

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΣΗΣ ΣΕ ΕΝΤΑΤΙΚΕΣ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΥΔΡΟΒΙΩΝ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ  
ΕΛΛΑΔΑ**

**ΓΟΥΡΖΙΩΤΗ Γ. ΕΥΓΕΝΙΑ**

Κτηνίατρος, MSc

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

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

Καρδίτσα 2014

*Στην οικογένεια μου  
και στους φίλους μου που ήταν πάντα δίπλα μου*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή εστιάζεται αφενός στην μελέτη της νόσου της μυξοβακτηριδίασης από το μυξοβακτηρίδιο *Tenacibaculum maritimum* σε εκτρεφόμενους πληθυσμούς θαλάσσιων ψαριών στην Ελλάδα και αφετέρου στην πραγματοποίηση πειραματικών μολύνσεων με το *T. maritimum* σε ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού για τον έλεγχο της παθογόνου δράσης του, καθώς και την μελέτη της επίδρασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T, στην αντιμετώπιση της νόσου της μυξοβακτηριδίασης.

Διερευνήθηκε η παρουσία του βακτηρίου *T. maritimum* σε εκτρεφόμενα είδη θαλάσσιων ψαριών σε διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και εκτιμήθηκε η κατάσταση της μυξοβακτηριδίασης στην Ελλάδα κατά την διάρκεια τεσσάρων (4) εποχικών δειγματοληψιών. Περιγράφηκε επίσης η παρουσία των μυξοβακτηριδίων, των θαλασσινών εκτρεφόμενων ψαριών στην Ελλάδα, σε σχέση με την γεωγραφική προέλευση, την εποχή, το είδος και την ηλικία των ψαριών, καθώς επίσης και αν αυτά στελέχη εμφανίζουν παρόμοιο βιοχημικό προφίλ, εντός των ελληνικών συνόρων. Ταυτοποιήθηκαν, κωδικοποιήθηκαν και διατηρήθηκαν βακτηριδιακά στελέχη του *T. maritimum* για μελλοντικές μελέτες.

Κύριοι στόχοι της διατριβής που υλοποιήθηκαν, είναι:

- Η απομόνωση και η ταυτοποίηση παθογόνων μυξοβακτηριδίων από εκτρεφόμενα στην Ελλάδα ψάρια (Μεσογειακά θαλασσινά είδη) με μικροβιολογικές, βιοχημικές και μοριακές μεθόδους.
- Ο έλεγχος της παθογόνου δράσης των απομονωμένων βακτηριδιακών στελεχών στα πιο ευαίσθητα είδη, με την πραγματοποίηση πειραματικών μολύνσεων σε ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού.
- Η ιστοπαθολογική μελέτη των ασθενών ψαριών.
- Η διατήρηση των απομονωμένων βακτηριδιακών στελεχών για μελλοντικές μελέτες, δημιουργία τράπεζας μυξοβακτηριδίων από τις Ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες.

Η διατριβή χωρίζεται σε πέντε κεφάλαια: 1<sup>ο</sup> Εισαγωγή, 2<sup>ο</sup> Υλικά & Μέθοδοι, 3<sup>ο</sup> Αποτελέσματα, 4<sup>ο</sup> Συζήτηση και 5<sup>ο</sup> Βιβλιογραφία.

Στην Εισαγωγή, γίνεται ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας. Το κεφάλαιο υποδιαιρείται σε τρία τμήματα. Στο πρώτο τμήμα περιγράφεται η κατάσταση των ιχθυοκαλλιέργειών σε παγκόσμιο, ευρωπαϊκό και ελληνικό επίπεδο. Στο δεύτερο τμήμα περιγράφονται τα παθολογικά προβλήματα που παρατηρούνται στις μεσογειακές ιχθυοκαλλιέργειες. Στο τρίτο τμήμα γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση με σκοπό την συλλογή πληροφοριών για τα είδη μυξοβακτηριδίων που προσβάλλουν εκτρεφόμενα ψάρια του θαλασσινού νερού, προκαλώντας νοσηρές καταστάσεις. Αναφέρονται πληροφορίες για την νόσο, τον αιτιολογικό παράγοντα, τα στελέχη, την κλινική εικόνα, τους μηχανισμούς λοιμογόνου δύναμης, τις μεθόδους διάγνωσης, την θεραπεία και πρόληψη καθώς και τις ιδιότητες των δύο αντισηπτικών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στις πειραματικές μολύνσεις.

Το κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, υποδιαιρείται σε πέντε τμήματα. Το πρώτο τμήμα, αναφέρεται στην: Μελέτη της εποχικότητας και του ποσοστού μόλυνσης από το μυξοβακτηρίδιο *T. maritimum*, σε εκτρεφόμενους πληθυσμούς θαλάσσιων ψαριών στην Ελλάδα. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν τέσσερες (4) εποχικές δειγματοληψίες, σε εκτρεφόμενα είδη που ήταν το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), η τσιπούρα (*Sparus aurata*), το λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*), το φαγκρί (*Pargus pargus*), το μυλοκόπι (*Umbrina Cirrosa*), το μυτάκι (*Diplodus puntazzo*), και ο συκιός (*Sciaena umbra*). Σε κάθε δειγματοληψία λαμβανόταν δείγμα 200 ψαριών. Τα βακτήρια απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν μικροβιολογικά, βιοχημικά και μοριακά, ελέγχθηκε η λοιμογόνος δύναμή τους και στη συνέχεια κωδικοποιήθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε υπερκατάψυξη. Ελήφθησαν επίσης δείγματα ιστών για ιστοπαθολογικές εξετάσεις.

Το δεύτερο τμήμα, αναφέρεται στην ανάπτυξη ενός πειραματικού μοντέλου μόλυνσης με το μυξοβακτηρίδιο *T. maritimum* σε ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού, με σκοπό τον έλεγχο της παθογόνου δράσης τους.

Οι πειραματικές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού, σε προκαθορισμένες συγκεντρώσεις βακτηριδίων,  $1.0 \times 10^6$  έως  $1.5 \times 10^6$  cells/ml *T. maritimum*. Οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση και με εμβάπτιση. Για αυτούς τους πειραματισμούς τα ιχθύδια χωρίστηκαν σε ομάδες, με τους κατάλληλους μάρτυρες αντίστοιχα. Από τα πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια, που εμφάνισαν συμπτώματα και αλλοιώσεις απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε εκ νέου ο αντίστοιχος παθογόνος παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε, επιβεβαιώνοντας την παθογονικότητα του, ενώ λαμβάνονταν δείγματα ιστών για



ιστοπαθολογικές εξετάσεις, για να διερευνηθούν ιστοπαθολογικά οι αλλοιώσεις των πειραματικά μολυσμένων ψαριών.

Το τρίτο τμήμα, αναφέρεται στην επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T, στην αντιμετώπιση της νόσου της μυξοβακτηριδίασης, μετά από πειραματικές μολύνσεις σε τσιπούρες και λαβράκια. Πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μολύνσεις και εμφαιτίσεις με τα δύο αντισηπτικά διαλύματα, σε πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού, με σκοπό τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας τους στην αντιμετώπιση της μυξοβακτηριδίασης.

Το τέταρτο τμήμα, αναφέρεται στον προσδιορισμό της θανατηφόρου συγκέντρωσης (LC50) του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T, σε ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού.

Τέλος, με βάση τα πρώτα αποτελέσματα από τις πειραματικές μολύνσεις και εμφαιτίσεις, εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της χλωραμίνης-T στην θεραπευτική αντιμετώπιση μολυσμένων με μυξοβακτηρίδια ιχθυδίων τσιπούρας, σε μια μονάδα εκτροφής. Το πέμπτο τμήμα, περιλαμβάνει την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Στο 3<sup>ο</sup> Κεφάλαιο παρουσιάζονται τα Αποτελέσματα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, διαπιστώθηκε ότι το *T. maritimum*, απομονώνεται από τα ψάρια, σε ποσοστό 39.25% (314/800) παρόλο που κατά την διάρκεια των δειγματοληψιών, πολλά ψάρια δεν εμφάνιζαν κανένα από τα χαρακτηριστικά συμπτώματα και αλλοιώσεις της νόσου.

