδειξαν καταρχάς ότι και τα δύο εμπορικά εμβόλια παρέχουν σημαντική προστασία στα ψάρια έναντι μολύνσεων με *L. anguillarum* O1 και Phdp, σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα ψάρια (μάρτυρες). Στο 1^ο πείραμα, που έγινε μόλυνση με Phdp, καταγράφηκε η ίδια θνησιμότητα (93% αθροιστική θνησιμότητα) και για τις 3 πειραματικές ομάδες, κάτι το οποίο πιθανώς οφείλεται σε εσφαλμένη διαδικασία του πειράματος, ή στον χειρισμό των ψαριών, ή άλλους εξωτερικούς παράγοντες όπως οι φυσικοχημικές παράμετροι. Το 2^ο πείραμα μόλυνσης που έγινε το Δεκέμβριο του 2013 διήρκησε περισσότερο πιθανώς λόγω χαμηλής θερμοκρασίας του νερού των ενυδρείων. Σύμφωνα με τους Whipple & Rohovec, (1994) η θερμοκρασία και το pH του νερού είναι περιοριστικοί παράγοντες για την επιβίωση των βακτηρίων στο περιβάλλον. Στο 5^ο πείραμα (τελευταίο) στη μόλυνση με *L. anguillarum* και στο 4^ο πείραμα (τελευταίο) στη μόλυνση με Phdp, παρατηρήθηκε ότι τα εμβολιασμένα ψάρια με το εμβόλιο Aquanac, προστατεύτηκαν καλύτερα είτε σε μόλυνση από *Vibrio* ή από Phdp. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι μειώνεται η επίδραση των εμβολίων με την πάροδο του χρόνου, κάτι που επιβεβαιώθηκε και από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου ο χρόνος μετά τον εμβολιασμό ήταν η πιο σημαντική παράμετρος επηρεασμού της επιβίωσης των εμβολιασμένων ψαριών.

Από τις παραμέτρους, που μπορεί να επηρεάσουν την επιβίωση των εμβολιασμένων ψαριών κατά τη διάρκεια των δοκιμών αποτελεσματικότητας με Phdp, καμία δεν ήταν σημαντική, με εξαίρεση το χρόνο μετά τον εμβολιασμό. Σε αυτή την περίπτωση, ακόμη και η σύνθεση των εμπορικών εμβολίων ήταν μη σημαντική παράμετρος. Με βάση τις πληροφορίες που παρέχονται από τους παρασκευαστές των εμπορικών εμβολίων, οι διαφορές μεταξύ των δύο σκευασμάτων είναι κυρίως η προσθήκη ορυκτελαίου στο εμβόλιο Alphaject 2000, ενώ τα βακτηριακά κύτταρα στο εμβόλιο Aquanac αναπτύχθηκαν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Κάθε μια από τις διαφορές αυτές είναι ευεργετική για διαφορετικούς λόγους και μπορεί να ευθύνεται για την μη σημαντική συνεισφορά αυτής της παραμέτρου στην παρούσα μελέτη.

Εξάλλου, από τα αποτελέσματα και το ποσοστό της αθροιστικής θνησιμότητας και της τυπικής απόκλισης φαίνεται ότι, το ελαιώδες ανοσοενισχυμένο εμβόλιο Alphaject 2000 προσφέρει μεγαλύτερη προστασία στα εμβολιασμένα ψάρια, σε σύγκριση με το υδατικό εμβόλιο Aquanac, καθώς και με τα μη εμβολιασμένα ψάρια (μάρτυρες). Καλύτερη απόδοση εμβολίων με ελαιώδες ανοσοενισχυμένο εμβόλιο έχει επίσης περιγραφεί σε πειράματα κατά του *Aeromonas salmonicida* σε εμβολιασμένο σολομό Ατλαντικού (Lund et al. 2003), για

μονοδύναμα εμβόλια αντι-Phdp σε ιαπωνικό μαγιάτικο (yellowtail) (Gravningen et al. 2008) και για διδύναμα εμβόλια σε λαβράκι (Bakoroulos et al. 2015b). Στα πειράματα που έγιναν στην παρούσα μελέτη, η σοβαρότητα της λοίμωξης όπως αποδείχθηκε από την ποσοστιαία αθροιστική θνησιμότητα των μη εμβολιασμένων ψαριών (μαρτύρων), επηρέασαν τις τιμές RPS που υπολογίστηκε και στις δύο περιπτώσεις και για τα δύο εμβόλια. Ακραία βακτηριακή πίεση (100% θνησιμότητα στα δείγματα αναφοράς) δεν επιτρέπει την αξιολόγηση της πραγματικής δυναμικής των σκευασμάτων, που από την άλλη πλευρά ήταν εφικτή όταν παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο θνησιμότητα 70-80% στους μάρτυρες (Spinos et al., 2017). Αυτό έχει αναφερθεί επίσης στη μελέτη των Bakoroulos et al. (2015b).

Στο παρελθόν έχουν διενεργηθεί διάφορες μελέτες αποτελεσματικότητας εμβολίων, κατά κύριο λόγο μονοδύναμων, έναντι είτε της φωτοβακτηριδίασης είτε της δονακίωσης σε διάφορα είδη ψαριών (Bakoroulos et al. 2015b). Παρόλο που υπάρχουν αυτές οι προηγούμενες μελέτες σχετικά με την αποτελεσματικότητα της προστασίας που επιτυγχάνεται μετά τον εμβολιασμό με μονοδύναμα εμβόλια (και διδύναμα με ορότυπους O1 και O2) είτε έναντι του *L. anguillarum* (Viale et al. 2006, Galeotti et al. 2013) είτε έναντι του Phdp (Magarinos et al. 1994, Magarinos et al. 1994a), η βιβλιογραφία είναι περιορισμένη, όταν εμβολιάζονται ψάρια με διδύναμα εμβόλια κατά των δύο παθογόνων (εκτός από το άρθρο των Gravningen et al. 1998, όσον αφορά στη φωτοβακτηριδίαση). Έτσι, δεν είναι εφικτή η απευθείας σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτής της μελέτης με προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποίησαν μονοδύναμα σκευάσματα.

Ειδική χυμική ανοσοαπόκριση

Η θετική επίδραση του ανοσοενισχυτικού στην παραγωγή υψηλότερων τίτλων αντισωμάτων που παρατηρήθηκε σε αυτή τη μελέτη επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα των Bakoroulos et al. (2015b). Η ανάλυση της ειδικής χυμικής ανοσοαπόκρισης της τσιπούρας, *Sparus aurata* (L.), έναντι του *L. anguillarum* O1 και του Phdp μετά από εμβολιασμό με εμπορικά και πειραματικά εμβόλια, έδειξε ότι τα ειδικά αντι-*L. anguillarum* O1 και αντι-Phdp αντισώματα που προκλήθηκαν από το ανοσοενισχυμένο εμπορικό εμβόλιο έφθασαν σε υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με το υδατικό εμπορικό και ένα πειραματικό εμβόλιο.

Η ανάλυση των ορών λαβρακιού που συλλέχθηκαν στην παρούσα μελέτη έδειξε ότι το εμπορικό εμβόλιο με ανοσοενισχυτικό, προκάλεσε την παραγωγή υψηλότερων επιπέδων IgM έναντι του Phdp. Το υδατικό εμπορικό εμβόλιο προκάλεσε την παραγωγή υψηλότερων επιπέδων αντι-Phdp IgM από την 24^η ημέρα από τον εμβολιασμό (D24) έως την 49^η ημέρα (D49) μετά την ανοσοποίηση, σε σύγκριση με το εμβόλιο με ανοσοενισχυτικό και στη συνέχεια τα επίπεδα IgM μειώθηκαν σε παρόμοια με τα αρχικά επίπεδα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το ανοσοενισχυτικό δρα ωφέλιμα στην παραγωγή αυξημένων επιπέδων IgM σε αντίθεση με το υδατοδιαλυτό εμβόλιο του οποίου τα επίπεδα IgM ήταν πολύ χαμηλότερα. Έτσι, η καλύτερη αντιγονική διέγερση των ανοσοποιημένων ψαριών οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή ειδικών αντι-Phdp IgM μόνο σε ψάρια που ανοσοποιήθηκαν με το εμπορικό εμβόλιο με ανοσοενισχυτικό σε σύγκριση με το υδατικό εμβόλιο. Παρομοίως, υψηλότερα επίπεδα ειδικών αντι-*L. anguillarum* O1 IgM προκλήθηκαν από το εμβόλιο με ανοσοενισχυτικό σε σύγκριση με το υδατικό εμβόλιο.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αργή απελευθέρωση του αντιγόνου που προκαλείται από το ανοσοενισχυμένο ελαιώδες εμβόλιο, ήταν επωφελής για την παραγωγή υψηλότερων

επιπέδων ειδικών αντισωμάτων έναντι και των δύο παθογόνων. Και αυτά τα υψηλότερα επίπεδα ειδικών αντισωμάτων σχετίζονται με την καλύτερη απόδοση της εμβολιασμένης ομάδας με Alphaject 2000, έναντι μολύνσεων με τα δύο παθογόνα. Οι ειδικοί τίτλοι αντισωμάτων έναντι του Phdp που προκαλούνται από τις δύο εμβολιασμένες ομάδες ήταν υψηλότεροι σε σύγκριση με τους ειδικούς τίτλους αντισωμάτων έναντι του *L. anguillarum* O1 -σε σχέση με το μέγεθος των αντιδράσεων στην ELISA-, παρά το ότι οι πλάκες μικροπιλοδότησης (που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία) καλύφθηκαν με παρόμοιο αριθμό βακτηριακών κυττάρων. Αυτό δείχνει ότι τα αντιγόνα Phdp προκαλούν υψηλότερη διέγερση της ανοσολογικής απόκρισης, ενώ και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ειδικά αντισώματα έναντι του δονακίου παράγονται έναντι περιορισμένου αριθμού αντιγόνων (Schroder et al. 2009).

Από τους Coeurdacier et al. (1997), για περίοδο 10 μηνών μελετήθηκε στο λαβράκι η σχέση μεταξύ των επιπέδων των συνολικών ανοσοσφαιρινών και η δραστικότητα αντισωμάτων στον ορό αίματος λαβρακιού, μετά από έναν ή δύο ενδοπεριτοναϊκούς εμβολιασμούς, έναντι του *L. anguillarum* (O1). Τα επίπεδα IgM μειώθηκαν κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα μετά την ανοσοποίηση (ip), αλλά αυξήθηκαν από τον τρίτο μήνα μέχρι τον όγδοο σε εμβολιασμένα ψάρια και μέχρι τον δέκατο μήνα σε ανοσοενισχυμένα ψάρια. Η ανάπτυξη και η πορεία της ανοσολογικής απόκρισης της παρούσας μελέτης, ακολούθησε παρόμοια εξέλιξη με εκείνη που αναφέρθηκε για ειδικά αντι-*L. anguillarum* αντισώματα στο λαβράκι από τους Coeurdacier et al. (1997).

Παρατηρήσεις ανοσολογικής αντίδρασης έγιναν σε προηγούμενες μελέτες στο λαβράκι (Bakoroulos et al. 2015a, Schroder et al. 2006) και αναφέρεται ότι τα ειδικά αντισώματα έναντι *L. anguillarum* κατευθύνονται προς έναν περιορισμένο αριθμό αντιγόνων και αυτό μπορεί να ευθύνεται για τα παρατηρούμενα σε αυτή τη μελέτη, χαμηλότερα επίπεδα αντι-*L. anguillarum* O1 των ειδικών αντισωμάτων που μετρήθηκαν (Spinou et al., 2017). Βακτηριακή ανάπτυξη, υπό καθεστώς έλλειψης σιδήρου, οδηγεί στην υπερέκφραση αντιγόνων που μπορούν να συμμετέχουν στην μολυσματικότητα του μικροοργανισμού (Magarinos et al. 1994b, Bakoroulos et al. 1997a) και, ως εκ τούτου, ασκείται θετική επίδραση στην ποιοτική ανοσολογική απόκριση και την προστασία.

Οι Gravningen et al. (2008), μελέτησαν τη προστασία μετά από ενδοπεριτοναϊκό (ip) εμβολιασμό σε ιαπωνικό μαγιάτικο (*Seriola quinqueradiata*) κατά της φωτοβακτηριδίασης σε πειράματα πεδίου. Τα μαγιάτικα ανοσοποιήθηκαν με ελαιώδες αντι-Phdp εμβόλιο και τα ψάρια ήταν υπό παρατήρηση για 15 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Παρατηρήθηκε έξαρση της φωτοβακτηριδίασης (η θνησιμότητα στην ομάδα ελέγχου κυμάνθηκε από 7% έως 77%), καθώς επίσης και σημαντική προστασία ($p < 0,01$) έναντι της φωτοβακτηριδίασης των εμβολιασμένων ομάδων σε σχέση με μη εμβολιασμένες ομάδες μάρτυρες. Τα εμβολιασμένα ψάρια έδειξαν αυξημένο επίπεδο συγκολλητικών αντισωμάτων έναντι του Phdp, με κορύφωση των επιπέδων αντισωμάτων περίπου 3-4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό, αυξημένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα και αυξημένη παραγωγή υπεροξειδικών ανιόντων σε απομονωμένα λευκοκύτταρα σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Τα αποτελέσματα προστασίας και εξέλιξης της χυμικής ανοσολογικής αντίδρασης στο ιαπωνικό μαγιάτικο επιβεβαιώνουν τα ευρήματα της παρούσας μελέτης στο λαβράκι.

Χειμερινός εμβολιασμός

Στην ετήσια ανοσολογική μελέτη που έγινε έπειτα από χειμερινό εμβολιασμό, προέκυψε βραδύτερη ανάπτυξη της ανοσολογικής απόκρισης που έφτασε σε ανώτερο σημείο την 82^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό. Στη συνέχεια, τα ειδικά αντι-*L. anguillarum* O1 αντισώματα άρχισαν να μειώνονται, απότομα στην αρχή και ομαλά στη συνέχεια μέχρι την 298^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι λόγω χαμηλής θερμοκρασίας και χαμηλότερου μεταβολισμού των ψαριών, η ανοσολογική διέγερση είναι πιο αργή και το υψηλότερο επίπεδο έρχεται πιο αργά. Ειδικά επίπεδα αντι-*L. anguillarum* O1 αντισωμάτων προκαλούνται από το εμβόλιο Alphaject 2000 και ήταν καθ' όλη την περίοδο σημαντικά υψηλότερα (p κυμαίνεται μεταξύ $2,193 \times 10^{-9}$ και $6,094 \times 10^{-12}$ για όλες τις συγκρίσεις ζεύγους) από τα επίπεδα των αντισωμάτων που προκαλούνται από το εμβόλιο Aquavac. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην ύπαρξη του ανοσοενισχυτικού που προκαλεί προσέλκυση λευκοκυττάρων στη περιοχή του εμβολίου (Afonso et al. 2005). Επίσης, ο χειμερινός εμβολιασμός οδήγησε σε βραδύτερη ανάπτυξη της ανοσολογικής απόκρισης που έφτασε πάλι σε ανώτερο σημείο την 82^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό και για το Phdp. Στη συνέχεια, τα ειδικά αντισώματα αντι-Phdp άρχισαν να μειώνονται, αλλά παρέμειναν σε σχετικά υψηλά επίπεδα με μια απότομη αύξηση την 267^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό (μήνας Οκτώβριος). Αυτό, όπως προαναφέρθηκε για τα ειδικά αντισώματα έναντι του *L. anguillarum*, οφείλεται στη χαμηλή θερμοκρασία, τον χαμηλότερο μεταβολισμό και πιο αργή ανοσολογική διέγερση των ψαριών. Πράγματι, σε θερμοκρασία περίπου 15°C παρατηρείται μια βαθιά επίδραση στο μεταβολικό ρυθμό του λαβρακιού, καθώς και στην ανάπτυξη, στην πρόσληψη τροφής και στην μετατρεψιμότητα της τροφής. Ειδικόί τίτλοι αντισωμάτων αντι-Phdp προκλήθηκαν από το εμβόλιο AJ και ήταν καθ' όλη την περίοδο σημαντικά υψηλότερα (p κυμαίνεται από $1,744 \times 10^{-12}$ έως $5,048 \times 10^{-12}$ για όλες τις συγκρίσεις ζεύγους) από τα επίπεδα των αντισωμάτων που προκαλούνται από το εμβόλιο AV.

Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκε αύξηση στο επίπεδο των ειδικών αντισωμάτων σε όλες τις πειραματικές ομάδες έναντι και των δύο παθογόνων σε κάποιες περιόδους μετά τον εμβολιασμό που δεν ακολουθούσαν την αναμενόμενη τάση ανόδου-πτώσης μετά τον εμβολιασμό. Τους μήνες Αύγουστο-Σεπτέμβριο του επόμενου έτους του εμβολιασμού (χειμερινού) και προς το τέλος τακτικών αιμοληψιών (για ανάλυση), διαπιστώθηκε αύξηση των ειδικών αντι-*L. anguillarum* O1 αντισωμάτων σε όλες τις πειραματικές ομάδες, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων. Αυτό μπορεί να συμπίπτει με την αύξηση των παθογόνων στο θαλασσινό νερό και την επαφή των ψαριών στο πεδίο με τα παθογόνα που μπορεί να προκάλεσαν ανοσολογική απόκριση.

Στατιστική ανάλυση

Με την ανάλυση παλινδρόμησης Cox, των δεδομένων δοκιμών αποτελεσματικότητας και για τα δύο παθογόνα, για το σύνολο της περιόδου μελέτης, επιβεβαιώνεται ότι τα δύο εμπορικά εμβόλια παρέχουν σημαντική προστασία έναντι μολύνσεων με *L. anguillarum* O1 και Phdp, σε σύγκριση με τους μάρτυρες, αλλά αυτό δεν ήταν απόλυτα σαφές με τις δοκιμές αποτελεσματικότητας έναντι Phdp. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζονται από προηγούμενες μελέτες για τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας μονοδύναμων σκευασμάτων κατά της δονακίωσης (Angelidis et al. 2006, Galeotti et al. 2013) και της φωτοβακτηριδίασης στο λαβράκι (Bakopoulos et al. 2003). Επίσης, υποστηρίζεται από τις λίγες προηγούμενες μελέτες που έχουν αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα των διδύναμων εμπορικών εμβολίων κατά της δονακίωσης (Gravingen et al., 1998) και της φωτοβακτηριδίασης στο

λαβράκι (Bakoroulos et al., 2015a). Η ανάλυση Παλινδρόμησης κατά Cox, για τη θνησιμότητα των εμβολιασμένων ψαριών σε σχέση με το χρόνο μετά τον εμβολιασμό, έδειξε ότι τα ψάρια που είχαν εμβολιαστεί, είχαν μικρότερο κίνδυνο να πεθάνουν μέχρι τη μέση της συνολικής διάρκειας των πειραμάτων, από μόλυνση με *L. anguillarum* O1 ή από μόλυνση με Phdρ. Αυτό το εύρημα σχετίζεται με την ανάπτυξη της ανοσολογικής απόκρισης μετά τον εμβολιασμό και των υψηλότερων επιπέδων ειδικών αντισωμάτων κατά αυτών των παθογόνων, που μετράται αμέσως μετά τον εμβολιασμό και την μετέπειτα πτωτική τάση που παρατηρείται (Spinós et al. 2017).

Αναφορικά με τη σημασία των παραμέτρων που μπορούν να επηρεάσουν την επιβίωση των εμβολιασμένων ομάδων κατά τη διάρκεια των δοκιμών αποτελεσματικότητας που διενεργήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, βρέθηκε ότι για τις δοκιμές με *L. anguillarum* O1, η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμές ήταν μη σημαντική παράμετρος.

Η δονακίωση συμβαίνει ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της άνοιξης και του φθινοπώρου, όταν η θερμοκρασία του νερού είναι 15-20°C και ο πληθυσμός του παθογόνου (*L. Anguillarum*) φτάνει στις μέγιστες και στις ελάχιστες τιμές του το καλοκαίρι και το χειμώνα αντίστοιχα (Larsen 1983). Επιπλέον, η φωτοβακτηριδίαση εμφανίζεται συνήθως από την άνοιξη έως το φθινόπωρο, όταν η θερμοκρασία της θάλασσας είναι 18-20°C (Magarinos et al. 1992, & 2001). Η ασθένεια εμφανίζει επίσης εποχική έξαρση, που σχετίζεται ιδιαίτερα με την αύξηση της θερμοκρασίας τους καλοκαιρινούς μήνες, όταν η θερμοκρασία υπερβαίνει τους 23°C (Magarinos et al 1995). Οι εποχικές διακυμάνσεις της θερμοκρασίας του νερού, ευθύνονται για την εμφάνιση αυξημένου αριθμού των δύο παθογόνων και σχετίζονται με τις συνθήκες που επικρατούν στην μελετούμενη μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας όπου διατηρήθηκαν οι πειραματικές ομάδες (Spinós et al. 2017).

Φλεγμονώδης αντίδραση

Από τους (Mutoloki et al. 2008) μελετήθηκε η φλεγμονώδης αντίδραση στην κοιλιακή κοιλότητα του γάδου του Ατλαντικού (*Gadus morhua* L.) μετά τον εμβολιασμό με εμβόλια με ανοσοενισχυτικό ορυκτέλαιο. Σε αυτή τη μελέτη, ομάδες *G. morhua* εμβολιάστηκαν ενδοπεριτοναϊκά με τα εμπορικά εμβόλια Alphaject 3000 (AJ 3000) και AJ 6-2. Εμβολιασμοί έγιναν επίσης με ένα υδατοδιαλυτό εμβόλιο το Alpha Marine, ένα πειραματικό εμβόλιο με εγκλεισμό των αντιγόνων σε λιποσώματα και φυσιολογικό αλατούχο διάλυμα (εικονικό εμβόλιο) για σύγκριση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εμφάνιση φλεγμονής σε όλες τις εμβολιασμένες ομάδες είχε ταχεία ανάπτυξη, με έντονες κυτταρικές διηθήσεις κυρίως από μονοκύτταρα κύτταρα σε ομάδες που εμβολιάστηκαν με εμβόλια με ανοσοενισχυτικό ορυκτέλαιο. Η φλεγμονή που προκαλείται από το Alpha Marine και τα εμβόλια με λιποσώματα είχε απορροφηθεί εντός 12 εβδομάδων. Αντίθετα, τα εμβόλια με ανοσοενισχυτικό ορυκτέλαιο εμφάνισαν ήπιες, επίμονες αλλά τελικά μειούμενες αντιδράσεις. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η φλεγμονώδης απόκριση του γάδου είναι παρόμοια με άλλα είδη οστεϊχθύων. Τα ευρήματα δείχνουν επίσης ότι ο γάδος έχει ένα αποτελεσματικό έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα που μπορεί να απομακρύνει ταχέως ή να απομονώσει τα αντιγόνα από το σημείο της έγχυσης που οδηγεί σε ρύθμιση και έλεγχο της φλεγμονής (Mutoloki et al. 2008). Τα ευρήματα της τελευταίας μελέτης επιβεβαιώνουν τις παρατηρήσεις επί των φλεγμονωδών αντιδράσεων στην κοιλιακή κοιλότητα, που καταγράφηκαν και στην παρούσα μελέτη, μετά από τον ενδοπεριτοναϊκό εμβολιασμό με το ανοσοενισχυμένο εμβόλιο AJ και εξηγούν την υψηλότερη ανοσολογική αντίδραση (υπό τη μορφή υψηλότερων τίτλων

αντισωμάτων) που παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη στις ομάδες που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο που περιείχε ανοσοενισχυτικό.

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η αποτελεσματικότητα των ανοσοενισχυμένων εμβολίων οφείλεται στη διέγερση των μη ειδικών ανοσολογικών παραγόντων, την έντονη έλξη των διαφόρων τύπων λευκοκυττάρων στην περιοχή όπου το εμβόλιο έχει εγχυθεί μέσα στην κοιλιακή κοιλότητα και την αργή απελευθέρωση αντιγόνων για μεγαλύτερες περιόδους (Afonso et al. 2005, Mutoloki et al. 2008). Οι Afonso et al.(2005), εμβολίασαν λαβράκια ενδοπεριτοναϊκά με μονοδύναμα (*L. anguillarum* ή Phdp) και διδύναμα (*L. anguillarum* και Phdp) εμβόλια, με ή χωρίς πρόσθετα (ορυκτέλαιο, λιποσώματα ή αλγινικά σφαιρίδια), για την αξιολόγηση βραχυπρόθεσμων και μακροπρόθεσμων παθολογικών παρενεργειών. Αξιολογήθηκαν με περιτοναϊκή ανάλυση-η οξεία περιτοναϊκή απόκριση και η χρόνια απόκριση-και συλλέχθηκαν λευκοκύτταρα για την ανάλυση κατά τις πρώτες ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Για την αξιολόγηση της χρόνιας απόκρισης, αναλύθηκε η καθυστερημένη περιτοναϊκή απόκριση λευκοκυττάρων, εξετάσθηκε η περιτοναϊκή κοιλότητα και αναζητήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των λευκοκυττάρων, και απόκρισης ιστών με φλεγμονώδη αντίδραση και της ανάπτυξης κοκκιωμάτων. Η οξεία απόκριση λευκοκυττάρων χαρακτηρίζεται από μια πρώιμη (24-48h) κινητοποίηση των ουδετερόφιλων και μακροφάγων, αλλά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές σε λεμφοκύτταρα, μικρά κύτταρα και εωσινόφιλα. Αργότερα, σημειώθηκε μια σταθερή αύξηση στα λεμφοκύτταρα, μικρά λευκοκύτταρα και εωσινόφιλα και μια υψηλή συγκέντρωση στα ουδετερόφιλα και στα μακροφάγα, η οποία διατηρήθηκε 30-60 ημέρες σε ομάδες που εμβολιάστηκαν ενδοπεριτοναϊκά με ελαιώδες ανοσοενισχυτικό. Όλες οι αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν ήταν μέτριες, υποδεικνύοντας ότι στο λαβράκι οι παθολογικές παρενέργειες λόγω ενδοπεριτοναϊκού εμβολιασμού είναι λιγότερο σοβαρές από ό,τι σε άλλα είδη ψαριών. Το διδύναμο ελαιώδες ανοσοενισχυμένο εμβόλιο προκαλεί τις πιο σοβαρές παρενέργειες, οι οποίες φαίνονται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με κοκκιώματα να υφίστανται μέχρι και 11 μήνες από την ενδοπεριτοναϊκή έγχυση (Afonso et al. 2005).

Οι Good et al. (2016) περιγράφουν ότι η χρόνια κοκκιωματώδης φλεγμονή είναι μια κοινή απόκριση των ψαριών σε πολλά ανοσολογικά ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένων βακτηριακών μολύνσεων, μυκητιάσεων και μεταζωϊκών λοιμώξεων, επίδραση εμβολίων με ορυκτέλαιο ανοσοενισχυτικό και επίδραση από βαρέα μέταλλα. Εκδηλώνεται με μεταστατική ασβεστοποίηση, όπου προκαλείται εκτεταμένο ξένο σώμα και σχηματισμός κοκκιώματος. Αυτές οι τοπικές αντιδράσεις παρατηρήθηκαν μόνο στην περιοχή του μεσεντερίου και στον λιπώδη ιστό, αλλά όχι σε άλλα όργανα της κοιλιακής κοιλότητας. Οι άσηπτες κοκκιωματώδεις βλάβες που αναπτύχθηκαν, καθώς και οι παρατηρούμενες συμφύσεις δεν έχουν αρνητικές επιπτώσεις στη συνολική επίδοση των εμβολιασμένων ψαριών.

Στις ομάδες των ψαριών που εμβολιάστηκαν με Alphaject 2000 στην παρούσα μελέτη, εμφανίστηκαν στην κοιλιακή κοιλότητα ήπιες συμφύσεις και αναπτύχθηκαν κοκκιώματα, αναπτύχθηκε δηλαδή κοκκιωματώδης φλεγμονή, η οποία έχει διαπιστωθεί μικροσκοπικά σε προηγούμενες μελέτες (Afonso et al. 2005). Η εν λόγω φλεγμονώδης αντίδραση μπορεί να επηρεάσει την λειτουργία του πεπτικού συστήματος των ψαριών. Οι άλλες ομάδες ψαριών που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο Aquanas δεν παρουσίασαν συμφύσεις στην κοιλιακή κοιλότητα ή άλλα συμπτώματα. Το ανοσοενισχυτικό ορυκτέλαιο που ενσωματώνεται στο εμβόλιο Alphaject 2000, προκάλεσε μια έντονη έλξη των λευκοκυττάρων και τον

σχηματισμό άσηπτων κοκκιωμάτων στην κοιλιακή κοιλότητα, η οποία προκαλεί καφέ μικρές κηλίδες ή μικρά καφέ οζίδια. Η ιστολογική εξέταση δειγμάτων της κοιλιακής κοιλότητας έδειξε ότι όταν παρέμενε έντονη φλεγμονή (για περίπου 3 μήνες μετά τον εμβολιασμό), (πίνακας 3.15) προκαλούνταν συμφύσεις μεταξύ της περιοχής του σχηματισμού κοκκιωμάτων και των παρακείμενων ιστών, αλλά αυτό δεν προκαλεί καμία εντυπωσιακή επίδραση στην επιβίωση ή στην ανάπτυξη των ψαριών. Αυτό αποδεικνύεται από τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης και τον συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής για τις πειραματικές ομάδες για όλη την περίοδο της μελέτης, η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ των ομάδων. Το υδατοδιαλυτό εμβόλιο, από την άλλη πλευρά, εκτός από ένα πρώιμο ήπιο ερύθημα και μια ήπια αντίδραση λευκοκυττάρων, δεν προκαλεί καμία σημαντική εμφανή βλάβη στους ιστούς (Srinios et al. 2017).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έντονη φλεγμονώδης απόκριση που προκαλείται από το ανοσοενισχυμένο ελαιώδες εμβόλιο, ήταν επωφελής και συσχετίζεται με την καλύτερη απόδοση της εμβολιασμένης ομάδας με Alphaject 2000, έναντι μολύνσεων με τα δύο παθογόνα.

Κλινικά συμπτώματα και παθογένεια των ψαριών της μελέτης

Στα ψάρια τα οποία πέθαναν λόγω της πειραματικής μόλυνσης, παρατηρήθηκαν συμπτώματα όπως ερυθρότητα του στόματος, έλκη στο σώμα και προοδευτική επιδείνωση βλαβών του ουραίου πτερυγίου (εικόνα 3.14). Τα μη εμβολιασμένα ψάρια που συμμετείχαν στα πειράματα, τα νεκρά και εκείνα που επέζησαν ήταν σε πολύ χειρότερη κατάσταση από ό,τι τα εμβολιασμένα και το νερό των ενυδρείων τους ήταν θολό λόγω της έκκρισης βλέννας, ως αντίδραση στην ανάπτυξη της μόλυνσης (αν και γινόταν καθημερινά ανανέωση του νερού σε όλα τα ενυδρεία). Όλα τα προσβεβλημένα ψάρια, κολυμπούσαν ακανόνιστα και ήταν πολύ νευρικά.

Ανάπτυξη ψαριών

Τα δύο εμπορικά εμβόλια (Alphaject 2000 και Aquavac) που μελετήθηκαν δεν προκαλούν θνησιμότητα ή σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη και την επιβίωση των εμβολιασμένων ψαριών. Επίσης η πρόσληψη τροφής των ψαριών δεν επηρεάζεται από τη διαδικασία εμβολιασμού ούτε και από το σημείο έγχυσης του εμβολίου. Μικρές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των εμβολιασμένων ομάδων ψαριών στην αύξηση του σωματικού τους βάρους, στο τέλος της πειραματικής περιόδου, που δεν ήταν σημαντικές και η διάρκεια του πειράματος δεν ήταν αρκετά μεγάλη για να εξαχθούν αξιόπιστα συμπεράσματα (σχήματα 3.15, 3.16, 3.17 και 3.18). Τα εμβολιασμένα ψάρια όμως βρέθηκε ότι έφτασαν σε υψηλότερο μέσο βάρος, σε σύγκριση με τα ψάρια μάρτυρες (σχήματα 3.19, 3.20 και 3.21), κάτι το οποίο έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (Viale et al. 2006, Gravningen et al. 2008). Εξάλλου, οι Good et al. (2016) περιγράφουν σε μελέτη τους ότι τα εμβολιασμένα ψάρια είχαν καλύτερη αύξηση του σωματικού τους βάρους σε σύγκριση με τα ψάρια μάρτυρες.

Οι Gravningen et al. (2008), σε πειράματα εμβολιασμού που διεξήγαγαν σε μαγιάτικο (*Seriola quinqueradiata*) κατά της φωτοβακτηριδίασης στο πεδίο, διαπίστωσαν μεταβατική μείωση του βάρους των ψαριών σε εμβολιασμένες ομάδες έως τις 10 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Ωστόσο, στις 15 εβδομάδες, το μέσο βάρος της εμβολιασμένης ομάδας ήταν σημαντικά υψηλότερο από αυτό της ομάδας ελέγχου. Αυτό συνέπεσε με την εμφάνιση των παρενεργειών στο σημείο έγχυσης του εμβολίου που είχαν αρχίσει να μειώνονται στις 10

εβδομάδες και η πτωτική τάση συνεχίστηκε μέχρι τον τελευταίο χρόνο συλλογής (41 εβδομάδες), αλλά με κάποιες διακυμάνσεις μεταξύ διαφορετικών περιοχών μελέτης. Σύμφωνα με τους Roberts (2001) και Richards (1980), καταγράφηκε σημαντική διαφορά στην αύξηση του βάρους σώματος μόνο στα ανοσοποιημένα ψάρια που εκτρέφονταν στη θάλασσα σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Περαιτέρω, καταγράφηκε μια καλύτερη «γενική κατάσταση» των ανοσοποιημένων ψαριών και τουλάχιστον 10% υψηλότερη παραγωγή.

Δείκτες αύξησης και μετατρεψιμότητας της τροφής

Ο ειδικός ρυθμός αύξησης (SGR) για ολόκληρη την πειραματική περίοδο ήταν χαμηλότερος για τα ψάρια μάρτυρες, ανεξάρτητα από το μέγεθός τους (0,22 για το μικρό και 0,26 για το μεσαίο μέγεθος). Τα μικρού και μεσαίου μεγέθους ψάρια που εμβολιάστηκαν με AquaVac είχαν SGR 0,50 και 0,51, αντίστοιχα, ενώ τα εμβολιασμένα ψάρια με το εμβόλιο AlphaJect 2000 είχαν SGR 0,45 και 0,53 αντίστοιχα (σχήματα 3.22, 3.23, 3.24 και 3.25). Ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) στα μεσαίου μεγέθους ψάρια που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο Aquavac ήταν χαμηλότερος (0,60), ενώ τα μικρού (0,74) μεγέθους ψάρια που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο Aquavac, τα μικρού (0,82) και μεσαίου (0,74) μεγέθους ψάρια που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο Alphaject 2000 και οι ομάδες με τα μικρού (0,78) και μεσαίου (0,79) μεγέθους ψάρια μάρτυρες είχαν σχετικά υψηλό FCR (σχήμα 3.26).

Συμπεράσματα

Παρακάτω δίνονται τα συμπεράσματα από την καταγραφή φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού των ενυδρείων των πειραμάτων, από την ανοσοαπόκριση στις πειραματικές μολύνσεις που έγιναν σε δύο ομάδες εμβολιασμένου λαβρακιού και μια ομάδα μη εμβολιασμένων (μαρτύρων) σε ελεγχόμενες συνθήκες σε ενυδρεία, από την αντίδραση των ψαριών στην ενδοπεριτοναϊκή έγχυση, από τη μελέτη της ανάπτυξης των ψαριών όλων των ομάδων που συμμετείχαν στα πειράματα και από τους δείκτες ειδικού ρυθμού αύξησης και μετατρεψιμότητας της τροφής των ψαριών.

- Η αλατότητα στη μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας που πραγματοποιήθηκε η μελέτη, έδειξε πολύ μικρές διακυμάνσεις που δεν επηρέασαν τα εκτρεφόμενα ψάρια της μελετούμενης μονάδας. Η μεγαλύτερη διάρκεια των πειραμάτων οφείλεται στη μειωμένη θερμοκρασία κατά τους χειμερινούς μήνες, πράγμα που είχε επιπτώσεις στη φυσιολογία των παθογόνων βακτηρίων από τα οποία είχαν προκληθεί οι λοιμώξεις, με αποτέλεσμα να απαιτείται περισσότερος χρόνος για να αναπτυχθεί η νόσος.
- Τα δύο εμπορικά εμβόλια που μελετήθηκαν προστατεύουν σημαντικά τα ψάρια έναντι των λοιμώξεων με *L. anguillarum* O1 και Phdp σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (control).
- Το ελαιώδες ανοσοενισχυμένο εμπορικό εμβόλιο, φαίνεται να προσφέρει μεγαλύτερη προστασία. Αυτό έχει επίσης αποδειχθεί για τις μελέτες αποτελεσματικότητας με *L. anguillarum* O1, αλλά όχι για τις δοκιμές αποτελεσματικότητας με Phdp.
- Η αντιγονική διέγερση των ανοσοποιημένων ψαριών οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή ειδικών αντι-Phdp IgM μόνο σε ψάρια που ανοσοποιήθηκαν με το εμπορικό εμβόλιο με ανοσοενισχυτικό, σε σύγκριση με το υδατικό εμβόλιο. Παρομοίως, υψηλότερα επίπεδα ειδικών αντι-*V. anguillarum* O1 IgM προκλήθηκαν από το εμβόλιο με ανοσοενισχυτικό, σε σύγκριση με το υδατικό εμβόλιο.
- Οι ειδικοί τίτλοι αντισωμάτων έναντι του Phdp που προκαλούνται από τις δύο

εμβολιασμένες ομάδες ήταν υψηλότεροι σε σύγκριση με τους ειδικούς τίτλους αντισωμάτων έναντι του *L. anguillarum* O1.

- Στην ετήσια ανοσολογική μελέτη που έγινε έπειτα από χειμερινό εμβολιασμό, προέκυψε βραδύτερη ανάπτυξη της ανοσολογικής απόκρισης λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας του νερού τους πρώτους μήνες της εν λόγω μελέτης. Διαπιστώθηκε αύξηση στο επίπεδο των ειδικών αντισωμάτων σε όλες τις πειραματικές ομάδες έναντι και των δύο παθογόνων σε κάποιες περιόδους μετά τον εμβολιασμό και συμπίπτει με την αύξηση των παθογόνων στο θαλασσινό νερό και την επαφή των ψαριών στο πεδίο με τα παθογόνα που μπορεί να προκάλεσαν ανοσολογική απόκριση.
- Το ελαιώδες ανοσοενισχυτικό εμβόλιο προκάλεσε τοπικές παρενέργειες στο σημείο της κοιλιακής κοιλότητας που διοχετεύθηκε ενδοπεριτοναϊκά στα λαβράκια που συμμετείχαν στα πειράματα, κάτι που έχει περιγραφεί και για άλλους τελεόστεους. Το υδατοδιαλυτό εμβόλιο προκάλεσε μόνο μία ήπια τοπική φλεγμονώδη αντίδραση στην περιοχή της κοιλιακής κοιλότητας των ψαριών, στο σημείο που διοχετεύθηκε.
- Από τα δεδομένα ανάπτυξης φαίνεται ότι τα εμβολιασμένα ψάρια που συμμετείχαν στα πειράματα εμφάνισαν καλύτερη ανάπτυξη σε σχέση με τα ψάρια μάρτυρες.
- Ο ειδικός ρυθμός αύξησης (SGR) για ολόκληρη την πειραματική περίοδο ήταν χαμηλότερος για τα ψάρια μάρτυρες, κάτι που δείχνει ότι τα εμβολιασμένα ψάρια έχουν καλύτερη ανάπτυξη από τα μη εμβολιασμένα.
- Ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) στα μεσαίου μεγέθους ψάρια που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο Aquanac ήταν χαμηλότερος, ενώ οι υπόλοιπες ομάδες ψαριών είχαν υψηλότερο FCR.

Η παρούσα διατριβή μπορεί να αποτελέσει τη βάση δημιουργίας προτύπων ορθής λειτουργίας των ιχθυοκαλλιεργειών και αφού εμπλουτιστεί με όσο το δυνατόν περισσότερα δεδομένα, βελτιωθεί και εξελιχθεί, μπορεί να εφαρμοστεί σε ιχθυοκαλλιέργειες όλης της Ελλάδας και πιθανόν του εξωτερικού. Τέλος, αυτή η μελέτη μπορεί να συμβάλλει στην ορθολογική χρήση εμπορικών εμβολίων στις ιχθυοκαλλιέργειες, να βελτιώσει την εφαρμογή των εμβολιασμών των ψαριών σε ένα θαλάσσιο περιβάλλον που συνεχώς αλλάζει και να αναδείξει παραμέτρους σωστής διαχείρισης των ιχθυοκαλλιεργειών.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

4.1 Διεθνής βιβλιογραφία

- Ackerman, P.A., Iwama, G.K., 2001. Responses of Juvenile Rainbow Trout to Vibriosis. *Journal of Aquatic Animal Health* 13(2), 173-180.
- Actis, L.A., Tomalsky, M.E. and Crosa, J.H., (1999). Vibriosis, in P.T.K. Woo and E.W. Bruno (Eds.), *Fish diseases and disorders*, vol. 3: viral, bacterial and fungal infections. Cab International Publishing, Wallingford, United Kingdom, pp. 523-557.
- Afonso A., Gomes S., da Silva J., Marques F. & Henrique M. (2005). Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis. *Fish & Shellfish Immunology* 19. 1-16.
- Altimiras, J. S.R Champion, M. Puigcerver and L. Tort., 1994. Physiological responses of the gilthead sea bream *Sparus aurata* to hypoosmotic shock. *Comp. Biochem. Physiol.* 108(A) 1: 75-80.
- Altman D.G., 1991. *Practical Statistics for Medical Research*. Chapman and Hall, London, UK.
- Amend D.F., 1981. Potency testing of fish vaccines. In: *International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines. Developments in Biological Standardisation*, 49, 447-454.
- Angelidis P., Karagiannis D., Crump E.M., 2006. Efficacy of *Listonella anguillarum* (syn. *Vibrio anguillarum*) vaccine for juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* (L. 1758). *Dis. Aquat. Organ.* 71, 19-24.
- Angelidis P., 2014. *Vibrio anguillarum*-associated vibriosis in the Mediterranean aquaculture (Chapter 11). In: Angelidis, P. (Ed). *Aspects of Mediterranean Aquaculture. Farming, Health, Processing*, first ed. Blue Crab PC Publisher, Chalastra Greece. Pp. 243-264.
- Aoki, T., Ikeda, D., Katagiri, T., Hirono, I., 1997. Rapid detection of the fish-pathogenic bacterium *Pasteurella piscicida* by polymerase chain reaction targeting nucleotide sequences of the species-specific plasmid pZP1. *Fish Pathol.* 32, 143-151.
- Aoki, T., Takano, T., Santos, M. D., Kondo, H., Hirono, I., 2008. Molecular Innate Immunity in Teleost Fish: Review and Future Perspectives. *Fisheries for Global Welfare and Environment*, 5th World Fisheries Congress 2008, 263–276.
- Aranguren R., Tafalla C., Novoa B., Figueras A. (2002) Nodavirus replication in a turbot cell line. *Journal of Fish Diseases*, 25: 361-366.
- Arijo, S., Rico, R., Chabrillon, M., Diaz-Rosales, P., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M.C, Toranzo, A.E., Morinigo, M.A., 2005. Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases* 28, 33-38.
- Arimoto M., Sato J., Maruyama K., Mimura G., Furusuwa I. (1996) Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture*, 143: 15–22.
- Arrhenius, S., 1889. Uber die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Sauren, *Z. Phys. Chem.*, 4, 226–248.
- Atalah, E., C.M. Hernández-Cruz, E. Ganuza, T. Benitez, R Ganga, J. Roo, D. Montero and M.S. Izquierdo., 2011. Importance of dietary arachidonic acid for survival, growth and stress resistance of larval European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed high dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids larvae.

- Aquaculture Research 42: 126-128.
- Athanasopoulou F. & Bitchava K. (2010). Main pathological conditions in Mediterranean marine finfish culture. "Recent Advances in Aquaculture Research", Transworld Research Network, 149-201, Kerala, India.
- Austin, R., Allen-Austin, D., 1987. Miscellaneous pathogens. In: Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. John Willey, New York, pp. 297-350.
- Austin, B., Austin, D.A., 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Chichester: Springer-Praxis. Jointly published with Praxis Publishing, UK, 4th ed., 2007, XXVIII, 552 pages.
- Austin B., Austin D. A., (2007). Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish. P. Dobbins (ed). Springer-Praxis books, Springer Netherlands 552 pages.
- Austin, B., 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. Veterinary Microbiology 27,140,(3-4), 310-317.
- Azad I.S., Jithendran K.P., Shekhar M.S., Thirunavukkarasu A.R., de la Pena L.D. (2006) Immunolocalisation of nervous necrosis virus indicates vertical transmission in hatchery produced Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch)-A case study. Aquaculture, 255 (1-4): 39-47.
- Baines, S. B. and Pace, M. L., 1991: The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria, patterns across marine and freshwater systems, Limnol. Oceanogr., 36, 1078–1090.
- Bakopoulos V., Adams A. & Richards R.H. (1995a). Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece and comparison with strains from Japan. France and Italy. Journal of Fish Diseases 18. 1-7.
- Bakopoulos V., Adams A., Richards R.H., 1997a. The effect of iron limitation growth conditions on the cell and extracellular components of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. J. Fish Dis. 20(4), 297-305.
- Bakopoulos, V., Adams A., Richards, R.H., 1997b. The serological relationship of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolates (the causative agent of fish Pasteurellosis) determined by western blot analysis using six monoclonal antibodies. Diseases of Aquatic Organisms 28, 69-72.
- Bakopoulos V., Adams, A., Richards, R.H., 1997c. The production and characterization of monoclonal antibodies against the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. Journal of Fish Diseases 20(4), 307-315.
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Galeotti, M., Richards, R.H., Adams, A., 1997d. Qualitative differences in the immunological response of rabbit, mouse and sea bass, *Dicentrarchus labrax*, L, to the injection of *Pasteurella piscicida*, the causative agent of fish Pasteurellosis. Fish and Shellfish Immunology 7, 161-174.
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Galeotti, M., Adams, A., 1999. Fish Pasteurellosis: An electron microscopic study of the course of the disease. European Association of Fish Pathologists, 9th International Conference, "Diseases of Fish and Shellfish", September 1999, Rhodes, Greece.
- Bakopoulos V., Volpatti D., Gusmani L., Galeotti M., Adams A. & Dimitriadis G.J. (2003). Vaccination trials of sea bass. *Dicentrarchus labrax* (L.) against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. using novel vaccine mixtures. Journal of Fish Diseases 26(2). 77-90.