Αποδείχθηκε πως η πλειοψηφία, 56% (112/200) των στελεχών του *T. maritimum*, για όλα τα είδη ψαριών που εξετάστηκαν, απομονώθηκε κατά την διάρκεια της 3<sup>ης</sup> δειγματοληψίας, δηλαδή το φθινόπωρο. Κατά την θερινή περίοδο διαπιστώθηκε επίσης μια μικρή αύξηση της θνησιμότητας συγκριτικά με την άνοιξη. Το γεγονός αυτό συνέπεσε με την παράλληλη ανάπτυξη αποικιών από *Listonella anguillarum*, σε μερικά είδη ψαριών, όπως το μυλοκόπι και ο συκιός. Η απομόνωση του *Listonella anguillarum* από το μυλοκόπι, από δείγμα νεφρού έγινε για πρώτη φορά, ενώ για πρώτη φορά διεθνώς, το *T. maritimum*, απομονώθηκε από εκτρεφόμενο συκίο (*Sciaena umbra*).

Ο μικρότερος αριθμός μυξοβακτηριδίων, προσβολή 29% (58/200) απομονώθηκε από τα ψάρια, κατά την διάρκεια της 4<sup>ης</sup> δειγματοληψίας, δηλαδή τον χειμώνα.

Όσον αφορά το ποσοστό μόλυνσης, ανά είδος ψαριού, πιο ευπαθές αποδεικνύεται το λαβράκι με περισσότερες απομονώσεις (128/200) και μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής (64%). Τα λυθρίνια εμφάνισαν το μικρότερο ποσοστό προσβολής και στις τέσσερες (4) δειγματοληψίες (18.75%).

Τα ευρήματα, φαίνεται να σχετίζονται με την άνοδο της θερμοκρασίας του νερού της θάλασσας, αφού τα ποσοστά παρουσίας των μυξοβακτηριδίων αυξήθηκαν με την αύξηση της θερμοκρασίας του νερού, 17°C-19°C (112/200 ψάρια).

Κατά την μακροσκοπική και νεκροτομική εξέταση, τα ασθενή ιχθύδια ανεξάρτητα του είδους, εμφάνισαν ανορεξία, καχεξία, αιμορραγίες στις γνάθους, αιμορραγική στοματίτιδα, ωχροκίτρινες νεκρωτικές αλλοιώσεις στο δέρμα, στα πτερύγια και στην ουρά, υπεραιμία στα πτερύγια, διάβρωση της ουράς και των πτερυγίων. Οι αλλοιώσεις και τα κλινικά συμπτώματα ήταν εντονότερα στα ιχθύδια με σωματικό βάρος από 0.5-3gr, ανεξάρτητα του είδους ψαριών.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών εξετάσεων, καταλληλότερο θρεπτικό υπόστρωμα για τα δείγματα δέρματος, ήταν το *Flexibacter maritimus* medium (FMM) (n=108) και για δείγματα βραγχίων το τροποποιημένο Anacker και Ordal agar (AOA), (n=76). Προσπάθειες να απομονωθούν μυξοβακτηρίδια από δείγματα νεφρού και σπλήνα ήταν άκαρπες, ενώ η προσθήκη των αντιβιοτικών φλουμεκίνη και νεομυκίνη (με σκοπό την εκλεκτική ανάπτυξη των μυξοβακτηριδίων) στα υποστρώματα επίσης δεν ευνόησε την ανάπτυξη των μυξοβακτηριδίων. Η πραγματική βέλτιστη θερμοκρασία επώασης καθορίστηκε στους 19 με 21°C.

Σχετικά με την βιοχημική ταυτοποίηση των στελεχών και τα αποτελέσματα του API 20E, το κυρίως βιοχημικό προφίλ για τα 252 από τα 314 στελέχη *T. maritimum*, ήταν το: 000200410. Το βιοχημικό προφίλ ήταν παρόμοιο για όλα τα στελέχη ανεξαρτήτως γεωγραφικού σημείου όπου εντοπίστηκαν, και του είδους όπου απομονώθηκαν, εντός των ελληνικών συνόρων. Στοιχεία που υποδηλώνουν μια ομοιογένεια στον Ελλαδικό χώρο σε ότι αφορά τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του *T. maritimum*. Μια διαφοροποίηση εντοπίστηκε στα τεστ ζελατίνης, υδρόθειου και Voges-Proskauer, σε 62 στελέχη.

Τα αποτελέσματα της μοριακής ταυτοποίησης και της PCR, επιβεβαίωσαν ότι το υπεύθυνο αίτιο στις περιπτώσεις των ψαριών με τις αλλοιώσεις αλλά και των υγιών ψαριών, ήταν το βακτήριο *T. maritimum*.

Σχετικά με την προσβολή από τα μονογενή παράσιτα, αποδεικνύεται πως το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής από τα παράσιτα, και για τα επτά (7) είδη ψαριών, εντοπίστηκε, το φθινόπωρο (28%), που συμπίπτει με το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής από το *T. maritimum* (56%).

Οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις εντοπίστηκαν κυρίως στο βραγχιακό επιθήλιο και στο δέρμα.

Τα αποτελέσματα του αντιβιογράμματος για τα στελέχη του *T. maritimum* απέδειξαν επίσης ότι και η φύση του θρεπτικού υποστρώματος επηρεάζει το μέγεθος του κύκλου αναστολής γύρω από τα δισκία αντιβιοτικών, ενώ όλα τα στελέχη του *T. maritimum* εμφάνισαν παρόμοιο προφίλ ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.

Σε αυτή την έρευνα, συνολικά, 314 στελέχη *T. maritimum* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από όλα τα δείγματα ψαριών (n=800) και διατηρήθηκαν στην κατάψυξη, στους -80°C.

Από τις πειραματικές μολύνσεις που πραγματοποιήθηκαν με στελέχη του *T. maritimum* στα ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού, αποδείχθηκε πως η προσπάθεια πειραματικής μόλυνσης με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση βακτηρίων δεν ήταν ικανή να προκαλέσει θνησιμότητα ή να προκαλέσει την νόσο στα ψάρια. Η παρατεταμένη εμβάπτιση των ψαριών για 18 ώρες με διάλυμα βακτηριών του *T. maritimum* αποδείχθηκε αποτελεσματικότερη μέθοδος πρόκλησης της μυξοβακτηριδίασης. Συμπερασματικά, το μοντέλο πειραματικής μόλυνσης των ψαριών, με εμβάπτιση, σε συγκέντρωση βακτηρίων από  $1.0 \times 10^6$  cells/ml έως  $1.5 \times 10^6$  cells/ml που περιγράφηκε σε αυτή την έρευνα, αποδείχθηκε αποτελεσματικό και μπορεί να αποτελέσει την βάση για μελλοντικές επιδημιολογικές μελέτες, με σκοπό την πρόληψη και έλεγχο της μυξοβακτηριδίασης.

Τα πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια λαβρακιού και τσιπούρας με εμβάπτιση, εμφάνισαν παρόμοιες αλλοιώσεις με τα φυσικά μολυσμένα ψάρια και υψηλή θνησιμότητα (λαβράκι 65%, τσιπούρα 35%). Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν την παθογένεια των απομονωμένων στελεχών καθώς και την αποτελεσματικότητα της πειραματικής εμβάπτισης στην εκδήλωση της νόσου στα πειραματικά μολυσμένα ψάρια.

Οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις εντοπίστηκαν κυρίως στο δέρμα και τα βράγχια και ήταν παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στα φυσικά μολυσμένα ψάρια.

Μετά την ολοκλήρωση των πειραματικών μολύνσεων και εμβαπτίσεων με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και την χλωραμίνη-T, στα ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού, τα ιχθύδια ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία, εμφανίζοντας μείωση της θνησιμότητας. Οι εμβαπτίσεις πραγματοποιήθηκαν με: υπεροξείδιο του υδρογόνου (διάλυμα 35%), στην δόση 200ppm/30min και χλωραμίνη-T στην δόση 12-15ppm/60min.

Όσον αφορά τα ιχθύδια τσιπούρας, αποδείχθηκε πως η μεσαία θανατηφόρα συγκέντρωση (LC50), για το υπεροξείδιο του υδρογόνου, στις 48 h, είναι τα 640ppm/30min και για την χλωραμίνη-T, στις 48 h, είναι η συγκέντρωση 80ppm/60min.

Όσον αφορά τα ιχθύδια λαβρακιού, αποδείχθηκε πως η μεσαία θανατηφόρα συγκέντρωση (LC50), για το υπεροξείδιο του υδρογόνου, στις 24 h, είναι τα 640ppm/30min και για την χλωραμίνη-T, στις 96 h, είναι η συγκέντρωση 80ppm/60min.

Τέλος, όσον αφορά την εφαρμογή στην πράξη, αποδείχθηκε πως η χρήση της χλωραμίνης-T, με 2 εμβαπτίσεις στην συγκέντρωση των 12ppm/60min στην θεραπευτική αντιμετώπιση μολυσμένων με μυξοβακτηρίδια ιχθυδίων τσιπούρας, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική.

#### **Ανακοινώσεις και Δημοσιεύσεις σχετιζόμενες με την παρούσα διατριβή**

- Kolygas M.N., **Gourzioti E.**, Vatsos I.N., Athanassopoulou F. (2012). Identification of *Tenacibaculum maritimum* strains from marine farmed fish in Greece. Journal of Veterinary Record 170(24): 623-625.
- **Ε. Γουρζιώτη**, M.N. Κολύγας, Φ. Αθανασοπούλου, Ι.Σ. Παππάς, Γ.Δ. Ευαγγελοπούλου. Βιοχημική και μοριακή ταυτοποίηση μυξοβακτηρίων από εκτρεφόμενες τσιπούρες και λαβράκια στην Ελλάδα. 5-8 Απριλίου 2012. 12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Αθήνα. Προφορική ανακοίνωση που δημοσιεύτηκε στο βιβλίο των περιλήψεων.

- Μ.Ν. Κολύγας, **Ε. Γουρζιώτη**, Φ. Αθανασοπούλου, Π. Καταραχιάς. Η παρουσία του βακτηρίου *Tenacibaculum maritimum* σε εκτρεφόμενα θαλασσινά είδη ψαριών στην Ελλάδα. 5-8 Απριλίου 2012. 12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Αθήνα. Προφορική ανακοίνωση που δημοσιεύτηκε στο βιβλίο των περιλήψεων.
- **Ε. Γουρζιώτη**, Μ.Ν. Κολύγας, Μ. Μαντέ, Φ. Αθανασοπούλου. Μελέτη παθολογικών προβλημάτων του μεσογειακού είδους μυλοκόπι *Umbrina cirrosa* (Linnaeus, 1758) σε μονάδα εντατικής εκτροφής στην περιοχή του Διαύλου Ωρεών: προκαταρκτικά αποτελέσματα. 10-13 Οκτωβρίου 2013. 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιχθυολόγων, Θεσσαλονίκη. Βιβλίο πρακτικών, σελ. 355-358.
- Μ.Ν. Κολύγας, **Ε. Γουρζιώτη**, Φ. Αθανασοπούλου. Πρώτη εμφάνιση μυκητίασης σε εκτρεφόμενα θαλασσινά ψάρια του είδους *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758) (Φαγκρί) από *Exophiala* sp. στην Ελλάδα. 10-13 Οκτωβρίου 2013. 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιχθυολόγων, Θεσσαλονίκη. Βιβλίο πρακτικών, σελ. 379-382.
- **Ε. Γουρζιώτη**, Μ.Ν. Κολύγας, Φ. Αθανασοπούλου, Ι.Σ. Παππάς. Απομόνωση και ταυτοποίηση του *Tenacibaculum maritimum* σε περιστατικά της νόσου μυξοβακτηριδίασης σε θαλασσινά εκτρεφόμενα ψάρια, στην Ελλάδα. 2-4 Μαΐου 2014. 3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Παραγωγικών Ζώων και υγιεινής τροφίμων, Ιωάννινα. Αποδοχή.
- **Ε. Γουρζιώτη**, Μ.Ν. Κολύγας, Φ. Αθανασοπούλου. Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου μόλυνσης με το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* σε ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού. 2-4 Μαΐου 2014. 3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Παραγωγικών Ζώων και υγιεινής τροφίμων, Ιωάννινα. Αποδοχή.
- **Ε. Γουρζιώτη**, Μ.Ν. Κολύγας, Φ. Αθανασοπούλου. Τράπεζα Αναφοράς Μυξοβακτηριδίων από τις Ελληνικές, θαλάσσιες Ιχθυοκαλλιέργειες.

Αποτελέσματα. 2-4 Μαΐου 2014. 3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Παραγωγικών Ζώων και υγιεινής τροφίμων, Ιωάννινα. Αποδοχή.

- **Ε. Γουρζιώτη**, Μ.Ν. Κολύγας, Φ. Αθανασοπούλου, Ι.Σ. Παππάς. Επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της γλωραμίνης T στην αντιμετώπιση της νόσου της μυξοβακτηριδίασης, μετά από πειραματικές μολύνσεις σε τσιπούρες και λαβράκια. 2-4 Μαΐου 2014. 3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής Παραγωγικών Ζώων και υγιεινής τροφίμων, Ιωάννινα. Αποδοχή.

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Φ. Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα

Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας & Υδατοκαλλιεργειών, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ι. Πάσχος, Καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής

Τμήμα Ιχθυοκομίας & Αλιείας, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Ηπείρου

Κ. Ναθαναηλίδης, Καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής

Τμήμα τεχνολογίας Αλιείας&Υδατοκαλλιεργειών, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Δυτικής Ελλάδας

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Φ. Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια

Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ι. Πάσχος, Καθηγητής

Τμήμα Ιχθυοκομίας & Αλιείας, ΤΕΙ Ηπείρου

Ρόδη Μπουριέλ Αγγελική, Καθηγήτρια

Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Α. Γκόβαρης, Καθηγητής

Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κ. Ναθαναηλίδης, Καθηγητής

Τμήμα τεχνολογίας Αλιείας&Υδατοκαλλιεργειών, ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας

Ι. Παππάς,

Αναπληρωτής Καθηγητής

Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Π. Αγγελίδης

Αναπληρωτής Καθηγητής

Κτηνιατρική Σχολή

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**SCHOOL OF HEALTH SCIENCES**  
**FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

**STUDY OF MYXOBACTERIOSIS IN INTENSIVE FARMS  
OF AQUACULTURE SPECIES IN GREECE**

**GOURZIOTI G. EVGENIA**

Veterinarian, MSc

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

Work carried out at the Laboratory of Fish Diseases and Aquaculture of the Faculty  
of Veterinary Medicine of the University of Thessaly

Karditsa. Greece 2014



## ABSTRACT

The present thesis concerns the study of myxobacteria infections from the bacterium *Tenacibaculum maritimum* in farmed marine fish in Greece and the accomplishment of experimental infections with *T. maritimum* in sea bream and sea bass for the control of their pathogenic action and also the study of the effect of hydrogen peroxide and chloramine-T, in the control of the disease.