- Bakopoulos V., Hanif A., Poulos K., Galeotti M., Adams A. & Dimitriadis G.J. (2004). The effect of in vivo growth on the cellular and extracellular components of the marine bacterial pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases* 27, 1-13.
- Bakopoulos V., Nikolaou I., Laspa E., Kosma I., Spinos E., 2015a. Humoral response of sea bass *Dicentrarchus labrax* L. after intraperitoneal immunization with commercial and experimental vaccines. 11th Panhellenic Symposium of Oceanography and Fisheries, 13-17 May 2015, Mytilene, Lesvos, Greece.
- Bakopoulos V., Nikolaou I., Kalovyra N., Amirali E., Kokkoris G., Spinos E., 2015b. Prevention of fish photobacteriosis. Comparison of the efficacy of intraperitoneally administered commercial and experimental vaccines. *Med. Mar. Sci.* 16(2), 385-392.
- Balado, M., Osorio, C.R., Lemos, M.L., 2008. Biosynthetic and regulatory elements involved in the production of the siderophore vanchrobactin in *Vibrio anguillarum*. *Microbiology* 154, 1400-1413.
- Balado, M., Osorio, C.R., Lemos, M.L., 2009. FvtA Is the Receptor for the Siderophore Vanchrobactin in *Vibrio anguillarum*: Utility as a Route of Entry for Vanchrobactin Analogues. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(9), 2775-2783.
- Balebona, M.C., Morinigo, M.A., Sedano, J., Martinez-Manzanares, E., Vidaureta, A., Borrego, J.J., Toranzo, A.E., 1992. Isolation of *Pasteurella piscicida* from sea bass in south-western Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 12(1), 168-170.
- Bandilla, M., Valtonen, E.T., Suomalainen, L.-R., Aphalo, P.J., Hakalahti, T., 2006. A link between ectoparasite infection and susceptibility to bacterial disease in rainbow trout. *International Journal for Parasitology* 36(9), 987-991.
- Banu G.R., Mori K., Arimoto M., Chowdhury M.B.R., Nakai T. (2004) Portal Entry and Progression of Betanodavirus causing Viral Nervous Necrosis in Sevenband Grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 2: 83-87.
- Barton, B.A., 1997. Stress in finfish: past, present and future—a historical perspective. pp 1-33. In: G.K Iwama, A.D. Pickering, J.P. Sumpter and C.B. Schreck (eds.). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Bauchot M.-L., 2003. Moronidae. p. 460-463 In C. Lévêque, D. Paugy and G.G. Teugels (eds.) *Faune des poissons d'eaux douce et saumâtres de l'Afrique de l'Ouest*, Tome 2. Coll. Faune et Flore tropicales 40. Musée Royal de l'Afrique Centrale, Tervuren, Belgique, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France and Institut de Recherche pour le Développement, Paris, France. 815 p.
- Baudin-Laurencin, F., Pepin, J.F., Raymond, J.C., 1991. First observation of an epizootic of Pasteurellosis in farmed and wild fish of the French Mediterranean coasts. *Book of Abstracts. 5th International Conference, "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Budapest, Hungary.*
- Baumann, P., Furniss, A.L., Lee, J.V., 1984. Genus I. *Vibrio* Pacini 1854. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 518-538. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Bhosle, N. B., Sankaran, P. D., and Wagh, A. B., 1992: Monosaccharide composition of suspended particles from the Bay of Bengal, *Oceanol. Acta*, 15, 279–286.

- Binesh C.P., Greeshma C., Jithendran K.P. (2013) Genomic classification of betanodavirus by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Archives of Virology*, 158: 1589–1594.
- Boeuf G., Payan P. (2001). How should salinity influence fish growth. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 130:411-423.
- Bonet, R., Magarinos, B., Romalde, J.L., Simon-Pujol, M.D., Toranzo, A.E., Congregado, F., 1994. Capsular polysaccharide expressed by *Pasteurella piscicida* grown in vitro. *FEMS Microbiology Letters* 124, 285-290.
- Booth, I.R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews* 49(4): 359-378. *Ocean Acidification: A National Strategy to Meet the Challenges of a Changing Ocean*. The National Academies Press. Washington, D.C. 2010.
- Borghetti, P., R. Saleri, E. Mocchegiani, A. Corradi and P. Martelli., 2009. Infection, immunity and the neuroendocrine response. *Vet Immunol. Immunopathol.* 130(3-4): 141-62.
- Brett, J.R. 1958. Implications and assessment of environmental stress. pp. 69-83. In: P.A Iarkin (ed.). *The Investigation of Fish-power Problems*. H.R. MacMillan Lectures in Fisheries. Univ. British Columbia, Vancouver, Canada.
- Breuil G., Pepin J.F., Castric J., Fauvel C., Thiery R. (2000) Detection of serum antibodies against nodavirus in wild and farmed adult sea bass: application to the screening of 223 broodstock in sea bass hatcheries. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 20 (3): 95-100.
- Bruno, D.W. and Ellis, A.E., 1996. Salmonid disease management. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* 29, 759-832.
- Bullock, G.L., 1978. Pasteurellosis of fish. US department of interior. Fish and Wildlife Service. Division of Fishery Research, Washington DC. Fish Disease Leaflet 54.
- Carrolla L. Michael, Cochran Sabine, Fielera Reinhold, Velvina Roger, White Patrick, 2003. Organic enrichment of sediments from salmon farming in Norway: environmental factors, management practices, and monitoring techniques. *Aquaculture* 226 (2003): 165 – 180.
- Castro P & Huber M., 1999. Book of “Marine Biology”. Greek Edition Koukouras A. & Voultziadou E., University Studio Press, 51-59 & 100-103.
- Cerdá-Reverter, J.M., S. Zanuy, M. Carrillo and J.A. Madrid. 1998. Time-course studies on plasma glucose, insulin, and cortisol in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) held under different photoperiodic regimes. *Physiol. Behav.* 64: 245-250.
- Ceschia, G., Quaglio, F., Giorgetti, G., Bertoja, G., Bovo, G., 1991. Serious outbreak of Pasteurellosis (*Pasteurella piscicida*) in euryhaline species along the Italian coasts. Book of Abstracts. 5th International Conference, “Diseases of Fish and Shellfish”, European Association of Fish Pathologists, Budapest, Hungary, 25-29 August.
- Chart, H., Munn, C.B., 1980. Experimental Vibriosis in the eel (*Anguilla anguilla*) In “Fish Diseases” (Ed. W. Ahne), Springer-Verlag, Berlin, pp. 39-44.
- Chart, H., 1983. Multiflagellate variants of *Vibrio anguillarum*. *Journal of General Microbiology* 129, 213-219.
- Chérif N., Thiéry R., Castric J., Biacchesi S., Brémont M., Thabti F., Limem L., Hammami S. (2009) Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in Tunisia. *Veterinary Research Communications*, 33: 345–353.

- Chrost R., 1991. Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes, in: Microbial enzymes in aquatic environments, edited by: Chr'ost, R., Springer, Heidelberg, 29–59.
- Cochran G.W., Cox M.G., 1953. Experimental Designs. Copyright by John Wiley & Sons, INC, pages 47 48 & 74-75.
- Coourdacier J.L., Pepin J.F., Fauvel C., Legall P., Bourmaud A.F., Romestand B., 1997. Alterations in total protein, IgM and specific antibody activity of male and female sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) sera following injection with killed *Vibrio anguillarum*. Fish & Shellfish Immunol. 7, 151–160.
- Conchas, R., Lemos, M., Barja, J., Toranzo, A., 1991. Distribution of plasmid- and chromosome-mediated iron uptake systems in *Vibrio anguillarum* strains of different origins. Applied and Environmental Microbiology 57, 2956-2962.
- Conides A., Anastasopoulou K.V., & Fotis G. (1993). Application of standard procedure for forecasting the maximum possible environmental impact of sea bream cage culture in Greece. Environmental Education and Information, University of Salford, 12:49-58.
- Couso, N., Castro, R., Magariños, B., Obach, A., Lamas, J., 2003. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead sea bream to pasteurellosis. Aquaculture 219, 99-109.
- Cox D.R., 1972. Regression models and life tables. J. Royal Stat. Soc. B, 34, 187-220.
- Crosa, J.H., Schiewe, M., Falkow, S., 1977. Evidence for plasmid contribution to the virulence of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Infection and Immunity 18, 509-513.
- Dalla Valle L., Zanella L., Patarnello P., Paolucci L., Belvedere P., Colombo L. (2000) Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. Journal of fish diseases, 23: 321-327.
- Dalla Via J., Villani P., Gasteiger E., Niederstatter H. (1998). Oxygen consumption in sea bass fingerling *Dicentrarchus labrax* exposed to acute salinity and temperature changes: metabolic basis for maximum stocking density estimations. Aquaculture(1998), 169:303-313.
- Den Hartog C. & Kuo J., 2006. Taxonomy and Biogeography of Seagrasses. P.1-23. In: Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation. Larkum, A.W.D., Orth, R.J. & Duarte, C.M., (Eds), Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Di Lorenzo, M, Stork, M, Tolmasky, M.E., Actis, L.A., Farrell, D, Welch, T.J., Crosa, L.M., Wertheimer, A.M., Chen, Q., Salinas, P., Waldbeser, L., Crosa, J.H., 2003. Complete Sequence of Virulence Plasmid pJM1 from the Marine Fish Pathogen *Vibrio anguillarum* Strain 775. J. Bacteriol 185(19), 5822-5830.
- Di Marco, P., A. Priori, M.G. Finoia, A. Massari, A. Mandich and G. Marino., 2008. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. Aquaculture 275: 319-328. doi:10.1016/j.aquaculture. 2007.12.012.
- Diaz-Almela, E. & Duarte, C.M., 2008. Management of Natura 2000 habitats. 1120 Posidonia beds (*Posidonium oceanicae*). European Commission.
- Dimitroglou, A, Merrifield, DL, Carnevali, O, Picchietti, S, Avella, M, Daniels, C., Güroy, D., Davies, S.J., 2011. Microbial manipulations to improve fish health and production - a Mediterranean perspective. Fish Shellfish Immunol 30, 1-16.
- Do Vale, A., Magariños, B., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Ellis, A.E., Toranzo, A.E., 2002.

- Binding of haemin by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Dis. Aquat. Org. 48, 109-115.
- Egusa, S., 1983. Disease problems in Japanese yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, culture : a review. In: J.E. Stewart (ed), Diseases of Commercially Important Marine Fish & Shellfish. Conseil International pour l' Exploration de la Mer, Copenhagen, pp. 10-18.
- Ellis, A. E., 1988a. General principles of fish vaccination. In: Ellis A-E. (Ed.) Fish vaccination. Academic Press, London, pp. 1-19.
- Ellis, A. E., 1988b. Optimizing factors in fish vaccination. In: Ellis A-E. (Ed.) Fish vaccination. Academic Press, London, pp. 32-46.
- Ellis, A. E., 1989a. The immunology of telcosts. In: Roberts W. (Ed.) Fish pathology, 2nd edition. Bailliere Tindall, London, pp. 135- 152.
- Ellis, A. E., 1989b. Vibriosis of Salmonids in Scotland, Aquaculture Information Series Number 7. Department of Agriculture and Fisheries for Scotland.
- Fanouraki E., P. Divanach and M. Pavlidis., 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*). Aquaculture 256: 294-304.
- Fanouraki, E., N. Papandroulakis, T. Ellis, C.C. Mylonas, A.P. Scott and M. Pavlidis., 2008. Water cortisol is a reliable indicator of stress in European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Behaviour 145 Suppl. SI: 1267-1281.
- Fanouraki, E., C.C. Mylonas, N. Papandroulakis and M. Pavlidis., 2011. Species specificity in the magnitude and duration of the acute stress response in Mediterranean marine fish in culture. Gen. Comp. Endocrinol. 173: 313-322.
- FAO, 2004. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome.
- FAO, 2006. Crop prospects and food situation. No. 3. October. Rome.
- FAO, 2008. The State of World Fisheries and Aquaculture.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization., 2009. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria (October 2001). "Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria". Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Retrieved 2009-11-04.
- Farrell, D.H., Crosa, J.H., 1991. Purification and characterization of a secreted protease from the pathogenic marine bacterium *Vibrio anguillarum*. Biochemistry 30, 3432-3436.
- Fast, M.D., Hosoya, S., Johnson, S.C., Afonso, L.O.B., 2008. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon *Salmo salar* Linnaeus subjected to short- and long-term stress. Fish & Shellfish Immunology 24 2, 194-204.
- Frerichs G.N., Tweedie A., Starkey W.G., Richards R.H. (2000) Temperature, pH, and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. Aquaculture, 185: 13-24.
- Frimodt C., 1995. Multilingual illustrated guide to the world's commercial warmwater fish. Fishing News Books, Osney Mead, Oxford, England. 215 p.
- Fukuda, Y., Kusuda, R., 1981. Efficacy of vaccination for pseudotuberculosis in cultured yellowtail by various routes of administration. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish 47, 147-150.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66, 365-378.

- Galleotti M., Volpelli, L.A., Volpatti, D., Del Grano, N., Ceschia, G., Giorgetti, G., Adams, A., Randolph, R.H., 1995. Pasteurellosis experimentally induced in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): II. Histological and Immunohistochemical Evaluation. Book of Abstracts. 7th International Conference, "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Palma de Mallorca, 10-15 September, Spain, p. 51.
- Galeotti M., Romano N., Volpatti D., Bulfona C., Brunetti A., Tiscar P. G., Mosca F., Bertoni F., Marchetti M.G. & Abelli L. (2013). Innovative vaccination protocol against vibriosis in *Dicentrarchus labrax* (L.) juveniles: Improvement of immune parameters and protection to challenge. *Vaccine* 31. 1224-1230.
- Gallardo M.A., Rebanal M.S., Ibarz A., Padros F., Blasco J., Borrás J.F., Sanchea J. (2003). Functional alterations associated with "winter syndrome" in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 223: 15–27.
- Ganga, R., G.J. Bell, D. Montero, E. Atalah, Y. Vras Kou, L. Tort, A. Fernandez and M.S. Izquierdo. 2011a. Adrenocorticotrophic hormone-stimulated cortisol release by the head kidney interrenal tissue from sea bream (*Sparus aurata*) fed with linseed oil and soyabean oil. *British Journal of Nutrition* 105: 238-247.
- Ganga, R., D. Montero, J.G. Bell, E. Atalah, E. Ganuza, L. Vega Orellana, L. Tort, J.M. Acerete, J.M. Afonso, T. Benitez-Santana, H. Fernández-Palacios and M.S. Izquierdo., 2011b. Stress response in sea bream (*Sparus aurata*) held under crowded conditions and fed diets containing linseed and/or soybean oil. *Aquaculture* 311: 215-223.
- Glazebrook J.S., Campbell R.S.F. (1987) Diseases of barramundi (*Lates calcarifer*) in Australia: a review. In: Management of Wild and Cultured Sea Bass/Barramundi *Lates calcarifer*, edited by Copland J.W., Grey D.I., ACIAR, Canberra, 204-206.
- Gomati, G., E. Papis, S. Rimoldi, G. Terova, M. Saroglia and G. Bernardini., 2004. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *GENE*. 341: 111-118.
- Good C., Marancik D., Welch T., May T., Davidson J. & Summerfelt S., 2016. Systemic granuloma observed in Atlantic salmon *Salmo salar* raised to market size in a freshwater recirculation aquaculture system. *Aquaculture Research*, 2016, 47, 3679–3683.
- 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. *Appl Environ. Microbiol.* 65(3), 969-73.
- Gravningen K., Thorarinsson R., Johansen L.H., Nissen B., Rikardsen K.S., et al., 1998. Bivalent vaccines for sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) against vibriosis and pasteurellosis. *J. Appl. Ichthyol.* 14, 159-162.
- Gravningen K., Sakai M., Mishiba T., Fujimoto T., 2008. The efficacy and safety of an oil based vaccine against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): A field study. *Fish & Shellfish Immunol.* 24, 523-529.
- Greenstreet, S.P.R., Tuck, I.D, Grewar, G.N., Armstrong, E., Reid, D.G. & Wright, P.J., 1997. An assessment of the acoustic survey technique, RoxAnn, as a means of mapping seabed habitat. *ICES Journal of Marine Science*, 54: 939–959.
- Grigorakis K. & Rigos G., (2011). Aquaculture effects on environmental and public welfare- the case of Mediterranean mariculture, *Chempisphere*, 85(6): 899-919.

- Grisez L. & Ollevier F., (1995). Comparative Serology of the Marine Fish Pathogen *Vibrio anguillarum*. Applied and Environmental Microbiology, 61(12):4367-4373.
- Grisez, L., Chair, M., Sorgeloos, P., Ollevier, F. (1996) Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. Diseases of Aquatic Organisms 26, 181-187.
- Grotmol S., Totland G.K., Kvellestad A., Fjell K., Olsen A.B. (1995) Mass mortality of larval and juvenile hatchery-reared halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) associated with the presence of virus-like particles in the central nervous system and retina. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 15: 176-180.
- Grotmol S., Bergh O., Totland G.K. (1999) Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk-sac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection. Diseases of Aquatic Organisms, 36: 95-106.
- Grotmol S., Totland G.K. (2000) Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. Diseases of Aquatic Organisms, 39: 89–96.
- Hadj-Kacem, N., J.F. Aldrin and B. Romestand., 1986. Influence immediate du broissage des bacs sur certains parametres sanguins du loup d' elevage *Dicentrarchus labrax* L.: effet du stress. Aquaculture 59: 53-59.
- Hair, G.F., Anderson, R.E., Tatham, R.L., Black, W.C. , 1998. Multivariate data analysis. Fifth Edition. Prentice-Hall International, Inc., 730 pp
- Hata N., Okinaka Y., Sakamoto T., Iwamoto T., Nakai T. (2007) Upper temperature limits for the multiplication of betanodaviruses. Fish Pathology, 42: 225-228.
- Hawke, J.P., Plakas, S.M., Minton, R.V., McPhearson, R.M., Sneider, T.G., Guarino, M., 1987. Fish Pasteurellosis of cultured striped bass (*Morone saxatilis*) in coastal Alabama. Aquaculture 65, 193-294.
- Heenatigala P.P.M. and Fernando M.U.L., 2016. Occurrence of bacteria species responsible for vibriosis in shrimp pond culture systems in Sri Lanka and assessment of the suitable control measures. Sri Lanka J. Aquat. Sci. 21 (1) : 1-17
- Hernes, P. J., Hedges, J. I., Peterson, M. L., Wakeham, S. G., and Lee, C. 1996. Neutral carbohydrate geochemistry of particulate material in the central equatorial Pacific, Deep-Sea Res. Pt. II, 43, 1181–1204.
- Hjeltnes B., Andersen K. & Ellingsen H.M. (1989). Vaccination against *Vibrio salmonicida*. the effect of different routes of administration and of revaccination. Aquaculture 83. 1-6.
- Hochachka, P.W. and G.N. Somero. 2002. *Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution*. Oxford University Press: Oxford. Ocean Acidification: A National Strategy to Meet the Challenges of a Changing Ocean. The National Academies Press. Washington, D.C. 2010.
- Hoff, K.A., 1989. Survival of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* at different salinities. Applied and Environmental Microbiology 55, 1775-1786.
- Hoppe, H.-G., Kim, S. J., and Gocke, K. 1988. Microbial decomposition in aquatic environments – combined process of extracellular enzyme-activity and substrate uptake, Appl. Environ. Microbiol., 54, 784–790.
- Horne, M.T., Richards, R.H., Roberts, R.J., Smith, P.C., 1977. Peracute vibriosis in juvenile

- turbot *Scophthalmus maximus*. J. Fish. Biol. 11, 335-361.
- Houghton, J. T., Ding, Y., Griggs, D. J., et al. 2001. Climate Change 2001: The Scientific Basis, Cambridge University Press, Cambridge.
- Huang Y.C., Lin T.S., Peng C., Chan N.L., Han Y.S. (2015a) Strong inhibition of betanodavirus replication by ribavirin targeting RNA-dependent RNA polymerase. Journal of Fish diseases, 39 (5): 619–623.
- Husgaro S., Grotmol S., Hjeltnes B., Rodseth O.M., Biering E. (2001) Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. Diseases of Aquatic Organisms, 45: 33-44.
- Janssen, W.A., Surgalla, M.J., 1968. Morphology, physiology and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). Journal of Bacteriology 96(5), 1606-1610.
- Jarvie H.P., Whitton B.A. & Neal C., (1998). Nitrogen and phosphorus in east coast British rivers: speciation, sources and biological significance, Science of the Total Environment, 210-211:79-109.
- Johnson S., Sperker S., Leggiadro C., Groman D., Griffiths S., Ritchie R., Cook M., Cusack R. (2002) Identification and characterization of a Piscine Neuropathy and Nodavirus from Juvenile Atlantic Cod from the Atlantic Coast of North America. Journal of Aquatic Animal Health, 14: 124-133.
- Kai Y.H., Chi S.C. (2008) Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) by bath immunization. Vaccine, 26: 1450-1457.
- Kai Y.H., Su H.M., Tai K.T., Chi S.C. (2010) Vaccination of grouper broodfish (*Epinephelus tukula*) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus. Vaccine, 28: 996–1001.
- Karakasis I., Hatziyianni E., (2000). Benthic disturbance due to fish farming analyzed under different levels of taxonomic resolution. Marine Ecology Progress Series, 203:247-253.
- Kawahara E., Kawai K. & Kusuda R. 1989. Invasion of *Pasteurella piscicida* in tissues of experimentally infected yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Nippon Suishan Gakkaishi 55(3), 499-501.
- Kim, K.H., Yoshida, T., Aoki, T., 1993. Detection of R plasmids encoded with resistance to florfenicol in *Pasteurella piscicida*. Gyobyo Kenkyu 28, 165-170.
- Kim, K.H., Hwang, Y.J., Bai, S.C., 1999. Resistance to *Vibrio alginolyticus* in juvenile rockfish *Sebastes schlegelii* fed diets containing difference doses of aloe. Aquaculture 180, 13-21.
- Kirkoudis I., Papaioannou N., Aggelidis P., Vlemas I., Photis G., (2001). Experimental *Vibrio anguillarum* serotype 1 infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Proceedings of the 19th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Thessaloniki, Greece, 25 – 28 September (2001).
- Kodama, H., Moustafa, M., Mikami, T., Izawua, H., 1985. Characterization of extracellular substances of *Vibrio anguillarum* toxic for rainbow trout and mice. Microbiology and Immunology 29, 909-920.
- Koike, Y., Kuwahara, A., Fujiwara, H., 1975. Characterisation of *Pasteurella piscicida* isolated from white perch and cultivated yellowtail. Japanese Journal of Microbiology

19(4), 241-247.

- Korsnes K., Karlsbakk E., Devold M., Nerland A.H., Nylund A. (2009) Tissue tropism of nervous necrosis virus (NNV) in Atlantic cod, *Gadus morhua* L., after intraperitoneal challenge with a virus isolate from diseased Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 32: 655–665.
- Kottelat M. and J. Freyhof, 2007. Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin. 646 pp.
- Koven, W.M., Y. Barr, S. Lutzky, I. Ben Atia, R. Weiss, M. Harel, P. Behrens and A. Tandler., 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n₆) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 193: 107-122.
- Kubota, S.S., Kimura, M., Egusa, S., 1970. Studies of bacterial tuberculoidosis of the yellowtail. I. Symptomatology and histopathology. *Fish Pathology* 4, 111-118.
- Kusuda, R., Fukuda, Y., 1980. Agglutinating antibody titers and serum protein changes of yellowtail after immunisation with *Pasteurella piscicida* cells. *Bulletin of The Japanese Scientific Fisheries* 46(7), 801-807.
- Kusuda R. & Hmaguchi M., (1987). A comparative study on efficacy of immersion and a combination of immersion and oral vaccination methods against pseudotuberculosis in yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53(6), 1005-1008.
- Kusuda, R., Hamaguchi, M., 1988. The efficacy of attenuated live bacterin of *Pasteurella piscicida* against pseudotuberculosis in yellowtail. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists* 8(3), 51-53.
- Kusuda, R., Salati, F., 1993. Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Ann. Rev. Fish Dis.* 3, 69-85.
- Lamas, J. Santos, Y., Bruno, D., Toranzo, A.E., Anadon, R., 1994. A comparison of pathological changes caused by *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish. Pathol.* 29, 79-89.
- Larsen J.L. (1983). *Vibrio anguillarum*: influence of temperature, PH, NaCl concentration and incubation time on growth. *Journal of Applied Bacteriology* (1984), 57:237-246.
- Larsen J.L. and Mellergaard S. (1984). Agglutination typing of *Vibrio anguillarum* isolates from diseased fish and from the environment. *Applied and Environmental Microbiology* 47: 1261-1265.
- Larsen, J.L., Pedersen, K. and Dalsgaard, I., 1994. *Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in fish. *Journal of Fish Diseases* 17, 259-267.
- Le Breton A., Grisez L., Sweetman J., Olivier F. (1997) Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of fish diseases*, 20: 145-151.
- Le Breton A.D. (1999). Mediterranean finfish pathologies: present status and new developments in prophylactic methods. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 19. 250–253.
- Le Moullac, G., Soyeux, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Jean Christophe Avarre, J.C., Levy, P., 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish & Shellfish Immunology* 88, 621-629.
- Lemos, M., Salinas, P., Toranzo, A., Barja, J., Crosa, J.H., 1988. Chromosome-mediated iron uptake system in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology*
-

- 170, 1920-1925.
- Lin C.C., Lin J.H.Y., Chen M.S., Yang H.L. (2007) An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture*, 268: 265-273.
- Lloris D., 2002. A world overview of species of interest to fisheries. Chapter: *Dicentrarchus labrax*. Retrieved on 05 May 2005, from www.fao.org/figis/servlet/species?fid=2291. 3p. FIGIS Species Fact Sheets. Species Identification and Data Programme-SIDP, FAO-FIGIS.
- López-Olmeda J.F., Oliveira C., Kalamariz H., Kulczykowska E., Delgado M.J., Sánchez-Vázquez F.J., (2009). Effects of water salinity on melatonin levels in plasma and peripheral tissues and on melatonin binding sites in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology* (2009). Part A, 152:486-490.
- Lopez-Jimena B., Cherif N., Garcia-Rosado E., Infante C., Cano I., Castro D., Alonso M.C. (2010) A combined RT-PCR and dot-blot hybridization method reveals the coexistence of SJNNV and RGNNV betanodavirus genotypes in wild meagre (*Argyrosomus regius*). *Journal of Applied Microbiology*, 109: 1361–1369.
- Lopez-Jimena B., Alonso M., Thompson K.D., Adams A., Infante K., Castro D., Borrego J., Rosado E.G (2011) Tissue distribution of Red Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) genome in experimentally infected juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Veterinary Microbiology*, 154: 86-95.
- Lopez-Jimena B., Garcia-Rosado E., Thompson K.D., Adams A., Infante C., Borrego J.J., Alonso, M.C. (2012). Distribution of redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) antigens in nervous and non-nervous organs of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) during the course of an experimental challenge. *Journal of Veterinary Science*, 13: 355–362.
- Lund V., Arnesen J. A., Coycheron D., Modalsli K., Syvertsen C., 2003. The *Aeromonas salmonicida* A-layer protein is an important protective antigen in oil-adjuvanted vaccines. *Fish & Shellfish Immunology* 15, 367-372.
- Lüning, K., 1990. Seaweeds. Their environment, biogeography, and ecophysiology. John Wiley and Sons, New York. 527p.
- Lupatsch, I., G.A. Santos, J.W. Schrama and J.A.J. Verreth., 2010. Effect of stocking density and feeding level on energy expenditure and stress responsiveness in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 298: 245-250.
- MacDonell, M.T., Colwell, R.R., 1984. Nucleotide base sequence of vibronaceae 5S rRNA. *FEBS Lett* 17, 183–188.
- Mackenzie, S., L. Ribas, M. Pilarczyk, D.M. Capdevila, S. Kadri and F.A. Huntingford., 2009. Screening for Coping Style Increases the Power of Gene Expression Studies. *PLoS ONE* 4(4): e5314.
- Magarinos B., Romalde, J.L., Bandín, I., Fouz, B., Toranzo, A.E., 1992a. Phenotypic, antigenic and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3316-3322.
- Magarinos B., Santos, Y., Romalde, J.L., Rivas, C., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1992b. Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *Journal of General Microbiology* 138, 2491-2498.

- Magarinos B., Romalde, J.L., Skarmeta, A.M., Silva, A., Toranzo, A.E., 1993. Viable but non-culturable *Pasteurella piscicida* in sea water and sediment microcosms. Book of Abstracts. 6th International Conference, "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Brest, France, 5-10 September 1993, p. 39.
- Magarinos B., Noya M., Romalde J.L., Perez G. & Toranzo A.E. (1994a). Influence of fish size and vaccine formulation on the protection of gilthead seabream against *Pasteurella piscicida*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 14. 120-122.
- Magarinos B., Romalde, J.L., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1994b. Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment. Appl. Environ. Microbiol. 60, 180-186.
- Magarinos B., Romalde, J.L., Santos, Y., Casal, J.F., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1994c. Vaccination trials on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*. Aquaculture 120, 201-208.
- Magarinos B., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1994d. Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. Applied and Environmental Microbiology 60(8), 2990-2998.
- Magarinos B., Pazos F., Santos Y., Romalde J.L., Toranzo A.E., 1995a. Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. Dis. Aqua. Org. 21, 103-108.
- Magarinos B., Romalde, J.L., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1995b. Ribotyping analysis of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. Book of Abstracts. 7th International Conference, "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Palma de Mallorca, 10-15 September 1995, Spain, p.59.
- Magarinos B., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., 1995c. Different susceptibility of gilthead sea bream and turbot to *Pasteurella piscicida* infection by the water route. Bulletin of the European Association of fish Pathologists 15(3), 88-90.
- Magarinos B., Romalde, J.L., Noya, M., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1996a. Adherence and invasive capabilities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. FEMS Microbiology Letters 138, 29-34.
- Magarinos B., Bonet, R., Romalde, J.L., Martínez, M.J., Congregado, F., Toranzo, A.E., 1996b. Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. Microb. Pathogen. 21, 289-297.
- Magarinos B., Osorio, C.R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., 1997. Applicability of ribotyping for intraspecific classification and epidemiological studies of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Syst. Appl. Microbiol. 20, 634-639.
- Magarinos B., Romalde, J.L., Barja, J.L., Núñez, S., Toranzo, A.E., 1999. Protection of gilthead sea bream against pasteurellosis at the larval stages. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 19, 159-161.
- Magarinos B., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Romalde, J.L., 2000. Existence of two geographically-linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* evidence by random amplified polymorphic DNA analysis. Epidemiol. Infect. 125, 213-219.
- Magarinos B., Couso N., Noya M., Merino P., Toranzo A.E., Lamas J., 2001. Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead sea bream

- (*Sparus aurata*). Aquac. 195, 17-21.
- Makridis Pavlos, Mente Elena, Grundvig Henrik, Gausen Martin, Koutsikopoulos Constantin & Bergheim Asbjørn (2017). Monitoring of oxygen fluctuations in seabass cages (*Dicentrarchus labrax* L.) in a commercial fish farm in Greece. Aquaculture Research, September 2017, pp 1–8.
- Mancuso, M., Avendaño-Herrera, R., Zaccone, R., Toranzo, A.E., Magariños, B., 2007. Evaluation of different DNA-based fingerprinting methods for typing *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Biol. Res. 40, 85-92.
- Matsusato, T., 1975. Bacterial tuberculoidosis of culture yellowtail. Proceedings of the 3rd US-Japan meeting on Aquaculture, Tokyo, Japan.
- Mauri, I.N. Roher, S. MacKenzie, A Romero, M. Manchado, J.C. Balasch, J. Béjar, M.C. Alvarez and L. Tort., 2011. Molecular cloning and characterization of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and Gilthead seabream (*Sparus aurata*) complement component C3. Fish and Shellfish Immunology 30: 1310-1322.
- Mazelet L., Dietrich J., Rolland J.L. (2011) New RT-qPCR assay for Viral Nervous Necrosis Virus detection in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.): application and limits for hatcheries sanitary control. Fish and Shellfish Immunology, 30: 27–32.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R.T.M., Børgwald, J., Castex, M., Ringø, E., 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture 302, 1-18.
- Metchnikoff, E., 1907. Essais optimistes. Paris. The prolongation of life. Optimistic studies. Translated and edited by P. Chalmers Mitchell. London: Heinemann.
- Milne P.H., 1970. Fish farming: a guide to design and construction of net enclosures. Mar. Res. De. Agric. Fish. Scot., 1970 (1), 31 p.
- Mladineo I. (2003) The immunohistochemical study of nodavirus changes in larval, juvenile and adult sea bass tissue. Journal of Applied Ichthyology, 19 (6): 366.
- Molinero, A., E. Gómez, J. Balasch and L. Tort., 1997. Stress by fish removal in the sea bream *Sparus aurata*: a time course study on the remaining fish in the same tank. J. Appl. Aquaculture 7: 1-12.
- Montero, D., T. Kalinowski, A. Obach, L. Robaina, L. Tort, M.J. Caballero, Y. and M.S. Izquierdo., 2003. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): Effects of fish health. Aquaculture 225: 353-370.
- Montero, D. and M.S. Izquierdo., 2010. Welfare and health of fish fed vegetable oils as alternative lipid sources to fish oil. pp. 439-485. In: G. Turchini, W. Ng and D. Tocher (eds.). Fish oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds. CRC Press, Cambridge, UK. ISBN: 978-1-4398-0862-7.
- Mori K., Mushiake K., Arimoto M. (1998) Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. Fish Pathology, 33: 443-444.
- Moriñigo, M.A., Romalde, J.L., Chabrilion, M., Magariños, B., Arijo, S., Balebona, M.C., Toranzo, A.E., 2002. Effectiveness of a divalent vaccine for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) against *Vibrio alginolyticus* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 22, 298-303.
- Mourino, S., Osorio, C.R., Lemos, M.L., 2004. Characterization of heme uptake cluster genes in the fish pathogen *V. anguillarum*. J. Bacteriol 186, 6159-6167.
- Munday B.L., Langdon J.S., Hyatt A. and Humphrey J.D. (1992) Mass mortality associated

- with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Aquaculture*, 103: 197-211.
- Munday B.L., Nakai T. (1997) Special topic review: nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13: 375–381.
- Munday B.L., Kwang J., Moody N. (2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases*, 25: 127-142.
- Muroga, K., Sugiyama, T., Ueki, N., 1977. Pasteurellosis in cultured black sea bream (*Mylio macrocephalus*). *Journal of the Faculty of Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima University* 16, 17-21.
- Muroga, K., Iida, M., Matsumoto, H., Nakai, T., 1986. Detection of *Vibrio anguillarum* from waters. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 52, 641–647.
- Mushiake K., Nishizawa T., Nakai T., Furusawa I., Muroga K. (1994) Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathology*, 29: 177-182.
- Mutoloki S., Alexandersen S., Gravning K., Evensen O., 2008. Time-course study of injection site inflammatory reactions following intraperitoneal injection of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) with oil-adjuvanted vaccines, *Fish & Shellfish Immunol.* 24, 386-393.
- Muus B.J. and J.G. Nielsen, 1999. Sea fish. *Scandinavian Fishing Year Book*, Hedehusene, Denmark. 340 p.
- Naka, H., Dias, G.M., Thompson, C.C., Dubay, C., Thompson, F.L., Crosa, J.H., 2011. Complete Genome Sequence of the Marine Fish Pathogen *Vibrio anguillarum* Harboring the pJM1 Virulence Plasmid and Genomic Comparison with Other Virulent Strains of *V. anguillarum* and *V. ordalii*. *Infect. Immun.* 79, 2889-2900.
- Nakai T., Fujiie N., Muroga K., Arimoto M., Mizuta Y. & Matsuoka S. (1992). *Pasteurella piscicida* infection in hatchery reared juvenile striped jack. *Gyobyu Kenkyu* 27. 103–108.
- Nakai T., Mori K., Sugaya T., Nishioka T., Mushiake K., Yamashita H. (2009) Current knowledge on viral nervous necrosis (VNN) and its causative betanodaviruses. *Israeli Journal Of Aquaculture-Bamidgeh*, 61: 198–207.
- Ndong, D., Y-Y., Lin, Y-H., Vaseeharan, B., Chen, J-C., 2007. The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. *Fish & Shellfish Immunology* 226, 686-694.
- Nelson, J.S., Kawahara, E., Kawai, K., Kusuda, R., 1989. Macrophage infiltration in pseudotuberculosis of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Bulletin of Marine Scientific Fisheries, Kochi University* 11, 17-22.
- Nguyen H.D., Nakai T., Muroga K. (1996) Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 24 (2): 99-105.
- Nishizawa T., Mori K., Furuhashi M., Nakai T., Furusawa I., Muroga K.J. (1995) Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *General Virology*, 76: 1563-1569.
- Nishizawa T., Furuhashi M., Nagai T., Nakai T., Muroga K. (1997) Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Applied*

- Environmental Microbiology, 63: 1633-1636.
- NLWRA 2002. National Land and Water Resources Audit, 2002.
- Noga E.J., 2011. Fish and Disease. Diagnosis and treatment. 2nd Ed. Wiley & Sons, Inc., Publication, USA.
- Nomura, J., Aoki, T., 1985. Morphological analysis of lipopolysaccharide from Gram negative fish pathogenic bacteria. Fish Pathology 20 (2/3), 193-197.
- Norqvist, A., Norrman, B., Wolf-Watz, H., 1990. Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Infect. Immun. 58(11), 3731-3736.
- Norqvist, A., Wolf-Watz, H., 1993. Characterization of a novel chromosomal virulence locus involved in expression of a major surface flagellar sheath antigen of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Infection and Immunity 61, 2434-2444.
- Novotny, A.J., 1975. Vibriosis: A common disease of Pacific salmon cultured in marine waters of Washington. Ext. Bull. Wash. State Univ. Coop. Ext. Serv., No. 663, 8.
- Noya, M., Magariños, B., Lamas, J., 1995b. Interactions between peritoneal exudate cells (PECs) of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and *Pasteurella piscicida*. A morphological study. Aquaculture 131, 11-21.
- O'Toole, R., Milton, D.L., Wolf-Watz, H., 1996. Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Molecular Microbiology 19, 625-637.
- Ohnishi, K., Watanabe, K., Jo, Y., 1982. Pasteurella infection in young black sea bream. Fish Pathology 16(4), 197-210.
- OIE, World Organisation for Animal Health (2016) Viral encephalopathy and retinopathy. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, Part 2, Section 2.3, Chapter 2.3.12, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_viral_encephalopathy_retinopathy.pdf.
- Olsen, J.E., Larsen, J., 1990. Restriction fragment length polymorphism of the *Vibrio anguillarum* serovar O1 virulence plasmid. Applied and Environmental Microbiology 56, 3130-3132.
- Olsen Y.A., Press C.M. (1997) Degradation kinetics of immunoglobulin in the egg, alevin and fry of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and the localization of immunoglobulin in the egg. Fish and Shellfish Immunology, 7: 81-91. 247
- Olsson, J.C., Jöborn, A., Westerdahl, A., Blomberg, L., Kjelleberg, S., Conway, P.L., 1996. Is turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine a portal of entry for the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. J. Fish Dis. 19, 225-234.
- Olsson, J.C., Jöborn, A., Westerdahl, A., Blomberg, L., Kjelleberg, S., Conway, P.L., 1998. Survival, persistence, and proliferation of *Vibrio anguillarum* in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine and faeces. J. Fish Dis. 21, 1-10.
- Olveira J.G., Soares F., Engrola S., Dopazo C.P., Bandin I. (2008). Antemortem versus postmortem methods for detection of betanodavirus in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 20: 215-219.
- Ortuno, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2001. Effects of short-term crowding stress on the gilthead sea bream *Sparus aurata* L. innate immune response. Fish & Shellfish Immunology 112, 187-197.
- Osorio, C.R., Collins, M.D., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Romalde, J.L., 1999. 16S rRNA sequence analysis of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* and nested PCR

- method for the rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2942-2946.
- Osorio, C.R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Barja, J.L., 2000. Multiplex PCR assay for UreC and 16SrRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. Dis. Aquat. Org. 40, 177-183.
- Osorio, C.R., Marrero, J., Wozniak, R.A.F., Lemos, M.L., Burrus, V., Waldor, M.K., 2008. Genomic and functional analysis of ICEPdaSpa1, a Fish-Pathogen-Derived SXT-related integrating conjugative element that can mobilize a virulence plasmid. J. Bacteriol. 190, 3353-3361.
- Padan, E., E. Bibi, M. Ito, and T.A. Krulwich. 2005. Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1717(2): 67-88. Ocean Acidification: A National Strategy to Meet the Challenges of a Changing Ocean. The National Academies Press. Washington, D.C. 2010.
- Pakulski, J. D. and Benner, R., 1994: Abundance and distribution of carbohydrates in the ocean, Limnol. Oceanogr., 39, 930–940.
- PanZarin V., Fusaro A., Monne I., Cappellozza E., Patarnello P., Bovo G., Capua I., Holmesd E.C., Cattoli G. (2012) Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. Infection, Genetics and Evolution, 12 (1): 63–70.
- Papadopoulos P., Bitchava K., Tzironi E., Athanassopoulou F., 2008. Fish vaccination. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 59(4): 308-319.
- Paspatis M., Batarias C., Tiangos P. & Kentouri M. (1999). Feeding and growth response of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared by four feeding methods. Aquaculture 175. 293-305.
- Paspatis, M., T. Boujard, D. Maragoudaki, G. Blanchard and M. Kentouri., 2003. Do stocking density and feed reward level affect growth and feeding of self-fed juvenile European sea bass. Aquaculture 216: 103-113.
- Pauly D., (1980). On the interrelationships between natural mortality, growth parameters, and mean environmental temperature in 175 fish stocks. Journal du Conseil / Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer, 39(2):175-192.
- Pavlidis, M., E. Karantzali, E. Fanouraki, C. Barsakis, S. Kollias and N. Papandroulakis., 2011. Onset of the primary stress in European sea bass *Dicentrarchus labrax*, as indicated by whole body cortisol in relation to glucocorticoid receptor during early development. Aquaculture 315: 125-130.
- Pedersen, K., Kuhn, I., Seppanen, J., Hellstrom, A., Tiainen, T., Rimaila-Parnanen, E., Larsen, J.L., 1999. Clonality of *Vibrio anguillarum* strains isolated from fish from the Scandinavian countries, Sweden, Finland and Denmark. Journal of Applied Microbiology 86, 337-347.
- Person-Le Ruyet J., Mahé K., Le Bayon N. & Le Delliou H., (2004). Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture, 237(1-4):269-280.
- Piontek J., Lunau M., Handel N., Borchard C., Wurst M. and Engel A., 2010. Acidification increases microbial polysaccharide degradation in the ocean. Biogeosciences, 7, 1615–1624.
- Pitta, P., Karakassis, I., Tsapakis, M., and Zivanovic, S. (1999). Natural vs. mariculture induced variability in nutrients and plankton in the Eastern Mediterranean.

- Hydrobiologia, 391: 181–194.
- Portner H.O., (2001). Climate change and temperature dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance animals, *Naturwissenschaften*, 88:137-136.
- Portner, H.O., M. Langenbuch, and A. Reipschläger. 2004. Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: Lessons from animal physiology and Earth history. *Journal of Oceanography* 60: 705-718. Ocean Acidification: A National Strategy to Meet the Challenges of a Changing Ocean. The National Academies Press. Washington, D.C. 2010.
- Portner H.O & Knust R., (2007). Climate change affects marine fishes through the Oxygen Limitation of Thermal Tolerance Science, 315:95-97.
- R Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ransom, D.P., Lannan, C.N., Rohovec, J.S., Fryer, J.L., 1984. Comparison of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific salmon. *Journal of Fish Diseases* 7, 107-115.
- Raven, J., Caldeira, K., Elderfield, H., et al. 2005. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide, Policy document 12/05, Roy. Soc. Rep., 12.
- Rekecki, A., Gunasekara, R.A.Y.S.A., Dierckens, K., Laureau, S., Boon, N., Favoreel, H., Cornelissen, M., Sorgeloos, P., Ducatelle, R., Bossier, P., Van den Broeck, W., 2012. Bacterial host interaction of GFP-labelled *Vibrio anguillarum* HI610 with gnotobiotic sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) larvae. *J. Fish Dis.* 35(4), 265–273.
- Richards, R.H., 1980. Observations on Vibriosis in Cultured Flatfish. In “Fish Diseases” (Ed. W. Ahne), Springer-Verlag, Berlin, pp. 75-81.
- Roberts, R. J., 1973. The histopathology of salmon tagging, III. Secondary infections associated with tagging. *J. Fish Biol.* 5, 621-623.
- Roberts, R. J., (2001). Fish pathology. Elsevier Health Sciences, 472.
- Robertsen, B., Rorstad, G., Engstad, E., Raa, J., 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal of Fish Diseases* 13, 391-400.
- Robohm, R.A., 1983. *Pasteurella piscicida*. In: D.P. Anderson, M. Dorson & P. Dubourget (eds). Antigenes of Fish Pathogens: Development and Production for Vaccines and Serodiagnostics. Collection Foundation Marcel Merieux, Lyon, pp. 161-175.
- Roche Helene, Boge Gerard, 1996. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Marine Environmental Research*, Vol. 41, Issue 1, pp. 27-43.
- Rolf, R.E., 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* 130, 396-402.
- Romalde, J.L., Magariños, B., Fouz, B., Bandín, I., Núñez, S., Toranzo, A.E., 1995b. Evaluation of BIONOR mono-kits for rapid detection of bacterial fish pathogens. *Dis. Aquat. Org.* 21, 25-34.
- Romalde, J.L., Breton, A.L., Magariños, B., Toranzo, A.E., 1995c. Use of BIONOR Aquarapid-Pp kit for the diagnosis of *Pasteurella piscicida* infections. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists* 15(2), 64-66.
- Romalde, J.L., Magariños, B., 1997. Immunization with bacterial antigens: pasteurellosis. *Fish Vaccinology* 90, 167-177.

- Romalde, J.L., Magariños, B., Lores, F., Osorio, C.R., Toranzo, A.E., 1999. Assessment of a magnetic bead-EIA based kit for the rapid diagnosis of fish pasteurellosis. *J. Microbiol. Methods* 38, 147-154.
- Romalde J.L., (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* : an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, 5:3-9.
- Romalde, J.L., Ravelo, C., López-Romalde, S., Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Toranzo, A.E., 2005. Vaccination strategies to prevent emerging diseases for Spanish aquaculture. *Fish Vaccinology* 121, 85-95.
- Romeo, M., N. Bennani, M. Gnassia-Barelli, M. Lafaurie and J.P. Girard., 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology* 48: 185-194.
- Rotllant, J., R.J. Arends, J.M. Mancera, G. Flik, S.E. Wendelaar Bonga and L. Tort., 2000. Inhibition of HP1 axis response to stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with physiological plasma levels of cortisol. *Fish Physiol. Biochem.* 23: 13-22.
- Rotllant, J., N.M. Ruane, M.J. Caballero, D. Montero and L. Tort., 2003. Confinement stress response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) is characterised by an increased biosynthetic capacity of interrenal tissue, with no effect on ACTH sensitivity. *Comp. Biochem. Physiol.* 136A: 613-620.
- Rotllant, J., N.M. Ruane, M.T. Dinis, A.V.M. Canario and D.M. Power., 2006. Intra-adrenal interactions in fish: catecholamine stimulated cortisol release in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 143: 375-381.
- Rubio, V.C., E. Sanchez and J.M. Cerda-Reverter., 2010. Compensatory feeding in the sea bass after fasting and physical stress. *Aquaculture* 298: 332-337.
- Rucker, P.R., 1959. *Vibrio* infections among marine and freshwater fish. *Prog. Fish Cult.* 21, 22-25.
- Sabine, C. L., Feely, R. A., Gruber, N., et al. 2004. The oceanic sink for anthropogenic CO₂, *Science*, 305, 367–371.
- Sako, H., 1988. Survival of fish pathogenic bacteria in seawater. *Bulletin of the Natural Resources Institute of Aquaculture* 13, 45-53.
- Salati, F., Giorgetti, G., Kusuda, R., 1993. Comparison among strains of *Pasteurella piscicida* from Japan, Italy and USA. *Book of Abstracts. 6th International Conference, "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, 5-10 September 1993, Brest, France, p. 25.*
- Samuelsen O.B., Nerland A.H., Jorgensen T., Schroder M.B., Saand T., Bergh O. (2006) Viral and bacterial diseases of Atlantic cod *Gadus morhua*, their prophylaxis and treatment: a review. *Diseases of Aquatic Organisms*, 71: 239–254.
- Sánchez Vázquez F. J, Muñoz Cueto J. A., 2014. *Biology of European Sea Bass*. CRC Press. Chapter 2.8 Pathology Ariadna Sitjà-Bobadilla, Carlos Zarza and Belén Fouz, pp 289-288.
- Santos Y., Pazos F., Bandin I., and Toranzo A.E., (1995). Analysis of Antigens Present in the Extracellular Products and Cell Surface of *Vibrio anguillarum* Serotypes O1, O2, and O3. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7): 2493-2498.
- Saraiva A., Costa J., Serrão J., Eiras J.C., Cruz C., (2015). Study of the gill health status of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.,1758) using different tools.

- Aquaculture(2015), 441:16-20.
- Schreck, C.B., 1981. Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. pp. 295-321. *In*: A.D. Pickering (ed.). Stress and Fish. Academic Press, London.
- Schreck, C.B., 2000. Accumulation and long-term effects of stress in fish. *In*: Moberg, G.P., Mench (eds.). The biology of animal stress. CAB International, Wallingford pp. 147-158.
- Schrøder M.B., Mikkelsen H., Børdal S., Gravningen K., Lund V., 2006. Early vaccination and protection of Atlantic cod (*Gadus morhua*, L. 1758) juveniles against classical vibriosis. *Aquac.* 254, 46–53.
- Schrøder M.B., Ellingsen T., Mikkelsen H., Norderhus E.A. and Lund V. 2009. Comparison of antibody responses in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* and *Francisella* sp. *Fish and Shellfish Immunology* 27, 112–119.
- Selvaraj, V., Sampath, K., Sekar, V., 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp *Cyprinus carpio* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 19, 293-306.
- Sigbjørn Tveteras, 2002. Working Paper No. 08/02. Norwegian salmon aquaculture and sustainability: the relationship between environmental quality and industry growth SNF-project No. 5400 "Value Added in the Norwegian Seafood Industry" The project is financed by the Research Council of Norway.
- Smart G., 2001. Proplems of Sea bass and Sea bream quality in the Mediterranean. *Farmed Fish Quality*, Blackwell Science Ltd., Osney Mead Oxford OX2 OEL UK, pp 120-128.
- Somero N.G., (2010). The Physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine "winners" and "losers", *Journal of Experimental Biology I*, 213:912-920.
- Somero N.G., (2012). The Physiology of Global Change: Linking Patterns to mechanisms, *Annual Review of Marine Science*, 4:2.1-2.23.
- Sommerset I., Lorenzen E., Lorenzen N., Bleie H., Nerland A.H. (2003) A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot. *Vaccine*, 21: 4661-4667.
- Spinos E., Ramfos A., Lazaridou E. & Bakopoulos V., (2012). Ecological study of Argostoli Gulf: Preliminary results of seabed mapping with emphasis on *Posidonia oceanica* seagrasses. 10th Panhellenic Symposium of Oceanography and Fishery, Athens 2012.
- Spinos E., Vavasis X., Bakopoulos V. (2013). First results of correlation of water temperature with clinical signs development of the encephalopathy-retinopathy virus in cultured sea bass in Western Greece. 15th Panhellenic Ichthyologists Conference. Aquatic Ecosystems: uses, effects and management. Thessalonica 10-13/10/2013.
- Spinos E. & Bakopoulos V., (2014). Comparison of two injectable bivalent commercial vaccines (anti-Vibrio-Photobacterium) in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758). 1st International Congress of Applied Ichthyology & Aquatic Environment-HydroMedit 2014. November 13-15/2014, Volos, Greece.
- Spinos E. Kokkoris G. & Bakopoulos V., (2017). Prevention of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) photobacteriosis and vibriosis. Long term efficacy study of

- intraperitoneally administered bivalent commercial vaccines. *Aquaculture*, Vol 471 p 172-184.
- Strannegård B. (2000) Interferons and their therapeutic applications. *The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [http://www.ifcc.org/ifcc-communications-publications-division-\(cpd\)/ifcc-publications/ejifcc-\(journal\)/e-journal-volumes/ejifcc-2000-vol-11/vol-11-n%C2%B0-3/interferons-and-their-therapeutic-applications/](http://www.ifcc.org/ifcc-communications-publications-division-(cpd)/ifcc-publications/ejifcc-(journal)/e-journal-volumes/ejifcc-2000-vol-11/vol-11-n%C2%B0-3/interferons-and-their-therapeutic-applications/).
- Stryer Lubert, 1988. *Biochemistry*, 3rd edition. W. H. Freeman and Company. (Βιοχημεία Τόμος Πρώτος, απόδοση στα ελληνικά Α. Αλετράς, Θ. Βαλκανά, Δ. Δραΐνας, Κ. Δραΐνας, Η. Κούβελας, Γ. Κ. Παπαδόπουλος, Μ.Γ. Παπαδόπουλος & Μ. Φράγκου-Λαζαρίδη, 1994. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Σελίδες 64-66).
- Su Y., Xu X., Ma H., Feng J., Wen W., Guo Z. (2015a) Dynamic distribution and tissue tropism of nervous necrosis virus in juvenile pompano (*Trachinotus ovatus*) during early stages of infection. *Aquaculture*, 440: 25-31.
- Surajit D. & Neelam M., 2015. Ocean acidification and marine microorganisms: responses and consequences. *Oceanologia* Volume 57, Issue 4, Pages 349-361
- Tanaka S., Mori K., Arimoto M., Iwamoto T., Nakai T. (2001) Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *Journal of Fish Diseases*, 24: 15-22.
- Tanaka S., Takagi M., Miyazaki T. (2004) Histopathological studies on viral nervous necrosis of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, at the grow-out stage. *Journal of Fish Diseases*, 27 (7): 385–399.
- Tanoue, E. and Handa, N., 1987. Monosaccharide composition of marine particles and sediments from the Bering Sea and the northern North Pacific, *Oceanol. Acta*, 10, 91–99.
- Teliouis, K., 2011. Contribution in the pathologicoanatomic study of the vibriosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). PhD dissertation, Veterinary Medicine School of Thessaloniki, Greece. P. 108, (in greek).
- Terlizzi A., Tedesco P., Patarnello P. (2012) Spread of Pathogens from Marine Cage Aquaculture-A Potential Threat for Wild Fish Assemblages Under Protection Regimes. In: *Health and Environment in Aquaculture*. Edited by: Carvalho E.D., David G.S., Silva R.J. InTech, Janeza Trdine 9, 51000 Rjeka, Croatia, 403-414.
- Terova, G., R Gornati, S. Rimoldi, G. Bernardini and M. Saroglia., 2005. Quantification of a glucocorticoid receptor in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) reared at high stocking densities. *GENE*. 357(2): 144-151.
- Therneau T.M., Grambsch, P.M., 2000. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. Springer, New York. ISBN 0-387-98784-3.
- Therneau T., 2015. A Package for Survival Analysis in S. version 2.38, "URL: <http://CRAN.R-project.org/package=survival>".
- Thiery R., Arnaud C., Delsert C. (1999) Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *Journal of fish diseases*, 22: 201-207.
- Thompson, F.L., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Engelbeen, K., Denys, R., Swings, J., 2002. *Vibrio trachuri* Iwamoto et al. 1995 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* Johnson & Shunk 1936 Baumann et al. 1981. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 973- 976.

- Thornton J.C., Garduno R.A. & Kay W.W. (1994). The development of live vaccines for furunculosis lacking the A-layer and O-antigen of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases* 17(3). 195-204.
- Thune, R.L., Fernández, D.H., Hawke, J.P., Miller, R., 2003. Construction of a safe, stable, efficacious vaccine against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Dis. Aquat. Org.* 57, 51-58.
- Thyssen, A., Goris, J., Pedersen, K., Swings, J., Larsen, J.L., Ollevier, F., 1999. Phenotypic and genotypic characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Proc. 9th Int Conf Dis Fish Shellfish*. Rhodes.
- Tipton, K. F. and Dixon, H. B., 1979. Effects of pH on enzymes, *Method. Enzymol.*, 63, 183–234.
- Tolmasky, M.E., Crosa, J.H., 1990. Plasmid-mediated iron transport and virulence in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. In: Olsvik, O. and Bukholm, G. (Eds.). *Application of Molecular Biology in Diagnosis of Infectious Diseases*. Norwegian College of Veterinary Medicine, Oslo, Norway, pp. 49-54.
- Tolmasky, M.E., Crosa, J.H., 1991. Regulation of plasmid-mediated iron transport and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Biology of Metals* 4, 33-35.
- Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magariños, B., Barja, J.L., 1991. Pasteurellosis in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture* 99, 1-15.
- Toranzo, A.E., Magarinos, B., Romalde, J. L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246, 37– 61.
- Tort L., F. Padros, J. Rotllant and S. Crespo., 1998. Winter syndrome in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. *Fish and Shellfish Immunology*. pp. 837-47.
- Tort L., D. Montero, L. Robaina, H. Fernandez-Palacios and M.S. Izquierdo., 2001. Consistency of stress response to repeated handling in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Aquaculture Research* 32: 593-598.
- Tort L., Rotllant J., Pavlidis M., Montero D. & Terova G., 2014. Book “Biology of European Sea Bass”-CRC Press. Eds F. Javier Sanchez Vazquez & Jose A Munoz-Cueto. Chapter 2.10 pp 374-395.
- Tortonese E., 1986. Moronidae. p. 793-796. In P.J.P. Whitehead M.-L. Bauchot, J.-C. Hureau, J. Nielsen and E. Tortonese (eds.) *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*. UNESCO, Paris. vol. 2.
- Trust, T.J., Courtice, I.D., Khouri, A.G., Crosa, J.H., Schiewe, M.H., 1981. Serum resistance and haemagglutination ability of marine vibrios pathogenic for fish. *Infection and Immunity* 34, 702-707.
- Trust, T., 1986. Pathogenesis of the infectious diseases of fish. *Annual Review of Microbiology* 40, 479-502.
- Varsamos, S., Flik, G., Pepin, J.F., Bonga, S.E.W., Breuil, G., 2006. Husbandry stress during early life stages affects the stress response and health status of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology* 20 1, 83-96.
- Vazzana, M., M. Carnmarata, E.I. Cooper and N. Parrinello. 2002. Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture* 210: 231-43.

- Vendramin N., Toffan A., Mancin M., Cappelozza E., PanZarin V., Bovo G., Cattoli G., Capua I., Terregino C. (2014) Comparative pathogenicity study of ten different betanodavirus strains in experimentally infected European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 37: 371–383.
- Viale I., Cubadda C., Angelucci G. & Salati F. (2006). Immunization of European Sea Bass. *Dicentrarchus labrax* L. 1758. Fingerlings with a Commercial Vaccine Against Vibriosis. *Journal of Applied Aquaculture*. 18(3). 53-67.
- Watanabe K., Yoshimizu M. (1998) Disinfection of Equipments for Aquaculture and Fertilized Eggs by Ozonated Seawater. *Fish Pathology*, 33: 135-146.
- Watanabe K., Nishizawa T., Yoshimizu M. (2000) Selection of broodstock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 41: 219–223.
- Watanabe K., Ide K., Iwasaki T., Satoh J., Mori K.I., Mekata T. (2013) Disinfection of fertilized grouper eggs with electrolyzed seawater for prevention of Viral Nervous Necrosis. *Fish Pathology*, 48: 5-8.
- Wistom G., Richardson J., Jaworski C., Graham C., Shron-Friling R., Segovia L. (1994) Crystallins: the over-expression of functional enzymes and stress proteins in the eye lens. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 12: 1-38.
- Woo P.T. K., Bruno D.W., 1996. *Fish Diseases and Disorders*. Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, (Woo P.T. K. and Bruno D.W., Eds.) Cab International Publishing, Wallingford, United Kingdom.
- Woo P.T.K. & Bruno D.W. (1999). *Fish Diseases and Disorders*. Vol. 3. Viral. Bacterial and Fungal infections. CAB International. Wallingford. Oxon. p.523.
- Yasunaga, N., Hatai, K., Tsukahara, J., 1983. *Pasteurella piscicida* from an epizootic of cultured red sea bream. *Fish Pathology* 18(2), 107-110.
- Yoshikoshi K., Inoue K. (1990) Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck and Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 13: 69-77.
- Zar H. J. (1999). *Biostatistical Analysis*. Department of Biological Sciences, Northern Illinois University. p.270-271, 286-288.
- Zar H. J., 2010. *Biostatistical Analysis*. 5th Edition. Pearson Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- Zhao J. & Aoki T. 1989. A specific DNA hybridisation probe for the detection of *Pasteurella piscicida*. *Diseases of Aquatic Animals* 7, 203-210.
- Zorriehzahra M.J., NaZari A., Ghasemi M., Ghiasi M., Haghghi Karsidani S., Giuseppe B., Mohd Daud H.H. (2014) Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of wild Golden grey mullet (*Liza aurata*) and Sharpnose grey mullet (*Liza saliens*) in Iranian waters of the Caspian Sea. *Virus Diseases*, 25 (4): 430–436.

4.2 Ελληνική βιβλιογραφία

- Ανδριοπούλου Αργυρώ & Βλησμά Αθηνά, 1996. Πτυχιακή εργασία: «Καταγραφή προβλημάτων ιχθυοπαθολογίας κατά το στάδιο της πάχυνσης σε ιχθυοκλωβούς των ευρύαλων ειδών τσιπούρας και λαβρακιού στην ευρύτερη περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας». Τ.Ε.Ι. Μεσολογγίου Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας Τμήμα

Ιχθυοκομίας-Αλιείας.

Αρχείο εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς Α.Ε.

Βρυώνης Παναγιώτης, (2013). Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «Μελέτη των πεδίων ανάμειξης γλυκού και αλμυρού νερού με βάση εποχιακές μεταβολές φυσικοχημικών παραμέτρων». Τμήμα Γεωλογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών.

Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2014. Έρευνα Υδατοκαλλιεργειών 2012, 2013.

Ελληνική Στατιστική Αρχή, 2016. Έρευνα Υδατοκαλλιεργειών 2015.

Καρακάσσης Ι., Πήττα Π., Δρακόπουλος Π., Τσαπάκης Ε. & Χατζηγιάννη Ε., (1998). «Αλληλεπίδραση υδατοκαλλιεργειών και θαλασσίου περιβάλλοντος-σύνθεση και τυποποίηση ιχθυοτροφών υψηλής θρεπτικής αξίας και χαμηλής περιβαλλοντικής επιβάρυνσης». Τεχνική Έκθεση ΕΠΕΤ II, Υποπρόγραμμα Ι. Σελίδες 1-4, 17-20.

Κατσέλης Γ., Ράμφος Α., Αβραμίδης Π., Πούλος Κ. (2013). Τεχνική Έκθεση με τίτλο: «Ανάλυση φυσικοχημικών, ιζήματος και βιολογικών παραμέτρων υπό ίδρυση Π.Ο.Α.Υ Κεφαλονιάς (Κόλπου Αργοστολίου)» Φάση Ι., σελ. 36-48.

Κλαδάς Ι., 1998. Σημειώσεις στο μάθημα Υδροβιολογίας. Τμήμα Ιχθυοκομίας-Αλιείας, Παράρτημα Ηγουμενίτσας, ΤΕΙ Ηπείρου.

Κλαουδάτος Σ., Αποστολόπουλος Ι., 1984. Μελέτη βιολογίας και αλιείας των σημαντικότερων ψαριών της λιμνοθάλασσας Μεσολογίου. 1^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Ωκεανογραφίας & Αλιείας.

Κοινή Υπουργική Απόφαση (Κ.Υ.Α.) Υπ.ΠΕ.ΧΩ.Δ.Ε. και Υπ.Α.Α.Τ. με αριθ. πρωτ. οικ. 121570/1866//12.06.2009.

Κονίδης Α., Κλαουδάτος Σ., Παρπούρα Α., Διαπούλης Α., Μπογδάνος Κ., Χατζευσταθίου Μ., & Κουγιούφας Π., (1999). Η αλληλεπίδραση Υδατοκαλλιεργειών και Περιβάλλοντος σύμφωνα με τις επικρατούσες συνθήκες στον Ελλαδικό χώρο. Τελική Έκθεση Έργου αριθ. 1577/96 ΠΕΝΕΔ 94. Εθνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών.

Κονίδης Α., Κουγιούφας Π., Γλυκοκόκκαλος Σ., Ασημακοπούλου Γ., Κωνσταντινοπούλου Α. & Παυλίδου Α. (2006). Διερεύνηση ευτροφικών συνθηκών Κόλπου Αργοστολίου Κεφαλληνίας σε σχέση με τις ιχθυοκαλλιεργητικές δραστηριότητες. Πραγματογνωμοσύνη α.π. 148118/1-2-2006 ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., σελ.5, 8-26, 28, 34 ,40, 44-45.

Λάμπου Ειρήνη, 2017. «Επιδημιολογική μελέτη του ιού Noda σε αλιεύματα, δίθυρα και ιχθείς και μελέτη της παθογένειάς του στο λαβράκι σε σχέση με τον εντοπισμό της πύλης εισόδου του ιού στον οργανισμό και τον τρόπο εξάπλωσης του στους ιστούς του ψαριού». Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, σελ. 40-49, 60-73.

Λασπά Ε., 2013. Πτυχιακή εργασία: «Σύγκριση αποτελεσματικότητας δύο εμπορικών εμβολίων κατά της φωτοβακτηριδίασης». Τμήμα Επιστημών της Θάλασσας Πανεπιστημίου Αιγαίου. Σελ.: 33-34 & 37-38.

Λοϊζίδου Μαρία 2006. Α. Διενέργεια δειγματοληψιών, μετρήσεων και αναλύσεων σε ύδατα και υγρά απόβλητα. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Μονάδα Περιβαλλοντικής Επιστήμης και Τεχνολογίας. Σελ. 30.

Μπελιάς Χ. (2004). «Διερεύνηση των σχέσεων ιχθυοκαλλιεργητικών μονάδων με το θαλάσσιο περιβάλλον: ισοζύγιο αζώτου, φωσφόρου και πυριτίου σε ιχθυοκαλλιέργεια της Δυτικής Ελλάδας». Διδακτορική διατριβή., Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, σελ.7-16, 131-136.

Νηρεύς Ιχθυοκαλλιέργειες, 2017. Ενημερωτική Έκθεση.

- Παπαπετροπούλου Μ. & Μαυρίδου Α., 1995. Βιβλίο «Μικροβιολογία του Υδάτινου Περιβάλλοντος-Βασικές Αρχές». Εκδόσεις «Κωσταράκη», Π. Τραυλός-Ε. Κωσταράκη Ο.Ε. Σελίδες 20-31.
- Πράπας Α., Σαββίδης Γ., Αθανασοπούλου Φ & Χριστοφιλογιάννης Π., 2000. Πρακτικός Οδηγός Ιχθυοπαθολογίας εκτρεφόμενων στην Ελλάδα ψαριών και οστρακόδερμων. Δ/ση Αλιευτικών Εφαρμογών και Εισροών Αλιευτικής Παραγωγής, Γενική Δ/ση Αλιείας, Υπουργείο Γεωργίας.
- Σ.Ε.Θ. (Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών) 2016. Ελληνική Υδατοκαλλιέργεια 2016.
- Φειδάντσης Κ. (2012). Εποχιακές βιολογικές και φυσιολογικές αποκρίσεις της τσιπούρας (*Sparus Aurata*). Συσχέτιση με τη θερμοκρασία της θάλασσας και την κλιματική αλλαγή. Διδακτορική διατριβή., Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, σελ. 12-18., σελ. 21.
- Φυτιάνος Κ. (1996). Η ρύπανση των θαλασσών, Β' Έκδοση, σελ. 71-74, 84.
- Χώτος Γ. & Ρογδάκης Ι., 1992. Υδατοκαλλιέργειες ευρύαλων ψαριών. Λαβράκι & τσιπούρα-Τεχνικές της αναπαραγωγής και πάχυνσης. Σελίδες 39-41.

4.3 Διαδικτυακές βιβλιογραφικές πηγές

www.fishbase.org/ διαπίστωση 2017

www.google earth.com/ διαπίστωση 2017

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Δημοσιεύσεις σε Διεθνή Επιστημονικά Περιοδικά

Mediterranean Marine Science

Indexed in WoS (Web of Science, ISI Thomson) and SCOPUS

The journal is available on line at <http://www.medit-mmr-sc.net>DOI: <http://dx.doi.org/10.12681/mms.1051>

Research Article

Prevention of fish photobacteriosis. Comparison of the efficacy of intraperitoneally administered commercial and experimental vaccines

V. BAKOPOULOS, I. NIKOLAOU, N. KALOVYRNA, E. AMIRALI, G. KOKKORIS and E. SPINOS

Department of Marine Sciences, School of The Environment, University of The Aegean, Lesvos, Greece

Corresponding author: v.bakopoulos@marine.aegean.gr

Handling Editor: Argyro Zenetos

Received: 11 September 2014; Accepted: 15 March 2015; Published on line: 21 May 2015.

Abstract

Two commercial multivalent vaccines against vibriosis, caused by *Vibrio anguillarum* serotype(s) and photobacteriosis, caused by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, one with oil adjuvant (AJ) and the other, being an aqueous solution (AV), and an experimental monovalent (*Ph. damsela* subsp. *piscicida*) vaccine inactivated with formalin or heat, namely EVF and EVH, were tested in laboratory trials on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with respect to their efficacy against experimentally induced photobacteriosis.

The first trial aiming at high bacterial pressure was carried out 34 days post-vaccination and resulted in 90% mortalities in the control. The relative per cent survival (RPS) of vaccinated fish was calculated at 24, 3.7, 0 and 0 for the AJ, AV, EVF and EVH formulations, respectively. The second trial aiming at medium bacterial pressure was carried out 49 days post-vaccination and resulted in 45% mortalities in the control. The relative per cent survival (RPS) of vaccinated fish was calculated at 100, 92.7, 77.8 and 66.7 for the AJ, EVF, EVH and AV formulations, respectively. Apparently, under both these high and medium bacterial pressure conditions, the commercial vaccine AJ performed better than the commercial vaccine AV, while under medium pressure there was no statistical difference between the performance of EVF and AJ. The measurement of specific antibody titers in sera collected from all fish groups 49 days post-vaccination, showed high levels in the fish vaccinated with the AJ vaccine, almost three times lower levels for the AV and EVF vaccines and even lower levels for the EVH vaccine. Results are discussed with respect to the choices available to mariculture companies in selecting a commercial vaccine against photobacteriosis and possible alternatives, which, if commercially developed, may reduce the cost of vaccination.

Keywords: Multivalent vaccines, efficacy, photobacteriosis, European sea bass.

Introduction

Mariculture of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) and sea bream (*Sparus aurata*, L.) faces disease problems of viral, bacterial and parasitic etiology (Athanassopoulou & Bitchava, 2010). The most important bacterial diseases, vibriosis and photobacteriosis, are caused by different serotypes of the Gram negative bacteria *Vibrio anguillarum* (Sorensen & Larsen, 1986; Toranzo & Barja, 1990) and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Bakopoulos *et al.*, 1995), respectively. Cultivated fish, and especially sea bass that reportedly appear to be much more sensitive than sea bream (Athanassopoulou & Bitchava, 2010) to both pathogens, are protected to a certain extent by vaccination and general hygiene measures. Vaccinating millions of individuals per mariculture venture is a copious activity that disrupts the routine on-growing procedure and entails high labour costs, long periods of administration and fish stock losses due to the development of stress and injuries, especially with individually administered vaccines. Due to the latter reasons, there is a tendency to minimize vaccination

applications during the life span of cultivated sea bass, which can be from 15 to 18 months, to the expense of better protection through anamnestic administrations. Commercially available vaccines against either vibriosis or photobacteriosis (consisting of inactivated whole bacterial cells) have been available for quite some time with good protection against vibriosis (Woo & Bruno, 1999) and variable results regarding photobacteriosis, especially in the field (Nakai *et al.*, 1992; Le Breton, 1999, 2009; Romalde, 2014). Another issue that stems from the problems associated with intraperitoneal (i.p.) vaccination, in particular, is that although at the beginning companies were vaccinating fish with monovalent or bivalent (two serotypes of *V. anguillarum*) vaccines against vibriosis or photobacteriosis, more recently, multivalent vaccines have been manufactured containing serotypes I & II of *V. anguillarum* and *Ph. damsela* subsp. *piscicida* inactivated bacterial cells. The production of such products was also dictated by the need for a single vaccine application. However, there are no published scientific data on the protection efficacy of these multivalent products. This, and especially the case for protection efficacy against

photobacteriosis, prompted our group to investigate the efficacy of these vaccines.

Thus, the objective of this study was to compare the two commercial and an experimental vaccine (inactivated with formalin or heat) in terms of protection of i.p. vaccinated sea bass against experimental infection with *Ph. damselae* subsp. *piscicida* (hereafter, Phdp).

Materials and Methods

Bacteria

A Phdp strain isolated in Greece in North Evoia during a natural photobacteriosis outbreak affecting sea bass in the summer of 2012 was used throughout this study. The isolate was a kind donation of Dr L. Papanna, Nireus S.A. The isolate was kept at -85°C on cryobeads (Protect, Heywood, Lancs., UK). For the initiation of culture, a microbead was added directly to a small volume of growth medium.

Both on arrival and every time we were initiating a culture from the freezer, bacterial colonies were tested with the API 20E system of Biomérieux, following the instructions of the manufacturer but using 2% NaCl as diluent for the bacterial colonies.

Concentrations of bacteria in solution were determined by measuring the OD₆₀₅. The optical reading was compared against a standard curve that we had previously constructed (OD₆₀₅ versus bacterial cells/ml) using plate counts of bacterial colonies of various dilutions of bacterial suspensions with known OD₆₀₅.

Media and culture conditions

For maintenance purposes or the initiation of culture, the isolate was cultured in brain heart infusion broth (BHIB) (Oxoid, Hampshire, UK) supplemented with NaCl at a final concentration of 2%.

For the preparation of the experimental vaccine, the Phdp isolate was grown in the liquid media described by Bakopoulos *et al.* (2003) for 48h at 21 ± 0.5°C. All chemicals were supplied by Sigma Chemical Company, St Louis, MD, USA, unless otherwise stated.

Commercial and experimental vaccine

Two commercially available vaccines against photobacteriosis were utilized in this study. According to the label attached to each of the commercial vaccines, they had the following characteristics:

AJ, is a vaccine formulation for i.p. injection; it contains inactivated cultures of the bacteria *V. anguillarum* (serotype I), Phdp and a non-mineral oil adjuvant. This vaccine is in the form of water-in-oil emulsion.

AV, is a vaccine formulation that can be used in both immersion and i.p. injection; it contains formalin-inactivated cultures of the bacteria *V. anguillarum* 785KID and MSC275 (serotype I & II) and Phdp, and is an aqueous solution without adjuvant.

The experimental vaccine was prepared as described by Bakopoulos *et al.* (2003) but modified so that the culture liquid was not separated from bacterial cells. The bacterial cells concentration in the vaccine mixture was 10⁹ bacterial cells/ml. A sample was then taken for the measurement of protein and carbohydrate content in the supernatants. Part of the bacterial mixture was then formalin-inactivated as described by Bakopoulos *et al.* (2003) and this experimental vaccine mixture is referred to as EVF, hereafter. The other part of the bacterial mixture was heat inactivated at 57°C for 30min. This experimental vaccine mixture is referred to as EVH, hereafter.

Measurement of protein and carbohydrate concentration

Samples collected from the mixture of the experimental vaccine were analyzed for protein and carbohydrate content as described previously (Bakopoulos *et al.*, 2003).

Fish, tank and aquarium system

Seven hundred and fifty (750) non-vaccinated, healthy sea bass juveniles weighing approximately 1g, were kindly donated by Selonda S.A., Loutra facility, Lesvos. Fish were transferred under sedation (0.01% phenoxyethanol) to the wet laboratory facilities of the Department of Marine Sciences, University of The Aegean, Lesvos, Greece and were placed in five separate tanks. Fish were fed twice daily at 4% /kg body weight/day, with commercial feed of the appropriate size until reaching an average weight of 10g (at about 8 weeks), in order to be vaccinated. One day before and one day after any handling, the fish were fasted, while handling was always performed after anaesthesia (0.1% phenoxyethanol).

The health status of fish during this period was assessed daily by observation (normal activity, feeding activity, reaction to stimuli, recording of any external disease signs or mortality) and found to be normal. A microbiological sampling was performed prior to the initiation of vaccination and prior to experimental infection to confirm that the fish were indeed not infected by an infectious agent. These tests were all negative for the presence of bacteria.

Growing and vaccinated fish were kept in a closed marine water recirculating system comprising 8 circular tanks with a conical bottom and a holding capacity of 2m³ each, i.e. a total of 16m³, a sand filter, a 110W UV water sterilization unit, a biological filter, a marine water pump with 9m³/h water flow capacity and air pumps distributing air to all the tanks through air stones. The tank system water was partially (1/3) renewed every 4 months.

Infected fish were kept in a static plastic aquaria system, comprising 15 aquaria of 50L capacity and air pumps distributing air to all the aquaria through air stones. Water in the aquaria system was partially (1/2) renewed daily.

Both systems were cleaned by fish excrements and uneaten food, and water parameters were monitored,

daily. Temperature ranged between 15.2°C in early spring and 24.05°C in mid-summer. Oxygen concentration ranged between 8.5mg/L in early spring and 5.7mg/L in mid-summer. Total ammonia concentration never exceeded 0.025mg/L throughout the experimental period.

Vaccination

Five groups of 10g sea bass comprising 150 fish/group were vaccinated i.p. with 50µL of each vaccine, with one group serving as control receiving the same volume of sterile 2% NaCl. The concentration of antigens in both the experimental vaccines per volume injected was 0.5×10^8 bacterial cells of Phdp, 1.9µg supernatants protein, 11.2µg supernatants carbohydrate without adjuvant, while both commercial vaccines contained the same number of bacterial cells. Further information cannot be provided because it is of proprietary nature.

After vaccination, the fish were placed in their respective tanks. Toxicity of the various vaccines was monitored throughout the experimental period and recorded. Randomly sampled, moribund and recently dead fish resulting from the efficacy studies were dissected and macroscopically observed for the presence of pathological signs caused by vaccination in the abdominal cavity. Tissue samples were also processed for microscopic observation using routine procedures and stained with hematoxylin-eosin.

Assessment of efficacy

The efficacy of the four vaccine formulations was assessed with two separate experimental infection trials, one resulting in heavy bacterial pressure and the other in milder bacterial pressure. Assessment of efficacy was initiated after 28 days post-vaccination to allow for full development of immune response, according to the suggestion of one of the manufacturers of the commercial vaccines (AV).

The bacterial doses required to achieve high and mild bacterial pressure were determined prior to the initiation of the efficacy assessment by performing i.p. experimental infections of controls using various concentrations of bacterial cells.

Thirty four days post-vaccination, 60 fish from each group were infected with an i.p. injection of 50µL of the Phdp isolate used in this study, grown in BHIB 2% NaCl for 48h at 21 ± 0.5 °C. The dose of bacteria received by each individual fish was 1.75×10^8 cells. After infection, the 60 fish of each group were randomly divided into three groups of 20 fish and placed in separate aquaria. Mortalities were monitored and recorded daily and the experiment was stopped when no mortalities were recorded for two consecutive days.

The 2nd infection trial was performed 49 days post-vaccination but in this case individual fish received 3.25×10^8 bacterial cells. The rest of the experiment was performed as described above.

Protection conferred by the different commercial

and experimental vaccine formulations was assessed as described by Amend (1981) by calculation of the relative per cent survival (RPS) using the following formula:

$$RPS = \left[1 - \frac{\% \text{ mortality of immunized fish}}{\% \text{ mortality of non immunized fish}} \right] * 100$$

Moribund and recently deceased fish were sampled with routine procedures for microbiological investigation in order to determine the cause of disease/death. Microbiological samples taken from the spleen and kidney were used to inoculate the surface of tryptone soy agar supplied with 2% NaCl, in petri dishes. Developed bacterial colonies were identified using the API 20E system (Biomérieux) using 2% NaCl as diluent.

Measurement of specific immunoglobulins (IgMs) in sea bass serum samples

Blood samples collected on day 49 (2nd trial) from all experimental groups were processed for the isolation of serum. Sera from each group were pooled and these samples were utilized in ELISA analysis (Bakopoulos *et al.*, 1997) for the determination of specific IgM levels against Phdp. Results were read on a MR-96A microplate reader (MINDRAY).

Statistical analysis

Results were processed using the Kaplan-Meier survival curves (Kaplan & Meier, 1958).

In order to compare the survival distribution for all the different vaccine treatments and the two experiments as well as pairwise, the Log-rank test (Mantel, 1966) was employed, setting statistically different results at $p < 0.05$. All statistical analyses were conducted with the use of the R software for Statistical Computing (R Core Team, 2013) and the Survival Package (Therneau, 2013).

Results

Toxicity-pathology evaluation

No mortalities in any group or vaccine formulation were recorded post-vaccination throughout the experimental period.

The macroscopic observation of internal organs in the abdominal cavity of vaccinated fish revealed none or mild reactions (localized erythema, mild inflammation at the point of injection) of fish vaccinated with the aqueous vaccine solutions (AV, EVF, EVH and 2% NaCl) and more severe reactions in fish vaccinated with the AJ vaccine (macroscopic data not shown).

Localized aseptic lesions caused by an inflammatory response (concluded after microbiological examination) to the latter vaccine were observed in all the specimens examined. These lesions were round, raised, off-white to brownish in colour, their diameter ranged between 0.3 and 1.2cm, they were located on the surface of the fatty tissue surrounding the gut and a vessel reticulum was clearly

evident around them. Microscopically, these lesions were characterized as aseptic granulomatous lesions (Fig. 1).

As evidenced in Figure 1A, consisting of granulomatous tissue at various developmental stages, the lesions have a core area of caseous necrosis tissue, mainly composed by oil (vacuoles), necrotic cells and debris (areas with dark colour). Externally, a layer of fibroblast-like cells was present (arrowhead in Fig. 1A and letter F in insert B), with large amounts of associated collagen fibres (arrow in Fig. 1A and letter C in insert B). These findings are consistent with granulomatous peritonitis.

Efficacy of vaccines

Moribund and recently dead fish, due to the experimental infections that were microbiologically sampled, were all found positive for Phdp.

High Infection Pressure Experiment

The high infection pressure experiment resulted in 90% cumulative mortality in the controls. The experiment lasted nine days and the final cumulative mortalities and RPS achieved for all the groups of fish is shown in Table 1.

The experimental EVH and EVF vaccines conferred no protection to the respective vaccinated fish groups. In contrast, an RPS value of 24% and 3.7% was calculated for the AJ and the AV commercial vaccines, respectively. Apparently, the protection efficacy of the AJ vaccine was superior by far compared to the AV commercial vaccine, under these experimental conditions.

The Kaplan-Meier survival curves for the LD₅₀ experiment are presented in Figure 2.

Evidently, survival rates dropped steeply for all vaccine groups except the AJ group.

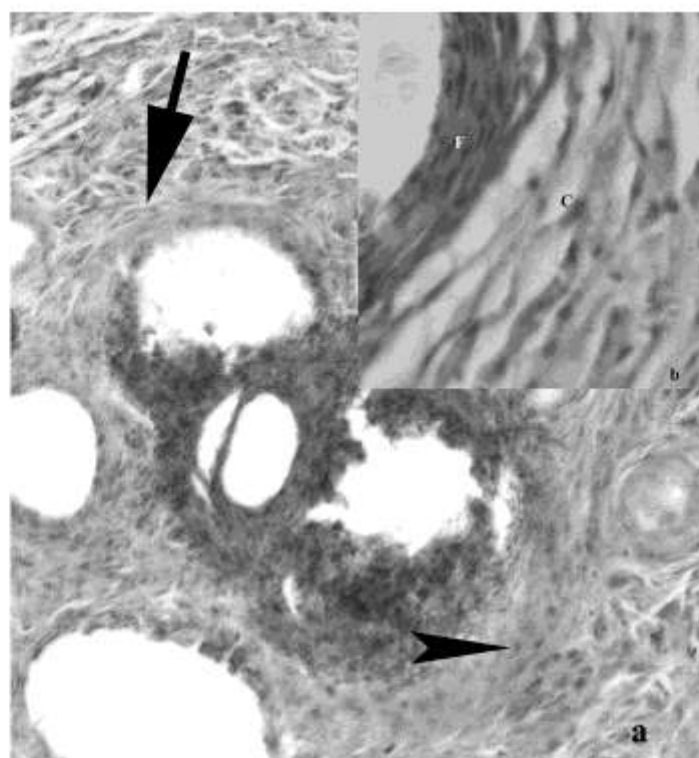


Fig. 1: A: Granulomatous tissue at various stages of development (10x magnification). Insert B: Detail of a formed granuloma (40x magnification). Haematoxylin-eosin.

Table 1. Cumulative mortalities and RPS values for all groups in both trials. LD₅₀ bacterial dose, 9 days post-challenge, 34 days post-vaccination & LD₂₅ bacterial dose, 15 days post-challenge, 49 days post-vaccination

Fish Groups	No of fish		Specific loss		% fish mortality		RPS value	
	LD ₅₀ Exp.	LD ₂₅ Exp.	LD ₅₀ Exp.	LD ₂₅ Exp.	LD ₅₀ Exp.	LD ₂₅ Exp.	LD ₅₀ Exp.	LD ₂₅ Exp.
Control	3x20	3x20	54	27	90	45	-	-
AJ	3x20	3x20	41	0	68.4	0	24	100
AV	3x20	3x20	52	9	86.7	15	3.7	66.7
EVF	3x20	3x20	58	2	96.7	3.3	0	92.7
EVH	3x20	3x20	60	6	100	10	0	77.8

In order to compare the survival distribution for the all different vaccine treatments as well as pairwise, the Log-rank test (Mantel, 1966) was employed. Comparisons of the differences between the five different treatments (controls and vaccines) in the experiments were found statistically significant ($p < 0.05$). Most pairwise comparisons of differences were statistically significant ($p < 0.05$). The non-significant differences observed in the LD₉₀ experiment were between the EVF vaccine and the control ($p = 0.756$).

Medium Infection Pressure Experiment

The medium infection pressure experiment resulted in 45% cumulative mortality in the controls. The experiment lasted fifteen days and the final cumulative mortalities and RPS achieved for all the groups of fish is shown in Table 1.

Fish vaccinated with the commercial AJ vaccine were 100% protected, as evidenced by the respective RPS value that was calculated. The performance of the experimental EVF vaccine conferring 92.7% RPS, followed by the EVH vaccine with 77.8% RPS, was also notable, while lower performance was observed by the AV commercial vaccine achieving a 66.7% RPS value.

The Kaplan-Meier survival curves for the LD₄₅ experiment are presented in Figure 3.

Evidently, survival rates dropped comparatively steeply for the control fish groups over a long period, which was longer for the AV groups but with a milder drop in survival rates, while, these rates for the EVH and EVF groups, after a steep and short drop, were stabilized.

The application of the Log-rank test for these results showed that the comparison of the differences between the five different treatments (controls and vaccines) in the experiments were found statistically significant ($p < 0.05$). Most pairwise comparisons of differences were statistically significant ($p < 0.05$). The non-significant differences observed for the LD₄₅ experiment were between the AV and EVH vaccine ($p = 0.48$), AJ and EVF vaccine ($p = 0.156$) and EVH and EVF vaccines ($p = 0.138$).

The RPS results obtained from both high and medium bacterial pressure experimental infection trials for the vaccines used are visualized in Figure 4 along with fitted linear regression lines. RPSs were related to the different bacterial doses achieving the LD₄₅ and LD₉₀ effect. These values were log₁₀ transformed.

Comparing these data it is expected that both the AJ and the EVF vaccines would perform better with respect to the RPS achieved up to a certain bacterial pressure and as this pressure is closer to causing 90% mortality in the controls, EVF is replaced by the AV vaccine in terms of the RPS achieved.

Levels of specific anti-Phdp IgM in sea bass sera

The levels of specific antibody titers against Phdp from all the vaccinated groups and controls on the start day of the

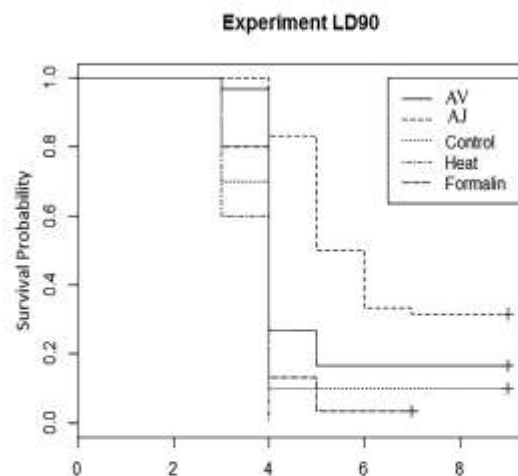


Fig. 2: Kaplan-Meier survival curves for the LD₉₀ experiment. Plus signs indicate right censored data.

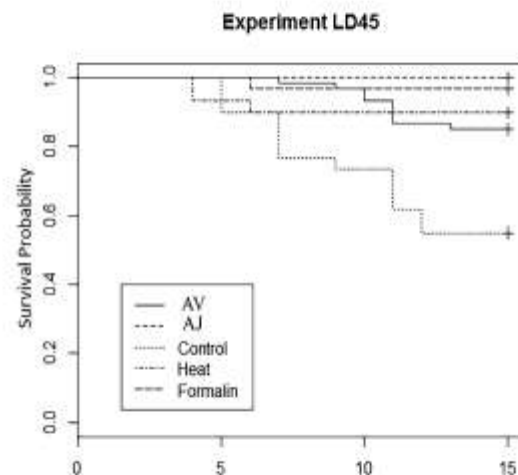


Fig. 3: Kaplan-Meier survival curves for the LD₄₅ experiment. Plus signs indicate right censored data.

2nd trial (day 49 post-vaccination) measured as absorbance at 450nm with ELISA analysis, are presented in Figure 5. Obviously, specific antibody levels against Phdp for the fish vaccinated with the AJ vaccine were very high, followed by the commercial AV vaccine and the experimental EVF vaccine that showed similar levels. The lowest antibody levels were measured for the EVH formulation.

Discussion

Although there are previous studies on the protection efficacy achieved post-vaccination with monovalent (and bivalent with serotypes I and II) vaccines either against *V. anguillarum* (Viale *et al.*, 2006; Galeotti *et al.*, 2013) or against Phdp (Magarinos *et al.*, 1994; Magarinos *et al.*, 1994a), information on the protection efficacy when fish are vaccinated with bivalent vaccines against both pathogens

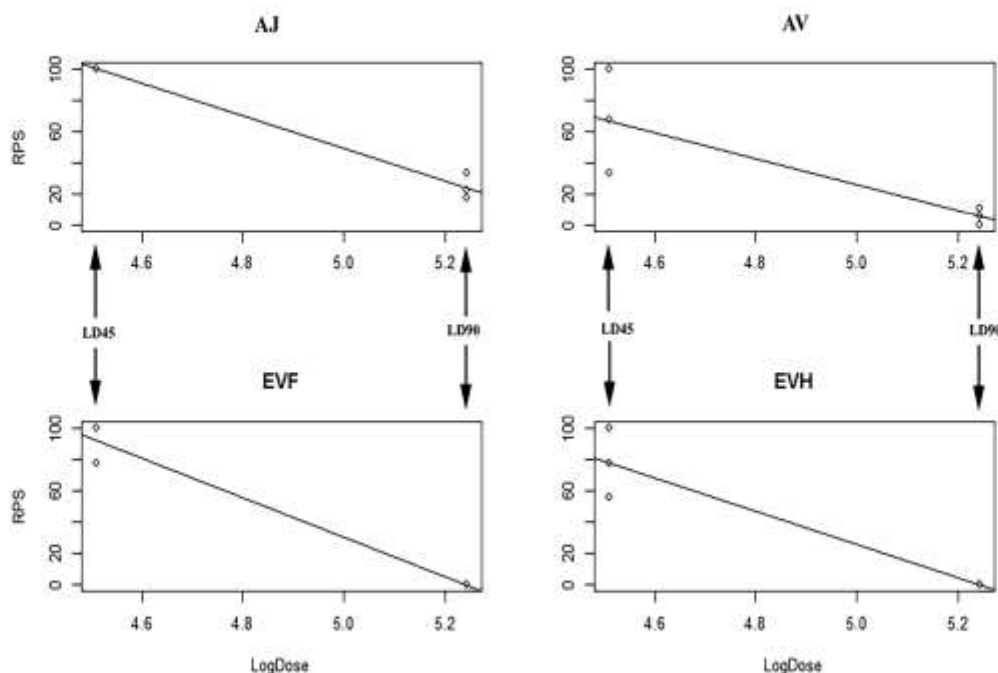


Fig. 4: Relative percentage of survival (RPS) for different lethal doses (values transformed Log_{10}) and different vaccines. Linear regression equations as follows: AJ: $y = -103.7x + 567.6$, $R^2 = 0.98$, $p < 0.0001$, AV: $y = -83.2x + 442$, $R^2 = 0.71$, $p = 0.0358$, EVF: $y = -126.4x + 662.8$, $R^2 = 0.98$, $p = 0.0002$, EVH: $y = -106.4x + 557.9$, $R^2 = 0.9$, $p = 0.0035$.