The presence of the bacterium *T. maritimum* was investigated in farmed marine fish in different areas of Greece and the condition of the disease of myxobacteriosis was estimated in Greece, during four (4) seasonal samplings. The presence of myxobacteria in farmed marine fish in Greece, was also described, depending on the geographical origin, the season, the species and the age of fish and also if these strains present a similar biochemical profile, inside Greek borders. Strains of the bacterium *T. maritimum*, were identified, coded and maintained for future studies.

The main objectives of the present thesis are:

- The isolation and identification of the pathogens myxobacteria in farmed marine fish in Greece (Mediterranean farmed marine fish) with microbiological, biochemical and molecular methods.
- The control of the pathogenic action of the isolated bacteria species in the most sensitive fish species, with experimental infections in sea bream and sea bass.
- The histopathological study of the infected fish.
- The preservation of the isolated bacteria species for future research, creation of aquaculture myxobacteria bank, from Greek aquaculture farms.

The thesis is divided in five Chapters: 1<sup>st</sup> Introduction, 2<sup>nd</sup> Material & Methods, 3<sup>rd</sup> Results, 4<sup>th</sup> Discussion and 5<sup>th</sup> Bibliography.

In the Introduction, the relevant literature is reviewed. The Chapter is subdivided into three parts. In the first part, the World, European and Greek aquaculture situation is described. In the second part, the pathological problems that are observed in Mediterranean aquaculture are described. In the third part, there is a literature review, in order to collect information for the myxobacteria species that infect farmed marine fish, causing disease. Informations for the disease, the causative agent, the strains, the clinical symptoms, the mechanisms of virulence, the methods of

diagnosis, the treatment and the prevention and also the properties of the two antiseptic solutions that are used in the experimental infections, are mentioned.

The chapter Material & Methods, is subdivided into five parts. The first part, refers to: The study of the seasonality and the infection rate from the bacterium *T. maritimum*, in farmed marine fish in Greece. For this reason four (4) seasonal samplings were performed in farmed fish species, *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata*, *Pagellus erythrinus*, *Pargus pargus*, *Umbrina Cirrosa*, *Diplodus puntazzo* and *Sciaena umbra*. In every sampling, 200 fish were collected. The bacteria were isolated, identified with microbiological, biochemical and molecular methods, their virulence was controlled and they were coded and storage in deep-freezing. Samples from tissues were also collected for histopathological examinations.

The second part, refers to the development of an experimental infection model with the bacterium *T. maritimum* in sea bream and sea bass, in order to control their pathogenic action.

The experimental infections were performed in sea bream and sea bass, with strains of myxobacteria, in certain concentrations,  $1.0 \times 10^6$  to  $1.5 \times 10^6$  cells/ml *T. maritimum*. The infections were performed with intraperitoneal injection and immersion. The fish were separated in groups, with the appropriate controls respectively. From the experimental infected fish, that showed symptoms and lesions, the causative pathogenic agent that was used, was isolated also, confirming the pathogenicity, while samples from tissues were also collected for histopathological examinations, in order to investigate the lesions of the experimental infected fish.

The third part, refers to the effect of the hydrogen peroxide and chloramine-T, in the control of the disease of myxobacteriosis, after experimental infections in sea bream and sea bass. Experimental infections and immersions with the two antiseptic solutions, in experimental infected sea bream and sea bass were performed, in order to control their effectiveness in the treatment of myxobacteriosis.

The fourth part, refers to the identification of the Lethal Concentration (LC50) of the hydrogen peroxide and chloramine-T, in sea bream and sea bass.

Last, depending on the results from the first experimental infections and immersions, the effectiveness of chloramine-T, was examined in the treatment of infected with myxobacteria juvenile sea bream, in an aquaculture farm. The fifth part, contains the statistical analysis of the results.

In the 3<sup>rd</sup> chapter, the Results are presented.

According to the results, was found that *T. maritimum*, is isolated from the fish, in a percentage of 39.25% (314/800), although during samplings, many fish didn't show any of the characteristics symptoms and lesions of the disease.

The results showed that the majority, 56% (112/200) of the strains of *T. maritimum*, for all the fish species that were examined, were isolated during the 3<sup>rd</sup> sampling, in autumn. During the summer period, also there was a slight increase in mortality from spring to the summer. This fact coincided with the parallel development of colonies of *Listonella anguillarum*, in few fish species, like Shi drum and Brown meagre. The isolation of *Listonella anguillarum* from Shi drum, from kidney sample was made for the first time. Also, for the first time internationally, *T. maritimum* was isolated from the cultured fish, Brown meagre (*Sciaena umbra*).

The lowest number of myxobacteria 29% (58/200), was isolated from the fish, during the 4<sup>th</sup> sampling, in winter.

Regarding the infection rate, depending on the fish species, more sensitive appears to be the sea bass with more isolations (128/200) and higher infection rate (64%). The red snapper appears to have the lowest infection rate for the four (4) samplings (18.75%).

These results seems to be related with the rise of the water temperature of the sea, because the rate of presence of myxobacteria, raised with the high water temperature, 17°C-19°C (112/200 fish).

During macroscopic and postmortem examination, the infected fish, regardless of the fish species showed anorexia, sickliness, hemorrhages to the mouth, hemorrhagic stomatitis, pale yellow necrotic lesions on the skin, fins and tail, hyperemia in the flaps, corrosion of the tail and fins. The lesions and symptoms were more severe in the group of fish with body weight 0.5-3gr, regardless of the fish species.

Regarding the results of the microbiological examinations, more effective nutrient substrates, proved to be for skin samples, the *Flexibacter maritimus* medium (FMM) (n=108) and for gills samples, the modified Anacker and Ordal agar (AOA) (n=76). Efforts to isolate myxobacteria from samples taken from kidney or spleen, had no result, while the addition of the antibiotics flumequine and neomycin (in order to have a selective development of the myxobacteria) in the nutrient substrates did not favored the development of the myxobacteria. The true optimum temperature of growth was determined at 19 to 21°C.

Regarding the biochemical identification of the strains and the results of API 20E, the main biochemical profile for the 252 of the 314 strains of *T. maritimum*, was: 000200410. The biochemical profile was similar for all the strains, regardless of the geographical location that were found and the species that were isolated, inside Greek borders. These results show that there is homogeneity in Greece, concerning the biochemical characteristics of *T. maritimum*. A variation was detected in gelatin, hydrogen sulfide and Voges-Proskauer test, in sixty two strains.

The results of the molecular identification and PCR, confirmed that the causative agent in the case of the fish with the lesions and also the healthy fish, was the bacterium *T. maritimum*.

Regarding the infection rate from the monogenea parasites, was proved that the highest infection rate from the parasites, for the seven (7) fish species, was found in autumn (28%), coinciding with the highest infection rate from *T. maritimum* (56%).

The histopathological lesions were found mainly in the gill epithelium and in the skin.

The results of the antibiogram for the strains of *T. maritimum*, showed that the nature of the nutrient substrate affects the size of the inhibition cycle around the antibiotic tablets, while all the strains of *T. maritimum* showed a similar profile of sensitivity in the antibiotics.

In this thesis, 314 strains of *T. maritimum* isolated and identified from all the fish samples (n=800) and were kept in deep-freezing, -80°C.

From the experimental infections that were made with strains of *T. maritimum* in sea bream and sea bass, was found that the effort of experimental infection with intraperitoneal injection of bacteria, was not effective to cause mortality or the disease to the fish. The prolonged immersion of the fish for 18 hours with a solution of bacteria of *T. maritimum* proved to be the most effective method of causing the disease of myxobacteriosis. In conclusion, the model of experimental infection of the fish with immersion, in a concentration of bacteria from  $1.0 \times 10^6$  cells/ml to  $1.5 \times 10^6$  cells/ml that was described in this thesis, proved to be effective and can constitute the base for future epidemiological studies, in order to prevent and control the disease of myxobacteriosis.

The experimental infected sea bass and sea bream with immersion, showed similar lesions with the natural infected fish and high mortality (sea bass 65%, sea bream 35%). These results show clearly the pathogenesis of the isolated strains and

also the effectiveness of the experimental immersion to cause the disease to the experimental infected fish.

The histopathological lesions were found mainly in the skin and gills and they were similar with the lesions observed in natural infected fish.

After the completion of the experimental infections and immersions with hydrogen peroxide and chloramine-T, to the sea bream and sea bass, the fish responded to the therapy, reducing the mortality rate. The immersions were made with: hydrogen peroxide (solution 35%), in the dose 200ppm/30min and chloramine-T, in the dose 12-15ppm/60min.

Regarding the sea bream, it was proved that the Lethal Concentration 50 (LC50), for hydrogen peroxide, in 48 h, was 640ppm/30min and for chloramine-T, in 48 h, was the concentration 80ppm/60min.

Regarding the sea bass, it was proved that the Lethal Concentration 50 (LC50), for hydrogen peroxide, in 24 h, was 640ppm/30min and for chloramine-T, in 96 h, was the concentration 80ppm/60min.

Finally, regarding the application in real conditions, the use of chloramine-T, with 2 immersions at the concentration of 12ppm/60min for the treatment of infected with myxobacteria juvenile sea bream, proved to be very effective.

### **Announcements and Publications associated with the present thesis**

- Kolygas M.N., **Gourzioti E.**, Vatsos I.N., Athanassopoulou F. (2012). Identification of *Tenacibaculum maritimum* strains from marine farmed fish in Greece. Journal of Veterinary Record 170(24): 623-625.
- **E. Gourzioti**, M.N. Kolygas, F. Athanassopoulou, I.S. Pappas, G.D. Evangelopoulou (2012). Biochemical and Molecular identification of Myxobacteria from cultured sea bass and sea bream in Greece. 12th Pan-hellenic Veterinary Congress, Athens, 5-8 April, Proceedings.
- M.N. Kolygas, **E. Gourzioti**, F. Athanassopoulou, P. Katarahias (2012). The presence of *Tenacibaculum maritimum* in farmed marine fish in Greece. 12th Pan-hellenic Veterinary Congress, Athens, 5-8 April, Proceedings.

- **E. Gourzioti**, M.N. Kolygas, M. Mante, F. Athanassopoulou (2013). Study of pathological problems of Mediterranean species of shi drum *Umbrina cirrosa* (Linnaeus, 1758) in an aquaculture farm placed in Channel Oreos. Publication in 15th Pan-Hellenic Conference of Ichthyologists, University of Thessaloniki, 10-13 October 2013. Book of proceedings, pp. 355-358.
- M.N. Kolygas, **E. Gourzioti**, F. Athanasopoulou (2013). First incident of mycosis in marine cultured red porgy (*Pagrus pagrus* Linnaeus, 1758) caused by *Exophiala* sp. in Greece. Publication in 15th Pan-Hellenic Conference of Ichthyologists, University of Thessaloniki, 10-13 October 2013. Book of proceedings, pp. 379-382.
- **E. Gourzioti**, M.N. Kolygas, F. Athanassopoulou, I.S. Pappas (2014). Isolation and identification of *Tenacibaculum maritimum* in outbreaks of the disease in farmed marine fish, in Greece. 3<sup>rd</sup> Pan-hellenic Veterinary Congress of Productive Animals and food hygiene, Ioannina, 2-4 May 2014. Acceptance.
- **E. Gourzioti**, M.N. Kolygas, F. Athanassopoulou (2014). Development of an experimental infection model with the bacterium *Tenacibaculum maritimum* in sea bream and sea bass. 3<sup>rd</sup> Pan-hellenic Veterinary Congress of Productive Animals and food hygiene, Ioannina, 2-4 May 2014. Acceptance.
- **E. Gourzioti**, M.N. Kolygas, F. Athanassopoulou (2014). Bank reference for Myxobacteria from Greek aquaculture farms. Results. 3<sup>rd</sup> Pan-hellenic Veterinary Congress of Productive Animals and food hygiene, Ioannina, 2-4 May 2014. Acceptance.
- **E. Gourzioti**, M.N. Kolygas, F. Athanassopoulou, I.S. Pappas (2014). Efficacy of hydrogen peroxide and chloramine T in the treatment of myxobacteriosis disease, after experimental infections in sea bream and sea

bass. 3<sup>rd</sup> Pan-hellenic Veterinary Congress of Productive Animals and food hygiene, Ioannina, 2-4 May 2014. Acceptance.

## **ADVISOR COMMITTEE**

F. Athanassopoulou, Professor, Supervisor  
Laboratory of Fish Diseases and Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine,  
University of Thessaly

I. Paschos, Professor, Member of advisory committee  
Department of Aquaculture and Fisheries, Technological Educational Institute of  
Epirus

C. Nathanailidis, Professor, Member of advisory committee  
Department of Fisheries and Aquaculture technology, Technological Educational  
Institute of Western Greece

## **EXAMINATION BOARD**

Professor F. Athanassopoulou Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Professor I. Paschos Technological Educational Institute of Epirus

Professor, A.R. Burriel Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Professor, A. Govaris Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Professor, C. Nathanailidis Technological Educational Institute of Western Greece

Associate Professor, I. Pappas Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

Associate Professor, P. Aggelidis School of Veterinary Medicine, Aristotle University of  
Thessaloniki



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελ.

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	3
<b>Ανακοινώσεις και Δημοσιεύσεις σχετιζόμενες με την παρούσα διατριβή</b>	8
<b>ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ-ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ</b>	11
<b>ABSTRACT</b>	13
<b>ADVISOR COMMITTEE-EXAMINATION BOARD</b>	20
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	21
<b>Σκοποί της παρούσας διατριβής</b>	27
<b>Ευχαριστίες</b>	29
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup></u></b>	31
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
<b>1.1 ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ</b>	32
1.1.1 Σημασία των υδατοκαλλιεργειών παγκοσμίως	32
1.1.2 Υδατοκαλλιέργειες σε Ευρώπη και Μεσόγειο	35
1.1.3 Υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα	37
<b>1.2 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΙΣ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ</b>	39
1.2.1 Νοσήματα που οφείλονται σε βακτήρια	40
<b>1.3 ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΣΗ</b>	44
1.3.1 Αιτιολογικός Παράγοντας	45
1.3.2 Ευπάθεια φορέων και Ξενιστές	47
1.3.3 Ποικιλία Στελεχών	49
1.3.4 Κλινική Εικόνα	50
1.3.5 Κινητικότητα	52
1.3.6 Μηχανισμοί Λοιμογόνου δύναμης	54
1.3.7 Μέθοδοι Διάγνωσης	56
1.3.7.1 Καλλιέργεια	56
1.3.7.2 Βιοχημικές Διαγνωστικές Μέθοδοι	58
1.3.7.3 Μοριακές Διαγνωστικές Μέθοδοι	59
1.3.8 Παθογένεια της μόλυνσης	60