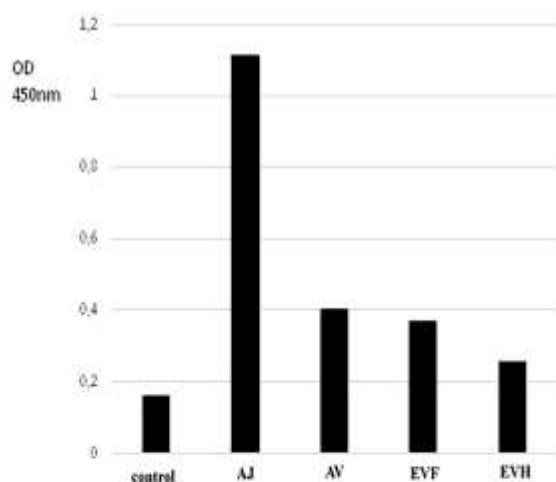


Fig. 5: Specific sea bass serum antibody titers against Phdp 49 days post-vaccination with the various vaccines.

is scarce [only the inconclusive article of Gravningen *et al.* (1998), regarding photobacteriosis]. Protection conferred post-vaccination against *V. anguillarum* is reportedly effective (Athanassopoulou & Bitchava, 2010; Galeotti *et al.*, 2013). In contrast, protection conferred post-vaccination against Phdp is variable (Nakai *et al.*, 1992; Le Breton, 1999, 2009; Romalde, 2014). For the former and latter reasons, in this study it was decided to compare

two commercially available vaccines and an experimental vaccine against fish photobacteriosis in terms of protection of intraperitoneally (i.p.) vaccinated sea bass against experimental infections with Phdp, designed to exert extreme and average bacterial pressures.

Neither the commercial or the experimental vaccines caused mortality or other noticeable effects on the wellbeing of vaccinated fish. Internally, however, the fish groups that were vaccinated with the AJ vaccine (water-in-oil emulsion) showed abdominal adhesions and developed granulomatous peritonitis. These findings are consistent with the findings of Afonso *et al.* (2005) and Poppe & Koppang (2014). The extent to which these aseptic inflammatory responses can influence the functioning of the digestive system remains to be investigated. The other groups showed none to very mild adhesions.

In order to evaluate how the various groups of vaccinated fish respond to high and medium bacterial pressure, two separate challenges were performed. To our knowledge this is the first time that performance of the same vaccinated groups is evaluated under different challenge pressures, performed a short period apart.

Results showed that, in both challenges, the groups that were vaccinated with the adjuvanted commercial AJ vaccine responded better compared to all the other commercial or experimental vaccines, achieving RPS values of 24% and 100%, for the LD_{99} and LD_{45} challenges, respectively. In contrast, fish groups vaccinated with the aqueous commercial vaccine AV, achieved an RPS value of only 3.7% in the

LD₅₀ challenge, and both the experimental vaccines failed to confer any protection at all. The latter result was very interesting because it contradicts the very good protection that was described in the Bakopoulos *et al.* (2003) study for the experimental vaccines that were assessed here. The differences between the two experiments were that in this study a higher cumulative mortality was achieved, the entire bacterial culture was used as the vaccine without prior isolation of bacterial cells and ECPs, and the challenge was performed with Phdp grown in BHIB 2% NaCl. Despite the fact that the culture medium plays a very important role in the antigens that a pathogen synthesizes and virulence (Bakopoulos *et al.*, 2003a; Bakopoulos *et al.*, 2004), the differences in challenge severity and the modification of the preparation method applied for the experimental vaccine, may account for the contradictory results obtained in this study. Unfortunately, protection of vaccinated sea bass against photobacteriosis under such extreme conditions cannot be compared with previous studies.

Very different results were obtained when the milder LD₄₅ challenge was performed. In this case, the RPS values obtained were in descending order, 92.7%, 77.8% and 66.7% for the fish groups vaccinated with the EVF, EVH and commercial AV vaccine, respectively, while the RPS value achieved by the AJ reached 100%. In this case, there was no statistical difference between the commercial AJ and the experimental EVF vaccines and between the experimental EVH and the commercial Aqua Vac vaccines. Furthermore, as it is evident from this challenge, heat inactivation of the experimental vaccine (EVH) had a deleterious effect on the protection conferred against photobacteriosis compared to formalin inactivation (EVF), despite the fact that no statistical difference was calculated. This is probably due to higher antigen destruction by heating as demonstrated in earlier studies (Levings, 1984; Samoylova *et al.*, 2012). The results obtained in this study cannot be directly compared to the previous study of Bakopoulos *et al.* (2003) because of the different conditions between the two experiments; however, results for the experimental EVF vaccine are comparable. Vaccines containing ECPs seem to perform better compared to vaccines composed of bacterial cells only (Magarinos *et al.*, 1994), as is the case for the commercial vaccines tested here.

The analysis of sea bass sera collected on the start day of the 2nd efficacy assessment trial, as regards the levels of specific anti-Phdp antibodies, correspond very well with the performance of the commercial AJ vaccine only, for which high antibody levels were measured. Interestingly, there was no correlation between the levels of specific anti-Phdp antibodies in the sea bass sera collected from the other experimental groups and the performance of the respective vaccines. The adjuvant included in the AJ vaccine acts in a beneficial way, increasing the levels of antibodies even at 49 days post-vaccination in contrast to the other formulations that did not contain an adjuvant

where antibody levels were indisputably much lower. Protection against the infection, however, is not a matter of quantity but rather of quality as discussed below.

Apparently, the results obtained from this study suggest that the commercial AJ vaccine acts better in comparison to the commercial AV vaccine as regards protection against the experimental challenge with Phdp, under the described conditions. This better performance was demonstrated under both extreme and medium bacterial pressure. The differences between the two product formulations, based on the information provided by the producers, consist mainly in the inclusion of a non-mineral adjuvant in the AJ vaccine and the fact that the bacterial cells included in the AV vaccine were grown in both normal and iron-limited media. Each of these differences is beneficial for different reasons. Adjuvants cause intense attraction of various types of leukocytes at the location of the vaccine and may have a prolonged effect because of slower antigen release (Afonso *et al.*, 2005). These may have a positive quantitative stimulation effect on the immune response. Bacterial growth under iron limitation conditions leads to the expression of antigens that may be involved in virulence (Magarinos *et al.*, 1994b; Bakopoulos *et al.*, 1997a) and, thus, may exert a positive qualitative effect on immune response and protection.

Regarding the experimental vaccine formulations, no protection was conferred under extreme conditions of infection, but a completely different case was revealed under medium infection pressure. In these conditions, the EVF vaccine conferred protection against Phdp infection in a similar manner to the commercial AJ vaccine, despite the fact that it does not contain adjuvants. It seems that the qualitative characteristics of the antigens included (Bakopoulos *et al.*, 2003a) have an "added-value" in terms of protection, comparable to an adjuvanted formulation. The EVH formulation was inferior to the EVF but apparently performed somewhat better than the AV vaccine. At practical level, this study suggests that the adjuvanted AJ vaccine needs to be used in areas where a high Phdp stress is foreseen, whereas under milder pressure the aqueous AV or an improved formulation, such as the EVF formulation without any adjuvant could be the alternative if commercially developed. This could reduce both the cost of the vaccine formulation and the effects of the adjuvant on the abdominal cavity.

Acknowledgements

This study was funded by the Department of Marine Sciences, School of The Environment, University of The Aegean, Greece. We wish to thank Mr Athanasios Frentzos, Cephalonian Aquaculture S.A., for providing the commercial vaccines.

Conflict of Interest: No conflict of interest exists between this research and any other companies providing the commercial products.

Ethics: The work presented in the article has been carried out in an ethical way and according to Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

References

- Afonso, A., Gomes, S., da Silva, J., Marques, F., Henrique, M., 2005. Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 19, 1-16.
- Amend, D.F., 1981. Potency testing of fish vaccines. In: International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines. *Developments in Biological Standardisation*, 49, 447-454.
- Athanassopoulou, F., Bitchava, K., 2010. Main pathological conditions in Mediterranean marine finfish culture. p. 149-201. In: *Recent Advances in Aquaculture*. Koumoundouros G. (Ed.). Transworld Research Network, Kerala, India.
- Bakopoulos, V., Adams, A., Richards, R.H., 1995. Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece and comparison with strains from Japan, France and Italy. *Journal of Fish Diseases*, 18, 1-7.
- Bakopoulos, V., Adams, A., Richards, R.H., 1997a. The effect of iron limitation growth conditions on the cell and extracellular components of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 20 (4), 297-305.
- Bakopoulos, V., Hanif, A., Poulos, K., Galeotti, M., Adams, A. et al., 2004. The effect of *in vivo* growth on the cellular and extracellular components of the marine bacterial pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 27, 1-13.
- Bakopoulos, V., Pearson, M., Volpatti, D., Gousmani, L., Adams, A. et al., 2003a. Investigation of media formulations promoting differential antigen expression by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and recognition by sea bass, *Dicentrarchus labrax*, (L.), immune sera. *Journal of Fish Diseases*, 26 (1), 1-13.
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Adams, A., Galeotti, M., Richards, R.H., 1997. Qualitative differences in the immune response of rabbit, mouse and sea bass, *Dicentrarchus labrax*, L., to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, the causative agent of fish Pasteurellosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 7, 161-174.
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Gusmani, L., Galeotti, M., Adams, A. et al., 2003. Vaccination trials of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, using novel vaccine mixtures. *Journal of Fish Diseases*, 26 (2), 77-90.
- Galeotti, M., Romano, N., Volpatti, D., Bulfona, C., Brunetti, A. et al., 2013. Innovative vaccination protocol against vibriosis in *Dicentrarchus labrax* (L.) juveniles: Improvement of immune parameters and protection to challenge. *Vaccine*, 31, 1224-1230.
- Gravning, K., Thorarinnsson, R., Johansen, L.H., Nissen, B., Rikardsen, K.S. et al., 1998. Bivalent vaccines for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis and pasteurellosis. *Journal of Applied Ichthyology* 14, 159-162.
- Kaplan, E.L., Meier, P., 1958. Non-parametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53, 457-481.
- Le Breton, A.D., 1999. Mediterranean finfish pathologies: present status and new developments in prophylactic methods. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologist*, 19, 250-253.
- Le Breton, A.D., 2009. Vaccines in Mediterranean aquaculture: Practice and needs. p. 147-154. In: *The use of veterinary drugs and vaccines in mediterranean aquaculture*. Rodgers, C., Basurco, B. (Eds) Options Méditerranéennes, Series A, No. 86, CIHEAM, Zaragoza, Spain.
- Levings, R.L., 1984. The effect of some common inactivation procedures on the antigens of bovine herpesvirus 1. *Veterinary Microbiology*, 9, 313-328.
- Magarinos, B., Noya, M., Romalde, J.L., Perez, G., Toranzo, A.E., 1994. Influence of fish size and vaccine formulation on the protection of gilthead seabream against *Pasteurella piscicida*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologist*, 14, 120-2.
- Magarinos, B., Romalde, J.L., Santos, Y., Casal, J.F., Barja, J.L. et al., 1994a. Vaccination trials on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*. *Aquaculture*, 120, 201-208.
- Magarinos, B., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1994b. Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Applied & Environmental Microbiology*, 60 (8), 2990-2998.
- Mantel, N., 1966. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemotherapy Reports*, 50, 163-170.
- Nakai, T., Fujie, N., Muroga, K., Arimoto, M., Mizuta, Y. et al., 1992. *Pasteurella piscicida* infection in hatchery reared juvenile striped jack. *Gyobyo Kenkyu*, 27, 103-108.
- Poppe, T.T., Koppang, E.O., 2014. Side-Effects of Vaccination. p. 153-161. In: *Fish Vaccination*. Gudding, R., Lillehaug A., Evensen, Ø. (Eds), Chapter 13, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp.
- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. Accessed 05/05/2014.
- Romalde, J.L., 2014. Vaccination against Photobacteriosis. p. 200-210. In: *Fish Vaccination*. Gudding, R., Lillehaug A., Evensen, Ø. (Eds), Chapter 17, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Samoylova, T.I., Norms, M.D., Samoylov, A.M., Cochran, A.M., Wolfe, K.G. et al., 2012. Infective and inactivated filamentous phage as carriers for immunogenic peptides. *Journal of Virology Methods*, 183, 63-68.
- Sorensen, U.B., Larsen, J.L., 1986. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Applied & Environmental Microbiology*, 51 (3), 593-597.
- Therneau, T., 2013. *A Package for Survival Analysis in S*, R package version 2.374, <http://CRAN.R-project.org/package=survival>. Accessed 05/05/2014.
- Toranzo, A.E., Barja, J.L., 1990. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Diseases of Aquatic Organisms*, 9, 73-82.
- Viale, I., Cubadda, C., Angelucci, G., Salati, F., 2006. Immunization of European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* L. 1758, fingerlings with a Commercial Vaccine Against Vibriosis. *Journal of Applied Aquaculture*, 18 (3), 53-67.
- Woo, P.T.K., Bruno, D.W., 1999. Fish Diseases and Disorders, Vol. 3, Viral, Bacterial and Fungal infections. CAB International, Wallingford, Oxon.



Prevention of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) photobacteriosis and vibriosis. Long term efficacy study of intraperitoneally administered bivalent commercial vaccines



Efthimios Spinos*, Giorgos D. Kokkoris, Vasileios Bakopoulos

Department of Marine Sciences, School of the Environment, University of the Aegean, Lesvos, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 November 2016
Received in revised form 17 January 2017
Accepted 18 January 2017
Available online 21 January 2017

Keywords:

Multivalent vaccines
Efficacy
Photobacteriosis
Vibriosis
European sea bass

ABSTRACT

The long term efficacy of different bivalent commercial vaccine formulations against Vibriosis and Photobacteriosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) was investigated. Duplicate whole cages in the field were intraperitoneally vaccinated with either an adjuvanted (AJ) or an aqueous (AV) commercial vaccine or with sterile 2% NaCl. All groups of fish were monitored over a period of 12 months in respect to natural disease outbreaks, performance and the condition of the abdominal cavity. At certain time-points post-vaccination, fish collected from the field were experimentally infected with either *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* serotype O1 or *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. In addition, blood samplings were performed for the isolation of sera in order to analyze the quantitative characteristics of the humoral immune response of vaccinated fish. No disease outbreak in the field was noted during the course of the study, for both pathogens under investigation. In the laboratory-based efficacy tests, both commercial products conferred significant protection in comparison to the controls. In 5 consecutive experimental infections with *V. anguillarum* O1 the RPSs calculated for each commercial vaccine were as follows: day 54 post-vaccination (dpv), 38.0 & 23.0; 96 dpv, 90.2 & 81.8; 163 dpv, 30.0 & 10.0; 230 dpv, 67.6 & 48.1; 306 dpv, 13.0 & 47.0, for the AJ and AV formulations, respectively. In 4 consecutive experimental infections with *Ph. damsela* subsp. *piscicida* the RPSs calculated were as follows: 82 dpv, 0.0 & 0.0; 142 dpv, 62.5 & 37.5; 209 dpv, 35.0 & 26.0; 287 dpv -21.0 & 31.0, for the AJ and AV formulations, respectively. The statistical evaluation of all the efficacy data collected over a 12-month period showed that the adjuvanted vaccine offered better protection against vibriosis. In contrast, there was no statistical difference between the commercial products in the protection against photobacteriosis. The vaccines did not affected negatively the survival of vaccinated fish (i.e. cumulative mortalities 10 months post-vaccination in the field were as follows: AJ: 2.41%, AV: 2.93%, Control: 1.78%). Fish vaccinated with the adjuvanted vaccine developed an aseptic granulomatous peritonitis and mild adhesions in the abdominal cavity in contrast to the aqueous vaccine where a mild attraction of leukocytes was the only observation. Vaccinated fish groups reached higher weights in comparison to the controls, while FCR and SGR between groups for the whole period were not statistically significant. The adjuvanted commercial vaccine provoked the production of significantly higher specific antibody titers against each of the pathogens in comparison to the other experimental groups. These higher antibody titers corresponded well to the overall performance of the adjuvanted vaccine. Results are discussed in view to the performance of these products and parameters that may influence it.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The intensification of fish mariculture has led to the emergence of fish diseases of viral, bacterial and parasitic etiology (Athanasopoulou and Bitchava, 2010). The most important bacterial diseases for sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.1758) and sea bream (*Sparus aurata*, L.1758), Vibriosis and Photobacteriosis, are caused by the Gram (–)

bacteria *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* (various serotypes) (Sorensen and Larsen, 1986; Toranzo and Barja, 1990) and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Bakopoulos et al., 1995; Bakopoulos et al., 2015a), respectively. Both pathogens are endemic to the marine environment and affect both wild and farmed fish, making impossible the implementation of eradication programs. Sea bass appears to be much more sensitive than sea bream (Athanasopoulou and Bitchava, 2010) to both pathogens, and both sea bass and sea bream are protected to some extent by general hygiene measures and vaccination.

Routine sea bass and sea bream vaccination programs involve the immersion vaccination of fish at 1–2 g in aqueous vaccine formulations

* Corresponding author at: Department of Marine Sciences, School of the Environment, University of the Aegean, University Hill, Mytilene 81100, Lesvos, Greece.
E-mail address: e.spinos@marine.aegean.gr (E. Spinos).

prior to transportation to floating cages, followed by an intraperitoneal (ip) administration of vaccine at 20–25 g which usually coincides with fish sizing. Modifications of this basic protocol are observed and associated with the management plan implemented and the characteristics of locally-faced disease problems.

Monovalent commercial vaccines against either pathogen have been available to mariculture companies for quite some time. In accordance, several researchers have investigated their efficacy against vibriosis (Fletcher and White, 1973; Dec et al., 1990; Angelidis et al., 2006; Schröder et al., 2006; Galeotti et al., 2013) and against photobacteriosis (Ninomyia et al., 1989; Magarinos et al., 1994a; Magarinos et al., 1994b; Bakopoulos et al., 2003) on both various other susceptible fish species and sea bass/sea bream. In general, these experimental or commercial formulations have provided a good protection against vibriosis (Woo and Bruno, 1999) and variable results against Photobacteriosis (Nakai et al., 1992; Le Breton, 1999, 2009; Romalde, 2014), especially in the field. In order to reduce multiple vaccine applications in the field, and especially ip injections which cause stress, injuries and mortality, vaccine companies have developed bivalent and multivalent formulations. These, apparently, can protect fish against all the pathogens they are targeting. Information on the performance of similar commercial products on sea bass is scarce (Gravningen et al., 1998; Bakopoulos et al., 2015a), inconclusive or partial and the efficacy tests performed for their licensing are not widely available.

Therefore, the objective of this study was to assess the efficacy of different bivalent (*Vibrio-Photobacterium*) commercial vaccine formulations (water-in-oil and aqueous) in the field and after laboratory experimental infections in sea bass over a year post-vaccination; to assess the performance of the water-in-oil commercial vaccine which uses a new adjuvant composition. In addition, to measure the development of the humoral immune response and record the effect of the vaccine formulation on the condition of the abdominal cavity of vaccinated fish.

2. Materials and methods

2.1. Location of the field and experimental trials and system for experimental trials

The field trial was performed in a mariculture sea bass and bream on-growing floating cages unit located in north Cephalonia, Ionian Sea, Western Greece. Selection of this location for the field trials was based on information provided by the company on recently increasing vibriosis and photobacteriosis incidents.

Experimental infectivity trials were conducted in a nearby land-based laboratory facility of the company. The laboratory trials were performed in black rectangular plastic tanks of 200 l capacity each. Every tank had its own air supply provided by two airstones connected to an air pump (ACD-005, Resun, China) with a capacity of 100 l/h. The system was operated in a semi-closed way with 50% renewal of water in each tank every second day. The discharged water was ozonated, remained for two days in uncovered outdoor plastic tanks and then discharged back to the sea. During the trials, fish were fed a minimum of 0.1% of their biomass to minimize the accumulation of feed metabolites.

2.2. Bacteria and culture conditions

Two bacterial species were used throughout this study. A strain of *V. anguillarum* serotype O1 that was isolated from sea bass in 2013 at Western Greece and it was kindly donated by Mr. Athanasios Prappas, Laboratory of Veterinary Medicine, Ministry of Agriculture, Greece, and a strain of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phdp, hereafter) that was isolated from sea bass in 2012 at the Island of Evoia, Greece and it was a kind donation from Dr. Kantham Papanna, Nireus Aquaculture S.A.

Both bacterial species on arrival to the laboratory were cultured in sterile brain heart infusion broth (BHIB) (Oxoid) with 2% NaCl and on tryptone soy agar (Oxoid) 2% NaCl. Bacterial species were confirmed using either previously prepared rabbit anti-*V. anguillarum* O1 serum against the ATCC 43305 *V. anguillarum* O1 strain (Sorensen and Larsen, 1986) or anti-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* monoclonal antibodies (Aquatic Diagnostics Ltd., Prod. No. PO2) (Bakopoulos et al., 1997c) in ELISA. Upon confirmation, the biochemical profiles for both pathogens were recorded using the API 20E system (Biomérieux) following the instructions of the manufacturer, but using sterile 2% NaCl as diluent and confirmed against previously published profiles (Austin and Austin, 2007; Bakopoulos et al., 1995). Freshly cultured bacterial colonies of these isolates were kept at -85°C using cryobeads (Protect, UK) in a Thermo Scientific HFU B freezer. The latter identification system was then routinely used to confirm the purity of the -85°C kept cultures.

For the experimental infections one cryobead was placed in 5 ml of sterile BHIB 2% NaCl and bacteria were allowed to grow at 21°C (Labtech, Daihan Ltd., Korea) under mild shaking. When growth was visible, the whole surface of petri dishes with BHA 2% NaCl were inoculated and the bacteria were allowed to reach maximum growth at the same conditions for 24–48 h. Bacterial cells were harvested off the surface of the culture medium using sterile 2% NaCl. Enumeration of bacterial cells in solution was performed using the OD at 605 nm (U-2900, Hitachi, Japan) and previously constructed standard curves based on the relationship of OD₆₀₅ and bacterial cell numbers using the plate count method of bacterial colonies. The desired numbers of bacterial cells/ml in solution was reached with appropriate dilutions of petri dish washes with sterile 2% NaCl. Immediately after that, bacterial solutions were used for the experimental infections.

2.3. Fish

Sea bass, 203,974 individuals with an average weight of 2.5 g, were purchased from the hatchery Plankton S.A. located at Mytikas, Aitolokalarnania, Greece. These fish were placed to sea cages for a period of 3.5 months, reaching an average weight of 33.04 g. Another batch of 60,000 sea bass was imported to the location in order to be vaccinated during winter at an average weight of 59.81 g at vaccination. All batches of fish were immersion vaccinated with the aqueous vaccine at 1.5 g in the aforementioned hatchery prior to their transportation to the on-growing unit. Fish were fed with a commercial food (Skretting SA, the Perla and Optibass product ranges) according to the feeding plan of the aquaculture company. The condition of these fish was monitored throughout the experimental period for any disease signs and their health status was assessed on a regular basis during the collection of blood and sampling of the abdominal organs (Sections 2.7 and 2.8 below) via microbiological sampling from the kidney and spleen.

2.4. Commercial vaccines

Two commercially available vaccines against vibriosis and photobacteriosis were utilized in this study. Alphaject 2000™ (A), hereafter, is an adjuvanted vaccine formulation for i.p. injection for sea bass (*D. labrax*); a single dose (0.1 ml) contains formalin-inactivated cultures of the bacteria *V. anguillarum* (serotype O1) and Phdp. The adjuvant is mineral oil (novel vaccine formulation as opposed to the previous formulation containing a non-mineral oil). This vaccine is in the form of water-in-oil emulsion. Sea bass are vaccinated at the size of 15 g and higher. Fish must be sedated prior to injection. AquaVac™ *Vibrio-Pasteurella* (AV, hereafter), is an aqueous vaccine solution for i.p. injection of sea bass for the immunization against vibriosis and photobacteriosis caused by the pathogens *V. anguillarum* and Phdp. It contains formalin-inactivated cultures of the bacteria Phdp (strain Pr85) grown in normal and iron-limited media, not $<2 \times 10^9$ cells/ml and *V. anguillarum* strains 785KID and MSC275 (serotypes I & II) not

$<2 \times 10^6$ cells/ml. It contains formaldehyde not >0.5 mg/ml. Sea bass are vaccinated at the size of 25 g and higher. Individual dose 0.1 ml. Fish must be sedated prior to injection. Both products were supplied by the company where the field trials were commissioned and utilized respecting in full the instructions of the manufacturers.

2.5. Vaccination

Whole populations of duplicate cages were vaccinated from 24/07/2014 to 02/08/2014 with the commercial vaccines AJ, AV and sterile 2% NaCl, as follows: a) two cages were vaccinated with the adjuvanted commercial vaccine AJ, group AJ1, 19,544 fish, mean weight (m.w.) 40.0 g and group AJ2, 19,435 fish, m.w. 30.0 g, b) two cages were vaccinated with the aqueous commercial vaccine AV, group AV1, 21,490 fish, m.w. 40.0 g and group AV2, 21,550 fish, m.w. 30.0 g and c) two cages were injected with sterile 2% NaCl (controls), group C1, 13,172 fish, 32.0 g and group C2, 11,238 fish, m.w. 30.0 g. The procedure involved the narcosis of fish using benzocaine at a concentration of 5%, vaccination of the fish and then sizing and placement to dedicated cages. Vaccination was performed with a self-refilling syringe (187.2 gun, Socorex) and the injection was located at the last third of the ventral side of the abdominal cavity. Fish prior to any operation were fasted for at least 24 h. From the 1st day post-vaccination fish were monitored daily for any disease signs and mortalities which were recorded for the whole 12-month period.

Another whole cage of fish was vaccinated during winter (05/02/2015) with the AJ vaccine, group AJW, 60,000 fish, m.w. 59.81 g. These fish were used only for the collection of blood and the isolation of immune sera in order to analyze the development of the humoral immune response during winter vaccination.

For the laboratory-based vaccine efficacy trials fish from each different group (cage) were used.

2.6. Efficacy studies

2.6.1. Determination of LD_{50-70}

Triplicate groups of 20 fish from the control group (300 fish, average weight 61.58 g) were transported 20 days post-vaccination to the laboratory under anesthesia (0.5% phenoxyethanol) and were placed in the tanks. They were allowed to acclimatize for 7 days and they were then anesthetized and i.p. infected with 100 μ l/fish of various doses of *V. anguillarum* O1 bacterial cells (0 , 10^4 , 10^5 , 10^6 and 10^7 cells/ml) grown and enumerated as described above. Water temperature was 23.15 °C. When the experiment was concluded, the same procedure was repeated for Phdp, in order to standardize the experimental infection procedure and establish infectious doses for each bacterium able to cause mortality ranging between 50 and 70% in the control group. The water temperature for the latter tests was 19 °C.

2.6.2. Efficacy trials

Since outbreaks for both diseases have been reported to occur occasionally at temperatures as low as 10–12 °C (Larsen, 1983; Austin and Austin, 2007; Angelidis, 2014) and in order to mimic field conditions, the water temperature used in all efficacy tests was the ambient sea water temperature in the field (ranging from 12.7–22.9 °C during the 12-month period). Infectious bacterial doses were adjusted accordingly for every experimental infection in order to account for fish weight and ambient water temperature changes. All groups of fish were monitored daily for mortalities which were recorded and the experimental infection trials ended when there was no mortality in any group for two consecutive days. The cause of mortality was confirmed with microbiological sampling of recently died fish from the head kidney and the spleen.

After the standardization of the infectious doses for *V. anguillarum* O1 and Phdp, the efficacy studies of the vaccines used in this study commenced at 54 days post-vaccination, with *V. anguillarum* O1 infection.

Sixty fish were randomly collected from both duplicate cages in the field and every experimental group and transported separately to the laboratory. They were then placed in the experimental tanks creating triplicate groups of 20 fish/vaccine and controls. Each of these groups was composed from equal numbers of individuals (10 + 10) from each duplicate field group. Fish were acclimatized in the tanks, as described above.

Five experimental infections with *V. anguillarum* O1 were performed at days 54, 96, 163, 230 and 306 post-vaccination with the average weight of the fish from each group, the water temperature and the bacterial dose/fish, shown in Table 1. Using the same procedure as above, 4 experimental infections with Phdp were performed at days 82, 142, 209 and 287 post-vaccination with the average weight of the fish from each group, the water temperature and the bacterial dose/fish, shown in Table 1.

The protection afforded by the commercial formulations of vaccines was evaluated by calculating the relative % survival (RPS) using the following formula (Amend, 1981):

$$RPS = \left[1 - \frac{\% \text{mortality of immunized fish}}{\% \text{mortality of non immunized fish}} \right] \times 100$$

2.7. Side effects caused by the vaccines

Any mortalities caused from the vaccines were recorded by the company in the field. On a regular basis fish ($N = 5$) were randomly sampled from each experimental group from the cages, they were sacrificed with an overdose of phenoxyethanol and their abdominal cavities dissected, inspected and photographed. Histological samples of the internal organs were isolated and placed in 10% phosphate buffered formalin for preservation. These samples were processed for histology with routine procedures, paraffin-embedded samples were cut in 5 μ m thick slices (Leica RM2125 RTS), stained with haematoxylin-eosin and observed under a light microscope (Olympus CM20, Japan). Necropsy views were photographed using a Sony 5.1 megapixels digital camera.

2.8. Humoral immune response

Blood was collected from randomly sampled fish from each fish group, after anesthesia, from the caudal vein. Blood collection involved at least triplicate samples per fish group. Blood was allowed to clot for 10 min at ambient temperature and then overnight at 4 °C. The samples were then centrifuged at 1750 \times g for 5 min (Hettich Zentrifugen D-7200, Tuttlingen) and the sera collected and stored at –85 °C until their analysis. Sera from each group were utilized in ELISA analysis (Bakopoulos et al., 1997a) for the determination of specific IgM levels against either *L. anguillarum* O1 or Phdp. Results were read on a MR-96A microplate reader (MINDRAY).

Table 1
Days post-vaccination and parameters of vaccine efficacy trials.

Experiment	Days post-vaccination	Average fish weight (g)	Water temperature (°C)	Bacterial cells/g of fish weight
<i>Vibrio anguillarum</i> O1				
1	54	61.5	22.9	1.481×10^7
2	96	108.86	19.5	4.513×10^6
3	163	130.55	14.5	3.229×10^6
4	230	155.53	15.4	4.187×10^5
5	306	166.26	20.0	3.983×10^5
<i>Photobacterium damela</i> subsp. <i>priscidisi</i>				
1	82	67.35	19.7	2.956×10^6
2	142	107.85	13.2	1.670×10^6
3	209	173.56	12.7	1.036×10^6
4	287	149.53	18.5	1.156×10^6

2.9. Growth measurements and indices

The fish from the experimental groups that were used for blood collection, served also for the measurement of individual weight. These data were correlated with data provided by the cooperating aquaculture unit. The average weight of the fish was estimated by the formula:

$$\bar{w}_i = \frac{\sum_{j=1}^n w_{ij}}{N_j}$$

where: \bar{w}_i : average weight of fish, i : group number, $\sum_{j=1}^n w_{ij}$: the sum of the weights of all population, N_j : number of individuals.

Specific growth rate (SGR) and feed conversion rate (FCR) of the fish from each experimental group were also calculated using the following formula (Paspatis et al., 1999):

$$\text{SGR} = 100 \frac{\ln W_f - \ln W_i}{t} \quad \text{FCR} = \frac{F}{W_f - W_i}$$

where, W_f και W_i : final and initial mean body weight, respectively, in grams, t : culture period in days, F : the total quantity of food administered, in grams.

2.10. Statistical analysis

The cumulative mortality curves for each vaccine and each pathogen at each experiment were evaluated using the Kaplan-Meier survival curves and the χ^2 test was used for statistical analysis comparing all pairs of experimental groups and considering results significant when $p < 0.05$.

For the statistical analysis of the average weights of fish the Analysis of covariance (ANCOVA) (Cochran and Cox, 1953; Zar, 2010) was used in the software program "Excel 2010".

The statistical analysis of specific antibody levels of the sera collected from all vaccinated groups was performed with the Wilcoxon-Mann-Whitney test (Zar, 2010).

In order to examine the factors that affected survival of individuals in the efficacy trials the method of Cox (1972) was employed (Cox's regression or proportional hazards regression analysis). Cox's regression is similar to multiple regression analysis, except that the response or dependent variable is the hazard function at a given time. The hazard function represents the risk of dying in a very short time interval after a given time, assuming survival thus far. It can therefore be interpreted as the risk of dying at time t (Altman, 1991). In our case, the explanatory or independent variables are *cohort* (control, AV or AJ fish groups) [coh], *time post-vaccination* [tpv], *temperature* at which the efficacy trial was performed [temp] and *number of bacterial cells of infecting microorganisms per gram of fish tissue* (accounting for two combined variables that influence fish survival, the infectious dose and fish weight) [inf]. The equation explaining survival may have the form:

$$h(t) = h_0(t) \cdot \exp(b_{\text{cohort}} \cdot \text{cohort} + b_{\text{age}} \cdot \text{age} + b_{\text{temp}} \cdot \text{temp} + b_{\text{dose}} \cdot \text{dose})$$

By taking the logarithms of both sides of the equation, it is transformed to:

$$\ln h(t) = \ln h_0(t) \cdot \exp(b_{\text{cohort}} \cdot \text{cohort} + b_{\text{age}} \cdot \text{age} + b_{\text{temp}} \cdot \text{temp} + b_{\text{dose}} \cdot \text{dose})$$

The quantity $h_0(t)$ is the baseline or underlying hazard function and corresponds to the probability of dying when all the independent variables are zero. The regression coefficients b_{cohort} to b_{dose} give the proportional change that can be expected in the hazard, related to changes in the explanatory variables. The quantity $\frac{h(t)}{h_0(t)}$ is called hazard ratio and it is the relative risk of a death occurring at time t .

A Cox regression analysis on the whole data from all efficacy trials for each pathogen was performed in order to assess the efficacy of the

two commercial vaccines used for the whole experimental period because the many variables that influence this function of vaccines did not allow a direct comparison between efficacy trials at various times post-vaccination. This analysis was primarily performed in order to answer the following scientific question: "which of the two vaccines provided better and long lasting protection against vibriosis and photobacteriosis". All statistical analyses were run on R environment for statistical computing (R Core Team, 2015). Cox's regression was performed using the package *Survival* (Therneau, 2015; Therneau and Grambsch, 2000).

2.11. Physico-chemical parameters of seawater

The physicochemical parameters (O_2 , $T^\circ C$) of the water at the study area were recorded daily as well as the parameters in the tanks during the experimental infections. Field measurements were performed with automatic waterproof recorders (Hobo type) placed in the center, on the surface and near the bottom of the on-growing floating unit, while tank measurements were performed with an Oxi 312i (WTW) portable probe. Total ammonia in the tanks never exceeded 0.5 mg/l and pH was in the range of 7.4–7.6.

3. Results

3.1. Efficacy monitoring in the field

No noticeable outbreaks of neither of the diseases (vibriosis or photobacteriosis) were observed in the field (Table 2).

3.2. Efficacy monitoring in laboratory trials

3.2.1. Determination of LD_{50-70}

During the preliminary infectivity trials for both pathogens, the LD_{50-70} (accounting for the differences between replicates) doses calculated were: 8.7×10^8 bacterial cells/ml for the challenge with *V. anguillarum* O1 (average weight of fish: 61.58 g and temperature $23.15^\circ C$) and 1.96×10^8 bacterial cells/ml for the challenges with Phdp (average weight of fish: 67.35 g and temperature $19^\circ C$).

3.2.2. Efficacy trials against *V. anguillarum* O1

The cumulative mortalities for each experimental group and each trial with *V. anguillarum* O1 are shown in Fig. 1 and the RPSs calculated for each trial in Table 3.

In 4 out of the 5 efficacy trials performed in this study, the commercial water-in-oil vaccine AJ protected in a superior manner fish against challenges with *V. anguillarum* O1 (except the fifth efficacy test where a better protection was observed by the AV vaccine). RPSs ranged from 38% during the 1st trial (54 days post-vaccination - dpv) to 90.9% during the 2nd trial (96 dpv), 30% during the 3rd trial (163 dpv), 67.6% during the 4th trial (230 dpv) and 13% during the 5th trial (306 dpv). The first, the third and the fifth trials exerted a very high bacterial pressure to the vaccinated fish as evidenced by the 100% mortality reached by the control groups. This influenced the performance of both vaccinated groups as seen by the relevant low RPS values calculated. RPS values for both products were greatly improved when an average or lower than 100% mortality was measured in the controls, during the second (55% control mortality) and the fourth (77% control mortality) trials.

In all the experiments the survival of the vaccinated groups was significantly higher in comparison to the control groups. The better performance of the adjuvanted vaccine in comparison to the aqueous vaccine was significant in the 1st and 3rd efficacy trials (D54 and D163 pv, respectively), with both trials performed under high bacterial pressure, but this was not the case for the 2nd, 4th and 5th trial (D96, D230 and D306 pv, respectively).

Table 2.
Cumulative mortality data in the field.

Group/cage	Date	Vaccine	Number of fish	Mortality	% mortality
Total population	10 & 29/4/2014–1/8/2014	Before vaccination	203,974	358	0.17
AJ	1/8/2014–30/06/2015	AJ	38,979	942	2.41
AV	1/8/2014–30/06/2015	AV	43,040	1264	2.93
Control	1/8/2014–30/06/2015	Not vaccinated	24,410	436	1.78

3.2.3. Efficacy tests against *Ph. damsela* subsp. *piscicida*

The cumulative mortalities for each experimental group and each vaccine efficacy trial with Phdp are shown in Fig. 2 and the RPSs calculated for each trial in Table 4.

The first efficacy test against Phdp reached a 93% mortality in all experimental groups and cannot be considered valid. As a result, it was excluded from the Cox's regression analysis. Overall, the rest 3 efficacy trials against Phdp did not reach the desired cumulative mortality in the controls and ranged between 23 and 48%, placing all the experimental groups under mild to average bacterial pressure. Under these conditions, the commercial water-in-oil vaccine AJ protected fish better against the challenges with Phdp during the 2nd trial (142 dpv, RPS 62.5%), and the 3rd trial (209 dpv, RPS 35.0%), while in the 4th trial (287 dpv), the aqueous AV vaccine performed better, with the adjuvanted commercial vaccine to develop higher mortalities than the control group.

The performance of both the commercial vaccines was not statistically significant when compared, except for the last trial. The survival of the vaccinated groups was higher in comparison to the control groups but not statistically significant in all cases, except for the AJ vaccine group and the 2nd trial. Microbiological sampling from recently died fish from all trials led to the isolation in pure culture of the respective infectious agent.

In order to determine which of the two vaccines performed better and in the long term under the conditions of these experiments, the 12-month results collected during the efficacy trials against both pathogens were evaluated with Cox's regression analysis. These evaluations had the following outcome.

Regarding the independent variables that may influence the efficacy of the vaccines against infections with *V. anguillarum* O1, it was found that when the effect of the vaccine AV was tested against the control, the variable temp was not significant and was excluded while all

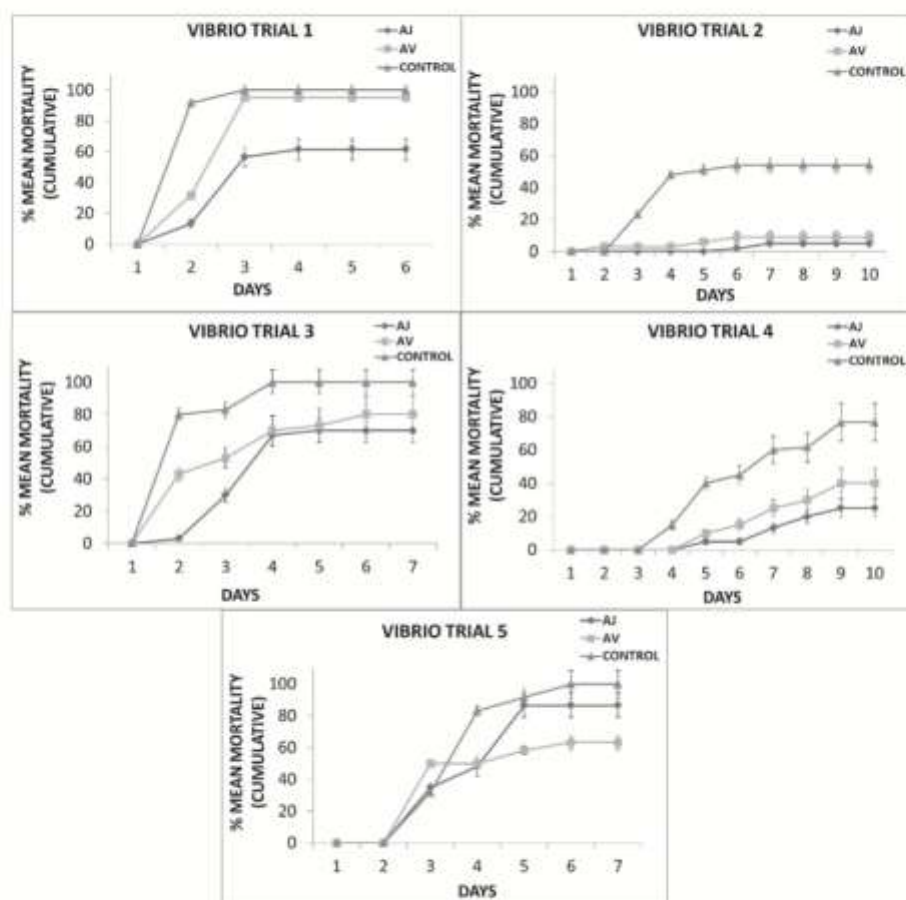


Fig. 1. Cumulative mortality % of the vaccine efficacy trials using *V. anguillarum* O1. Exp.1: D54 post-vacc. (pv); Exp.2: D96 pv; Exp.3: D163 pv; Exp.4: D230 pv and Exp.5: D306 pv.

Table 3Number of fish, mortalities, % mortality and RPS fish per experimental group in the vaccine efficacy trials using *V. anguillarum* O1.

Experimental group	Number of fish	Loss	% mortality	RPS
Experiment 1				
Control	60	60	100	–
AJ	60	37	62	38
AV	60	46	77	23
Experiment 2				
Control	60	33	55	–
AJ	60	3	5	90.9
AV	60	6	10	81.8
Experiment 3				
Control	60	60	100	–
AJ	60	42	70	30
AV	60	54	90	10
Experiment 4				
Control	60	46	77	–
AJ	60	15	25	67.6
AV	60	24	40	48.1
Experiment 5				
Control	60	60	100	–
AJ	60	52	87	13
AV	60	38	53	47

remaining variables were found statistically significant. Thus, temperature was not statistically significant in explaining differential survival of the fish. When the effect of vaccine AJ was tested against the control, results showed that all variables were significant. Thus, all variables for the AJ vaccine were significant in explaining differential survival of the fish. Since variable cohort for both vaccines was significant, both vaccines reduced mortality when compared to non-vaccinated fish. When the two vaccines AV and AJ were compared, variable temp was found to be non-significant in contrast to all the other variables. Again, temperature did not played an important role in explaining differential survival. The variable was removed and Cox's regression was applied for the remaining variables. All regression coefficients were found positive but those of variables tpv and inf were very close to zero. Important

Table 4

Number of fish, mortalities, % mortality and RPS fish per experimental group in the vaccine efficacy trials using Phdp.

Experimental group	Number of fish	Loss	% mortality	RPS
Experiment 1				
Control	60	56	93	–
AJ	60	56	93	0
AV	60	56	93	0
Experiment 2				
Control	60	24	40	–
AJ	60	9	15	62.5
AV	60	15	25	37.5
Experiment 3				
Control	60	14	23	–
AJ	60	9	15	35
AV	60	10	16	26
Experiment 4				
Control	60	29	48	–
AJ	60	35	58	–
AV	60	20	33	31

variable was tpv and the adjuvanted vaccine AJ performed better in comparison to the aqueous vaccine AV in the long run. Individuals that were vaccinated with AV had a 32% increase (compared with individuals vaccinated with AJ) in the risk of dying (after adjustment for the other explanatory variables). This hazard ratio, as it is shown in Fig. 3, increased (higher the risk of death) for both vaccines over time but it was significantly better (lower) for the AJ group in comparison to the aqueous AV vaccine.

Regarding the independent variables that may influence the efficacy of the vaccines against experimental infections with Phdp, it has been found that all explanatory variables were not significant when they were tested for the effect of both vaccines vs. control. That is, differential survival was not observed when vaccine and control cohorts were compared. When the effect of the two vaccines was compared, again all variables, except tpv, were not significant. Only time post vaccination affected survival of the fish. It is interesting to note here that even the effect of the type of vaccine was not significant perhaps in line with

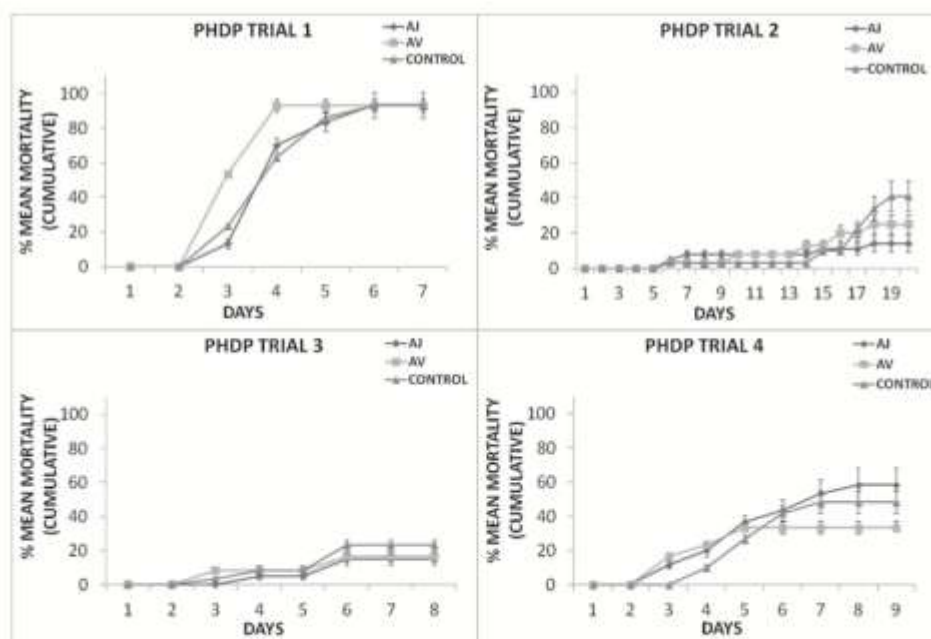


Fig. 2. Cumulative mortality % of the vaccine efficacy trials using Phdp, Exp.1: D82 post-vacc. (pv); Exp.2: D142 pv; Exp.3: D209 pv; Exp.4: D287 pv.

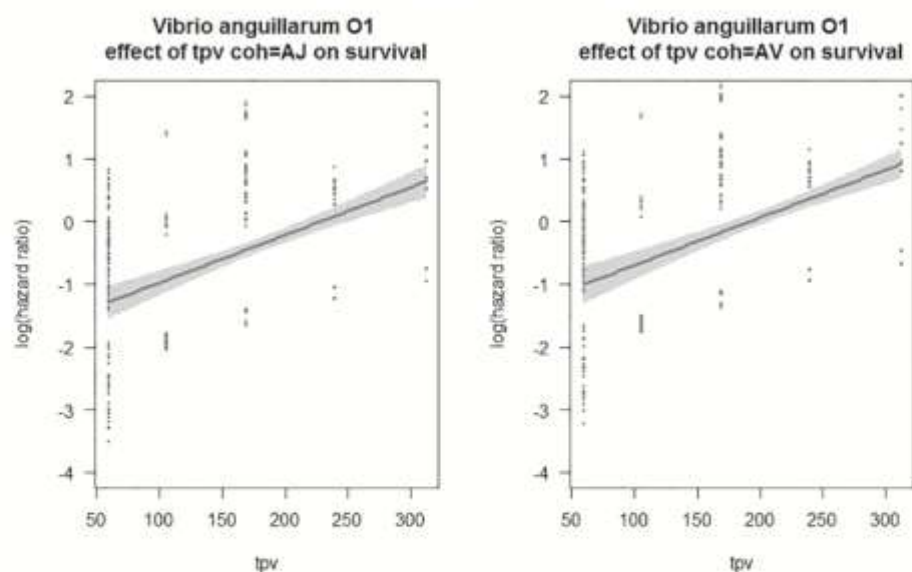


Fig. 3. Effect of time-post-vaccination (tpv) on hazard ratio of experimentally infected with *V. anguillarum* O1 fish vaccinated with either the AJ or the AV vaccines.

the previous results when we compared survival of vaccinated against non-vaccinated fish. The hazard ratio as it is shown in Fig. 4 increased over time (greater risk of death).

3.3. Side effects of vaccines

The condition of the abdominal cavity of fish during the study was assessed macroscopically and histologically. Fig. 5 provides selected photographic evidence of the macroscopic view of the abdominal organs at increasing intervals post-vaccination.

As early as 7 days post-vaccination (pv) round whitish nodules (<1 cm) representing the AJ vaccine and local erythema were observed in the abdominal fat surrounding the gut (data not shown). These nodules were progressively organized from beige to light brown nodules and size of 1–10 mm (Fig. 5A, day 47 pv) to hardened brown nodules with size <40 mm (Fig. 5B, day 112 pv). This macroscopic picture,

enriched with brown flat areas, was maintained on days 162 and 290 pv (Fig. 5C and D, respectively). Twelve months pv these reactions in most samples disappeared while in a few of them a couple of flat brown areas (1–2 mm) and well isolated nodules (≤ 30 mm) were still observed (data not shown). Mild or no adhesions were macroscopically observed in all cases. Local erythema and petechia in the fat surrounding the gut were the only macroscopic observation from the aqueous vaccine abdominal samples. These reactions persisted until day 104 pv and disappeared after day 162 pv (data not shown).

The histological microscopic evaluation of the groups vaccinated with the AJ vaccine at increasing intervals post-vaccination is shown in Fig. 6.

Intense aggregation of leukocytes (Fig. 6A, arrowheads) in the abdominal fat tissue and various stages of granuloma formation (Fig. 6A, arrows) was observed in all samples. Granulomas had various sizes and some of them were adjacent to the external gut wall and the

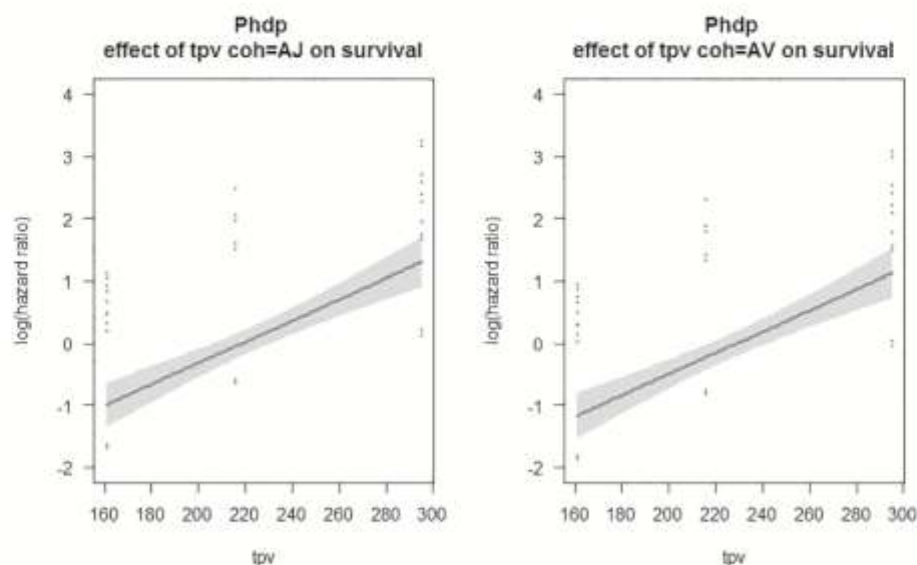


Fig. 4. Effect of time-post-vaccination (tpv) on hazard ratio of experimentally infected with Phdp fish vaccinated with either the AJ or the AV vaccines.

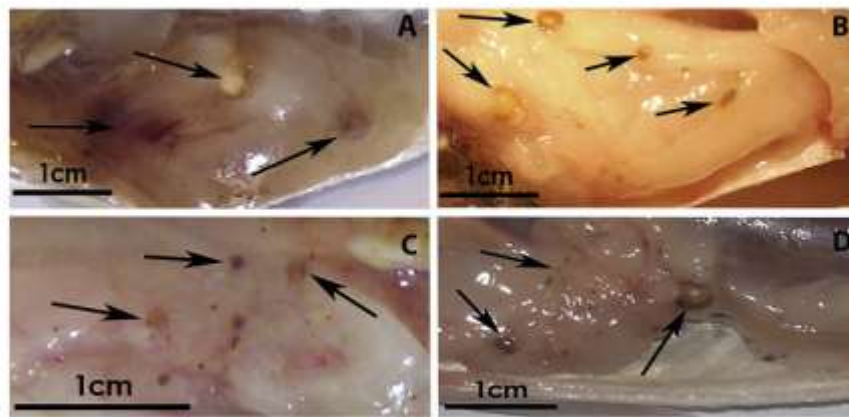


Fig. 5. Abdominal view of necropsied fish days post vaccination. A: AJ-vaccinated fish, D47; B: AJ-vaccinated fish, D112; C: AJ-vaccinated fish, D162; D: AJ-vaccinated fish, D290. Arrows indicate local reactions.

pancreatic tissue (Fig. 6B, arrowhead). The granuloma depicted is in the early stage of formation with antigens being processed by leukocytes at the center of the formation, followed by layers of cells transforming to fibroblasts, while in the outer layers characteristic fibroblasts with elongated cytoplasm and nucleus were evident (Fig. 6B). Large leukocyte numbers persisted in the adipose tissue and granulomas were seen in

various sizes and stages of formation (data not shown) 42 days pv. Occasional very large granulomas were observed 70 days pv but the main finding was granulomas still in various formation stages (Fig. 6C) and, in addition, the formation of "multigranulomas" (Fig. 6D). Fig. 6E provides evidence of connective tissue formation (arrowheads) along with granulomas in connection to the gut external wall, 99 days pv and Fig. 6F

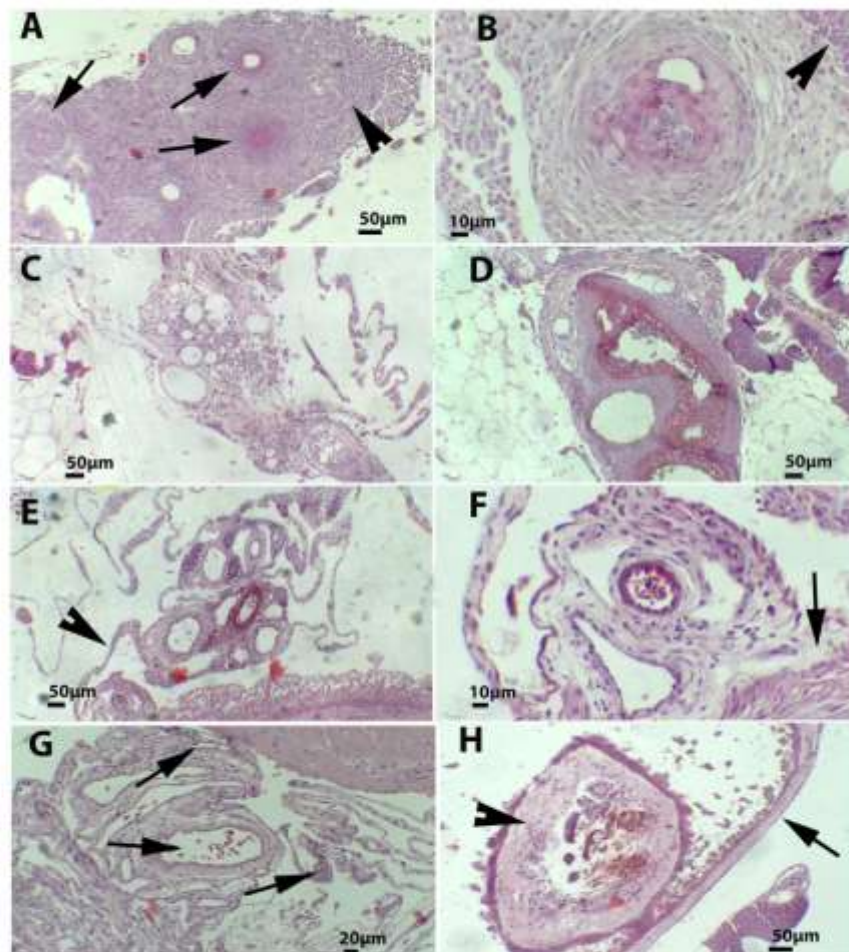


Fig. 6. Microscopic findings of abdominal cavity tissue samples from fish vaccinated with the adjuvanted vaccine: A & B: 28 days (D) post-vaccination (pv); C & D: 70 D pv; E & F: 99 D pv; G: 163 D pv; H: 226 D pv.

depicts detail of adhesion between a granuloma and the gut external wall (arrow), while the general view of the abdominal fat tissue reveals that leukocyte infiltration is residing. One hundred and twenty seven days pv, the general status of abdominal tissues shows a small number of large and mature granulomas and occasional small granulomas with cords of connective tissue formed inside the adipose tissue (data not shown). Small well defined locations with granulomas were observed 163 days pv which were connected via connective tissue to the external gut wall. Fig. 6G shows these findings as well as vessels (arrows) inside the connective tissue. A month later, 191 days pv, the status of the abdominal cavity tissues did not change, with some old-formed granulomas being observed along some small scattered granulomatous lesions in defined locations (data not shown). On day 226 pv smaller solitary granulomas became scarce and there is a reduction in the connective tissue previously formed inside the fat tissue. Occasional large mature granulomas were observed and Fig. 6H depicts a younger granuloma (arrowhead) formed inside a larger, older (arrow), granuloma. The structure of the fat tissue surrounding the gut 251 days pv had returned to normal condition, histologically. Occasional large, old, granulomas with smaller adjacent ones are still observed (data not shown) but in one or two locations in the fat tissue.

The histological microscopic evaluation of the groups vaccinated with the aqueous AV commercial vaccine at increasing intervals post-vaccination is shown in Fig. 7.

One month pv there was evidence of moderate aggregation of leukocytes in some areas of the fat tissue (Fig. 7A, arrows) and surrounding the gut as it is evident in Fig. 7B (arrows). Vessels and a connective tissue reticulum is evident around the external gut wall. Two months pv there is no change in the status of the abdominal fat with some aggregates of leukocytes in various areas and adjacent to the external gut wall. Leukocytes were seen in connection to connective tissue cords and inside the wall of the gut as it is shown in Fig. 7C (arrows). The same findings as for the previous periods were observed 90 days pv, especially near the pancreatic tissue (data not shown). Four months pv there was scarce evidence of some leukocytes in the adipose tissue.

There was no evidence of connective tissue between the gut and the fat tissue surrounding it (Fig. 7D). Five months pv areas with local aggregation of leukocytes adjacent to pancreatic tissue were scarcely observed (data not shown). On day 177 pv the general view was of leukocytes that were scarcely observed. Fig. 7E represents a brief from connective tissue between the gut wall and the adipose tissue bearing leukocytes. Both samples on days 212 and 237 pv did not show evidence of increased numbers of leukocytes in the abdominal tissues (data not shown).

3.4. Humoral immune response

Triplicate serum samples were collected for almost a year post-vaccination, from each duplicate experimental group and from the group that was vaccinated during winter and were utilized in ELISA analysis against either *V. anguillarum* O1 or Phdp in order to measure the levels of specific antibodies produced against these pathogens.

3.4.1. Specific anti-*V. anguillarum* O1 antibody levels

The development of the specific humoral response against *V. anguillarum* O1 is shown in Fig. 8.

In all cases specific antibody levels rose sharply since the 1st week post-vaccination and reached a plateau at day 48–49 post-vaccination for the AJ group and day 22–29 for the AV group. Specific anti-*V. anguillarum* O1 antibodies then started to drop and continued dropping smoothly over a long period until the end of the study. Around August–September the following year of vaccination and towards the end of samplings, an increase of specific anti-*V. anguillarum* O1 antibodies was measured in all experimental groups, including the controls. Winter vaccination resulted in slower development of the humoral response reaching a plateau on day 82 post-vaccination. Then, specific anti-*V. anguillarum* O1 antibodies started to drop, steeply at the beginning and smoothly afterwards until day 298 post-vaccination. Specific anti-*V. anguillarum* O1 antibody levels provoked by the AJ vaccine were during the whole period significantly higher from the antibody levels

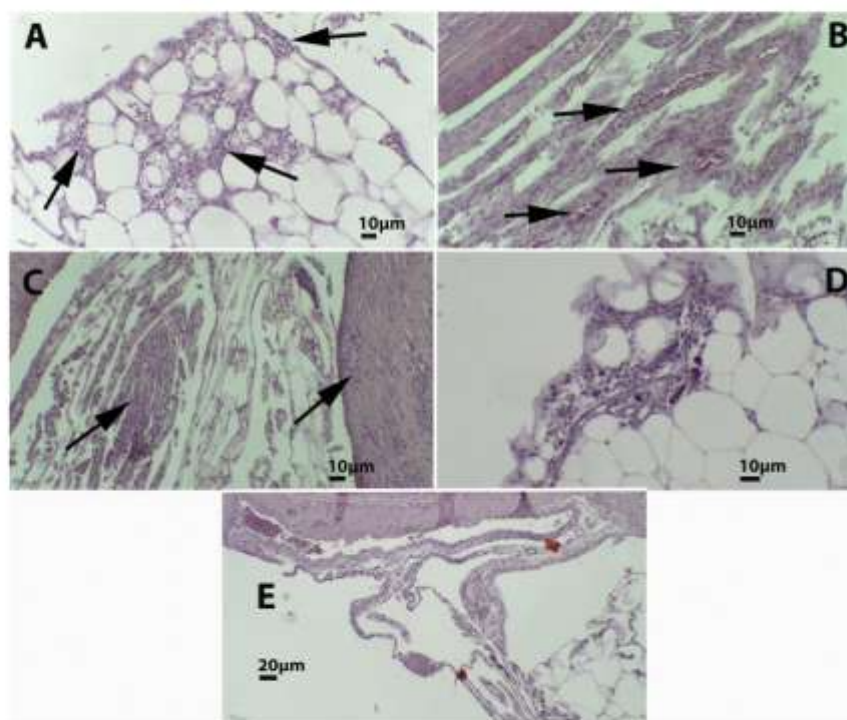


Fig. 7. Microscopic findings of abdominal cavity tissue samples from fish vaccinated with the aqueous vaccine: A & B: 30 days (D) post-vaccination (pv); C: 60 D pv; D: 120 D pv; E: 177 D pv.

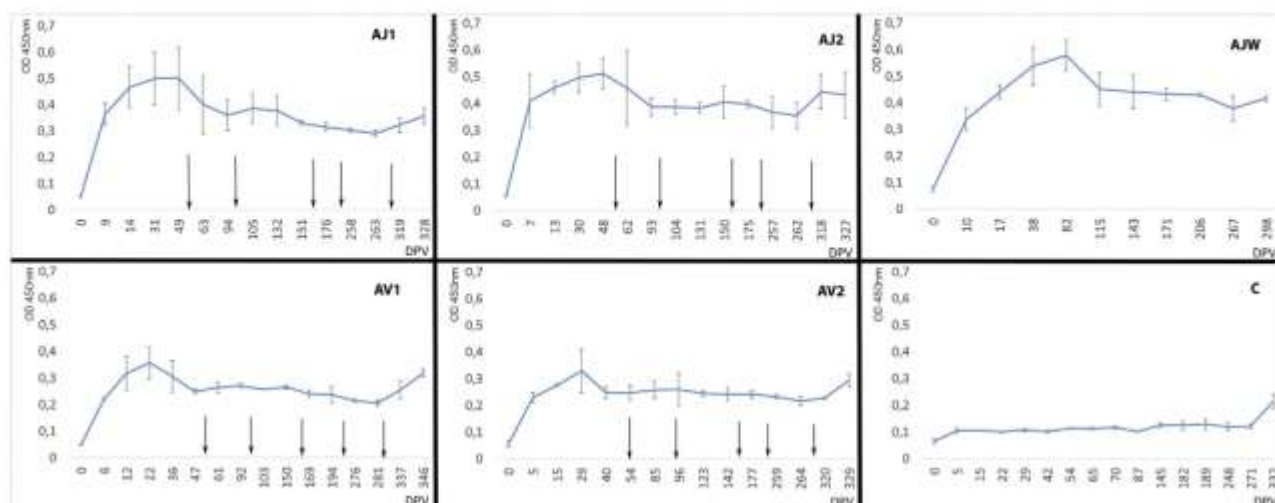


Fig. 8. Levels of specific anti-*V. anguillarum* O1 antibodies over time post vaccination. AJ: adjuvanted vaccine; AV aqueous vaccine; C: control group; AJW: group vaccinated during winter. DPV: days post-vaccination. Arrows indicate the efficacy tests against *V. anguillarum* O1 performed during the course of the study.

provoked by the AV vaccine and these levels for both vaccines were significantly higher from those measured for the controls. There was no statistical difference ($p < 0.05$) between duplicates of the same experimental groups. Specific anti-*V. anguillarum* O1 antibody titers in the sera of the winter vaccinated group (AJW) were significantly higher compared to those of the AV groups, the AJ1 group but did not differ significantly from the AJ2 group.

3.4.2. Specific anti-*Ph. damsela* subsp. *piscicida* antibody levels

The development of the specific humoral response against Phdp is shown in Fig. 9.

Specific antibody levels for all experimental groups rose sharply since the 1st week post-vaccination and reached a plateau at day 30–32 post-vaccination for the AJ group and earlier for the AV group. Specific anti-Phdp antibodies then started to drop and continued dropping smoothly over a long period until the end of the study. As for the analysis of the sera against *V. anguillarum* O1, around August–September the following year of vaccination and towards the end of samplings,

an increase of specific anti-Phdp antibodies was measured in all experimental groups, including the controls. Winter vaccination resulted also in slower development of the humoral response reaching a plateau again on day 82 post-vaccination. Then, specific anti-Phdp antibodies started to drop, but remained in relatively high levels with an abrupt increase on day 267 post-vaccination (month October). Specific anti-Phdp antibody levels provoked by the AJ vaccine were during the whole period significantly higher from the antibody levels provoked by the AV vaccine and these levels for both vaccines were significantly higher from those measured for the controls. There was no statistical difference between duplicates of the same experimental groups. Specific anti-Phdp antibody titers in the sera of the winter vaccinated group (AJW) were significantly higher compared to those of the AV groups, the AJ2 group but did not differ significantly from the AJ1 group.

Comparing the levels of specific antibodies produced against Phdp and *V. anguillarum* O1, both vaccines caused the production of higher levels against the former pathogen and this difference was significant ($p < 2.2 \times 10^{-16}$).

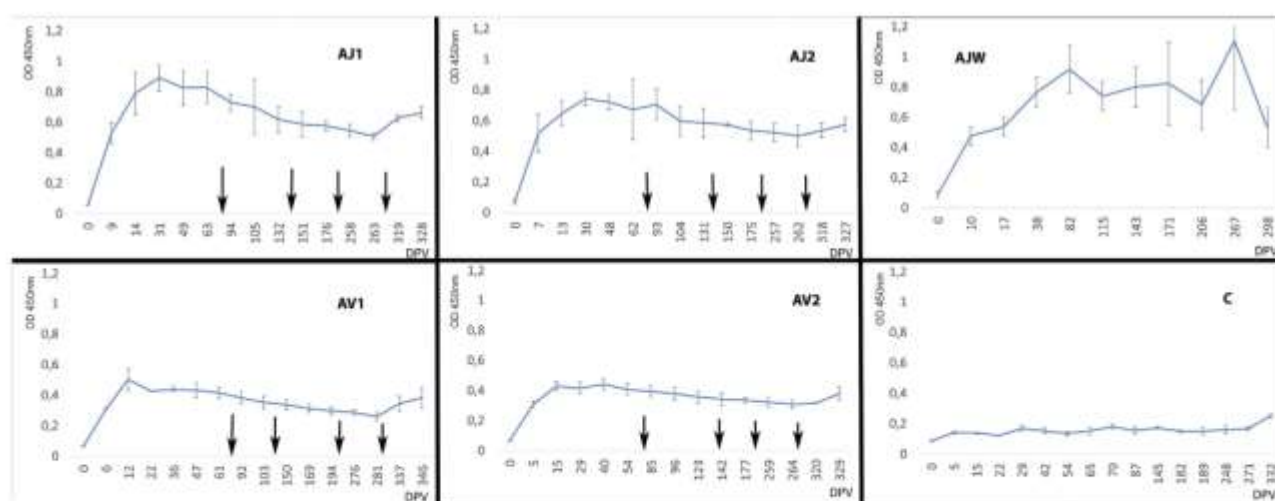


Fig. 9. Levels of specific anti-Phdp antibodies over time post vaccination. AJ: adjuvanted vaccine; AV aqueous vaccine; C: control group; AJW: group vaccinated during winter. DPV: days post-vaccination. Arrows indicate the efficacy tests against Phdp performed during the course of the study.

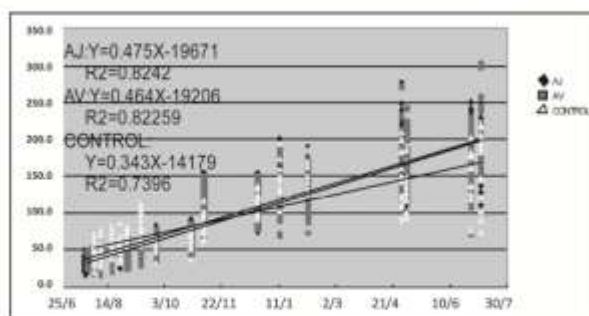


Fig. 10. Weight development of experimental groups for the duration of the study.

3.5. Fish performance

Fig. 10 illustrates the individual weights of all the fish sampled during the whole experimental period. Statistical analysis of weight data showed that individual weights of fish in each group were different, with the control fish reaching the lowest average weight (232.5 ± 7.5) compared to the vaccinated groups (AJ: 242.5 ± 22.5 , AV: 252.5 ± 22.5).

3.6. Growth indices-specific growth rate (SGR) and feed conversion rate (FCR)

3.6.1. Specific growth rate

Specific growth rate calculated for the whole experimental period is illustrated in Fig. 11.

The SGR for the entire experimental period was apparently better for the unvaccinated fish, followed by the SGR calculated for the AV vaccine, and the SGR for fish vaccinated with the AJ vaccine. There was no statistical difference between all pair comparisons.

3.6.2. Food conversion rate

Fig. 12 illustrates the FCRs calculated for all groups for the entire period. FCRs were calculated using the weight of the feed and the wet weight of fish.

Apparently the FCR was better (lower) for the fish vaccinated with the AV vaccine (0.67), followed by the fish vaccinated with the AJ vaccine (0.78) and the control (0.78). Similarly to SGR, there was no statistical difference between all pair comparisons.

3.7. Physicochemical parameters of water

Fig. 13 illustrates the mean monthly temperature of the surface of seawater and dissolved oxygen (D.O.) for the period April 2014 to June 2015. Temperature follows the expected seasonal pattern and the dissolved oxygen decreases as the temperature increases and vice versa. These applied to both field sea water and tank water.

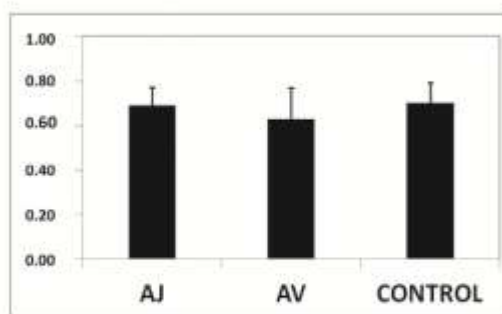


Fig. 11. Specific growth rates for each experimental group (SGR) and whole the experimental period.

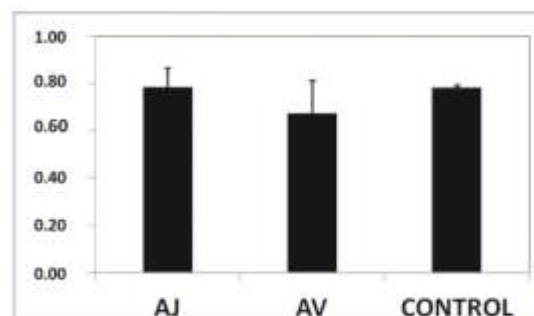


Fig. 12. Food conversion rate (FCR) for each experimental group and the entire period.

Salinity for the same period ranged from 38.4 in winter to 38.9‰ in summer.

4. Discussion-conclusion

The efficacy tests as performed in this study against both pathogens showed, on a test by test basis, that both commercial vaccines conferred significant protection against infections with *V. anguillarum* O1 and Phdp in comparison to the non-vaccinated controls and that the adjuvanted vaccine conferred a better protection in comparison to the aqueous vaccine (except for the last tests where the aqueous vaccine performed better). Better performance of oil-adjuvanted vaccines has been also described for *Aeromonas salmonicida* vaccines used in Atlantic salmon vaccination (Lund et al., 2003 and references therein), for monovalent anti-Phdp vaccines in yellowtail (Gravningen et al., 2008) and for bivalent vaccines in sea bass (Bakopoulos et al., 2015a) and it is widely accepted to be the outcome of the stimulation of non-specific immune factors, of a persistent intense attraction of different types of leukocytes to the site where the vaccine is deposited and of a slower release of antigens over longer periods (Afonso et al., 2005; Mutoloki et al., 2008).

Cox's regression analysis of the efficacy trials data for both pathogens for the whole period agreed that both commercial vaccines conferred significant protection against infections with *V. anguillarum* O1 and Phdp in comparison to the non-vaccinated controls but this was not clear with the efficacy tests against Phdp. These findings, are supported by previous studies investigating monovalent formulations against vibriosis (Angelidis et al., 2006; Galeotti et al., 2013) and photobacteriosis in sea bass (Bakopoulos et al., 2003). They are also supported by the few previous studies assessing the efficacy of bivalent commercial vaccines against Vibriosis (Gravningen et al., 1998) and photobacteriosis in sea bass (in the short term study of Bakopoulos et al., 2015a). Both the latter studies used the commercial adjuvanted vaccine used in this study, but the adjuvant was a non-mineral oil.

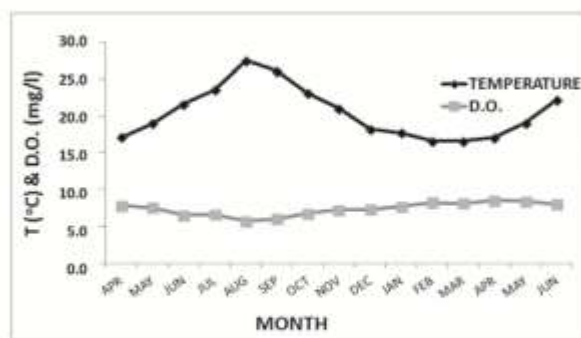


Fig. 13. Average monthly temperature and D.O. of the surface sea water in the field and in the tanks.

Regarding the importance of the parameters that may influence the survival of the vaccinated groups during the efficacy trials as performed in this study, it was found that for the tests with *V. anguillarum* O1, temperature was an insignificant parameter in contrast to the other parameters. Susceptible to vibriosis fish defend against infections using both the already existing arsenal of immune factors at the time of infection and, in addition, infection itself triggers an immune response. It has been demonstrated that antibodies raised after immunization of fish with *V. anguillarum* are directed mainly against the O-antigens of the pathogens, the lipopolysaccharide (LPS) (Schröder et al., 2006). LPS is a T-cell independent antigen and specific anti-lipopolysaccharide antibodies can be produced by B-cells without the need of prior processing by cells of the immune system (Ellis, 1988) in contrast to protein antigens which are T cell-dependent antigens. Consequently, raising an immune response against LPS requires less energy in comparison to protein antigens and in fish, being poekilotherms, temperature proportionally influences their metabolic rates and energy production. This may explain why temperature was found to be an insignificant parameter in the efficacy trials with *V. anguillarum* O1.

In contrast, none of the parameters that may influence the survival of the vaccinated groups during the efficacy trials with Phdp was significant, except time post-vaccination. In this case, even the vaccine formulation was an insignificant parameter. Based on the information provided by the producers of the commercial vaccines, the differences between the two product formulations are mainly the inclusion of a mineral oil adjuvant in the AJ vaccine and that the bacterial cells in the AV vaccine were grown in both normal and iron limited media. Each of these differences is beneficial for different reasons and may account for the insignificance of this parameter in the present study. Adjuvants cause intense attraction of various types of leukocytes at the location of the vaccine (Afonso et al., 2005) and this may have a positive quantitative stimulation effect on the immune response. Bacterial growth under iron limitation conditions leads to the expression of antigens that may be involved in virulence (Magarinos et al., 1994b; Bakopoulos et al., 1997b) and, thus, may exert a positive qualitative effect on immune response and protection.

Cox's regression analysis of the risk of dying of vaccinated fish in relation to time post-vaccination showed that fish vaccinated with either of the vaccines had lesser risk to die from a *V. anguillarum* O1 or a Phdp infection early post-vaccination. This somewhat expected finding correlates well to the development of the humoral immune response post-vaccination and the higher specific antibody levels against these pathogens measured soon after vaccination.

The mineral oil adjuvant incorporated in the AJ vaccine caused an intense attraction of leukocytes and the formation of aseptic granulomas in the abdominal cavity which around harvest were either reduced to a couple of flat brown small spots or well isolated small brown nodules. The histological examination of abdominal cavity samples revealed that when intense inflammation had resided (at about 3 months post-vaccination), it left behind adhesions between the area of granulomas formation and adjacent tissues, but this, apparently, did not cause any striking effect on the performance of fish. As a matter of fact, vaccinated fish were found to reach higher average weight in comparison to the controls in support to previous studies (Viale et al., 2006; Gravningen et al., 2008). The aqueous vaccine, on the other hand, did not cause any significant local tissue responses.

The development and course of the humoral immune response followed similar patterns to those reported for specific anti-*V. anguillarum* antibodies by Coeurdaer et al. (1997) in sea bass. The intense inflammatory response and the slower release of antigen caused by the adjuvanted vaccine were beneficial for the production of higher specific antibody levels against both pathogens. And these higher specific antibody levels correlated well with the better performance of the AJ vaccinated group against infections with both pathogens.

Specific antibody titres against Phdp provoked by both vaccinated groups were higher when compared to the specific anti-*V. anguillarum*

O1 antibody titres, in respect to the magnitude of reactions in the ELISA, despite that plates were coated with a similar number of bacterial cells. This indicates that Phdp antigens cause a higher stimulation of the humoral immune response. Similar magnitude of reaction observations were made in a previous study with sea bass (Bakopoulos et al., 2015b). Furthermore, Schröder et al. (2006) reported that specific antibodies against *V. anguillarum* are directed towards a limited number of antigens, and this may account for the observed lower levels of anti-*V. anguillarum* O1 specific antibodies measured in this study.

An increase of specific antibody levels in all experimental groups and against both pathogens was measured towards autumn. This may coincide with an increase of pathogens in the sea water and contact of fish in the field may have provoked an immune response. Indeed, as it has been reported, both vibriosis and photobacteriosis occur particularly during autumn and spring when the water temperature is between 15 and 20 °C (Larsen, 1983; Magarinos et al., 1992, 2001). Both the seasons and the prevailing water temperature for the appearance of elevated numbers of both pathogens are well correlated to the conditions at the farm where experimental groups were maintained. This is also supported by the water microbiological analysis records kept by the farm.

During winter vaccination a delay in reaching the plateau of specific antibody levels against both pathogens levels was observed. Temperatures near 15 °C have a profound effect on the metabolic rate of sea bass as well as growth, feed intake and feed efficiency (Person-Le Ruyet et al., 2004) and this may account for the observed delay in reaching the plateau of the humoral immune response in comparison to summer vaccination.

Concluding, under these experimental conditions, both commercial vaccines protected significantly against infections with *V. anguillarum* O1 and Phdp in comparison to the controls. The oil-adjuvanted commercial vaccine, overall, seems to perform better in respect to protection. This has been well demonstrated for the efficacy trials with *V. anguillarum* O1 (both on a trial by trial and the overall assessment), but not with the efficacy trials with Phdp.

The oil-adjuvanted vaccine caused the production of significantly higher specific antibody titers against both the pathogens and these findings correlate well to the observed overall performance of this vaccine formulation during the efficacy trials.

The mineral-oil adjuvant caused similar local side-effects at the site where the vaccine has been deposited inside the abdominal cavity, as it has been described for other teleosts. These local reactions as well as the observed adhesions did not have a negative effect on the overall performance of vaccinated fish. This was also the case for the group vaccinated with the aqueous commercial vaccine.

Conflict of interest

No conflict of interest exists between this research and any other companies providing the commercial products.

Ethics

The work presented in the article has been carried out in an ethical way and according to Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

Acknowledgements

We would like to thank the company "Ichthyokalliergiritiki Eryssos LTD.", for the supply of fish and conducting part of the experiments in the aquaculture unit of their property, as well as the company "Kefalonia Fisheries S.A.", for the provision of materials, equipment and expertise on farming. This work was performed under the frame of cooperation of these companies with the University of the Aegean and the doctoral candidate Mr. Spinos E., M.Sc. and it was funded by institutional funds.

References

- Afonso, A., Gomes, S., da Silva, J., Marques, F., Henrique, M., 2005. Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 1–16.
- Altman, D.G., 1991. *Practical Statistics for Medical Research*. Chapman and Hall, London, UK.
- Amend, D.F., 1981. Potency testing of fish vaccines. *International Symposium on Fish Biology: Serodiagnostics and Vaccines* 49. Develop. Biol. Stand., pp. 447–454.
- Angelidis, P., 2014. *Vibrio anguillarum*-associated vibriosis in the Mediterranean aquaculture (Chapter 11). In: Angelidis, P. (Ed.), *Aspects of Mediterranean Aquaculture, Farming, Health, Processing*, first ed. Blue Crab PC Publisher, Chalastra Greece, pp. 243–264 (ISBN: 978 618-80999-0-6).
- Angelidis, P., Karagiannis, D., Cramp, E.M., 2006. Efficacy of *Listonella anguillarum* (syn. *Vibrio anguillarum*) vaccine for juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* (L. 1758). *Dis. Aquat. Org.* 71, 19–24.
- Athanassopoulou, F., Bitchava, K., 2010. Main pathological conditions in Mediterranean marine finfish culture. In: Koumoundouros, G. (Ed.), *Recent Advances in Aquaculture*. Transworld Research Network, Kerala, India, pp. 149–201.
- Austin, B., Austin, D.A., 2007. *Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish*. Springer-Praxis books, Springer Netherlands 552 pages.
- Bakopoulos, V., Adams, A., Richards, R.H., 1995. Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece and comparison with strains from Japan, France and Italy. *J. Fish Dis.* 18, 1–7.
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Adams, A., Galeotti, M., Richards, R.H., 1997a. Qualitative differences in the immune response of rabbit, mouse and sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L. 1758), to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, the causative agent of fish Pasteurellosis. *Fish Shellfish Immunol.* 7, 161–174.
- Bakopoulos, V., Adams, A., Richards, R.H., 1997b. The effect of iron limitation growth conditions on the cell and extracellular components of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *J. Fish Dis.* 20 (4), 297–305.
- Bakopoulos, V., Adams, A., Richards, R.H., 1997c. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Pasteurella piscicida*, the causative agent of fish pasteurellosis. *J. Fish Dis.* 20 (4), 307–315.
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Gusmani, L., Galeotti, M., Adams, A., Dimitriadis, G.J., 2003. Vaccination trials of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L. 1758), against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* using novel vaccine mixtures. *J. Fish Dis.* 26 (2), 77–90.
- Bakopoulos, V., Nikolau, I., Kaloyirna, N., Aminaki, E., Koldoris, G., Spiros, E., 2015a. Prevention of fish photobacteriosis. Comparison of the efficacy of intraperitoneally administered commercial and experimental vaccines. *Mediterr. Mar. Sci.* 16 (2), 385–392.
- Bakopoulos, V., Nikolau, I., Laopa, E., Kosma, I., Spiros, E., 2015b. Humoral response of sea bass *Dicentrarchus labrax* L. after intraperitoneal immunization with commercial and experimental vaccines. 11th Panhellenic Symposium of Oceanography and Fisheries, 13–17 May 2015, Mytilene, Lesvos, Greece.
- Cochran, G.W., Cox, M.G., 1953. *Experimental Designs*. John Wiley & Sons, INC (pages 47–48 & 74–75).
- Conradacier, J.L., Pepin, J.F., Fauvel, C., Legall, P., Bourmaud, A.F., Romet and, B., 1997. Alterations in total protein, IgM and specific antibody activity of male and female sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) sera following injection with killed *Vibrio anguillarum*. *Fish Shellfish Immunol.* 7, 151–160.
- R Core Team, 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria URL: <https://www.R-project.org/>.
- Cox, D.R., 1972. Regression models and life tables. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 34, 187–220.
- Dec, C., Angelidis, P., Baudin-Laurencin, F., 1990. Effects of oral vaccination against Vibriosis in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), and sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L. 1758). *J. Fish Dis.* 13 (5), 369–376.
- Ellis, A.E., 1988. *Fish vaccination*. Academic Press, London 255 pages.
- Fleisher, T.C., White, A., 1973. Antibody production in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.) after oral parenteral immunization with *Vibrio anguillarum* antigens. *Aquaculture* 1, 417–428.
- Galeotti, M., Romano, N., Volpatti, D., Balfano, C., Brunetti, A., Tiscar, P.G., Mosca, F., Bertoni, F., Marchetti, M.G., Abelli, L., 2013. Innovative vaccination protocol against vibriosis in *Dicentrarchus labrax* (L. 1758) juveniles: improvement of immune parameters and protection to challenge. *Vaccine* 31, 1224–1230.
- Gavringsen, K., Thorarinnsson, R., Johansen, L.H., Nissen, B., Håkardson, K.S., et al., 1998. Bivalent vaccines for sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) against vibriosis and pasteurellosis. *J. Appl. Ichthyol.* 14, 159–162.
- Gavringsen, K., Sakai, M., Mishiba, T., Fujimoto, T., 2008. The efficacy and safety of an oil based vaccine against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): a field study. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 523–529.
- Larsen, J.L., 1983. *Vibrio anguillarum*: influence of temperature, pH, NaCl concentration and incubation time on growth. *J. Appl. Bacteriol.* 57, 237–246.
- Le Breton, A.D., 1999. Mediterranean finfish pathologies: present status and new developments in prophylactic methods. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 19, 250–253.
- Le Breton, A.D., 2009. Vaccines in Mediterranean aquaculture: practice and needs. In: Rodgers, C., Basurco, B. (Eds.), *The Use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture* Options Méd., Series A 86. CIHEAM, Zaragoza, Spain, pp. 147–154.
- Lund, V., Arnesen, J.A., Coucheron, D., Modalsli, K., Syversten, C., 2003. The *Aeromonas salmonicida* A-layer protein is an important protective antigen in oil-adjuvanted vaccines. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 367–372.
- Magarinos, B., Noya, M., Romalde, J.L., Perez, G., Toranzo, A.E., 1992. Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (10), 3316–3322.
- Magarinos, B., Noya, M., Romalde, J.L., Perez, G., Toranzo, A.E., 1994a. Influence of fish size and vaccine formulation on the protection of gilthead seabream against *Pasteurella piscicida*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 14, 120–122.
- Magarinos, B., Romalde, J.L., Santos, Y., Casal, J.F., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1994b. Vaccination trials on gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L. 1758) against *Pasteurella piscicida*. *Aquaculture* 120, 207–208.
- Magarinos, B., Couso, N., Noya, M., Mirino, P., Toranzo, A.E., Leraux, J., 2001. Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 195, 17–21.
- Mutoboki, S., Alexandersen, S., Gavringsen, K., Evensen, D., 2008. Time-course study of injection site inflammatory reactions following intraperitoneal injection of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) with oil-adjuvanted vaccines. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 386–393.
- Nakai, T., Fujise, N., Maroga, K., Arimoto, M., Mizuta, Y., Matsuoaka, S., 1992. *Pasteurella piscicida* infection in hatchery reared juvenile striped jack. *Gyobyo Kenkyu* 27, 103–108.
- Ninomiya, M., Muraoka, A., Kusuda, R., 1989. Effect of immersion vaccination of cultured yellowtail with a ribosomal vaccine prepared from *Pasteurella piscicida*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55, 1773–1776.
- Paspatis, M., Batarais, C., Tsangos, P., Kentouri, M., 1999. Feeding and growth response of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) reared by four feeding methods. *Aquaculture* 175, 293–305.
- Person-Le Ruyet, J., Mahé, K., Le Bayon, N., Le Delliou, H., 2004. Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 237 (1–4), 269–280.
- Romalde, J.L., 2014. Vaccination against Photobacteriosis. In: Gadding, R., Lillehaug, A., Evensen, Ø. (Eds.), *Fish Vaccination*, Chapter 17. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 200–210.
- Schroder, M.B., Mikkelsen, H., Børstl, S., Gavringsen, K., Lund, V., 2006. Early vaccination and protection of Atlantic cod (*Gadus morhua*, L. 1758) juveniles against classical vibriosis. *Aquaculture* 254, 46–53.
- Sorenst, U.B., Larsen, J.L., 1986. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 (3), 593–597.
- Therneau, T., 2015. A Package for Survival Analysis in S, Version 2.38. URL: <http://CRAN.Rproject.org/package=survival>.
- Therneau, T.M., Grambsch, P.M., 2000. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. Springer, New York (ISBN 0-387-98784-3).
- Toranzo, A.E., Barja, J.L., 1990. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum* with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis. Aquat. Org.* 9, 73–82.
- Viale, I., Cubadda, C., Angelacci, G., Salati, F., 2006. Immunization of European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* L. 1758. Fingerlings with a commercial vaccine against vibriosis. *J. Appl. Aquac.* 18 (3), 53–67.
- Woo, P.T.K., Bruno, D.W., 1999. *Fish Diseases and Disorders*, Vol. 3. Viral, Bacterial and Fungal Infections. CAB International, Wallingford, UK, p. 523.
- Zar, H.J., 2010. *Biostatistical Analysis*, fifth ed. Pearson Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA.

**Εργασίες που ανακοινώθηκαν σε Διεθνή Επιστημονικά Συνέδρια με κριτές
Hydromedit 2014, 2nd International Congress of Applied Ichthyology & Aquatic
Environment Noveber 13-15, Volos, Greece**

**ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΔΥΟ ΕΝΕΣΙΜΩΝ ΔΙΔΥΝΑΜΩΝ ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ ΕΜΒΟΛΙΩΝ (*VIBRIO-
PHOTOBACTERIUM*) ΣΕ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΑ ΛΑΒΡΑΚΙΑ (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) ΜΕ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ**

Σπίνος Ε.^{1,2*}, Μπακόπουλος Β.¹

¹ Τμήμα Επιστημών της Θάλασσας, Σχολή Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Λόφος Πανεπιστημίου, 811 00 Μυτιλήνη Λέσβος, Ελλάδα.

² Τμήμα Αλιείας, Δ/ση Αγροτικής Οικονομίας & Κτηνιατρικής, Περιφερειακή Ενότητα Κεφαλληνίας, Διοικητήριο, 281 00 Αργοστόλι Κεφαλονιά, Ελλάδα.

Περίληψη

Τον Ιούλιο 2013 ξεκίνησε μελέτη σύγκρισης δύο ενέσιμων διδύναμων (*Vibrio - Photobacterium*) εμπορικών εμβολίων σε συνθήκες εκτροφής λαβρακιού, σε συνεργασία με μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας στην ΒΑ Κεφαλονιά. Η παρούσα μελέτη έχει στόχο να αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα, στο πεδίο και με πειραματικές μολύνσεις, δύο ενέσιμων διδύναμων (*Vibrio-Photobacterium*) εμπορικά διαθέσιμων εμβολίων στην Ελλάδα, έναντι των ασθενειών που προκαλούνται, από τους παθογόνους παράγοντες *Vibrio anguillarum* O1 και *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, στο λαβράκι. Από τα αποτελέσματα των πειραματικών μολύνσεων όπου δίνονται η % αθροιστική θνησιμότητα και η τυπική απόκλιση, καθώς και η τιμή RPS, φαίνεται ότι το ελαιώδες εμβόλιο AlphaJect 2000, παρέχει μεγαλύτερη προστασία στα ψάρια που εμβολιάστηκαν με αυτό, σε σχέση με τα ψάρια που εμβολιάστηκαν με το υδατοδιαλυτό εμβόλιο Aquavac και σε σχέση με τα ανεμβολίαστα ψάρια (μάρτυρες).

Λέξεις κλειδιά: *Dicentrarchus labrax*, *Vibrio anguillarum* O1, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

*Συγγραφέας επικοινωνίας: Σπίνος Ευθύμιος (e.spinos@marine.aegean.gr)

**COMPARISON OF TWO INJECTABLE BIVALENT COMMERCIAL VACCINES (*VIBRIO-
PHOTOBACTERIUM*) IN CULTURED SEA BASS (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) WITH
EXPERIMENTAL INFECTIONS**

Spinos E.^{1,2*}, Bakopoulos V.¹

¹ Department of Marine Sciences, School of the Environment, University of Aegean, University Hill, 811 00 Mytilene Lesvos, Greece.

² Department of Fisheries, Directorate of Rural Economy and Veterinary, Regional Unit of Kefalonia, Residency, 281 00 Argostoli Kefalonia, Greece.

Abstract

In July 2013, a study comparing two injectable bivalent (*Vibrio-Photobacterium*) commercial vaccines in field conditions in sea bass was launched, in collaboration with a farm in NE Kefalonia. This study aims to assess the efficacy in the field and after experimental infections of two injectable bivalent (*Vibrio-Photobacterium*) vaccines commercially available in Greece, against the diseases caused by the pathogens *Vibrio anguillarum* O1 and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, in sea bass. From the results of the experimental infections that show % cumulative mortality and standard deviation, and the RPS value, seems that the oil-adjuvanted vaccine AlphaJect 2000 confers greater protection compared to the fish vaccinated with the aqueous vaccine AquaVac and to non-vaccinated fish (controls).