1.3.9 Θεραπεία - Πρόληψη	64
1.3.10 Άλλα προφυλακτικά μέτρα	67
<b>1.4. ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) &amp; ΧΛΩΡΑΜΙΝΗ-Τ</b>	68
1.4.1 Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	68
1.4.2 Χλωραμίνη-Τ	76
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup></u></b> <b>ΥΑΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	80
<b>2.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΟΧΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>Tenacibaculum maritimum</i> ΣΕ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ</b>	81
2.1.1 Σκοπός της δικής μας έρευνας	81
2.1.2 Δειγματοληψίες	81
2.1.2.1 Περιοχή δειγματοληψίας	82
2.1.2.2 Πρωτόκολλο δειγματοληψιών	86
2.1.2.3 Μακροσκοπική και Νεκροτομική εξέταση	87
2.1.2.4 Βακτηριολογική εξέταση	89
2.1.2.5 Μικροσκοπική εξέταση νωπών επιχρισμάτων και επιχρισμάτων μετά από χρώση Gram	93
2.1.2.6 Βιοχημική ταυτοποίηση	94
2.1.2.6.1 API 20 E	95
2.1.2.6.2 API ZYM	96
2.1.2.6.3 API 50CH	97
2.1.2.7 Παρασιτολογική εξέταση	97
2.1.2.8 Ιστοπαθολογική εξέταση	98
2.1.2.9 Αντιβιόγραμμα	99
2.1.2.10 Απομόνωση Γενετικού υλικού	100
2.1.2.11 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση βακτηρίων <i>Tenacibaculum maritimum</i>	102
2.1.2.12 Ηλεκτροφόρηση των DNA αμπλικονίων (PCR)	104
<b>2.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>Tenacibaculum maritimum</i> ΣΕ ΙΧΘΥΔΙΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ</b>	105
2.2.1 Σκοπός των πειραματικών μολύνσεων	105

2.2.2 Εξέταση των ψαριών πριν την έναρξη των πειραμάτων	106
2.2.3 Πειραματική μόλυνση ιχθύων με τα παθογόνα στελέχη <i>Tenacibaculum maritimum</i>	106
2.2.3.1 1 <sup>η</sup> Πειραματική Μόλυνση	107
2.2.3.2 2 <sup>η</sup> Πειραματική Μόλυνση	109
2.2.4 Εξέταση των πειραματικά μολυσμένων ιχθύων	110
<b>2.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΙΝΗΣ Τ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΗΣ ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΑΔΙΑΣΗΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΣΕ ΤΣΙΠΟΥΡΕΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΑ</b>	112
2.3.1 Σκοπός των πειραματικών εμβαπτίσεων με υπεροξείδιο του υδρογόνου και χλωραμίνη-T	112
2.3.1.1 1 <sup>η</sup> Πειραματική Μόλυνση	114
2.3.1.2 2 <sup>η</sup> Πειραματική Μόλυνση	116
2.3.2 Εξέταση των πειραματικά μολυσμένων ιχθύων, μετά τις εμβαπτίσεις των ουσιών	117
<b>2.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (LC50) ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΙΝΗΣ Τ, ΣΕ ΙΧΘΥΔΙΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ</b>	118
2.4.1 Σκοπός των πειραματικών εμβαπτίσεων με υψηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου και χλωραμίνης-T, για τον προσδιορισμό της (LC50)	118
2.4.1.1 1 <sup>η</sup> Πειραματική Εμβάπτιση	118
2.4.1.2 2 <sup>η</sup> Πειραματική Εμβάπτιση	119
2.5 Εφαρμογή στην πράξη	121
2.6 Στατιστική ανάλυση	122
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup></u></b>	124
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	
<b>3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΟΧΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>Tenacibaculum maritimum</i> ΣΕ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ</b>	125
3.1.1 Μακροσκοπική και Νεκροτομική εξέταση	125
3.1.2 Βακτηριολογική εξέταση	133
3.1.3 Στατιστική ανάλυση	195

3.1.4 Ποσοστά προσβολής από το <i>Tenacibaculum maritimum</i> , ανάλογα με το είδος ψαριού και ανά δειγματοληψία	201
3.1.5 Στατιστική ανάλυση	208
3.1.6 Μικροσκοπική εξέταση νωπών επιχρισμάτων και επιχρισμάτων μετά από χρώση Gram	214
3.1.7 Βιοχημική ταυτοποίηση	217
3.1.8 Παρασιτολογική εξέταση	222
3.1.9 Ιστοπαθολογική εξέταση	225
3.1.10 Αντιβιόγραμμα	240
3.1.11 Μοριακή ταυτοποίηση-Απομόνωση Γενετικού υλικού PCR,	242
3.1.12 Τράπεζα Αναφοράς Μυξοβακτηριδίων από τις Ελληνικές, θαλάσσιες Ιχθυοκαλλιέργειες	244
<b>3.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>Tenacibaculum maritimum</i> ΣΕ ΙΧΘΥΔΙΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ</b>	245
3.2.1 Πειραματική μόλυνση ιχθύων με τα παθογόνα στελέχη <i>Tenacibaculum maritimum</i>	245
3.2.1.1 1 <sup>η</sup> Πειραματική Μόλυνση	246
3.2.1.2 2 <sup>η</sup> Πειραματική Μόλυνση	250
3.2.1.3 Εξέταση των πειραματικά μολυσμένων ιχθύων	250
3.2.1.4 Ιστοπαθολογική εξέταση	271
<b>3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΙΝΗΣ-Τ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΗΣ ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΣΗΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΣΕ ΤΣΙΠΟΥΡΕΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΑ</b>	285
3.3.1 1 <sup>η</sup> Πειραματική Μόλυνση	285
3.3.1.1 Εξέταση των πειραματικά μολυσμένων ιχθύων, μετά τις εμβαπτίσεις των ουσιών	286
3.3.1.2 Στατιστική ανάλυση	286
3.3.2 2 <sup>η</sup> Πειραματική Μόλυνση	289
3.3.2.1 Εξέταση των πειραματικά μολυσμένων ιχθύων, μετά τις εμβαπτίσεις των ουσιών	290
3.3.2.2 Στατιστική ανάλυση	290
<b>3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (LC50)</b>	295

<b>ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΙΝΗΣ Τ, ΣΕ ΙΧΘΥΔΙΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ</b>	
3.4.1 1 <sup>η</sup> Πειραματική Εμβάπτιση	295
3.4.2 2 <sup>η</sup> Πειραματική Εμβάπτιση	300
3.4.3 Ιστοπαθολογική εξέταση	303
3.5 Εφαρμογή στην πράξη	305
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup></u></b> <b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	313
<b>4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΟΧΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>Tenacibaculum maritimum</i> ΣΕ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ</b>	314
4.1.1 Μακροσκοπική και Νεκροτομική εξέταση	318
4.1.2 Βακτηριολογική εξέταση	319
4.1.3 Στατιστική ανάλυση	322
4.1.4 Μικροσκοπική εξέταση νωπών επιχρισμάτων και επιχρισμάτων μετά από χρώση Gram	324
4.1.5 Βιοχημική ταυτοποίηση	324
4.1.6 Μοριακή ταυτοποίηση-Απομόνωση Γενετικού υλικού PCR	326
4.1.7 Παρασιτολογική εξέταση	327
4.1.8 Ιστοπαθολογική εξέταση	327
4.1.9 Αντιβιογράμμα	331
4.1.10 Τράπεζα Αναφοράς Μυξοβακτηριδίων από τις Ελληνικές, θαλάσσιες Ιχθυοκαλλιέργειες	332
<b>4.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>Tenacibaculum maritimum</i> ΣΕ ΙΧΘΥΔΙΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ</b>	334
4.2.1. Ιστοπαθολογική εξέταση	337
<b>4.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΙΝΗΣ-Τ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΗΣ ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΣΗΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΣΕ ΤΣΙΠΟΥΡΕΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΑ</b>	337
<b>4.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (LC50) ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΙΝΗΣ Τ, ΣΕ</b>	342

<b>ΙΧΘΥΔΙΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ</b>	
<b>4.5 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ - ΣΥΝΕΧΙΣΗ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ</b>	345
Greek Aquaculture Mycobacteria (GAM), Τράπεζα Αναφοράς Μυξοβακτηριδίων από τις Ελληνικές, θαλάσσιες Ιχθυοκαλλιέργειες	347
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup></u></b>	356
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	381

## Σκοποί της παρούσας διατριβής

Σε μια περίοδο που οι ιχθυοκαλλιέργειες αναπτύσσονται ταχύτατα παγκοσμίως και ένας από τους σημαντικότερους περιοριστικούς παράγοντες της οικονομικής σταθερότητας τους είναι τα νοσήματα των ψαριών, η διδακτορική αυτή διατριβή πρωτοπορεί και αποτελεί την πρώτη οργανωμένη μελέτη της νόσου της μυξοβακτηριδίασης από το μυξοβακτηρίδιο *Tenacibaculum maritimum* στις εντατικές ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες.

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι:

- Να διερευνηθεί η παρουσία του βακτηρίου *T. maritimum* σε εκτρεφόμενα είδη θαλάσσιων ψαριών σε διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και να εκτιμηθεί η κατάσταση της μυξοβακτηριδίασης στην χώρα μας κατά την διάρκεια 4 εποχικών δειγματοληψιών. Να περιγραφεί η παρουσία των μυξοβακτηριδίων, στα θαλάσσια εκτρεφόμενα ψάρια στην Ελλάδα, σε σχέση με την γεωγραφική προέλευση, την εποχή, το είδος και την ηλικία των ψαριών, καθώς επίσης και αν αυτά τα στελέχη εμφανίζουν παρόμοιο βιοχημικό προφίλ, εντός των ελληνικών συνόρων, με στόχο την μελέτη της εποχικότητας, της παθολογίας και του ποσοστού μόλυνσης από το μυξοβακτηρίδιο *T. maritimum*.
- Να απομονωθούν, ταυτοποιηθούν και να διατηρηθούν βακτηριδιακά στελέχη του *T. maritimum* από εκτρεφόμενα στην Ελλάδα ψάρια με μικροβιολογικές, βιοχημικές και μοριακές μεθόδους, για μελλοντικές μελέτες με την δημιουργία Τράπεζας Μυξοβακτηριδίων και να αξιολογηθεί η ιστοπαθολογική τους εικόνα.
- Να αναπτυχθεί ένα πειραματικό μοντέλο μόλυνσης με το μυξοβακτηρίδιο *T. maritimum* σε ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού, με πειραματικές μολύνσεις με απομονωμένα βακτηριδιακά στελέχη του *T. maritimum* στα ιχθύδια, με σκοπό τον έλεγχο της παθογόνου δράσης τους.
- Να αξιολογηθεί αν το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και η χλωραμίνη-T, μπορούν να θεωρηθούν αποτελεσματικοί τρόποι αντιμετώπισης της μυξοβακτηριδίασης καθώς και η επίδραση τους στα ψάρια, με την πραγματοποίηση δοκιμών σε πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού, δύο είδη τα οποία καλλιεργούνται σε ευρεία κλίμακα στις θαλάσσιες ιχθυοκαλλιέργειες, στην Ελλάδα.

- Να προσδιοριστεί η μεσαία θανατηφόρα συγκέντρωση (Lethal Concentration 50) (LC50) των δύο διαλυμάτων, υπεροξειδίου του υδρογόνου και χλωραμίνης-T, σε ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ιχθυολογίας – Ιχθυοπαθολογίας σε συνεργασία με το εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Πηγή  
χρηματοδότησης είναι το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) -  
Ευρωπαϊκή Ένωση και  
Εθνικοί Πόροι.**

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.





## **Ευχαριστίες**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Φωτεινή Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η οποία μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω αυτή τη διατριβή και την επέβλεψε, υποστηρίζοντας και καθοδηγώντας με καθ' όλη τη διάρκειά της. Η συμβολή της ήταν καθοριστική στην επιλογή του θέματος, στην κριτική ανάγνωση του κειμένου και οι συμβουλές της πολύτιμες. Επίσης την ευχαριστώ για την ανεύρεση χρηματικών πόρων μέσω της ένταξής μου σε ένα εξαιρετικό ερευνητικό πρόγραμμα, καθώς και για τη συνεχή βοήθειά της σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ, επίσης, τον κ. Πάσχο Ιωάννη, Καθηγητή του Τμήματος Ιχθυοκομίας – Αλιείας του ΤΕΙ Ηπείρου για τη συμβολή, την συνεχή καθοδήγηση του ως μέλος της τριμελούς επιτροπής και τις πολύτιμες συμβουλές του. Επίσης, ευχαριστώ τον Κ. Ναθαναηλίδη Κοσμά, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Ιχθυοκομίας – Αλιείας του ΤΕΙ Ηπείρου, για τη βοήθειά του, την συνεχή υποστήριξή του και τις πολύτιμες συμβουλές του, που αποδείχθηκαν ιδιαίτερα σημαντικές για την ολοκλήρωση της διδακτορική διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης, τον κ. Παππά Ιωάννη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την συνεχή καθοδήγηση και την βοήθεια του σε όλο το διάστημα των δειγματοληψιών και των πειραματικών μολύνσεων.

Θερμές ευχαριστίες στον κ. Κολύγα Μάρκο, υποψήφιο διδάκτορα του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την βοήθειά του σε όλες τις φάσεις πραγματοποίησης της διπλωματικής εργασίας, τις συμβουλές του, τη βοήθεια στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, καθώς και για την ηθική συμπαράσταση του σε όλο αυτό το διάστημα συγγραφής της εργασίας.

Ευχαριστίες επίσης απευθύνω:

Στην κ. Μαντέ Μαρία, υπεύθυνη της μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας Αφοί ΔΗΜ. ΜΑΝΤΕ & ΣΙΑ Ο.Ε.", για την άριστη συνεργασία κατά την συλλογή των δειγμάτων.

Στον κ. Χατζόπουλο Αχιλλέα, Ιχθυολόγο καθώς και στους υπεύθυνους της Εταιρίας Ιχθυοκαλιεργειών «Νηρέας» για την βοήθεια τους στην συλλογή των δειγμάτων.

Στην κα. Γκουργιώτη Αργυρώ, γραμματέα του Εργαστηρίου Ιχθυολογίας-Ιχθυοπαθολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τις

πολύτιμες συμβουλές τις, κατά την πραγματοποίηση των ιστοπαθολογικών εξετάσεων.

Στους φίλους μου, που ήταν δίπλα μου και με στήριζαν όταν τους χρειαζόμουν.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, για τη μέχρι τώρα προσφορά τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και για την απεριόριστη συμπαράσταση που μου έδειξαν στις δύσκολες στιγμές, καθώς και για όσα έχουν κάνει για μένα μέχρι σήμερα.

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>**

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΚΕΙΜΕΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ**

## 1.1 ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

### 1.1.1 Σημασία των υδατοκαλλιέργειών παγκοσμίως

Ο όρος ‘υδατοκαλλιέργειες’ αφορά στην δια των αιώνων, ελεγχόμενη εκτροφή υδρόβιων οργανισμών. Η ελεγχόμενη εκτροφή υδρόβιων οργανισμών εμφανίζει μια συνεχώς αυξανόμενη ανάπτυξη κατά τις τελευταίες δεκαετίες (FAO, 2009).

Οι υδατοκαλλιέργειες, μετά την σταθερή ανάπτυξή τους τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες, έφτασαν να συνεισφέρουν σήμερα κατά 50% στην συνολική κατανάλωση ψαριών παγκοσμίως. Αυτό αντανακλά την ζωτικότητα του τομέα των υδατοκαλλιέργειών, την παγκόσμια οικονομική ανάπτυξη, αλλά και τις συνεχείς εξελίξεις στην επεξεργασία και εμπορία των ψαριών (FAO, 2009). Σύμφωνα με τα στοιχεία του FAO (Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών), οι ιχθυοκαλλιέργειες από το 1970 και μετά, με μέσο ποσοστό αύξησης κατά 6,9%, δηλαδή ρυθμό που υπερέρχει άλλων τομέων της ζωικής παραγωγής, εξελίχθηκαν στην πιο γρήγορα αναπτυσσόμενη δραστηριότητα παγκοσμίως, διότι τα ψάρια και τα προϊόντα τους αποτελούν σημαντική πηγή πρωτεϊνών για τον άνθρωπο, εδώ και αιώνες (FAO, 2009). Στον Πίνακα 1.1, φαίνεται η παγκόσμια παραγωγή ιχθύων από την αλιεία και τις υδατοκαλλιέργειες (FAO, 2012).