Key words: *Dicentrarchus labrax*, *Vibrio anguillarum* O1, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

*Corresponding author: Spinios Efthimios (e.spinos@marine.aegean.gr)

1. Εισαγωγή

Η εντατικοποίηση της εκτροφής υδρόβιων οργανισμών έχει οδηγήσει στην εμφάνιση ιογενών βακτηριακών και παρασιτικών ασθενειών των ψαριών (Athanasopoulou & Bitchava 2010). Οι πιο σημαντικές βακτηριακές ασθένειες είναι η δονακίωση και η παστερέλλωση που προκαλείται από τα Gram (-) βακτηρίδια *Listonella anguillarum* (πρώην *Vibrio anguillarum*) διάφοροι ορότυποι (Sorensen & Larsen 1986, Toranzo & Barja 1990) και *Photobacterium damsela subsp. piscicida* (Bakopoulos *etal.* 1995), αντίστοιχα. Από τις πρώτες περιγραφές των δύο ασθενειών, τα δύο παθογόνα έχουν γίνει ενδημικά στο θαλάσσιο περιβάλλον και επηρεάζουν τόσο άγρια όσο και εκτρεφόμενα ψάρια, γεγονός που καθιστά αδύνατη την εφαρμογή οποιουδήποτε προγράμματος εξάλειψης. Από τα εκτρεφόμενα ψάρια, το λαβράκι το οποίο είναι πολύ πιο ευαίσθητο από την τσιπούρα (Athanasopoulou & Bitchava 2010), προστατεύεται σε κάποιο βαθμό από τον εμβολιασμό και τη διατήρηση καλών συνθηκών εκτροφής και διαχείρισης.

Ο εμβολιασμός εκατομμυρίων ψαριών στις υδατοκαλλιέργειες είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει υψηλό κόστος εργατικών, μεγάλη διάρκεια, με απώλειες ψαριών που οφείλονται στο stress και στους τραυματισμούς, ειδικά όταν τα εμβόλια χορηγούνται σε κάθε ψάρι ενδοπεριτοναϊκά (ip). Συνήθως, ο πρώτος εμβολιασμός πραγματοποιείται με εμβάπτιση σε εναίωρημα που περιέχει το εμβόλιο όταν το μέγεθος των ψαριών είναι 1-2g και ο δεύτερος εμβολιασμός πραγματοποιείται ενδοπεριτοναϊκά (ip) όταν τα ψάρια φθάσουν 20-25g. Τροποποιήσεις αυτού του βασικού πρωτοκόλλου παρατηρούνται μεταξύ των εταιρειών και συνδέονται με το σχέδιο διαχείρισης που εφαρμόζεται. Ο εμβολιασμός με εμβάπτιση οδηγεί κυρίως στην ανάπτυξη τοπικής ανοσίας στα επιθήλια (Thornton *etal.* 1994, Kusuda & Hamaguchi 1987), σε αντίθεση με τον ενδοπεριτοναϊκό εμβολιασμό (ip) που οδηγεί στην ανάπτυξη συστηματικής ανοσίας (Hjeltneset *etal.* 1989, Bakopoulos *etal.* 2003). Εμπορικά εμβόλια (που αποτελούνται από απενεργοποιημένα στελέχη βακτηρίων) έναντι της δονακίωσης ή της παστερέλλωσης, είναι διαθέσιμα εδώ και αρκετό καιρό με καλή προστασία κατά της δονακίωσης (Woo & Bruno, 1999) και ποικίλα αποτελέσματα σχετικά με την παστερέλλωση, (Nakai *etal.* 1992, Le Breton 1999). Διδύναμα εμβόλια είναι επίσης διαθέσιμα στο εμπόριο και είναι ένα μίγμα των μονοδύναμων εμβολίων και προσφέρουν το πλεονέκτημα της εφαρμογής ενός εμβολιασμού έναντι και των δύο ασθενειών. Επειδή οι πληροφορίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα αυτών των εμβολίων είναι σπάνιες ή ασαφείς, η μελέτη αυτή έχει ως στόχο τη αξιολόγηση των δύο εμπορικά διαθέσιμων διδύναμων εμβολίων από την άποψη της προστασίας των εμβολιασμένων ψαριών έναντι της δονακίωσης και της παστερέλλωσης, σε πραγματικές και πειραματικές συνθήκες.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Η μελέτη ξεκίνησε τον Ιούλιο του 2013 σε μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας στη ΒΑ Κεφαλονιά σε έξι (6) ιχθυοκλωβούς που περιείχαν περίπου 34.000 ψάρια (λαβράκια) / κλωβί μέσου βάρους 33g. Από το σύνολο του υπό μελέτη πληθυσμού ψαριών, εμβολιάστηκαν ενδοπεριτοναϊκά (ip) ψάρια δύο κλωβών με το ελαιώδες εμβόλιο AlphaJect 2000, ψάρια δύο κλωβών με το υδατοδιαλυτό εμβόλιο AquaVac και σε δύο κλωβούς τα ψάρια παρέμειναν ανεμβολίαστα έτσι ώστε να χρησιμεύσουν ως μάρτυρες. Και τα δύο εμπορικά εμβόλια ήταν διδύναμα (περιέχουν παρόμοιες ποσότητες αδρανικοποιημένων βακτηριακών κύτταρων των παθογόνων *Vibrio anguillarum* O1 και *Photobacterium damsela subsp. piscicida*) και ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε ενδοπεριτοναϊκά (ip) ακολουθώντας τις οδηγίες των παρασκευαστών των εμβολίων. Για την υλοποίηση της μελέτης σε πειραματικές συνθήκες, σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά τον εμβολιασμό, ψάρια από κάθε πειραματική ομάδα μεταφέρθηκαν από την υπό μελέτη μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας και τοποθετήθηκαν σε γυάλινα ενυδρεία χωρητικότητας 250 L το καθένα. Μετά τον εγκλιματισμό τους, τα ψάρια μολύνθηκαν με έγχυση (ip) με βακτηριακά κύτταρα είτε του *Vibrio anguillarum* O1 ή του *Photobacterium damsela subsp. piscicida*, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε συνήθη στερεά υλικά καλλιέργειας. Ο αριθμός των παθογόνων βακτηριακών κυττάρων προσδιορίστηκε φωτομετρικά και για κάθε πειραματική μόλυνση καθορίστηκε η δοσολογία ανάλογα με το μέγεθος των ψαριών και τη θερμοκρασία του νερού. Μετά την πειραματική μόλυνση τα ψάρια ανά ομάδα τοποθετήθηκαν τυχαία σε τρία ενυδρεία και παρακολουθούνταν καθημερινά τα συμπτώματα της ασθένειας, η θνησιμότητα και οι φυσικοχημικές παράμετροι του νερού. Κάθε πείραμα ολοκληρωνόταν όταν δεν καταγραφόταν θνησιμότητα για δύο συνεχόμενες ημέρες. Τα 2/3 του νερού ανανεώνονταν κάθε μέρα για να αποφευχθεί η συσσώρευση τοξικών ουσιών ή η ανάπτυξη μικροβίων στο νερό. Τα ψάρια που συμμετείχαν στα πειράματα τρέφονταν ελάχιστα. Από τα ετοιμοθάνατα ψάρια λαμβάνονταν δείγματα για μικροβιολογική επιβεβαίωση της αιτίας της νόσου. Η μεταφορά, οι χειρισμοί και η πειραματική μόλυνση των ψαριών γινόταν κάτω από νάρκωση με τη χρήση φαινοξυαιθανόλης.

Η προστασία που παρέχεται από τα εμπορικά εμβόλια αξιολογήθηκε με τον υπολογισμό του σχετικού ποσοστού επιβίωσης (Relative Percent Survival-RPS) με την ακόλουθη εξίσωση:

$$RPS = \left[1 - \frac{\% \text{ θνησιμότητα εμβολιασμένων ψαριών}}{\% \text{ θνησιμότητα μη εμβολιασμένων ψαριών}} \right] \times 100$$

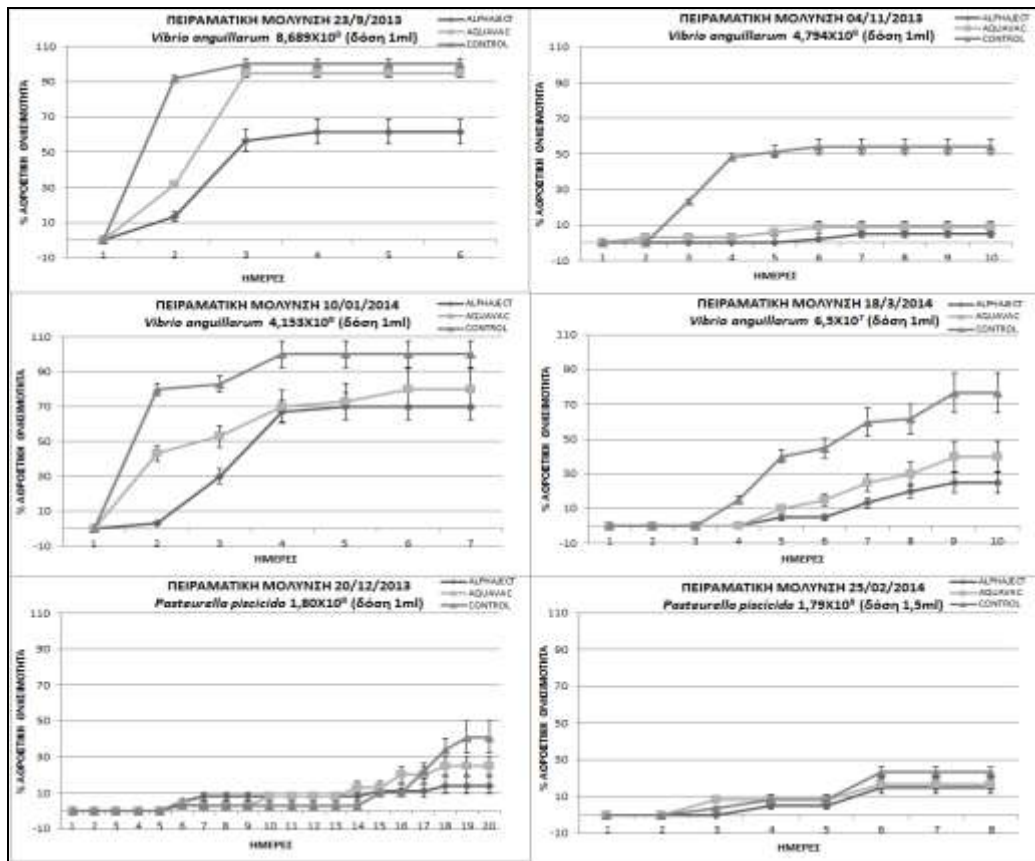
3. Αποτελέσματα

Στον Πίνακα 1, παρουσιάζονται ο αριθμός των ιχθύων και οι ομάδες που συμμετείχαν στις πειραματικές μολύνσεις, ο αριθμός των νεκρών ψαριών, η % θνησιμότητα και οι τιμές RPS ανά πείραμα. Στις γραφικές παραστάσεις στο Σχήμα 1 δίνεται η % αθροιστική θνησιμότητα και η τυπική απόκλιση των έξι πειραμάτων που διεξήχθησαν. Σε όλες τις περιπτώσεις, το εμβόλιο AlphaJect 2000 φαίνεται ότι παρέχει μεγαλύτερη προστασία ανεξάρτητα από το παθογόνο που χρησιμοποιείται και την βακτηριακή πίεση που εφαρμόζεται στα ψάρια σε σύγκριση με τα ψάρια που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο AquaVac.

Πίνακας 1. Πειραματικές μολύνσεις, ημερομηνία, παθογόνος οργανισμός, αριθμός ψαριών, απώλειες, % θνησιμότητα και σχετικό ποσοστό επιβίωσης (RPS), ανά ομάδα ψαριών.

ΠΕΙΡΑΜΑ	ΟΜΑΔΑ ΨΑΡΙΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΨΑΡΙΩΝ	ΑΠΩΛΕΙΕΣ	% ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ	ΤΙΜΗ RPS
23/9/2013 VIBRIO	Control	60	60	100	-
4 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ T°C=23,5±0,5	AlphaJect 2000	60	37	62	38
	AquaVac	60	46	77	23
4/11/2013 VIBRIO	Control	60	33	55	-
9 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ T°C=19,0±0,8	AlphaJect 2000	60	3	5	90,9
	AquaVac	60	6	10	81,8
20/12/2013 PHOTOBACTERIUM	Control	60	24	40	-
19 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ T°C=13,4±1,1	AlphaJect 2000	60	9	15	62,5
	AquaVac	60	15	25	37,5
10/1/2014 VIBRIO	Control	60	60	100	-
22 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ T°C=14,8±0,8	AlphaJect 2000	60	42	70	30
	AquaVac	60	54	90	10
25/2/2014 PHOTOBACTERIUM	Control	60	14	23	-
28 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ T°C=13,0±1,0	AlphaJect 2000	60	9	15	35
	AquaVac	60	10	16	26
18/3/2014 VIBRIO	Control	60	46	77	-
30 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ T°C=15,5±1,5	AlphaJect 2000	60	15	25	67,6
	AquaVac	60	24	40	48,1

Στα ψάρια που πέθαναν από την πειραματική μόλυνση, τα συμπτώματα που παρατηρήθηκαν ήταν ερυθρότητα του στόματος, έλκη στο σώμα και ερυθρότητα και προοδευτική αλλοίωση του ουραίου περυγίου. Εσωτερικά, τα ψάρια που πέθαναν από δονακίωση έδειξαν διόγκωση των οργάνων και αιμορραγίες ενώ παρόμοια διόγκωση και περιστασιακά υπόλευκα οζίδια παρατηρήθηκαν στον σπλήνα των ψαριών που πέθαναν από παστερέλλωση. Τα μη εμβολιασμένα ψάρια ήταν σε πολύ χειρότερη κατάσταση από ό,τι τα εμβολιασμένα ψάρια σε όλες τις περιπτώσεις. Από την αρχή μέχρι το τέλος της μελέτης δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα δονακίωσης ή παστερέλλωσης στα ψάρια της υπό μελέτη μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας στο φυσικό περιβάλλον.



Σχήμα 1. Αθροιστική % θνησιμότητα και τυπική απόκλιση για κάθε πειραματική μόλυνση.

4. Συζήτηση

Στη θαλασσοκαλλιέργεια στην Ελλάδα, προκειμένου να μειωθεί η θνησιμότητα σε εκτρεφόμενα ψάρια που προκαλείται κυρίως από τα παθογόνα βακτήρια *L. anguillarum* και *P. damsela subsp. piscicida*, θα πρέπει να εφαρμόζεται εμβολιασμός με εμφύσηση των μικρών ψαριών και ενδοπεριτοναϊκά (ip) σε μεγαλύτερα ψάρια. Αν και υπάρχουν προηγούμενες μελέτες σχετικά με την αποτελεσματικότητα της προστασίας που επιτυγχάνεται μετά από εμβολιασμό με μονοσθενή εμβόλια έναντι του *L. anguillarum* (Viale *et al.* 2006 & Galeotti *et al.* 2013) ή έναντι του *P. damsela subsp. piscicida* (Magarinos *et al.* 1994a & 1994b), υπάρχουν λίγες πληροφορίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα της προστασίας, όταν τα ψάρια εμβολιάζονται με διδύναμα εμβόλια κατά των δύο παθογόνων. Η προστασία μετά τον εμβολιασμό κατά του *L. anguillarum* φέρεται να είναι αποτελεσματική (Αθανασοπούλου & Bitchava 2010 & Galeotti *et al.* 2013). Σε αντίθεση, η προστασία μετά τον εμβολιασμό έναντι του *P. damsela subsp. piscicida* είναι αμφίβολη (Nakai *et al.* 1992 & Le Breton 1999).

Παρομοίως, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η προστασία που επιτυγχάνεται από αυτά τα διδύναμα εμβόλια έναντι μολύνσεων από το *L. anguillarum* O1 ήταν υψηλή και μακράς διάρκειας (ακόμη και 30 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό – 7,5 μήνες) με το εμβόλιο AlphaJect 2000 (που περιέχει ελαιώδες ανοσοενισχυτικό) να είναι πάντοτε καλύτερο σε σύγκριση με το εμβόλιο AquaVac (υδατικό, χωρίς ανοσοενισχυτικό). Τα ποσοστά σχετικής επιβίωσης που υπολογίστηκαν για το εμβόλιο AlphaJect 2000 ήταν πάντοτε υψηλά εκτός των περιπτώσεων όπου εφαρμόστηκε υπερβολική βακτηριακή πίεση (θνησιμότητα 100% στους μάρτυρες). Σε ότι αφορά τις μολύνσεις με το *P. damsela subsp. piscicida*, και πάλι το εμβόλιο AlphaJect 2000 υπήρξε πάντοτε καλύτερο σε σύγκριση με το εμβόλιο AquaVac. Δεκαεννιά (19) εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό (περίπου 5 μήνες) και με μεσαίας έντασης βακτηριακή πίεση (40% θνησιμότητα στους μάρτυρες), υπολογίστηκαν ποσοστά σχετικής επιβίωσης 62,5 και 37,5 για το εμβόλιο AlphaJect 2000 και AquaVac, αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε μία τάση μείωσης του αποτελέσματος του εμβολιασμού και για τα δύο εμβόλια με τη πάροδο του χρόνου. Δυστυχώς, υπάρχει μόνο ένα επιστημονικό άρθρο που διερεύνησε το ίδιο διδύναμο εμβόλιο *Vibrio-Pasteurella*, με ανοσοενισχυτικό ή χωρίς (Gravingen *et al.* 1998). Αν και δεν μπορεί να γίνει απευθείας σύγκριση μεταξύ των δύο μελετών εξαιτίας του πρωτοκόλλου των εμβολίων που χρησιμοποιήθηκαν, το μακροχρόνιο αποτέλεσμα

πάνω στη προστασία των ψαριών έναντι της δονακίωσης είναι παρόμοιοι και στις δύο μελέτες με το εμβόλιο που περιέχει ανοσοενισχυτικό να δρα καλύτερα.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι το διδύναμο (*Vibrio – Pasteurella*) με ελαιώδες ανοσοενισχυτικό εμβόλιο AlphaJect 2000 παρέχει μεγαλύτερη προστασία στα ψάρια που εμβολιάστηκαν με αυτό, σε σχέση με τα ψάρια που εμβολιάστηκαν με το διδύναμο (*Vibrio – Pasteurella*) υδατοδιαλυτό εμβόλιο AquaVac, ανεξαρτήτως του παθογόνου που χρησιμοποιείται για την πειραματική μόλυνση και τη βακτηριακή πίεση.

Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε το Πανεπιστήμιο Αιγαίου για την ανάθεση και τη χρηματοδότηση της μελέτης, τις εταιρείες Aquavet A.E. και Pharmaq A.E. για τη χρηματοδότηση της μελέτης, τη διάθεση των εμβολίων και τους εμβολιασμούς, καθώς και την εταιρεία Ιχθυοκαλλιεργητική Ερύσσου ΕΠΕ για την εφαρμογή των πειραμάτων στη μονάδα της και την προμήθεια των ψαριών που χρειάστηκαν για τα πειράματα.

Βιβλιογραφία

- Athanassopoulou, F. & Bitchava, K. (2010). Main pathological conditions in Mediterranean marine finfish culture. In: "Recent Advances in Aquaculture Research", ed. Koumoundouros G., pp. 149-201, Transworld Research Network, Kerala, India.
- Bakopoulos, V., Adams, A. & Richards, R.H. (1995). Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece and comparison with strains from Japan, France and Italy. *Journal of Fish Diseases* 18, 1-7.
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Gusmani, L., Galeotti, M., Adams, A. & Dimitriadis G.J. (2003). Vaccination trials of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), against *Photobacterium damsela subsp. piscicida*, using novel vaccine mixtures. *Journal of Fish Diseases* 26(2), 77-90.
- Galeotti, M., Romano, N., Volpatti, D., Bulfona, C., Brunetti, A., Tiscar, P. G., Mosca, F., Bertoni, F., Marchetti, M.G. & Abelli, L. (2013). Innovative vaccination protocol against vibriosis in *Dicentrarchus labrax* (L.) juveniles: Improvement of immune parameters and protection to challenge. *Vaccine* 31, 1224-1230.
- Gravningen K, Thorarinnsson R, Johansen LH, Nissen B, Rikardsen KS, Greger E, & Vigneulle M. (1998) Bivalent vaccines for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis and pasteurellosis. *Journal of Applied Ichthyology* 14, 159–162.
- Hjeltneset B., Andersen K. & Ellingsen H.M. (1989). Vaccination against *Vibrio salmonicida*; the effect of different routes of administration and of revaccination. *Aquaculture* 83, 1-6.
- Kusuda R. & Hmaguchi M. (1987). A comparative study on efficacy of immersion and a combination of immersion and oral vaccination methods against pseudotuberculosis in yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53(6), 1005-1008.
- Le Breton, A.D. (1999). Mediterranean finfish pathologies: present status and new developments in prophylactic methods. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 19, 250–253.
- Magarinos B., Noya M., Romalde J.L., Perez G. & Toranzo A.E. (1994a). Influence of fish size and vaccine formulation on the protection of gilthead seabream against *Pasteurella piscicida*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 14, 120–122.
- Magarinos B., Romalde J.L., Santos Y., Casal J.F., Barja J.L. & Toranzo A.E. (1994b). Vaccination trials on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*. *Aquaculture* 120, 201–208.
- Nakai, T., Fujiie, N., Muroga, K., Arimoto, M., Mizuta, Y. & Matsuoka, S. (1992). *Pasteurella piscicida* infection in hatchery reared juvenile striped jack. *Gyobyo Kenkyu* 27, 103–108.
- Sorensen U.B. & Larsen J.L. (1986). Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Applied & Environmental Microbiology* 51(3), 593-597.
- Thornton J.C., Garduno R.A. & Kay W.W. (1994). The development of live vaccines for furunculosis lacking the A-layer and O-antigen of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases* 17(3), 195-204.
- Toranzo, A. E. & Barja, J. L. (1990). A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Disease of Aquatic Organisms* 9, 73.
- Viale, I., Cubadda, C., Angelucci, G. & Salati F. (2006) Immunization of European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* L. 1758, Fingerlings with a Commercial Vaccine Against Vibriosis. *Journal of Applied Aquaculture*, 18(3), 53-67
- Woo, P.T.K. & Bruno, D.W. (1999). *Fish Diseases and Disorders*, Vol. 3, Viral, Bacterial and Fungal infections, CAB International, Wallingford, Oxon, p.523.

**HydroMedit 2018-3d International Congress of Applied Ichthyology & Aquatic Environment
8-11 November 2018 Volos, Greece**

**EFFECTS OF TEMPERATURE AND SALINITY ON OUTBREAKS OF
BACTERIAL DISEASES OF FARMED SEA BASS *DICENTRARCHUS LABRAX*
(LINNAEUS, 1758)**

Spinos E.^{1,2}, Gerakis A.³, Palaiologos A.² & Bakopoulos V.²

¹ Directorate of Rural Economy and Veterinary Science, Regional Unit of Cephalonia, 281 00 Argostoli

² Department of Marine Sciences, University of the Aegean, 811 00 Mytilene

³ Department of Food Technology, TEI of Ionian Islands, 281 00 Argostoli

Abstract

In aquaculture, several environmental parameters are critical in determining susceptibility to disease outbreaks. In this work we recorded, processed and correlated sea water temperature (T °C) and salinity (S‰) during 2011–2015 with outbreaks of the most important bacterial pathogens of sea bass *Dicentrarchus labrax*, i.e., *Listonella anguillarum* (La) and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phdp), in two aquaculture units in the Bay of Argostoli in Cephalonia, Greece. During 2011–2014 we noted that bacterial diseases broke out when water temperature rose above 18 °C in the summer months. In the interval January–May 2015 we noted only La outbreaks, albeit with low mortality rate (1.5–1.8%); from mid-summer to mid-autumn 2015, we noted outbreaks of Phdp along with viral encephalopathy and retinopathy (VER). Based on the relation between bacterial disease outbreaks, water temperature and salinity we identified that mostly water temperature and to some degree salinity influence disease outbreaks among farmed sea bass in the Bay of Argostoli.

Keywords: Bay of Argostoli, Cephalonia, *Photobacterium*, *Vibrio*

*Corresponding author: Spinios Efthimios (e.spinios@marine.aegean.gr)

1. Introduction

Intensive aquaculture has led to outbreaks of viral, bacterial and parasitic fish diseases. The most important bacterial diseases are *Listonella anguillarum* (La) serotype O1 and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phdp). Since the two diseases were first described, they have become endemic to the marine environment and infect wild as well as farmed fish, which renders eradication programs difficult. Among farmed species, sea bass can be somewhat safeguarded by vaccinations and good farming and management practices (Spinios & Bakopoulos 2014). Every microorganism exhibits an optimum temperature for metabolism and reproduction. With respect to temperature preference, there are three main types of microorganisms: Psychrophiles, favouring a range of 4–25 °C (such as the bacteria La and Phdp), mesophiles, favouring a range of 25–40 °C, and thermophiles, favouring a range of 40–65 °C. Nonetheless, this categorisation is not very precise with respect to all aquatic microorganisms. For example, there are psychrotroph microorganisms, i.e., mesophiles, yet they can reproduce, albeit slower, at low temperatures (Papapetropoulou & Mavridou, 1995).

A recent study among aquaculture operations in the Bay of Argostoli found that at two locations termed South (A) and North (B), sea water temperature conforms to the typical seasonal variation in temperate seas of the Northern hemisphere, with a maximum in July-August and a minimum in February (Katselis et al. 2013). Oxygen consumption and ammonia excretion from sea bass depends on temperature and food intake, as is generally true for fish. Oxygen consumption about doubles at 25 °C compared to 15 °C. The mean daily rate of ammonia excretion about triples at 25 °C compared to 13 °C. There is an exponential relationship between nitrogen excretion and nutrition and temperature (Katselis et al. 2013). Sea bass weighing 25–325 g prefers to feed at 17 °C (Person-Le Ruyet et al. 2004). Tidal fluctuations, intense rainfall or other fresh water influx, wind intensity and direction, as well as frequent diurnal variations in temperature limit the metabolism of juvenile sea bass (Dalla Via et al. 1998). Temperature and salinity also affect melatonin (Mel), a hormone produced in the pineal gland of sea bass that regulates food intake, mobility, metabolism, and reproduction (López-Olmeda et al.

2009). Salinity is important for survival, metabolism, physiology and development of aquatic organisms and their internal chemical processes (Fytianos 1996).

The objective of this work is to relate mean daily temperature and mean daily salinity of sea water with outbreaks of the main bacterial diseases (La and Phdp) that affect aquaculture operations in the Bay of Argostoli.

2. Material and Methods

The study area was the Gulf of Argostoli where aquaculture units produce sea bass, sea bream and meagre. The Bay is oblong with an opening to the south 2.9 km wide connecting it to the Ionian Sea. Maximum depth is about 25 m. Along the western and northern coastline the bottom exhibits a smooth gradient. Along the eastern coastline, where the aquaculture operations are located, the bottom exhibits a sharp gradient. In this study we collected data on sea water temperature and salinity from aquaculture units at two locations within the Bay, South (A) and North (B).

From January 2011 to December 2015 we recorded daily values of sea water temperature and salinity via portable digital instruments. After processing and analyzing the data, we related them with La and Phdp outbreaks. Data on disease outbreaks, fish mortality rates and vaccinations were provided by the firm that operates the two aquaculture units. Mortality was recorded as cumulative per annum.

The fish pathogens were diagnosed at specialized and certified fish pathology labs via microbial and biochemical analyses of infected samples. The results of the analyses were supplied by the firm that operates the two aquaculture units.

3. Results

In Table 1 presents data from La and Phdp outbreaks. With respect to the cumulative mortality at the two locations, evidently it was higher at location A. From 14/08/2015 to 09/11/2015, mortality due to viral encephalopathy (Noda)-VER and Phdp at either location was estimated using a ratio of one Noda case to three cases of Phdp. Both diseases broke out simultaneously.

Table 1. Timing of disease outbreaks at aquaculture units at locations A and B in the bay of Argostoli.

Interval	Disease	Cumulative annual	Cumulative annual
		mortality at location A (%)	mortality at location B (%)
01/06–31/08/2011	Phdp	7.0	3.3
01/06–31/07/2012	Phdp	8.0	1.0
01–31/07/2013	Phdp/La	15.0	7.0
01–31/07/2014	Phdp/La	7.0	3.0
01/01–31/05/2015	La	1.5	1.8
14/08–09/11/2015	Phdp	13.3	3.6

The seasonal variability in temperature and salinity was fairly standard for the study area. Temperature ranged from a February low of 12 °C to an August high of 27 °C. The seasonal variation in salinity was normal for sea water (38.2–39.9‰). From Figure 1, it is evident that bacterial diseases break out when water temperature rises above ca. 18 °C at the same time that salinity rises. Temperature seems to exhibit regular and pronounced seasonal variability during the five years of study, in accordance to the temperature standards for the region and for temperate Mediterranean ecosystems in general (Katselis et al. 2013). Notwithstanding other factors such as currents, water depth, influx of cold water from subterranean springs in the eastern part of the

Bay, and management practices, temperature seems to be a major factor that affects bacterial diseases outbreaks of farmed sea bass. Salinity also exhibits seasonal variability during the five years of study, albeit not as pronounced.

An examination of elevated temperatures, particularly above 18 °C, along with the associated increase in salinity and outbreaks of bacterial diseases reveals that that in 2011 and 2012 disease outbreaks lasted longer, albeit with lower mortality rates, whereas in 2013 and 2014 disease outbreaks lasted less, albeit with higher mortality rates. In 2015, the La outbreak lasted from mid-winter to end of spring, while the values of the studied parameters gradually increased from a minimum, yet mortality appeared very low (1.5% and 1.8% at the two locations, respectively). From the end of summer to mid-autumn we observed an outbreak of VER followed by a late outbreak of Phdp, possibly due in part to the weakening of the fish immune system effected by the virus.

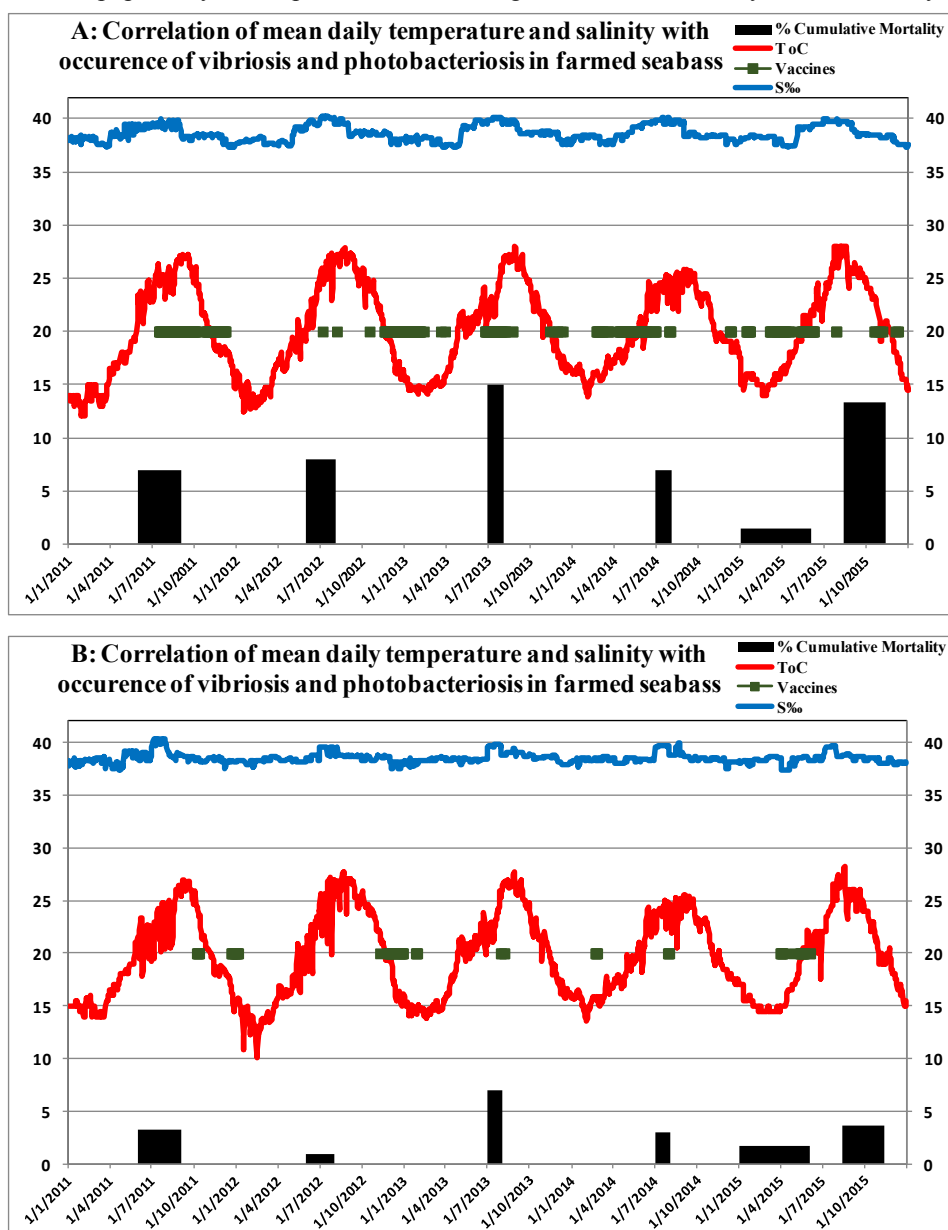


Figure 1. Graphs that relate mean daily sea temperature and salinity with the diseases La and Phdp among farmed sea bass (disease outbreaks and associated cumulative mortality rate) and vaccinations at the aquaculture units at locations A and B in the Bay of Argostoli during 2011–2015.

Throughout the study period (2011–2015) both aquaculture units had their fish populations vaccinated, especially following disease outbreaks. Vaccination dates are noted with green dots in Fig. 1. Combination vaccines against both bacterial diseases were injected.

At location A the bottom is deeper by 4 m, composed of harder substrate in places and mostly sandy,

whereas at location B the bottom is predominantly silty and the currents are stronger (Conides et al. 2006). Location B is more influenced by human activity due to its proximity to the ports of Argostoli and Lixouri. Location B evidenced lower mortality due to disease, possibly because it has lower fish capacity and larger mean fish size compared to location A; cumulative mortality rate does not exceed 15% and in most cases is very low, which confirms the positive effect of vaccinations against both La and Phdp.

In conclusion, it seems that sea water temperature and salinity are parameters that influence disease outbreaks in both aquaculture units studied, with temperature exhibiting a stronger influence on susceptibility to disease. Vaccinations of fish populations and good management practices contribute to suppression of bacterial disease. We propose that the aforementioned parameters are continuously monitored, that more data sets are generated, and comparisons are made with other regions of Greece in order to arrive at definite conclusions that will bear significance to the future of the aquaculture industry.

Acknowledgements

We thank Kefalonia Fisheries for supplying data for this study. This work is part of the doctoral dissertation of the senior author, currently in progress at the Department of Marine Sciences of the University of the Aegean.

References

- Conides A., Kougioufas P., Glykokokalos S., Asimakopoulou G., Konstantinopoulou A. & Pavlidou A. (2006). Investigation of eutrophic conditions of the Argostoli Gulf of Kefallinia in relation to the fish farming activities. Expert opinion no 148118/1-2-2006 NCMR, pp. 5, 8-26, 28, 34, 40, 44-45.
- Dalla Via J., Villani P., Gasteiger E., Niederstatter H. (1998). Oxygen consumption in sea bass fingerling *Dicentrarchus labrax* exposed to acute salinity and temperature changes: metabolic basis for maximum stocking density estimations. *Aquaculture* (1998), 169:303-313.
- Fytianos K. (1996). *The pollution of the Seas*, 2nd Edition, pp 71-74, 84.
- Katselis G., Ramfos A., Avramides P., Poulos K. (2013). Technical Report entitled: "Analysis of the physicochemical, sediment and biological parameters to be established Organized Aquaculture Development Areas of Kefalonia island (Gulf of Argostoli)" Phase I, p. 36-48.
- López-Olmeda J.F., Oliveira C., Kalamariz H., Kulczykowska E., Delgado M.J., Sánchez-Vázquez F.J., (2009). Effects of water salinity on melatonin levels in plasma and peripheral tissues and on melatonin binding sites in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology* (2009). Part A, 152:486-490.
- Papapetropoulou & Mavridou, 1995. Paper "Microbiology of the Aquatic Environment-Basic Principles". "Kostaraki" Publications, P. Travlos-E. Kostarakis OE. Pages 20-31.
- Person-Le Ruyet J., Mahé K., Le Bayon N. & Le Delliou H., (2004). Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 237(1-4):269-280.
- Spinis E. & Bakopoulos V. (2014). Comparison of two injectable bivalent commercial vaccines (anti-Vibrio-Photobacterium) in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758). 1st International Congress of Applied Ichthyology & Aquatic Environment-HydroMedit 2014. November 13-15, Volos, Greece.
- Spinis Efthimios, Bakopoulos Vasileios, (2016). Correlation of temperature and the occurrence of diseases in farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) in the Gulf of Argostoli Kefalonia. 16th Panhellenic Ichthyologists Conference, Kavala 6-9/10/2016.

**HydroMedit 2018-3d International Congress of Applied Ichthyology & Aquatic Environment
8-11 November 2018 Volos, Greece**

**MICROBIOLOGICAL STUDY IN AQUACULTURE FARMS OF ARGOSTOLI
GULF**

Spinos E.^{1,3}, Ramfos A.², Poulos K.², Bakopoulos V.³, Palaiologos A.³, Katselis G.²

¹ Directorate of Rural Economy and Veterinary Science, Regional Unit of Cephalonia, 281 00 Argostoli

² Department of Aquaculture and Fisheries Technology, TEI Western Greece, 302 00 Mesolochi

³ Department of Marine Sciences, University of the Aegean, 811 00 Mytilene

Abstract

This study was conducted in the Argostoli Gulf and examined microbiological factors and the microbiological state of seawater. Several anthropogenic activities occur in the study area, and there are 2 aquaculture units located on the eastern side of the Gulf. From 2004-2006 a study of the impact of the units was carried out and 8 samples were taken at 3 stations and a microbiological study was also carried out in 2013. The microbiological analyses of 2004-2006 showed that in all sea water samples from the floating cages the number of total coliform bacteria, *E. coli* and fecal streptococci was less than that defined as the desired limit. The measurements showed that there is no microbial contamination in the Argostoli Gulf. Analysis of microbiological parameters in 2013 have shown that enterococci values were within the desired limits for drinking water, total coliforms were slightly higher than the limits for drinking water limits and at lower levels for shellfish aquaculture water.

Keywords: *Marine microorganisms, aquaculture, Cephalonia.*

*Corresponding author: Spinou Eftimios (e.spinou@marine.aegean.gr)

1. Introduction

The aim of the present study is to study microbiological factors of the Argostoli bay and to record its microbiological status. Sea water contains a large number of micro-organisms, most of which are part of its

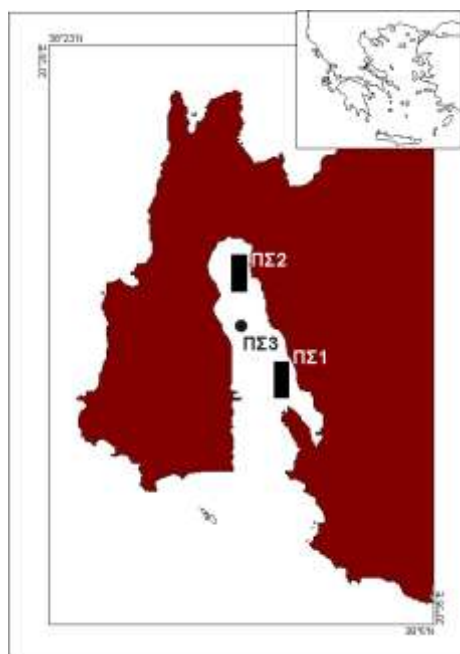


Figure 1 Study area and sampling stations 2004-2006.

natural flora. Others end up in the water through natural phenomena (rains, landslides, etc.) and others through human activities (waste, urban wastewater etc)

(Papapetropoulou & Mavridou, 1995).

The Argostoli Gulf is 13.5 km long on the north-south axis and average width 2.8 km (figure 1) and communicates with the Ionian Sea in its southern part through a 2.9km wide aperture. Along the western and northern



Figure 2 Water sampling locations (red circles, S1-S2 (Σ1-Σ3) of the Gulf of Argostoli for the year 2013. With yellow box the areas where fish fattening units are operating.

coastline the bottom is mildly tilted while along the eastern coastline the depth is larger and there is a steep slope (Spinou et al., 2012).

Various anthropogenic activities such as fishing, aquaculture, tourism and other coastal activities occur

mainly in the summer months. In the eastern and northeastern parts of the Gulf there are also three fish farms. The outlet of the Lixouri's city wastewater pipeline is located in front of the city's harbor in the western part of the Gulf. In the eastern part of the Gulf there is the city and port of Argostoli with intense touristic and coastal activity as well as the wastewater treatment plants of the city of Argostoli (Spinou et al., 2012). These activities as well as some minor ones (eg agriculture in the surrounding coastal areas) affect the composition and quality of the waters in the Gulf. The impact of the activities around the Argostoli Bay does not seem to be as important as in similar areas in other parts of Greece. This is due to the geomorphological characteristics of the Gulf, the way of variation and movement of the thermocline and the model of water movement (Konididis et al., 2006).

2. Material and Methods

In the period 2004-2006, a study of the impact of the aquaculture units of Argostoli Bay on the marine environment was carried out and water sampling was carried out on two aquaculture units. Among other things, microbiological parameters of water were checked. Three different sampling stations were selected (Figure 1). The first station was PS1 (ΠΣ1), the second was PS2 (ΠΣ2) and finally a control station, far away from the fattening units, named PS3 (ΠΣ3). There were 8 samples taken in the study area on 29/6/2004, 15/9/2004, 13/12/2004, 30/3/2005, 31/5/2005, 2/2/2006, 4/5/2006 and on 19/7/2006 and samples of surface water were collected from all 3 stations for microbiological analysis. The samples collected were placed in sterile glass bottles and sealed with parafilm. The samples were packaged in a portable refrigerator and sent for microbiological analyzes in a specialized laboratory.

In 2013, in the framework of a study on the establishment of the Organic Aquaculture Development Area of the Aquaculture Unit of the Argostoli Bay, among other procedures water samples were taken for the individual study of the microbiological parameters in the specific units. Three sampling stations were selected, S1 and S3 in the floating units and the S2 (Σ2) control station (Figure 2). The control station had the same characteristics as the stations in the S1 (Σ1) and S3 (Σ3) units, ie depth, distance from the shore and was in the middle of the distance of the positions that the units are installed and operating. On 9/9/2013 water samples were taken at three stations in the study area at a depth of 1m from the surface. They were then analyzed according to marine environmental quality standards: ISO 7899-2 (enterococci), ISO 9308-1 (total coliforms at 37°C), ISO 6222 [number of cultures of cultivable microorganisms (AUCM) at 22 & 37 °C] and ISO 9308-1 (detection of *E. coli*) (Directive 98/83 / EU on the quality of water intended for human consumption).

3. Results

The results obtained and recorded in Table 1 and illustrated in Figure 3 were obtained from the samples taken in 2004-2006 for the study of the microbiological parameters in the aquaculture units of the Argostoli Bay and the analysis that followed.

Table 1 Microbiological parameters of aquaculture fish water in the study area.

Sample Station	PS1- ΠΣ1	PS2- ΠΣ2	PS3- ΠΣ3	PS1- ΠΣ1	PS2- ΠΣ2	PS3- ΠΣ3	PS1- ΠΣ1	PS2- ΠΣ2	PS3- ΠΣ3
Samplings	1 st Sampling			2 nd Sampling			3 rd Sampling		
Total coliforms CFU/100ml	0	0	0	6	0	9	2	0	2
<i>E.coli</i> /100ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Streptococci/100ml (enterococci)	0	2	0	0	0	0	2	2	0
<i>Pasteurella spp</i> cfu/100ml	0	0	4	0	0	0	0	0	0
<i>Aeromonas spp</i> cfu/100ml	0	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>Pseudomonas spp</i> cfu/100ml	5	0	0	0	0	0	0	0	1
OMX x 22 °C/1ml	50	70	10	1920	0	250	480	160	150
OMX x 37 °C/1ml	20	40	10	1025	0	150	200	67	84
Samplings	4 th Sampling			5 th Sampling			6 th Sampling		

Total coliforms CFU/100ml	0	2	0	12	8	13	0	0	0
E.coli/100ml	0	0	0	12	0	0	0	0	0
Streptococci/100ml (enterococci)	2	0	2	1	0	4	0	0	0
<i>Pasteurella spp</i> cfu/100ml	0	0	0	0	0	0	0	3	0
<i>Aeromonas spp</i> cfu/100ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas spp</i> cfu/100ml	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OMX x 22 °C/1ml	235	3700	0	8	7	19	4	4	1
OMX x 37 °C/1ml	158	180	0	5	43	48	13	1	1
Samplings	7th Sampling			8th Sampling					
Total coliforms CFU/100ml	12	8	13	0	8	0			
E.coli/100ml	12	0	0	0	0	0			
Streptococci/100ml (enterococci)	1	0	4	0	0	0			
<i>Pasteurella spp</i> cfu/100ml	0	0	0	0	100	0			
<i>Aeromonas spp</i> cfu/100ml	0	0	0	100	0	0			
<i>Pseudomonas spp</i> cfu/100ml	0	0	0	0	0	0			
OMX x 22 °C/1ml	8	7	19	7	130	49			
OMX x 37 °C/1ml	5	43	48	5	110	20			

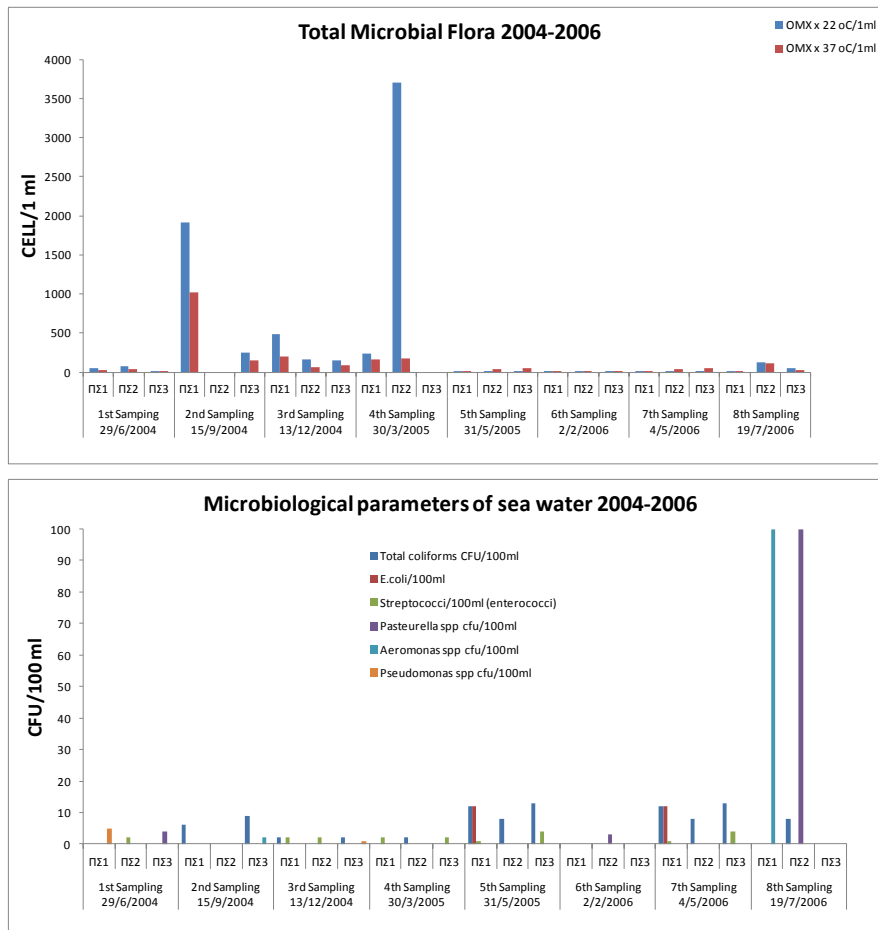


Figure 3 Graphs depicting the total microbial flora and other microbiological parameters of Argostoli Bay during the period 2004-2006.

From the microbiological sampling and analysis carried out in September 2013 on the aquaculture units of Argostoli Bay, the following results were obtained (Table 2).

Table 2 Microbiological parameter analysis report. Dates: Sampling: 9/9/2013, start of test: 9/9/2013, end of test: 13/9/2013 (Katselis et al., 2013).

Microbiological tests	Method	S1 cfu/100ml	S2 cfu/100ml	S3 cfu/100ml
Enterococci	ISO 7899-2 Slanetz & Bartley Agar	-	-	-
Total coliforms	ISO 9308-1 Lactose TTC	80	75	95
AAKM 22 °C	ISO 6222 Plate count Agar	100	200	100
AAKM 37 °C	ISO 6222 Plate count Agar	40	45	50
<i>E. coli</i>	ISO 9308-1 Detection of indole	+	+	+

Due to the lack of legislation defining the limits of the microbiological parameters in the water column for fish farming at sea, the above findings were compared with the desired limits for drinking water, bathing and shellfish culture as defined in the legislation (JMD No 46399/1352/1986 , Government Gazette No 438/1986, V.B) (Table 3).

Table 3 Desirable values of microbiological parameters in drinking water, bathing water and shellfish farming, in accordance with Joint Ministerial Decision No 46399/1352/1986, Government Gazette V. B No 438/1986 and the values of the present study (Katselis et al., 2013).

Microbiological parametres	Drinking water**	Swimming water**	Aquaculture of shells**	Present study
ENTEROCOCCI	<20*	<100		0
TOTAL COLIFORMS (37 °C)	<50*	500-10000	70-700	75-90
O.M.X. 22 °C				100-200
O.M.X. 37 °C				40-50
<i>E.coli</i>	<20*	100-500		<75-90

* desired water values for water category (1) (minimum tolerance).

** desirable values (cfu / 100 ml) in drinking water, bathing and shelling according to Joint Ministerial Decision No 46399/1352/1986, Government Gazette V B. No 438/1986.

From the records kept by existing aquaculture units on estimates of the above parameters on a quarterly basis for the period 2010-2012, which were measured and evaluated by an accredited entity, they give the same conclusions as the data from the study carried out by the Katselis et al. (2013).

The results from microbiological analyses of 2004-2006 show that in all sea water samples from floating cages, the number of total coliforms, *E. coli* and faecal streptococci is less than that set as the desired limit for the water to be suitable for swimming. The measurements showed that there is no microbial contamination in the Argostoli Gulf water, thus, they are suitable for swimming for this factor (Kefalonia Fish Farms SA). According to the results of the microbiological parameter analyses in 2013, it appears that enterococci values are within the desired limits for drinking water, total coliforms are slightly higher than the drinking water limits and the lower limits for shellfish culture water since the *E.coli* values are at the minimum of swimming rates and are relatively higher than the drinking water limits. It also appears that the values of the studied microbiological parameters, except in the case of *E. coli*, are comparable to the desired drinking water limits, which are the smallest limit values for different uses of water (Katselis et al., 2013). Pathogenic microorganisms such as coliforms, enterococci and streptococci come from the digestive system of mammals (humans or farmed production animals) and probably their presence in the Argostoli Gulf water is due to urban waste water or livestock units that are established and operate in the wider area around the area studied. Urban waste water, livestock manure and animal droppings and humans containing pathogenic micro-organisms are the main source of water contamination and indicate potential pathogenicity. In water (sea and fresh), pathogenic microorganisms are found in very small concentrations and are very difficult to detect. For this reason, coliforms, which are not generally pathogenic, are used as indicators of water contamination but are daily excreted by humans at rates

ranging from 10^{11} to 4×10^{11} bacterial cells per person. A key feature of coliforms that makes them a suitable indicator of the potential pathogenicity in water is the fact that water disinfection clears them more difficult compared to all other pathogenic bacteria. This means that eradication of coliforms ensures the simultaneous elimination of other pathogenic bacteria. However, this does not apply to viruses since there is no direct and complete correlation with coliforms, and more specialized analyses are required to identify them (Loizidou 2006). So the presence and high coliform values in a coastal ecosystem means that there will be other pathogenic micro-organisms that can potentially cause diseases in native or farmed fish populations.

Acknowledgements

For this work we should thank Kefalonia Fish Farms SA for the data we have provided, and the data for the year 2013 are part of the study for the creation of Organized Aquaculture Development Areas (OADA) in the Argostoli Gulf. This work is part of the doctoral dissertation of the senior author, currently in progress at the Department of Marine Sciences of the University of the Aegean.

References

- Katselis G., Ramfos A., Avramides P., Poulos K. (2013). Technical Report entitled: "Analysis of the physicochemical, sediment and biological parameters to be established Organized Aquaculture Development Areas of Kefalonia island (Gulf of Argostoli)" Phase I., p. 36-48.
- Spinou E., Ramfos A., Lazaridou E. & Bakopoulos V., (2012). Ecological study of Argostoli Gulf: Preliminary results of seabed mapping with emphasis on *Posidonia oceanica* seagrasses. 10th Panhellenic Symposium of Oceanography and Fishery, Athens 2012.
- Konidis A., Kougioufas P., Glykokokalos S., Asimakopoulou G., Konstantinopoulou A. & Pavlidou A. (2006). Investigation of eutrophic conditions of the Argostoli Bay of Kefallinia in relation to the fish farming activities. Expert opinion a. 148118 / 1-2-2006 HCMR.
- Loizidou Maria 2006. A. Performing sampling, measurements and analyzes in water and liquid wastes. National Technical University of Athens, School of Chemical Engineering, Department of Environmental Science and Technology. P. 30.
- Papapetropoulou M. & Mavridou A., 1995. Paper "Microbiology of the Aquatic Environment-Basic Principles". "Kostaraki" Publications, P. Travlos-E. Kostarakis GP. Pages 20-31.

Εργασίες που ανακοινώθηκαν σε Πανελλήνια Επιστημονικά Συνέδρια με κριτές

10ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Ωκεανογραφίας & Αλιείας, 7-11 Μαΐου 2012, Αθήνα

ΟΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΟΛΠΟΥ ΑΡΓΟΣΤΟΛΙΟΥ: ΠΡΟΚΑΤΑΡΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΥΘΜΕΝΑ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΟΥΣ ΛΕΙΜΩΝΕΣ ΠΟΣΕΙΔΩΝΙΑΣ

Σπίνος Ε.^{1,2}, Ράμφος Α.³ Λαζαρίδου Ε.⁴ & Μπακόπουλος Β.¹

¹ Τμήμα Επιστημών της Θάλασσας, Σχολή Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, v.bakopoulos@marine.aegean.gr

² Τμήμα Αλιείας, Περιφερειακή Ενότητα Κεφαλληνίας, e.spinos@marine.aegean.gr

³ Τμήμα Υδατοκαλλιεργειών και Αλιευτικής Διαχείρισης, ΤΕΙ Μεσολογγίου, ramfos@teimes.gr

⁴ Τμήμα Περιβάλλοντος & Υδροοικονομίας, Περιφερειακή Ενότητα Κεφαλληνίας, tlazaridou@kefalonias.edu.gr

Περίληψη

Τα λιβάδια Ποσειδωνίας λόγω της σημαντικότητάς τους για τη διατήρηση της βιοποικιλότητας, χαρακτηρίζονται ως «οικότοπος προτεραιότητας» στο πλαίσιο θέσπισης του δικτύου NATURA 2000. Στο πλαίσιο έρευνας με αντικείμενο την συσχέτιση των περιβαλλοντικών παραμέτρων με τις ασθένειες εκτρεφόμενων ψαριών και πρόληψη των ασθενειών στον Κόλπο Αργοστολίου, έγινε χαρτογράφηση του πυθμένα και καταγράφηκαν υποθαλάσσια λιβάδια του φανερόγαμου *Posidonia oceanica* και μικροί πληθυσμοί του διθιρού μαλακίου *Pinna nobilis*. Η περιοχή μελέτης συνολικής επιφάνειας περίπου 52km², καταλαμβάνει όλο τον Κόλπο Αργοστολίου καθώς και την είσοδο του. Για τη χαρτογράφηση χρησιμοποιήθηκε ηχοβολιστικό όργανο αποτύπωσης πυθμένα από πλωτό μέσο και έγινε επιβεβαίωση με υποβρύχια συρόμενη κάμερα και στοχευμένες δειγματοληψίες με αρπάγη. Στο εσωτερικό του Κόλπου, τα λιβάδια του *P. oceanica* βρέθηκαν περιορισμένα κοντά στην ακτογραμμή σε βάθη μέχρι 20m ενώ στην είσοδο του Κόλπου καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της περιοχής σε βάθη μέχρι 25m. Πληθυσμοί του είδους *P. nobilis* εντοπίστηκαν σε τέσσερις θέσεις στην περιοχή μελέτης.

Λέξεις Κλειδιά: θαλάσσια φανερόγαμα, αποτύπωση πυθμένα.

ECOLOGICAL STUDY OF ARGOSTOLI GULF: PRELIMINARY RESULTS OF SEABED MAPPING WITH EMPHASIS ON *POSIDONIA OCEANICA* SEAGRASSES

Spinos E.^{1,2}, Ramfos A.², Lazaridou E.³ & Bakopoulos V.¹

¹ Department of Marine Sciences, School of Environment, Aegean University, v.bakopoulos@marine.aegean.gr

² Department of Fisheries, Regional Section Cephalonia, e.spinos@marine.aegean.gr

³ Department of Aquaculture and Fisheries Management, TEI of Messolonghi, ramfos@teimes.gr

⁴ Department of Environment & Hydro economy, Regional Section Cephalonia, tlazaridou@kefalonias.edu.gr

Abstract

Seagrass meadows are considered as a "priority habitat" in establishing the network of NATURA 2000, because of their importance for biodiversity conservation. In the context of an ongoing research on the correlation of environmental parameters and farmed fish diseases and prevention of diseases in Argostoli Gulf, the mapping of *Posidonia oceanica* meadows as well as of restricted populations of the bivalve *Pinna nobilis* are presented. The study area covering approximately 52km² occupies the Gulf of Argostoli as well as the entrance of the Gulf. A remote acoustic sounder was used for the classification of the seabed and various substrate types were confirmed by an underwater camera and grab samples. *P. oceanica* meadows were found restricted along the coastline of the Gulf up to 20m depth, whereas in the entrance of the Gulf the meadows were more extensive covering most of the substrate up to 25m depth. Populations of *P. nobilis* were located at four sites in the study area.

Keywords: seagrasses, seabed mapping.

1. Εισαγωγή

Η ανάπτυξη ενός ορισμένου τύπου θαλάσσιας βλάστησης σε ένα βιότοπο είναι αποτέλεσμα ενός συνόλου αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων και η μελέτη και αναλυτική περιγραφή της δομής των βενθικών θαλάσσιων φυτοκοινωνιών σε μία περιοχή αποτελεί ένα πεδίο βασικής έρευνας, με επακόλουθη δυνατότητα αξιοποίησης των αποτελεσμάτων (Lüning 1990).

Η κάθε ζώνη, υπέρ-, μέσο-, υπό- και περιπαράλια χαρακτηρίζεται από κάποια ή κάποιες φυτοκοινωνίες (Pérez 1982). Στη Μεσόγειο θάλασσα πολύ σημαντικό οικολογικό ρόλο παίζουν οι κοινωνίες του σκληρού

υποστρώματος των ειδών του γένους *Cystoseira* και οι κοινότητες των θαλάσσιων φανερόγαμων του μαλακού υποστρώματος και ιδιαίτερα οι λειμώνες του *Posidonia oceanica* (Giaccone 1972, Λαζαρίδου 1994, Ballesteros et al. 1998, Τσιρίκα 2005). Ειδικότερα, οι λειμώνες που σχηματίζουν τα θαλάσσια φανερόγαμα, σε παγκόσμιο επίπεδο, αποτελούν τα πλέον σημαντικά θαλάσσια οικοσυστήματα και τη βάση της βιοποικιλότητας των παράκτιων υδάτων (Den Hartog 1970, Ribera et al. 1997, Green & Short 2003). Από τις κοινότητες των θαλάσσιων φανερόγαμων των ελληνικών ακτών, οι συχνότερες είναι οι κοινότητες των ειδών *Posidonia oceanica*, *Cymodocea nodosa*, *Zostera noltii* και *Halophila stipulacea*.

Το ενδημικό μεσογειακό αγγειόσπερμο *Posidonia oceanica* L. σχηματίζει εκτεταμένους υποθαλάσσιους λειμώνες σε βάθη από λίγα εκατοστά ως 40 μ. Ο ρόλος τους είναι πολύ σημαντικός στη διατήρηση της οικολογικής ισορροπίας των παράκτιων οικοσυστημάτων και έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών (Jeudy De Grissac & Boudouresque 1985, Mazzella et al. 1992, Pergent–Martini et al. 1999). Προσφέρουν ενδιαίτημα σε πλήθος οργανισμών. Ειδικότερα ως προς τη βιώσιμη διαχείριση της αλιείας τα λιβάδια παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αναπαραγωγή των ψαριών. Οι προνύμφες των ψαριών βρίσκουν καταφύγιο στα λιβάδια και η προστασία τους αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την ανανέωση των ιχθυο-αποθεμάτων (Δρακοπούλου κ.ά. 2009). Χαρακτηρίζονται ως πρότυπα οικοσυστήματα (climax) για τη λεκάνη της Μεσογείου (Boudouresque et al. 1990). Η υψηλή οικολογική αξία σε συνδυασμό με τη συνεχή τάση υποβάθμισης των λειμώνων από τις ανθρώπινες δραστηριότητες αντανακλάται στο καθεστώς προστασίας τους σε ευρωπαϊκό και μεσογειακό επίπεδο. Έχει χαρακτηριστεί ως οικότοπος προτεραιότητας του Παραρτήματος I της Οδηγίας 92/43/ΕΟΚ, ενώ προστατεύεται από τη Σύμβαση της Βαρκελώνης για την προστασία της Μεσογείου από τη ρύπανση (Πρωτόκολλα 4 και 6).

Για να καταστεί εφικτή η προστασία και η διαχείριση των θαλάσσιων βενθικών ενδιαιτημάτων και των παράκτιων οικοσυστημάτων, είναι απαραίτητη η γνώση της κατανομής και της δομής των θαλάσσιων κοινωτών σε δεδομένη χρονική στιγμή, αλλά και η παρακολούθηση της εξέλιξης των πληθυσμών στο χώρο και στον χρόνο σε μεγάλες χρονικές περιόδους. Σύμφωνα με τους Díaz-Almela & Duarte (2008) το πρώτο βασικό εργαλείο για την παρακολούθηση κυρίως των λειμώνων Ποσειδωνίας είναι η καταγραφή της θέσης και της κατανομής τους. Οι χάρτες των λειμώνων αποτελούν το βασικό διαχειριστικό εργαλείο, παρέχοντας μια εποπτική εικόνα της κατάστασης του οικοτόπου στους υπεύθυνους λήψης αποφάσεων αλλά και στο κοινό. Αντίστοιχα, ο McKenzie (2003) αναφέρει ότι η αναγκαιότητα της χαρτογράφησης και παρακολούθησης των λειμώνων των θαλάσσιων φανερόγαμων σε χωροχρονική κλίμακα είναι πρωταρχικής σημασίας στη διαδικασία αξιολόγησης της κατάστασης των παράκτιων οικοσυστημάτων.

Υπάρχει μια πληθώρα μεθόδων για τη χαρτογράφηση των θαλάσσιων λειμώνων (επιτόπου αποτύπωση μέσω συστηματικών παρατηρήσεων με κατάδυση, συλλογή δειγμάτων με αρπάγη, βίντεο ή ηχοβολιστικά, τηλεπισκοπικές μέθοδοι, συνδυασμός μεθόδων) (Díaz-Almela & Duarte, 2008). Η χαρτογράφηση με την εφαρμογή τεχνικών ταξινόμησης πυθμένα με το ηχοβολιστικό σύστημα RoxAnn GD-X έχει πραγματοποιηθεί σε πολλές θαλάσσιες περιοχές του δικτύου Natura 2000 (Cook et al. 1999, Siakavara et al. 2000, Siakavara and Lazaridou 2000, Ehrhold 2004, Wilson, 2006).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η απόκτηση των δεδομένων της κατανομής της θαλάσσιας βλάστησης και ειδικότερα των λειμώνων των θαλάσσιων φανερόγαμων του Κόλπου Αργοστολίου Κεφαλονιάς, η δημιουργία του χάρτη βάσης (baseline map) ως βασικού εργαλείου για την περαιτέρω ανάλυση της δομής των φυτοκοινωνιών με απώτερο στόχο την εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης των παράκτιων υδάτων και τη δημιουργία διαχειριστικού εργαλείου για τη λήψη αποφάσεων στο χωρικό σχεδιασμό των θαλάσσιων δραστηριοτήτων.

2. Μεθοδολογία

Η χαρτογράφηση πραγματοποιήθηκε στην περιοχή του Κόλπου του Αργοστολίου ο οποίος είναι ένας ημικλειστός Κόλπος με μήκος 13.5 km στον άξονα βορρά-νότου και μέσο πλάτος 2.8 km (Εικόνα 1). Επικοινωνεί με το Ιόνιο Πέλαγος στο νότιο τμήμα του μέσω ενός ανοίγματος πλάτους 2.9 km. Στο μεγαλύτερο

μέρος του ο Κόλπος έχει βάθος 10 m ενώ το μέγιστο βάθος του είναι περίπου 25 m. Κατά μήκος της δυτικής και βόρειας ακτογραμμής ο πυθμένας έχει ήπια κλίση ενώ κατά μήκος της ανατολικής ακτογραμμής υπάρχει απότομη κλίση. Ήπια κλίση απαντάται και στο νότιο τμήμα.

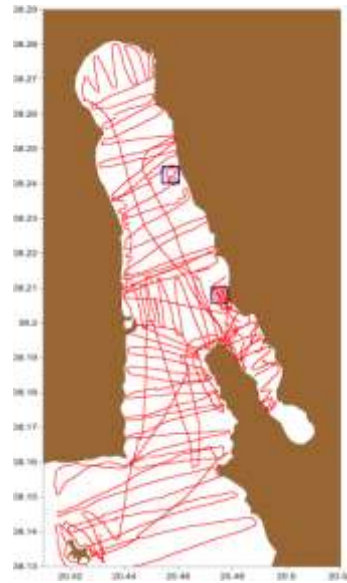


Εικόνα 1. Περιοχή μελέτης.

Η θαλάσσια περιοχή του Κόλπου Αργοστολίου χαρακτηρίζεται από πολυποίκιλη ανθρώπινη δραστηριότητα. Στο ανατολικό τμήμα του Κόλπου βρίσκεται η πόλη και το λιμάνι του Αργοστολίου με έντονη τουριστική και ακτοπλοϊκή δραστηριότητα καθώς και οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων της πόλης του Αργοστολίου (Εικόνα 1). Στο Α-ΒΑ τμήμα του Κόλπου δραστηριοποιούνται επίσης τρεις ιχθυοπαραγωγικές μονάδες. Στο δυτικό τμήμα του Κόλπου βρίσκεται η πόλη και το λιμάνι του Ληξουρίου. Η ακτογραμμή του τμήματος αυτού έχει ιδιαίτερα έντονη τουριστική δραστηριότητα και οικιστική ανάπτυξη. Η έξοδος του αγωγού επεξεργασμένων λυμάτων της πόλης του Ληξουρίου βρίσκεται μπροστά από το λιμάνι της πόλης. Στο νότιο μυχό του Κόλπου βρίσκεται η τεχνητή λιμνοθάλασσα Κουτάβου, ένας μεσοτροφικός και τους θερινούς μήνες ευτροφικός (Κονίδης κ.ά. 2006) υγρότοπος με ιδιαίτερο οικολογικό ενδιαφέρον ο οποίος αλληλεπιδρά με τον υπόλοιπο Κόλπο.

Σύμφωνα με πρόσφατα ωκεανογραφικά δεδομένα και συγκεκριμένα μελέτη της ρευματογραφίας της περιοχής, αναφέρεται ότι το ρεύμα εισόδου κινείται ανατολικά περνώντας από τον κάβο Αγίων Θεοδώρων Αργοστολίου και ακολουθεί την ανατολική ακτογραμμή περνάει δηλαδή κατά μήκος των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας. Φαίνεται έτσι ότι το ρεύμα εισόδου ακολουθεί τα βαθύτερα σημεία του Κόλπου, προφανώς επειδή στα σημεία αυτά βυθίζεται κάτω από το ζεστότερο επιφανειακό στρώμα. Αντίθετα στις ρηχές δυτικές περιοχές, ακολουθεί σχεδόν ευθύγραμμη κίνηση λόγω ανάμιξης των νερών από τον κυματισμό. Ο όγκος του νερού του Κόλπου είναι περίπου 550 km³ και η μέση τιμή της ανανέωσης του νερού είναι 4,2 km³/ημέρα, ποσότητα που φτάνει το 0,76% (Κονίδης κ.ά. 2006).

Στη διάρκεια της μελέτης πραγματοποιήθηκαν σαρώσεις του πυθμένα με το ηχοβολιστικό σύστημα RoxAnn GD-X (Εικ. 2) και οι διαδρομές έγιναν με μέση ταχύτητα 5 κόμβων, ενώ η συχνότητα καταχώρησης των μετρήσεων ρυθμίστηκε στις 30 μετρήσεις/λεπτό. Ο αισθητήρας του ηχοβολιστικού συστήματος RoxAnn GD-X τοποθετήθηκε στο πλάι ενός σκάφους μήκους 5m σε βάθος περίπου 1 m, συνδέθηκε με φορητό Η/Υ και το GPS του σκάφους και ρυθμίστηκε στα 200 khz.



Εικόνα 2. Οι σαρώσεις του πυθμένα που πραγματοποιήθηκαν με το ηχοβολιστικό σύστημα RoxAnn GD-X

Η απόσταση μεταξύ των διατομών κυμάνθηκε μεταξύ 100 και 400 m (Εικ. 2) και η αποτύπωση του πυθμένα πραγματοποιήθηκε σε ολόκληρο τον Κόλπο Αργοστολίου και εξωτερικά του ανοίγματός του (Εικ. 4).



Εικόνα 3. Η περιοχή μελέτης και τα σημεία επιβεβαίωσης αποτύπωσης πυθμένα.

Η επιβεβαίωση και ταυτοποίηση των διαφόρων τύπων υποστρώματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υποβρύχιας κάμερας τύπου TOV-1 καθώς και αρπάγης (βενθολήπτη) (Εικόνα 3). Επειδή ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο εντοπισμός των λιβαδιών θαλάσσιων φανερόγαμων, δόθηκε έμφαση στην ταυτοποίηση του σήματος του οργάνου στις περιοχές με φυτική κάλυψη. Ως εκ τούτου δεν πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες ιζήματος για τον προσδιορισμό της κοκκομετρικής σύστασης του υποστρώματος και η κατηγοριοποίηση του ιζήματος στα δείγματα που συλλέχθηκαν με την αρπάγη πραγματοποιήθηκε επί τόπου ανάλογα με την υφή του ιζήματος σε γενικές κατηγορίες (π.χ. χονδρόκοκκη άμμος, λεπτόκοκκη άμμος κλπ). Τα είδη των φανερόγαμων αναγνωρίστηκαν σύμφωνα με την κλειδα αναγνώρισης των Den Hartog & Kuo, (2006).

Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν μεταφέρθηκαν σε φύλλο εργασίας του Excel όπου φιλτραρίστηκαν για να αφαιρεθούν οι λανθασμένες τιμές που πιθανώς οφείλονταν στην παρουσία ψαριών ή φυσαλίδων στον αισθητήρα ή σε αδυναμία λήψης σωστής μέτρησης του οργάνου. Οι λανθασμένες αυτές τιμές συνοδεύονται σχεδόν πάντα από λανθασμένες ενδείξεις του βάθους (Greenstreet et al. 1997) με αποτέλεσμα το «φιλτράρισμα» τους να γίνεται εύκολα με την αφαίρεση των τιμών στις οποίες η διαφορά του βάθους μεταξύ δύο διαδοχικών μετρήσεων ήταν μεγαλύτερη του 1 m. Με τη διαδικασία αυτή αφαιρέθηκε περίπου το 6% των μετρήσεων ενώ

διατηρήθηκαν 52.487 τιμές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την απεικόνιση των τύπων του υποστρώματος και της βυθομετρίας. Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν με εξομαλυσμένες τιμές των ενδείξεων E1 και E2 του οργάνου με τη χρήση κινητού μέσου εύρους 20 τιμών (Εικ. 4). Η επεξεργασία αυτή πραγματοποιήθηκε για να αποφευχθεί η επίδραση σπάνιων ακραίων τιμών στην αποτύπωση των δεδομένων.

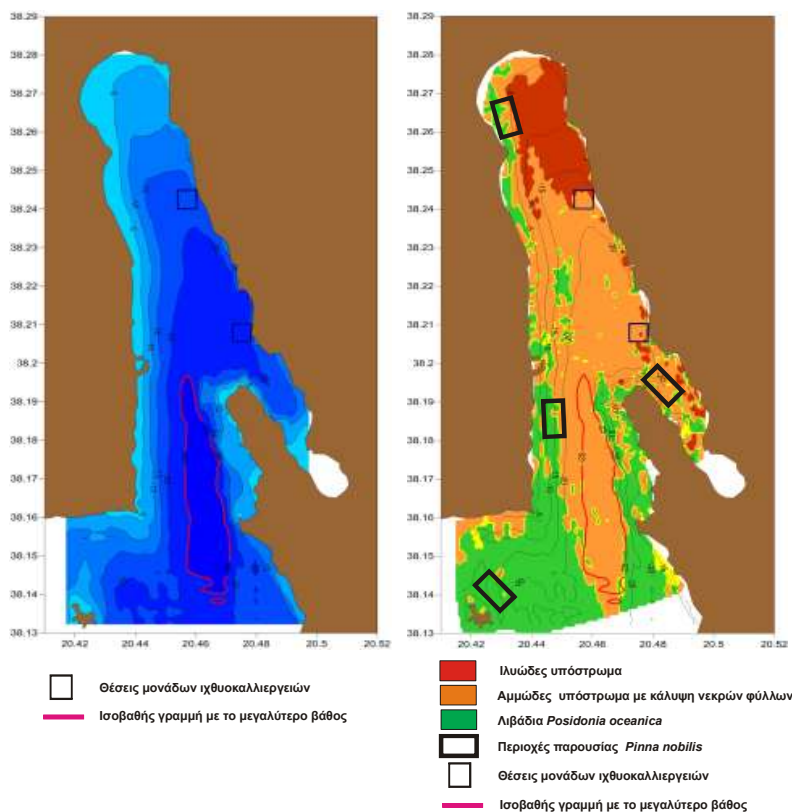
Οι κατηγορίες του υποστρώματος απεικονίσθηκαν με τη χρήση του λογισμικού χαρτογράφησης Surfer v.9.0 (Golden Software Inc. USA) με τη χρήση του αλγόριθμου απεικόνισης nearest neighbour, ενώ η απεικόνιση της βυθομετρίας της περιοχής πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αλγόριθμου απεικόνισης Kriging.

3. Αποτελέσματα

Η περιοχή μελέτης καλύπτεται σχεδόν ολόκληρη από μαλακό αμμώδες υπόστρωμα (Εικ. 4) Από όλες τις δειγματοληψίες και τις οπτικές παρατηρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, ταυτοποιήθηκε ένα είδος θαλάσσιου φανερόγαμου το *P. oceanica*. Μικρές συστάδες σε αραιή διάταξη του είδους *Cymodocea nodosa* παρατηρήθηκαν κοντά στα λιμάνια Αργοστολίου και Ληξουρίου. Στην ΒΑ περιοχή του Κόλπου η αποτύπωση του πυθμένα και η επιβεβαίωσή του έδειξε ότι ήταν κυρίως ιλυώδης, αφού πιθανόν λόγω των κινήσεων των θαλασσιών μαζών (Κονίδης κ.ά. 2006) καταλήγουν εκεί αιωρούμενα σωματίδια, οργανικά και ανόργανα υλικά, από όλη την περιοχή και πιθανόν επιβαρύνεται από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες.

Η παρουσία λιβαδιών του είδους *P. oceanica* στην περιοχή περιορίστηκε κυρίως στη δυτική πλευρά, υπάρχουν μικρές συστάδες ανατολικά και καταγράφηκαν συνεχόμενα λιβάδια και εκτεταμένες συστάδες στο άνοιγμα του Κόλπου, σε μια περιοχή που αρχίζει βόρεια από τον φάρο των Αγίων Θεοδώρων και επεκτείνεται νότια μέχρι τις ανατολικές ακτές και δυτικά στις νησίδες Βαρδιάνους (Εικ. 4).

Στις υποβρύχιες λήψεις με κάμερα προκειμένου να γίνει επιβεβαίωση του σήματος του ηχοβολιστικού οργάνου RoxAnn GD-X, παρατηρήθηκαν διάσπαρτα πολυάριθμα εχινόδερμα κυρίως ολοθουροειδή και αχινοί σε όλο τον πυθμένα της περιοχής μελέτης. Παρατηρήθηκαν επίσης, σε τέσσερις περιοχές του Κόλπου και σε βάθος μεγαλύτερο των 2 m, μικροί πληθυσμοί του δίθυρου μαλακίου *Pinna nobilis*. Οι περιοχές αυτές είναι ΒΔ του Κόλπου, νότια του λιμανιού Ληξουρίου, στο λιμάνι Αργοστολίου και λίγο βορειότερα κοντά στις ακτές και σε μικρό βάθος και ανατολικά των νησίδων Βαρδιάνων.



Εικόνα 4. Βυθομετρία και αποτύπωση πυθμένα του Κόλπου Αργοστολίου.

4. Συμπεράσματα/Συζήτηση

Για τον Κόλπο Αργοστολίου δεν υπάρχουν παλαιότερα δεδομένα χαρτογράφησης του πυθμένα, έτσι η χαρτογράφηση που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας στην περιοχή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και από τα αποτελέσματα εξάγονται συμπεράσματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω μελέτη.

Τα λιβάδια του είδους *P. oceanica* στην περιοχή μελέτης, καλύπτουν κυρίως την δυτική περιοχή του Κόλπου Αργοστολίου. Η μορφή του λιβαδιού, όπως φάνηκε από τις οπτικές παρατηρήσεις με την υποβρύχια κάμερα, δεν ήταν συνεχόμενη και εκτεταμένη. Η ακρίβεια της απεικόνισης είναι περιορισμένη σημειακά αφού προέρχεται από εκτίμηση μεταξύ των δεδομένων που συλλέχθηκαν κατά μήκος των διαδρομών (βλ. Εικ. 2).

Η παρουσία του λιβαδιού στην περιοχή μελέτης κρίνεται ως ιδιαίτερα σημαντική. Τα λιβάδια *P. oceanica* αν και βρέθηκαν περιορισμένα και δεν καλύπτουν μεγάλη περιοχή, εκτιμάται ότι η παρουσία τους και η προστασία τους είναι σημαντική για τη διατήρηση της οικολογικής ισορροπίας και της βιοποικιλότητας στην περιοχή.

Οι μικροί πληθυσμοί του προστατευόμενου δίθυρου μαλακίου *Pinna nobilis*, χρήζουν περαιτέρω μελέτης, διαχείρισης και λήψης μέτρων προστασίας. Το είδος *P. nobilis* (κν. πίννα) έχει χαρακτηριστεί ως απειλούμενο είδος στη Μεσόγειο. Σε εφαρμογή της οδηγίας 92/43/ΕΟΚ (Παράρτημα IV), το *P. nobilis* βρίσκεται υπό καθεστώς αυστηρής προστασίας, προστατεύεται επίσης από το προεδρικό διάταγμα 67/1981 σύμφωνα με το οποίο απαγορεύεται η θανάτωση, η απόπειρα θανάτωσης, η κακοποίηση, ο τραυματισμός, η πρόκληση βλάβης, η κατοχή, η σύλληψη, η ταρίχευση, η αγορά, η πώληση, η μεταφορά και η εξαγωγή ατόμων του είδους (Κατσανεβάκης & Θεσσαλού-Λεγάκη, 2009) και από τη Σύμβαση της Βαρκελώνης. Όπως αναφέρουν οι Díaz-Almela & Duarte (2008) η πίννα αποτελεί δείκτη της ποιότητας των υδάτων και αποτελεί χαρακτηριστικό είδος των λειμώνων Ποσειδωνίας.

Ο Κόλπος Αργοστολίου είναι ένα κλειστό δυναμικό οικοσύστημα το οποίο επιδέχεται έντονες ανθρωπογενείς επιδράσεις που το επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό. Η παρουσία όμως ζωοβενθικών και φυτοβενθικών οργανισμών που λειτουργούν ως βιολογικοί δείκτες φανερώνει ότι είναι ένα ευαίσθητο περιβάλλον επί του οποίου δρουν μεταξύ άλλων και οι εν λόγω οργανισμοί ως μηχανισμοί αυτοκαθαρισμού. Για το οικοσύστημα του Κόλπου Αργοστολίου θα πρέπει να ληφθούν μέτρα προστασίας και ορθολογικής διαχείρισης και να δημιουργηθεί σύστημα συνεχούς παρακολούθησης των παραγόντων που το επιβαρύνουν για να διατηρηθεί έτσι η οικολογική του ισορροπία.

5. Ευχαριστίες

Στην εργασία αυτή παρουσιάζονται τα πρώτα αποτελέσματα υπό εκπόνηση διδακτορικής διατριβής. Ευχαριστούμε όλους τους υπευθύνους δημοσίων και ιδιωτικών φορέων που δραστηριοποιούνται στον Κόλπο Αργοστολίου για τις πληροφορίες που μας παρείχαν και για την πρόσβαση σε όλη την περιοχή μελέτης.

6. Βιβλιογραφικές αναφορές

- Ballesteros, E., Sala, E., Garrabou, J. & Zabala, M., 1998. Community structure and frond size distribution of a deep water stand of *Cystoseira spinosa* (Phaeophyta) in the Northwestern Mediterranean. *Eur. J. Phycol.* 33: 121-128.
- Boudouresque, C.F., Meinesz, A., Ballesteros, E., Ben Maiz, N., Boisset, F., Cinelli, F., Cirik, S., Cormaci, M., Jeudy De Grissac, A., Laboret, J., Lanfranco, E., Lundberg, B., Mayhoub, H., Panayotidis, P., Semroud, R., Sinnassamy, J.M., Span, A., 1990. Livre Rouge 'Gérard Vuignier' des végétaux, peuplements et paysages marins menaces de Méditerranée. UNEP/IUCN/GIS Posidonie. MAP Technical Report Series No 43. UNEP, Athens: 250 pp.
- Cook, B., Emblow, C.S. & Costello, M.J., 1999. Marine Subtidal Survey and Mapping Methods. SensMap 3.
- Den Hartog, C., 1970. The seagrasses of the world. North Holland Publishing Company, Amsterdam, London. 275p.
- Den Hartog, C. & Kuo, J., 2006. *Taxonomy and Biogeography of Seagrasses*. P.1-23. In: *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Larkum, A.W.D., Orth, R.J. & Duarte, C.M., (Eds), Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Díaz-Almela, E. & Duarte, C.M., 2008. Management of Natura 2000 habitats. 1120 *Posidonia beds (*Posidonium oceanicae*). European Commission.
- Ehrhold, A., 2004. Mapping shallow coastal benthic habitats using acoustic methods. MESH Project, Action 4. Coastal environment and planning directorate
- Giaccone, G., 1972. Ecologie et chorologie des *Cystoseira* de Méditerranée. *Rapp. Comm. Int. mer Médit.* 22: 49-50.

- Green, E. P. & Short, F. T. 2003. World atlas of seagrasses. UNEP World Conservation Monitoring Centre (pp. 1 – 298). University of California Press
- Greenstreet, S.P.R., Tuck, I.D., Grewar, G.N., Armstrong, E., Reid, D.G. & Wright, P.J., 1997. An assessment of the acoustic survey technique, RoxAnn, as a means of mapping seabed habitat. ICES Journal of Marine Science, 54: 939–959.
- Jedy de Grissac, A. & Boudouresque, C.F., 1985. Rôles des herbiers de phanérogames marines dans les mouvements des sédiments côtiers: les herbiers à *Posidonia oceanica*. Coll. Fr. Japon. Oceanogr., Marseille. 1: 143-151.
- Lüning, K., 1990. Seaweeds. Their environment, biogeography, and ecophysiology. John Wiley and Sons, New York. 527p.
- Mazzella, L., Buia, M., Gambi, M.C., Lorenti, M., Russo, G.F., Scipione, M.B. & Zupo, V., 1992. Plant – animal trophic relationships in the *Posidonia oceanica* ecosystem of the Mediterranean Sea: a review. Int. Workshop on *Posidonia oceanica* beds. G.I.S. Posidonie Publ. pp. 91-99.
- McKenzie, L.J., 2003. Draft guidelines for the rapid assessment of seagrass habitats in the western Pacific (QFS, NFC, Cairns) 43pp.
- Péres, J.M., 1982. Specific pelagic assemblages. In: (O. KINNE, J. WILEY eds) Marine Ecology, New York. 5: 373-522.
- Pergent-Martini, C., Pergent, G., Fernandez, C. & Ferrat L., 1999. Value and use of *Posidonia oceanica* as a biological indicator. In: Proceedings MEDCOAST 99-EMECS 99 Joint Conference “Land-ocean interactions: managing coastal ecosystems”, MEDCOAST, Middle East Technical Univ. Publ, Ankara 1: 73-90.
- Ribera, G., Coloreu, M., Rodriguez-Prieto, C. & Ballesteros, E., 1997. Phytobenthic Assemblages of Addaia Bay (Menorca, Western Mediterranean): Composition and Distribution. Bot. Mar. 40: 523-532.
- Siakavara, A. & Lazaridou, E., 2000. Mapping of *Posidonia oceanica* beds in Strymonikos and Ierissos gulfs. 6. Hellenic Symp. on Oceanography and Fisheries, Chios (Greece), 23- 26 May 2000, NCMR Association of Employees, vol. 1, p. 361-365.
- Siakavara, K., Valavanis, V.D. & Banks, A.C., 2000. Mapping of NATURA 2000 marine benthic habitats using remote sensing techniques. Proceedings of the 1st Mediterranean Symposium on Marine Vegetation, Regional Activity Centre for Specially Protected Areas (RAC/SPA), October 2000, Ajaccio Corsica.
- Wilson, B.D., 2006. Bottom Sediment Mapping of the Central Delaware Bay Oyster Beds: The New Jersey Pilot Area Result. Final Report Delaware Coastal Program.
- Δρακοπούλου, Π., Κυριακίδου, Χ. & Παναγιωτίδης, Π., 2009. Χαρτογράφηση λιβαδιών *Posidonia* & *Cymodocea* στο θαλάσσιο μέτωπο Ναυπάκτου-Ιτέας. Πρακτικά 9ου Πανελληνίου Συμποσίου Ωκεανογραφίας & Αλιείας. Τόμος Ι σελ. 572-577.
- Κατσανεβάκης, Σ. & Θεσσαλού-Λεγάκη, Μ., 2009. Καταγραφή προστατευόμενων ειδών στον Κόλπο της Σούδας. Πρακτικά 9ου Πανελληνίου Συμποσίου Ωκεανογραφίας & Αλιείας. Τόμος ΙΙ σελ. 745-750.
- Κονίδης, Α., Κουγιούφας, Π., Γλυκοκόκαλος, Σ., Ασημακοπούλου, Γ., Κωνσταντινοπούλου, Α. & Παυλίδου, Α., 2006. Διερεύνηση ευτροφικών συνθηκών κόλπου Αργοστολίου Κεφαλληνίας σε σχέση με τις ιχθυοκαλλιεργητικές δραστηριότητες. Πραγματογνωμοσύνη ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. αριθ. πρωτ. 148118/1-2-2006, ανάθεση από Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων
- Λαζαρίδου, Ε., 1994. Συστηματική, βιονομική και οικολογική μελέτη του θαλάσσιου φυτοβένθους της νήσου Μήλος (Κυκλάδες, Ελλάδα). Διδακτορική διατριβή, Θεσσαλονίκη. 279 σελ. + 75 σελ. Παράρτημα.
- Τσιρίκα, Α., 2005. Μελέτη του θαλάσσιου φυτοβένθους στο Εθνικό Θαλάσσιο Πάρκο Ζακύνθου. Διδακτορική διατριβή, Θεσσαλονίκη. 205 σελ. + 20 σελ. Παράρτημα.

Πρώτα αποτελέσματα συσχέτισης της θερμοκρασίας του νερού με την κλινική εμφάνιση του ιού της εγκεφαλοπάθειας-αμφιβληστροειδοπάθειας στο εκτρεφόμενο λαβράκι στη Δυτική Ελλάδα

Ευθύμιος Σπίνος^{1,2}, Χριστόφορος Βαβάσης², Βασίλειος Μπακόπουλος¹

¹ Τμήμα Επιστημών της Θάλασσας, Σχολή Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, e.spinos@marine.aegean.gr

² Τμήμα Αλιείας, Περιφερειακή Ενότητα Κεφαλληνίας

ABSTRACT

Efthimios Spinos^{1,2}, Christopher Vavasis², Vasileios Bakopoulos¹: First results of correlation of water temperature with the clinic appearance of betanodavirus encephalopathy and retinopathy in farmed sea bass in western Greece.

In the present study, a correlation of surface water temperature and the effect of viral encephalopathy and retinopathy in farmed sea bass *Dicentrarchus labrax* is conducted. The infected individuals, young and older fish, show a variety of symptoms such as erratic swimming and peculiar motional behaviors. The disease has been observed in all fish farms under study when the temperature of the water decreases, following a relatively hot summer with high temperatures. The encephalopathy and retinopathy virus affects mainly the farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*), leading to increased mortality.

Keywords: betanodavirus, *Dicentrarchus labrax*, temperature.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μέσα στην τελευταία δεκαετία οι λοιμώξεις από betanodavirus έχουν αναδειχθεί σημαντικοί περιοριστικοί παράγοντες στη θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια σχεδόν σε όλα τα μέρη του κόσμου. Η εμφάνιση αυτών των λοιμώξεων φαίνεται να είναι σε συνάρτηση με τον αριθμό των ειδών που καλλιεργούνται και με την ένταση της καλλιέργειας. Η έλλειψη γνώσης της επιδημιολογίας των ασθενειών που προκαλούνται από nodaviruses, εκτός από την κάθετη μετάδοση του παθογόνου παράγοντα σε ορισμένα είδη, δυσκόλεψε την ανάπτυξη μέτρων ελέγχου, με αποτέλεσμα μεγάλες απώλειες (Munday *et al.* 2002).

Η ιογενής νευρική νέκρωση (Viral Nervous Necrosis-VNN) (Yoshikoshi & Inoue 1990) ή ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια (Viral Encephalopathy and Retinopathy-VER) προκαλείται από ιούς του γένους b-Nodavirus της οικογένειας Nodaviridae και έχει βλάψει σημαντικά την παγκόσμια θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια από την πρώτη εμφάνισή του στα τέλη της δεκαετίας του 1980. Σε μονάδα εντατικής εκτροφής περιγράφηκε για πρώτη φορά, σε ένα εκκολαπτήριο εκτροφής του ψαριού *Oplegnathus fasciatus* στην Ιαπωνία (Yoshikoshi & Inoue 1990) και στο ασιατικό λαβράκι *Lates calcarifer* στην Αυστραλία (Glazebrook *et al.* 1990). Αργότερα, αναφέρθηκε στο καλκάνι *Scophthalmus maximus* (Bloch *et al.* 1991), στο ευρωπαϊκό λαβράκι *Dicentrarchus labrax* (Breuil *et al.* 1991) και στο είδος *Epinephelus akaara* (Mori *et al.* 1991).

Ο αριθμός των ειδών που προσβάλλονται από ιογενή νευρική νέκρωση αυξάνεται σταθερά. Αν συγκρίνουμε παλιότερες ανασκοπήσεις για τη νόσο (Munday & Nakai, 1997) με νεώτερες (Munday *et al.* 2002) βλέπουμε ότι από 19 είδη προσβαλλόμενων ψαριών που ανήκουν σε 10

οικογένειες και 3 τάξεις ο αριθμός αυξήθηκε σε 32 είδη ψαριών που ταξινομούνται σε 16 οικογένειες και 5 τάξεις. Σε πιο πρόσφατες δημοσιεύσεις ο αριθμός των ειδών έχει φθάσει τα 39 που ανήκουν σε 22 οικογένειες και 8 τάξεις (Nakai *et al.* 2009).

Τα μολυσμένα άτομα εμφανίζουν ακανόνιστη κολυμβητική συμπεριφορά, αλλά δεν έχουν παρατηρηθεί τέτοιες ανωμαλίες στην κολύμβηση σε προσβεβλημένες προνύμφες. Ιστοπαθολογικά η νόσος χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη νέκρωση και δημιουργία κενотоπιών στο κεντρικό νευρικό σύστημα, (εγκέφαλο, νωτιαίο μυελό) και στον αμφιβληστροειδή χιτώνα των ματιών. Υπάρχουν αποκλίσεις στη χρονική διάρκεια στην οποία παρουσιάζεται η θνησιμότητα σε σχέση με την αρχική εμφάνιση της νόσου (Munday *et al.* 2002). Κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού του 1995, εμφανίστηκε υψηλό επίπεδο θνησιμότητας σε εκτρεφόμενα λαβράκια σε πλωτές μονάδες σε δύο περιοχές τις Ελλάδας. Τα ψάρια και στις δύο περιοχές που επλήγησαν ανήκαν σε δύο διαφορετικές ηλικιακές κλάσεις και εμφάνισαν νευρικά συμπτώματα (Le Breton *et al.* 1997). Η ασθένεια, με τα μέχρι σήμερα δεδομένα είναι αποκλειστικά νόσος των ψαριών και πλήττει στην Ελλάδα, κυρίως το εκτρεφόμενο λαβράκι.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στην παρούσα μελέτη, γίνεται συσχέτιση της θερμοκρασίας επιφανειακού νερού και της εμφάνισης της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας σε εκτρεφόμενα ψάρια μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας, στις περιοχές νήσος Πεταλάς Εχινάδων νήσων, στον Αμβρακικό Κόλπο και σε δύο περιοχές στην Κεφαλονιά. Οι μονάδες στις περιοχές Κεφαλονιά Α και Κεφαλονιά Β βρίσκονται σε απόσταση μεταξύ τους γύρω στα 2 ν.μ. Οι θερμοκρασίες αφορούσαν τις περιόδους από Ιούνιο έως Δεκέμβριο των ετών 2011 και 2012. Στις περιοχές νήσος Πεταλάς, Αμβρακικός Κόλπος και Κεφαλονιά οι θερμοκρασίες που αναφέρονται στη μελέτη καταγράφονταν καθημερινά καθ' όλη τη χρονική περίοδο της μελέτης με ψηφιακά θερμομέτρα μεγάλης ακρίβειας.

Η ταυτοποίηση του μελετώμενου ιού έγινε σε δείγματα του εκτρεφόμενου είδους *Dicentrarchus labrax*, από πιστοποιημένα εργαστήρια, με τις μεθόδους και τις προδιαγραφές οι οποίες προβλέπονται διεθνώς. Στα δείγματα έγινε μικροβιολογικός και παρασιτολογικός έλεγχος με αρνητικά αποτελέσματα, καθώς και ιολογικός έλεγχος. Κατά τον ιολογικό έλεγχο έγινε ενοφθαλμισμός εξειδικευμένων κυτταρικών σειρών (BF-2, EPC και SSN-1) για την διαπίστωση ιογενούς μόλυνσης. Ο ενοφθαλμισμός εναιωρήματος ομογενοποιημένων εγκεφάλων και οφθαλμών στην κυτταρική σειρά SSN-1 έδωσε θετικά αποτελέσματα για την παρουσία του *Betanodavirus*. Η ταυτοποίηση του ιού έγινε με τη χρήση ειδικών για τον ιό μοριακών δεικτών σε PCR. Τα προς εξέταση δείγματα ψαριών προέρχονταν από όλες τις ηλικιακές ομάδες και από όλες τις μονάδες εκτροφής. Τα δείγματα είτε εμφάνιζαν κλινικά συμπτώματα είτε ήταν τυχαία και λαμβάνονταν σε όλη την διάρκεια των συμπτωμάτων (δεν πάρθηκαν δείγματα πριν την εμφάνιση της νόσου). Κατά τη διάρκεια της μελέτης καταγράφηκαν τα συμπτώματα και η συμπεριφορά των προσβεβλημένων ψαριών. Καταγράφηκαν επίσης η έναρξη και η λήξη των συμπτωμάτων της νόσου, η έναρξη και η λήξη της θνησιμότητας εξαιτίας της προσβολής των ψαριών από τον ιό και τέλος τα ποσοστά της θνησιμότητας στις πληγείσες μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα διαγράμματα της Εικ. 1 δίνεται η ημερήσια καταγραφή της θερμοκρασίας σε μονάδες

ιχθυοκαλλιέργειας της δυτικής Ελλάδος. Στον Πίνακα I δίνονται η έναρξη και η λήξη της εμφάνισης συμπτωμάτων του ιού της εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας σε εκτρεφόμενα ψάρια, η έναρξη και η λήξη θνησιμοτήτων σε σχέση με την θερμοκρασία και τα ποσοστά θνησιμότητας.

Κατά την διάρκεια της μελέτης παρατηρήθηκαν στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας καθ' όλη τη διάρκεια εμφάνισης των συμπτωμάτων, ακανόνιστη κολυμβητική συμπεριφορά, σπειροειδής στροβιλισμός και έντονη νευρική κούραση, των προσβεβλημένων ψαριών. Παρόμοια συμπτώματα παρατηρήθηκαν και στη μελέτη των Yoshikoshi & Inoue (1990), Bloch *et al.* (1991), Mori *et al.* (1991) και είναι χαρακτηριστικά της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας. Επίσης, από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η εμφάνιση της μεγάλης θνησιμότητας στα εκτρεφόμενα ψάρια των τεσσάρων μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας της δυτικής Ελλάδος, συμβαίνει έπειτα από παρατεταμένη διάρκεια υψηλών θερμοκρασιών τους καλοκαιρινούς μήνες. Επιδρά δε κυρίως στα μέσα του φθινοπώρου όταν η θερμοκρασία αρχίζει να μειώνεται. Από τον Le Breton *et al.* (1997), διαπιστώθηκε ανάλογη εμφάνιση στο λαβράκι *Dicentrarchus labrax*, σε ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες.

Από τις καμπύλες της θερμοκρασίας που δίνονται στα διαγράμματα της Εικ. 1 και τις τιμές του Πίνακα I φαίνεται ότι στις μονάδες Πεταλά και Αμβρακικού υπάρχει θνησιμότητα και τα δύο έτη της μελέτης, όμως παρόλο που η θερμοκρασία είναι υψηλότερη το 2012 καταγράφηκε μικρότερη θνησιμότητα, κάτι το οποίο πιθανώς οφείλεται στην λήψη διαχειριστικών μέτρων από τις ιδιοκτήτριες εταιρείες και πιθανή ανοσία των ψαριών που είχαν έρθει σε επαφή με τον ιό το έτος 2011. Στις μονάδες της Κεφαλονιάς το 2011 δεν καταγράφηκε θνησιμότητα εξαιτίας του betanodavirus, ούτε υπάρχουν στοιχεία για τους άγριους πληθυσμούς με κλινικά συμπτώματα του ιού που να καταδεικνύουν κάτι τέτοιο. Το έτος 2012 λόγω της παρατεταμένης υψηλής θερμοκρασίας που έφτασε τους 26-27°C, από το τέλος του καλοκαιριού μέχρι τα μέσα του φθινοπώρου δημιουργήθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες για την εμφάνιση του ιού. Η έναρξη των θνησιμοτήτων συνέβη όταν άρχισε να μειώνεται η θερμοκρασία του νερού κάτω από τους 26-27°C και λόγω της προσβολής των ψαριών από τον ιό η οποία διήρκεσε τόσο (από την έναρξη των συμπτωμάτων) ώστε να οδηγήσει στην κατάρρευση του οργανισμού τους.

Πίνακας I Αρχή και λήξη συμπτωμάτων θνησιμότητας και ποσοστό θνησιμότητας σε εκτρεφόμενα ψάρια μολυσμένα με τον ιό betanodavirus.

Table 1 Onset and end of symptoms, mortality and mortality rate in fish infected by betanodavirus.

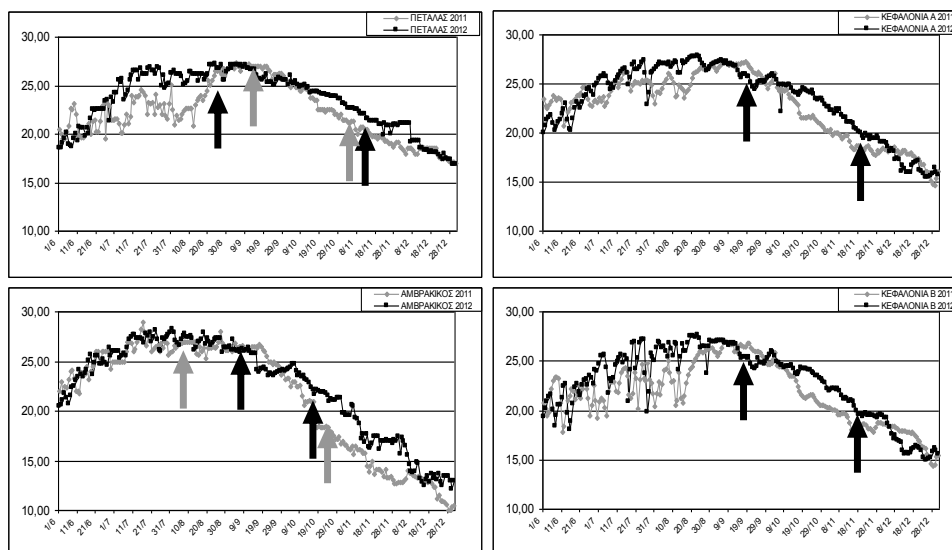
ΕΤΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	Αρχή συμπτωμάτων	Τέλος συμπτωμάτων	Αρχή θνησιμότητας	Τέλος θνησιμότητας	Ποσοστό μέσης θνησιμότητας (%)	
2011	ΠΕΤΑΛΑΣ	25/8	25/11	10/9	5/11	22 %	
	T °C	26,5	19,0	27,0	21,3		
2011	ΑΜΒΡΑΚΙΚΟΣ	20/7	20/11	5/8	24/10	30 %	
	T °C	28,0	18,3	26,8	18,3		
2012	ΠΕΤΑΛΑΣ	10/8	30/11	23/8	7/11	15 %	
	T °C	26,4	20,9	27,1	22,5		
2012	ΑΜΒΡΑΚΙΚΟΣ	20/8	20/11	4/9	22/10	10 %	
	T °C	27,3	17,4	26,1	21,9		
2012	ΚΕΦΑΛΟΝΙΑ Α	13/9	10/12	17/9	20/11	ψάρια έως 1 έτους	ψάρια 1-3 έτη

	T °C	26,7	17,2	25,9	19,6	20 %	5 %
2012	ΚΕΦΑΛΟΝΙΑ Β	13/9	10/12	17/9	20/11	ψάρια έως 1 έτους	ψάρια 1-3 έτη
	T °C	26,7	16,9	25,3	19,4	-	3 %

Υπάρχει κάποια ιδιαιτερότητα στις μονάδες της Κεφαλονιάς οι οποίες εμφάνισαν την νόσο παρόλο που είναι απομονωμένες γεωγραφικά. Σύμφωνα με τους υπευθύνους των συγκεκριμένων μονάδων παράγουν ιχθύδια σε ιχθυογεννητικό σταθμό ιδιοκτησίας τους και προμηθεύουν τις μονάδες πάχυνσης, χωρίς να εισάγουν γόνο ή ενήλικα ψάρια από άλλες περιοχές της Ελλάδας και γενικότερα της Μεσογείου θάλασσας ή της Ευρώπης. Αυτό καταδεικνύει ότι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα προσβολής των εκτρεφόμενων ψαριών και κυρίως του λαβρακιού από άγριους πληθυσμούς ψαριών. Θα πρέπει να σημειωθεί δε ότι οι ντόπιοι αλιείς ανέφεραν, στις τοπικές αρμόδιες Αρχές, περιστατικά άγριων ψαριών (κυρίως της οικογένειας Seranipidae) τα οποία είχαν συμπτώματα της νόσου.

Στη μονάδα της περιοχής Κεφαλονιά Α η θνησιμότητα που εμφανίζεται είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την θνησιμότητα της μονάδας της περιοχής Κεφαλονιά Β, παρόλο που οι μονάδες αυτές βρίσκονται στην ίδια θαλάσσια περιοχή σε μεγάλη όμως απόσταση μεταξύ τους. Αυτό μπορεί να οφείλεται, δεδομένου ότι τα ψάρια προέρχονταν από την ίδια πηγή, στη μικρότερη ημερήσια θερμοκρασία που καταγράφηκε στη συγκεκριμένη περιοχή και μπορεί να σχετίζεται με το διαφορετικό βάθος, τη ρευματογραφία της περιοχής και με το ότι στην εν λόγω μονάδα υπήρχαν ψάρια μεγαλύτερης ηλικίας (1-3 ετών) τα οποία είναι πιο ανθεκτικά στον ιό.

Υπάρχουν σε εξέλιξη ερευνητικά προγράμματα για την πρόληψη και την θεραπεία από τον ιό betanodavirus, αλλά είναι σημαντικό να λαμβάνονται προληπτικά διαχειριστικά μέτρα από τους ιχθυοκαλλιεργητές, όπως είναι η αραιώση των εκτρεφόμενων πληθυσμών, συχνόι καθαρισμοί των



Εκ. 1. Διαγράμματα θερμοκρασίας από μονάδες ιχθυοκαλλιεργειών τεσσάρων περιοχών της δυτικής Ελλάδας. Τα γκρι βέλη δείχνουν την εμφάνιση της θνησιμότητας το 2011 και τα μαύρα βέλη το 2012.

Fig. 1. Temperature charts from the farm in four regions of western Greece. The grey arrows indicate the mortality occurrence in 2011 and the black arrows in 2012.

διχτυών και συνεχής παρακολούθηση των φυσικοχημικών παραμέτρων και κυρίως της θερμοκρασίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bloch B., Gravningen K. & Larsen J.L. (1991). Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Diseases of Aquatic Organisms*, 10:65-70.
- Breuil G., Bonami J.R., Pepin J.F. & Pichot Y. (1991). Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 97:109-116.
- Glazebrook J.S., Heasman M.P. & De Beer S.W. (1990). Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Journal of Fish Diseases*, 13:245-249.
- Le Breton A., Grisez L., Sweetman J. & Olievier F. (1997). Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 20:145-151
- Mori K., Nakai T., Nagahara M., Muroga K., Mukuchi T. & Kanno T. (1991). A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathology*, 26:209-210.
- Munday B.L. & Nakai T. (1997). Special topic review: nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13:375-381.
- Munday B.L., Kwang J. & Moody N. (2002). Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases*, 25:127-142.
- Nakai T., Mori K., Sugaya T., Nishioka T., Mushiake K. & Yamashita H. (2009). Current Knowledge on Viral Nervous Necrosis (VNN) and its Causative Betanodaviruses. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 61(3) :198-207.
- Yoshikoshi K. & Inoue K. (1990). Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 13:69- 77.

Humoral response of sea bass *Dicentrarchus labrax* L. after intraperitoneal immunization with commercial and experimental vaccines

Bakopoulos, V.¹, Nikolaou, I.¹, Laspà, E.¹, Kosma, I.¹ and Spinos, E.¹

¹Department of Marine Science, University of the Aegean, University Hill, Mytilene 81100, Greece v.bakopoulos@marine.aegean.gr, mar08073@marine.aegean.gr, mar31304@marine.aegean.gr, mar08042@marine.aegean.gr, e.spinos@marine.aegean.gr

Abstract

Groups of sea bass were immunized with adjuvanted and aqueous commercial vaccines (*Vibrio* spp. & *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) and experimental formulations (only *Ph. damsela* subsp. *piscicida*) in order to measure specific IgM levels against either of the bacterial pathogens. The commercial adjuvanted vaccine caused the production of the highest specific IgM levels against both pathogens in all cases compared to the other aqueous formulations. Differences were noted in the level of reaction when the sera isolated from the fish immunized with the commercial adjuvanted vaccine were tested against a natural *V. anguillarum* O1 isolate and the strain of the same bacterium that contained in the aqueous vaccine formulation of the same company, the level of reaction being higher to the latter.

Keywords: Adjuvanted vaccines, aqueous vaccines, *Vibrio*, *Pasteurella*, sea bass, humoral response, IgM

1. Introduction

The most important bacterial diseases of maricultured fish are caused by the Gram negative bacteria *Vibrio anguillarum* serotypes (Sorensen & Larsen, 1986; Toranzo & Barja, 1990) and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phdp, hereafter) (Bakopoulos et al., 1995), respectively. Prevention against these diseases is practiced by hygiene measures and vaccination. Vaccination is preferred to be applied at minimum applications in the life span of cultivated sea bass, at the expense of better protection through anamnestic administrations. Commercially available vaccines against either vibriosis or photobacteriosis have been available with a good protection conferred against vibriosis (Woo & Bruno, 1999) and variable results regarding photobacteriosis, especially in the field (Nakai et al., 1992; Le Breton, 1999; Romalde, 2014). More recently, multivalent vaccines have been manufactured containing serotypes I & II of *V. anguillarum* and Phdp inactivated bacterial cells. The production of such products was forced by the need of only one vaccine application as well. However, there are no published scientific data on the humoral response achieved by these multivalent products. The objective of this study was to compare the humoral response of two commercial and an experimental vaccines (inactivated with formalin or heat) against Phdp and of the two commercial vaccines against *V. anguillarum* O1.

2. Materials & Methods

Bacteria: A Phdp strain isolated in Greece in N. Evoia during a natural photobacteriosis outbreak affecting sea bass in the summer of 2012 was used throughout this study (production of experimental formulations, infection and in ELISA tests). A *V. anguillarum* O1 strain isolated from sea bass in 2013 in the Ionian sea and *V. anguillarum* O1 strain cells isolated from an aqueous commercial vaccine were also utilized (both in ELISA). All bacteria were made suspensions in sterile solution of 2% NaCl at an OD₆₀₅=1, corresponding to 10⁹ bacterial cells/ml.

Commercial and experimental vaccines: Two commercially available vaccines against vibriosis & photobacteriosis were utilized in this study. The adjuvanted vaccine (AJ, hereafter), which is used for i.p. injection, contains inactivated cultures of the bacteria *V. anguillarum* (serotype I) and Phdp and a non-mineral oil adjuvant. The aqueous vaccine (AV, hereafter), which can be used in both immersion and i.p. injection, contains formalin-inactivated cultures of the bacteria *V. anguillarum* 785KID and MSC275 (serotype I & II) and Phdp in an aqueous solution. The experimental vaccine was prepared as described before (Bakopoulos et al., 2003) with the modification to be that the culture liquid was not

separated from bacterial cells. Part of the bacterial mixture was then formalin-inactivated as described before (Bakopoulos et al., 2003) and this experimental vaccine mixture is referred to as EVF, hereafter. The other part of the bacterial mixture was heat inactivated at 57°C for 30min. This experimental vaccine mixture is referred to as EVH, hereafter.

Immunization & blood sampling: Five groups of 50 fish each with an average weight of 10gr non-vaccinated sea bass were immunized i.p. with 50μL of each different vaccine with one group serving as control receiving the same volume of sterile 2% NaCl. On the day of immunization and periodically until day 68 post-immunization blood was collected from each different fish group (3 fish / group, each sampling), serum was isolated and then pooled and stored at -20°C for future testing. Temperature during the experiment ranged between 21.5-24.05°C in mid-summer.

Measurement of specific immunoglobulins (IgMs) in sea bass serum samples: Serum samples were utilized in an indirect ELISA analysis (Bakopoulos et al., 1997) for the determination of specific IgM levels against Phdp and two strains of *V. anguillarum* O1. Results were read in a MR-96A microplate reader (MINDRAY).

3. Results

The levels of sea bass specific IgM levels against Phdp from all fish groups for the duration of the study (10 samplings) are presented in Fig. 1. Specific anti-Phdp IgM levels started rising from day (D) 19 post-immunization, especially for the commercial vaccines, reached a plateau on D29 post-immunization and settled to a slightly lower level until the end of the experiment. This was the case for the AJ vaccine, since for the AV vaccine levels dropped more. For the experimental formulations, EVF and EVH, much lower specific IgM levels were measured in comparison to the commercial products, in almost all samplings. It is worth noting that specific anti-Phdp IgM levels produced in response to the immunization with the AJ vaccine were the highest measured from D19 post-immunization.

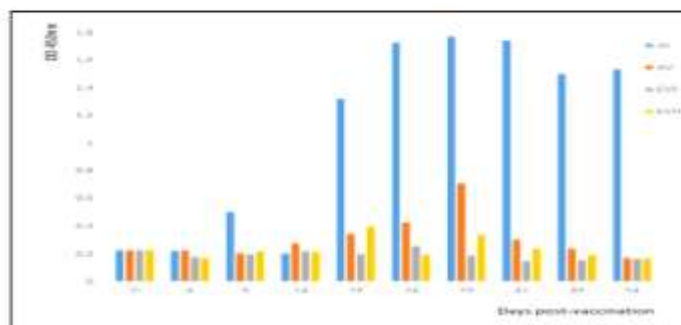


Fig. 1. Sea bass specific IgM levels against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

In order to assess what will be the effect of infection of immunized fish on the humoral immune response, all fish groups were i.p. infected on D49 post-immunization with Phdp and an LD₄₅ dose (3.25x10⁴ bacterial cells/fish) and blood samples and serum was isolated from the survivors 19 days post-infection. These sera were utilized in ELISA analysis for specific anti-Phdp IgM levels and the findings are presented in Fig.2. An anamnestic effect of immunization was evident only for the AJ and the EVF formulations, comparing for each formulation specific anti-Phdp IgM levels at D54 (end of experiment), D19 from immunization and D19 post-infection.

The levels of sea bass specific IgM levels against *V. anguillarum* O1 from all fish groups for the duration of the study (10 samplings) are presented in Fig. 3a (strain from natural outbreak) and 3b (strain isolated from an aqueous commercial *Vibrio* vaccine). Specific anti-*V. anguillarum* O1 IgM levels started rising from day D19 post-immunization, especially for the AJ, reached a plateau on D41 post-immunization and settled to a slightly lower level until the end of the experiment. The AV-

produced IgM levels were much lower and seemed to fluctuate at these low levels throughout the study.

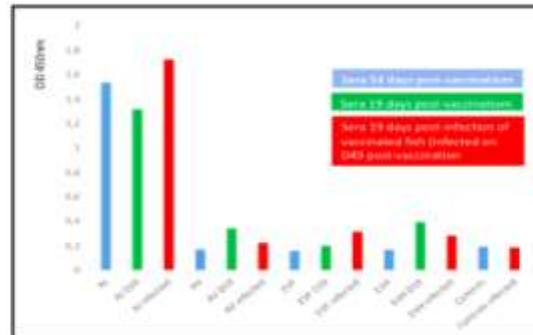


Fig. 2. Sea bass specific IgM levels against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* after infection.

Once more, specific anti-*V. anguillarum* O1 IgM levels produced in response to the immunization with the AJ vaccine were the highest measured in both cases, when sera tested against *V. anguillarum* O1 from a natural outbreak (Fig.3a) or against *V. anguillarum* O1 isolated an aqueous commercial *Vibrio* vaccine (Fig. 3b), but in the latter case specific IgM levels almost doubled.

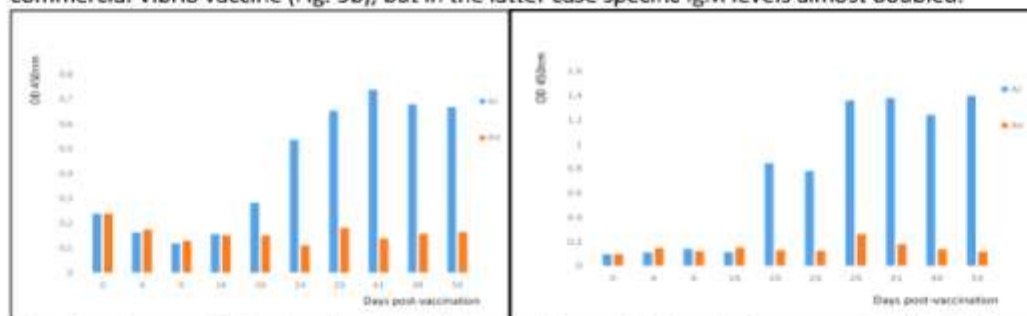


Fig. 3. Sea bass specific IgM levels against *Vibrio anguillarum* O1; (a) strain from natural outbreak, (b) strain from an aqueous commercial *Vibrio* vaccine.

These differences in the measured specific anti-*V. anguillarum* O1 IgM levels for the fish immunized with the AJ vaccine are depicted in Fig.4. The differences in IgM levels measured are evident, while no such difference between the two *V. anguillarum* O1 strains was noted for the sera collected from fish immunized with the AV vaccine (data not shown).

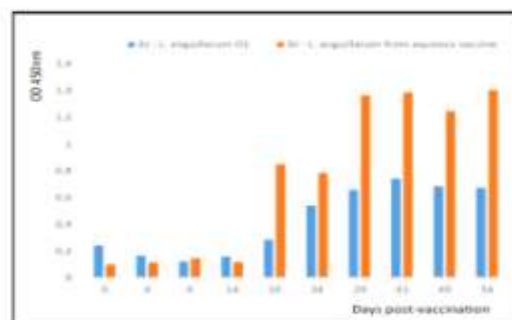


Fig. 4. Reaction of sea bass sera vaccinated with the AJ vaccine against two different *V. anguillarum* O1.

4. Discussion

The analysis of sea bass sera collected during this experimental procedure showed that the AJ commercial vaccine caused the production of the highest IgM levels against Phdp. The AV vaccine caused the production of higher anti-Phdp IgM levels from D24 to D49 post-immunization compared to the EVF and EVH formulations and then IgM levels dropped to similar levels. Results demonstrate that the adjuvant included in the AJ vaccine acts in a beneficial way towards the production of increased levels of IgM in contrast to the other formulations that were aqueous and IgM levels were indisputably much lower. Adjuvants cause an intense attraction of various types of leukocytes at the location of the vaccine and may have a prolonged effect because of a slower antigen release (Afonso et al., 2005). These may have a positive quantitative stimulation effect on the immune response. Antigenic stimulation of immunized fish led to increased specific anti-Phdp IgM production only in the fish immunized with the AJ and the EVF formulations indicating the induction of a stronger immunological memory effect. Similarly, higher levels of specific anti-*V. anguillarum* O1 IgM levels were caused by the AJ vaccine in comparison to the AV vaccine. Testing for these specific anti-*V. anguillarum* O1 IgM against an isolate from a natural outbreak and the antigens included in an aqueous commercial *Vibrio* vaccine, revealed a difference in the magnitude of response indicating antigenic differences between the natural isolate and the strain used for vaccine production. This may have implications on efficacy in the field.

5. Acknowledgements

This study was funded by the Department of Marine Sciences, School of The Environment, University of The Aegean, Greece. We wish to thank Mr Frentzos Athanasios, Cephallonian Aquaculture S.A., for the provision of the commercial vaccines, Dr Kantham Larksmi, Nireus S.A. for the kind donation of the Phdp isolate and Mr Athanasios Prapas for the donation of the *V. anguillarum* O1 wild isolate.

6. References

- Afonso, A., Gomes, S., da Silva, J., Marques, F. and Henrique, M. 2005. Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 19, 1-16.
- Bakopoulos, V., Adams, A. and Richards, R.H. 1995. Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece and comparison with strains from Japan, France and Italy. *Journal of Fish Diseases*, 18, 1-7.
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Adams, A., Galleotti, M. and Richards, R.H. 1997. Qualitative differences in the immune response of rabbit, mouse and sea bass, *Dicentrarchus labrax*, L. to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, the causative agent of fish Pasteurellosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 7, 161-174.
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Gusmani, L., Galeotti, M., Adams A. et al. 2003. Vaccination trials of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, using novel vaccine mixtures. *Journal of Fish Diseases*, 26 (2), 77-90.
- Le Breton A.D. 1999. Mediterranean finfish pathologies: present status and new developments in prophylactic methods. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 19, 250-253.
- Nakai, T., Fujii, N., Muroga, K., Arimoto, M., Mizuta, Y. et al. 1992. *Pasteurella piscicida* infection in hatchery reared juvenile striped jack. *Gyobya Kenkyu*, 27, 103-108.
- Romalde, J.L. 2014. Vaccination against Photobacteriosis. p. 200-210. In: *Fish Vaccination*. Gudding, R., Lillehaug A., Evensen, Ø. (eds). John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Sorensen, U.B. and Larsen, J.L. 1986. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Applied & Environmental Microbiology*, 51 (3), 593-597.
- Toranzo, A.E. and Barja, J.L. 1990. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Diseases of Aquatic Organisms*, 9, 73-82.
- Woo, P.T.K. and Bruno, D.W. (eds.). 1999. *Fish Diseases and Disorders, Vol. 3, Viral, Bacterial and Fungal Infections*. CAB International Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 901 pp.

16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιχθυολόγων 6-9/10/2016

Συσχέτιση της θερμοκρασίας με την εμφάνιση ασθενειών στο εκτρεφόμενο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) στον Κόλπο Αργοστολίου Κεφαλονιάς

Ευθύμιος Σπίνος^{1,2} Βασίλειος Μπακόπουλος¹

1 Τμήμα Επιστημών της Θάλασσας, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη Λέσβος, e.spinos@marine.aegean.gr, vbakopoulos@marine.aegean.gr

2. Τμήμα Αλιείας, Περιφερειακή Ενότητα Κεφαλληνίας, Αργοστόλι Κεφαλονιά, espinos@pin.gov.gr

ABSTRACT

Efthimios Spinos^{1,2} Vasileios Bakopoulos¹. Correlation of temperature and the occurrence of diseases in farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) in the Gulf of Argostoli Kefalonia.

The purpose of this study is to correlate the seasonal fluctuations of temperature with the appearance of pathologies in farmed sea bass in the Argostoli Gulf. The surface water temperature in the study area was recorded every hour, daily, from January 2013 to December 2014. Outbreaks of Winter syndrome were correlated to temperature in both sea bass and, especially, sea bream, (Gallardo *et al.* 2003). The syndrome appeared when temperature was substantially lower during January, February and March. Disease outbreaks caused by *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum* and *Photobacterium* (*Pasteurella*) *damsela* subsp. *piscicida* occurred during the summer months when there is a temperature increase. Finally, viral encephalopathy-retinopathy occurred after prolonged periods of high water temperature and when the latter decreases in early to mid-autumn. Evidence showed that pathologies in farmed sea bass are directly related to water temperature which is a crucial environmental factor.

Keywords: Aquaculture, vibriosis, pasterellosis, viral encephalopathy-retinopathy, winter syndrome.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εντατικοποίηση των υδατοκαλλιεργειών έχει οδηγήσει στην εμφάνιση ασθενειών ποικίλης προελεύσεως. Αυτές μπορεί να οφείλονται σε μολυσματικούς ή μη μολυσματικούς παράγοντες. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που μπορεί να προκαλέσουν μολυσματικές ασθένειες στα ψάρια είναι ιοί, βακτήρια, μύκητες και παράσιτα (Athanasopoulou & Bitchava 2010).

Μια σοβαρή ασθένεια που προσβάλλει κυρίως το εκτρεφόμενο λαβράκι είναι η δονακίωση των ψαριών. Ο ορότυπος του *L. anguillarum* που απομονώνεται συνηθέστερα στα Μεσογειακά εκτρεφόμενα είδη είναι ο O1, ενώ ο ορότυπος O3 εμφανίζεται σε νύμφες λαβρακιού (Santos *et al.*, 1995). Η δονακίωση εμφανίζεται ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου και της άνοιξης, όταν η θερμοκρασία του νερού βρίσκεται μεταξύ 15-20°C. Το βακτήριο παρουσιάζει μέγιστους και ελάχιστους πληθυσμούς το καλοκαίρι και το χειμώνα αντίστοιχα (Larsen 1983). Η δονακίωση έχει παρατηρηθεί και κατά τη διάρκεια του χειμώνα σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 15°C (Grisez & Ollevier 1995). Η Παστερέλλωση αποδίδεται στο βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phdp), το οποίο είναι ένα Gram (-) βακτήριο, αλόφιλο, ακίνητο, με διπολική χρώση, και πολυμορφισμό από κόκκους και δονάκια μέχρι και νηματώδεις μορφές (Romalde 2002). Η ασθένεια εμφανίζεται από την άνοιξη έως το φθινόπωρο σε θερμοκρασία νερού 18-20°C (Magarinos *et al.* 1992). Επίσης, εμφανίζει εποχική έξαρση και σχετίζεται ιδιαίτερα με τους καλοκαιρινούς μήνες, όταν η θερμοκρασία υπερβαίνει τους 23°C (Magarinos *et al.* 1995). Μέσα στην τελευταία εικοσαετία οι λοιμώξεις από b-Nodavirus έχουν αναδειχθεί σημαντικοί περιοριστικοί παράγοντες στη θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια σχεδόν σε όλα τα μέρη του κόσμου και η εμφάνιση αυτών των λοιμώξεων φαίνεται να είναι σε συνάρτηση με τον αριθμό των ειδών που καλλιεργούνται, καθώς και με την ένταση της καλλιέργειας (Munday *et al.* 2002). Η ασθένεια, με τα μέχρι σήμερα δεδομένα είναι αποκλειστικά νόσος των ψαριών και πλήττει στην Ελλάδα κυρίως το εκτρεφόμενο λαβράκι (Le Breton *et al.* 1997). Το πρόβλημα της χαμηλής θερμοκρασίας είναι κρίσιμο στην εντατική καλλιέργεια, διότι τα ψάρια δεν μπορούν να μετακινηθούν σε θερμότερα νερά. Στην πραγματικότητα, όταν η θερμοκρασία πέφτει στους 8-10°C, η κορτιζόλη του πλάσματος των εκτιθέμενων ψαριών αυξάνεται ως αντίδραση στο στρες και σε θερμοκρασίες κάτω των 12°C, τα ψάρια σταματούν να τρέφονται (Gallardo *et al.* 2003). Η ασθένεια η οποία αποδίδεται

στη πτώση της θερμοκρασίας του νερού είναι το «Χειμερινό Σύνδρομο» (Winter Syndrome), το οποίο επηρεάζει αποκλειστικά καλλιέργειες στη Μεσόγειο θάλασσα και είναι πιο σοβαρό στις βόρειες περιοχές της. Τα είδη που επηρεάζονται από αυτή την ασθένεια είναι το λαβράκι, η τσιπούρα (είναι το είδος που έχει αναφερθεί κυρίως η παθολογική κατάσταση-μπορεί να συνδέεται/συνοδεύεται και από βακτηριακές μολύνσεις) και το καλκάνι, που συχνά μπορεί να εκτρέφονται και στις ίδιες εγκαταστάσεις (Gallardo *et al.* 2003). Το σύνδρομο αυτό προκαλεί θνησιμότητα κατά τους ψυχρότερους μήνες και οξεία επεισόδια θνησιμότητας όταν η θερμοκρασία ανεβαίνει, μειώνει δε την ικανότητα των ψαριών να αντιστέκονται σε επιθέσεις από ευκαιριακά παράσιτα, φαίνεται να επηρεάζει μόνο τα πιο αδύναμα και τα μικρότερα ψάρια, ή ψάρια που είναι πιο ευαίσθητα στο στρες και τις τοξίνες και τα προσβεβλημένα ψάρια δείχνουν μερική ηπατική ανεπάρκεια, είτε ως αιτία, είτε ως αποτέλεσμα (Gallardo *et al.* 2003).

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να γίνει συσχέτιση των εποχικών διακυμάνσεων της θερμοκρασίας με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων στο εκτρεφόμενο λαβράκι στον Κόλπο Αργοστολίου και τα συμπεράσματα που θα προκύψουν θα χρησιμεύσουν στον κλάδο των ιχθυοκαλλιεργειών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η περιοχή μελέτης ήταν ο Κόλπος Αργοστολίου ο οποίος είναι ένας ημίκλειστος Κόλπος με μήκος 13,5km στον άξονα βορρά-νότου και μέσο πλάτος 2,8km. Επικοινωνεί με το Ιόνιο Πέλαγος στο νότιο τμήμα του μέσω ενός ανοίγματος πλάτους 2,9km. Στο μεγαλύτερο μέρος του ο Κόλπος έχει βάθος 10m ενώ το μέγιστο βάθος του είναι περίπου 25m. Στον εν λόγω Κόλπο δραστηριοποιούνται δύο εταιρείες ιχθυοκαλλιέργειας με τρεις συνολικά μονάδες και συστοιχίες ιχθυοκλωβών, τοποθετημένες στο μεσο-ανατολικό τμήμα του Κόλπου.

Οι τιμές της θερμοκρασίας του νερού της περιοχής μελέτης καταγράφονταν από τον Ιανουάριο 2013 έως τον Δεκέμβριο 2014. Για την παρακολούθηση της θερμοκρασίας τοποθετήθηκαν αυτόματα αδιάβροχα καταγραφικά (τύπου Hobo) στο κέντρο των πλωτών μονάδων πάχυνσης σε δύο θέσεις (οι οποίες βρίσκονται βόρεια και νότια σε απόσταση περίπου 2,5 ν.μ. μεταξύ τους) στον Κόλπο Αργοστολίου, στην επιφάνεια του νερού και σε βάθος 1,0-2,0m. Η καταγραφή της θερμοκρασίας γινόταν καθημερινά (ανά 1 ώρα) και συνεχίστηκε σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Στοιχεία για την θνησιμότητα και τα αίτια που την προκάλεσαν, καθώς επίσης και για το είδος και την εμφάνιση των ασθενειών, δόθηκαν από το αρχείο της εταιρείας Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς Α.Ε.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από μελέτη στις ιχθυοκαλλιέργειες του Κόλπου Αργοστολίου πρόεκυψε ότι η θερμοκρασία του νερού παρουσιάζει τη τυπική εποχική διακύμανση των εύκρατων θαλάσσιων περιοχών του βορείου ημισφαιρίου, με μέγιστο τον Ιούλιο-Αύγουστο και ελάχιστο τον Φεβρουάριο. Η μέση θερμοκρασία του νερού στην περιοχή εκτιμάται στους 19,4°C, η μέση ελάχιστη στους 11,9°C και η μέση μέγιστη στους 27,5°C, ενώ δεν καταγράφεται στατιστικά σημαντική τάση (αύξηση ή μείωση) (Katselis *et al.* 2013).

Από στοιχεία για την εμφάνιση ασθενειών σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου (πίνακας 1), έγινε συσχέτιση της μέσης ημερήσιας θερμοκρασίας, κατά την διάρκεια των ετών 2013 και 2014, με την εμφάνιση αυτών των παθολογικών καταστάσεων στο εκτρεφόμενο λαβράκι στις εν λόγω μονάδες (σχήμα 1), οι οποίες είναι λοιμώξεις που προκαλούνται από τα βακτήρια *L. anguillarum* και *P. damsela* subsp. *Piscicida*, η ιογενής εγκεφαλοπάθεια που προκαλείται από τον ιό b-*Nodavirus* και τέλος το χειμερινό σύνδρομο.

Πίνακας 1. Εμφάνιση ασθενειών σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας στις θέσεις Κόκκινος Βράχος και Λιβάδι του Κόλπου Αργοστολίου (αρχείο Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς ΑΕ).

Table 1. Diseases on fish farms in locations Red Rock and Meadow of Argostoli Gulf (from files of Kefalonia Fisheries SA).

Ημερομηνία	Ασθένεια	% Θνησιμότητα (Κόκκινος Βράχος)	% Θνησιμότητα (Λιβάδι)	Εμφάνιση ασθένειας
01-31/01/2013	Winter syndrome	7,00	0,00	Στο σύνολο των κλωβών όπου εμφανίσθηκε

01-31/07/2013	<i>Pasteurella piscicida/Listonella anguillarum</i>	15,00	7,00	Στο σύνολο των κλωβών όπου εμφανίσθηκε
01/09-07/11/2013	b-Nodavirus	10,00	2,00	Στο σύνολο του πληθυσμού της περιοχής
01-31/03/2014	Winter syndrome	2,00	0,00	Στο σύνολο των κλωβών όπου εμφανίσθηκε
01-31/07/2014	<i>Pasteurella piscicida/Listonella anguillarum</i>	7,00	3,00	Στο σύνολο των κλωβών όπου εμφανίσθηκε
17/10-15/12/2014	b-Nodavirus	11,00	4,50	Στο σύνολο του πληθυσμού της περιοχής

Σύμφωνα με τα στοιχεία που αναφέρονται στον πίνακα 1, η εμφάνιση και η εκδήλωση συγκεκριμένων ασθενειών στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου, έχουν εποχική περιοδικότητα. Οι λοιμώξεις από *L. anguillarum* και *P. piscicida* εμφανίστηκαν τους καλοκαιρινούς μήνες, η ιογενής εγκεφαλοπάθεια εμφανίστηκε και εκδηλώθηκε, έπειτα από το καλοκαίρι και μετά από παρατεταμένες υψηλές τιμές της θερμοκρασίας, όταν η συγκεκριμένη παράμετρος μειώνεται στις αρχές έως τα μέσα του φθινοπώρου (Srinios *et al.* 2013), ενώ το χειμερινό σύνδρομο (Gallardo *et al.* 2003) παρουσιάστηκε τους μήνες Ιανουάριο, Φεβρουάριο και Μάρτιο. Σχετικά με τα ποσοστά θνησιμότητας στις δύο θέσεις που λειτουργούν μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας, φαίνεται ότι στη θέση Λιβάδι είναι χαμηλότερα σε σχέση με τη θέση της μονάδας στη θέση Κόκκινος Βράχος. Επίσης διαφορετική είναι και η εξάπλωση της κάθε ασθένειας στις πλωτές μονάδες, με την ιογενή εγκεφαλοπάθεια να έχει ευρύτερη εξάπλωση σε όλον τον πληθυσμό των ψαριών στις συγκεκριμένες θέσεις εκτροφής. Αυτό μπορεί να οφείλεται, δεδομένου ότι τα ψάρια προέρχονταν από τον ίδιο Ιχθυογεννητικό Σταθμό, σε διαφορές στις φυσικοχημικές παραμέτρους που πιθανώς σχετίζονται με το διαφορετικό βάθος και τη ρευματογραφία της περιοχής.



Σχήμα 1. Συσχέτιση της θερμοκρασίας με την εμφάνιση ασθενειών σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Κόλπου Αργοστολίου.

Figure 1. Correlation of temperature and the occurrence of diseases in aquaculture sites of Argostoli Gulf.

Από την προαναφερθείσα συσχέτιση προέκυψε ότι οι λοιμώξεις από *L. anguillarum* και *P. piscicida* εμφανίζονται τους καλοκαιρινούς μήνες όταν η θερμοκρασία αυξάνεται (ανοιχτόχρωμες γκρι στήλες του γραφήματος), η ιογενής εγκεφαλοπάθεια εκδηλώνεται έπειτα από το καλοκαίρι και παρατεταμένες υψηλές τιμές της θερμοκρασίας και όταν αυτή μειώνεται στις αρχές με μέσα του φθινοπώρου (μαύρες στήλες του γραφήματος), ενώ το χειμερινό σύνδρομο κάνει την εμφάνισή του όταν μειώνεται αισθητά η θερμοκρασία τους μήνες Ιανουάριο, Φεβρουάριο και Μάρτιο (σκούρες γκρι στήλες του γραφήματος).

Η θερμοκρασία είναι η παράμετρος που επηρεάζει περισσότερο την εμφάνιση ασθενειών στις ιχθυοκαλλιέργειες του Κόλπου Αργοστολίου, η οποία παρουσιάζει μέσο ελάχιστο τον Φεβρουάριο με 11,9°C και μέσο μέγιστο τον Αύγουστο με 27,5°C και λειτουργεί συνεργιστικά με άλλους παράγοντες,

όπως είναι τα ρεύματα, το βάθος στο οποίο βρίσκονται οι κλωβοί, πηγές υπόγειου γλυκού νερού που αναβλύζει στην ανατολική περιοχή του Κόλπου Αργοστολίου και τη διαχείριση κατά την διάρκεια εκτροφής, ενώ φαίνεται να αποτελεί σημαντικό προδιαθέτοντα παράγοντα εποχικής εμφάνισης ασθενειών. Συγκεκριμένα κατά τους φθινοπωρινούς μήνες έχουμε την εμφάνιση της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας. Ο ιός b-Nodavirus εμφανίστηκε λόγω της παρατεταμένης υψηλής θερμοκρασίας που έφτασε τους 26-27°C, από το τέλος του καλοκαιριού μέχρι τα μέσα του φθινοπώρου και δημιουργήθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες για την εκδήλωσή του στα ήδη μολυσμένα ψάρια. Η έναρξη της συμπτωματολογίας και της θνησιμότητας σε υψηλά ποσοστά συνέβη όταν άρχισε να μειώνεται η θερμοκρασία του νερού κάτω από τους 26-27°C λόγω της προσβολής των ψαριών από τον ιό και της ανάπτυξής του στον ξενιστή κατά την προηγούμενη θερμή περίοδο, η οποία διήρκησε τόσο ώστε να οδηγήσει στην κατάρρευση του οργανισμού τους (Spinos *et al.* 2013).

Συμπερασματικά, σε μονάδες εκτροφής λαβρακιού στην περιοχή μελέτης, τους καλοκαιρινούς μήνες κάνουν την εμφάνισή τους η δονακίωση και η παστερέλλωση, μετά από ένα πολύ ζεστό καλοκαίρι εμφανίζεται το φθινόπωρο η ιογενής εγκεφαλοπάθεια, ενώ κατά τη διάρκεια του χειμώνα όταν η θερμοκρασία είναι χαμηλή εμφανίζεται το χειμερινό σύνδρομο.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστούμε την εταιρεία «Ιχθυοτροφεία Κεφαλονιάς Α.Ε.» για την παροχή στοιχείων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Athanassopoulou F. & Bitchava K. (2010). Main pathological conditions in Mediterranean marine finfish culture. "Recent Advances in Aquaculture Research", Transworld Research Network, 149-201, Kerala, India
- Gallardo M.A., Rebanal M.S., Ibarz A., Padros F., Blasco J., Borrás J.F., Sanchea J. (2003). Functional alterations associated with "winter syndrome" in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 223: 15–27.
- Grisez L. & Ollevier F. (1995). Comparative Serology of the Marine Fish Pathogen *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12):4367-4373.
- Katselis G., Ramfos A., Avramides P., Poulos K. (2013). Technical Report entitled: "Analysis of the physicochemical, sediment and biological parameters to be established Organized Aquaculture Development Areas of Kefalonia island (Gulf of Argostoli)" Phase I., p. 36-48.
- Larsen J.L. (1983). *Vibrio anguillarum*: influence of temperature, PH, NaCl concentration and incubation time on growth. *Journal of Applied Bacteriology* (1984), 57:237-246.
- Le Breton A., Grisez L., Sweetman J. & Ollevier F. (1997). Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 20:145-151.
- Magarinos B., Noya M., Romalde J.L., Perez G. & Toranzo A.E. (1992). Phenotypic, Antigenic, and Molecular Characterization of *Pasteurella piscicida* Strains isolated from Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(10):3316-3322.
- Magarinos B., Pazos F., Santos Y., Romalde J.L., Toranzo A.E. (1995). Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 21:103-108.
- Munday B.L., Kwang J. & Moody N. (2002). Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases*, 25:127-142.
- Romalde J.L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* : an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, 5:3-9.
- Santos Y., Pazos F., Bandin I., and Toranzo A.E. (1995). Analysis of Antigens Present in the Extracellular Products and Cell Surface of *Vibrio anguillarum* Serotypes O1, O2, and O3. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7): 2493-2498.
- Spinos E., Vavasis X., Bakopoulos V. (2013). First results of correlation of water temperature with clinical signs development of the encephalopathy-retinopathy virus in cultured sea bass in Western Greece. 15th Panhellenic Ichthyologists Conference. Aquatic Ecosystems: uses, effects and management. Thessalonica 10-13/10/2013.