**Πίνακας 1.1.** Παγκόσμια παραγωγή ιχθύων από την αλιεία και τις υδατοκαλλιέργειες και χρήση τους (FAO, 2012).

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<b>Εκατομμύρια τόνοι</b>						
<b>ΠΑΡΑΓΩΓΗ</b>						
<b>ΑΛΙΕΙΑ</b>						
Γλυκά νερά	9.8	10.0	10.2	10.4	11.2	11.5
Θάλασσα	80.2	80.4	79.5	79.2	77.4	78.9
<b>Σύνολο</b>	<b>90.0</b>	<b>90.3</b>	<b>89.7</b>	<b>89.6</b>	<b>88.6</b>	<b>90.4</b>
<b>ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ</b>						
Γλυκά νερά	31.3	33.4	36.0	38.1	41.7	44.3
Θάλασσα	16.0	16.6	16.9	17.6	18.1	19.3
<b>Σύνολο</b>	<b>47.3</b>	<b>49.9</b>	<b>52.9</b>	<b>55.7</b>	<b>59.9</b>	<b>63.6</b>
<b>ΣΥΝΟΛΟ ΠΑΓΚΟΣΜΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ</b>	<b>137.3</b>	<b>140.2</b>	<b>142.6</b>	<b>145.3</b>	<b>148.5</b>	<b>154.0</b>

<b>ΧΡΗΣΗ</b>						
Ανθρώπινη κατανάλωση	114.3	117.3	119.7	123.6	128.3	130.8
Χρήση εκτός τροφής	23.0	23.0	22.9	21.8	20.2	23.2
Πληθυσμός(δισεκατομμύρια)	6.6	6.7	6.7	6.8	6.9	7.0
Κατά κεφαλήν κατανάλωση ψαριών (kg)	17.4	17.6	17.8	18.1	18.6	18.8

Σημείωση: Τα υδρόβια φυτά δεν περιλαμβάνονται. Τα δεδομένα για το 2011 είναι προσωρινές και κατά προσέγγιση εκτιμήσεις.

Η παγκόσμια αύξηση της ζήτησης για ψάρια, βοηθάει την ραγδαία ανάπτυξη και βελτίωση της τεχνολογίας της ιχθυοκαλλιέργειας. Η στροφή των καταναλωτών σε μια πιο υγιεινή διατροφή, μεγαλώνει την κατανάλωση ψαριών, λόγω των θρεπτικών ωφελειών που προσφέρουν στον καταναλωτή τους. Τα ψάρια αποτελούν πλούσια πηγή πρωτεϊνών, βιταμινών, ιχνοστοιχείων και άλλων θρεπτικών στοιχείων που χρειάζεται ο ανθρώπινος οργανισμός. Η σαφής αύξηση της ζήτησης οδήγησε τους κρατικούς μηχανισμούς να υποστηρίξουν τον κλάδο των ιχθυοκαλλιεργειών παγκοσμίως, με εθνικά και διεθνή προγράμματα χρηματοδότησης, που συμβάλλουν στην μείωση του κόστους παραγωγής, στη βελτίωση της ποιότητας παραγόμενου προϊόντος και κυρίως στη συνέχιση της ανάπτυξης του κλάδου (FAO, 2009).

Σήμερα, οι υδατοκαλλιέργειες προσφέρουν στην:

- Παραγωγή τροφίμων για τον άνθρωπο.
- Παραγωγή τροφής για τα κατοικίδια.
- Παραγωγή προϊόντων για τη βιομηχανία.
- Βελτίωση φυσικών αποθεμάτων υδρόβιων οργανισμών με τεχνητές μεθόδους.
- Παραγωγή διακοσμητικών υδρόβιων οργανισμών.
- Παραγωγή δολωμάτων για την αλιεία ιχθύων.
- Παραγωγή ιχθύων κατάλληλων για τον εμπλουτισμό φυσικών υδάτινων μαζών και την ερασιτεχνική αλιεία (Παπουτσόγλου, 1997).

Οι υδατοκαλλιέργειες παγκοσμίως είναι ο διατροφικός κλάδος που γνωρίζει τη μεγαλύτερη ανάπτυξη και αποτελεί ένα από τους σημαντικότερους και συγχρόνως οικονομικότερους τρόπους παραγωγής τροφίμων. Εξάλλου, η κατανάλωση ιχθύων διατηρεί ένα σημαντικό μερίδιο στην αγορά ζωικής πρωτεΐνης, της οποίας η ζήτηση αυξάνεται συνεχώς εξαιτίας των νεότερων διατροφικών απαιτήσεων των καταναλωτών σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες υψηλής ποιότητας,

χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος και σχετικά μεγάλη περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (FAO, 2009). Αυτές τις απαιτήσεις ικανοποιούν πλήρως τα ιχθυρά, κυρίως ορισμένων ειδών ψαριών, όπως ο σολομός.

Έτσι, η θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια κυριαρχείται από τον σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*) με κύριους παραγωγούς την Νορβηγία, την Χιλή, το Ηνωμένο Βασίλειο, τον Καναδά και την Ιρλανδία. Όμως, σε σύνολο ειδών ψαριών, οι κυριότερες χώρες παραγωγής ψαριών σε ιχθυοκαλλιέργειες παγκοσμίως, είναι η Κίνα (67% της παγκόσμιας παραγωγής) (FAO, 2009), η Ινδία, το Βιετνάμ, η Ταϊλάνδη και η Ινδονησία. Στην Ευρώπη οι κυριότερες χώρες παραγωγής ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας είναι η Νορβηγία, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Τουρκία, η Ελλάδα, η Ισπανία, η Ιταλία και η Γαλλία. Η συνολική παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού στην Ευρώπη, όσο και η παραγωγή του κάθε είδους ψαριού ξεχωριστά ακολουθεί ανοδική πορεία. Πιο συγκεκριμένα, το σύνολο της παραγωγής από 92.310 τόνους το 1999 ανήλθε σε 175.196 τόνους το 2006, παρουσιάζοντας μέσο ετήσιο ρυθμό αύξησης 9,6%. Η Ελλάδα είναι η χώρα με τη μεγαλύτερη παραγωγή ευρύαλων ψαριών (τσιπούρας και λαβρακιού) μεταξύ των Μεσογειακών χωρών. Στον Πίνακα 1.2, φαίνεται η Ευρωπαϊκή παραγωγή εκτρεφόμενων ψαριών ανά χώρα, σε τόνους, 2007-2011 (Eurostat 2011).

Η Ελλάδα κατατάχθηκε πρώτη στην παραγωγή τσιπούρας στην Ευρώπη το 2008, παράγοντας 60.000 τόνους με μερίδιο 43,73% στην παγκόσμια αγορά. Η δε συνολική ποσότητα παραγωγής λαβρακιού το 2008 ήταν 105.900 τόνοι, από τους οποίους η Ελλάδα παρήγαγε τις 35.000 τόνους καταλαμβάνοντας ποσοστό 33,05% επί του συνόλου (FISHSTAT & FEAP, 2008). Γενικώς η παραγωγή λαβρακιού των μεγαλύτερων παραγωγών-χωρών στην Ευρώπη, αυξανόταν με μέσο ετήσιο ρυθμό αύξησης 9,8%.

**Πίνακας 1.2.** Ευρωπαϊκή παραγωγή εκτρεφόμενων ψαριών ανά χώρα, σε τόνους, 2007-2011 (Eurostat 2011).

	2007	2008	2009	2010	2011
<b>EU-28</b>	1 321 676	1 271 519	1 318 062	1 272 128	1 253 368
<b>BE</b>	-	-	576	539	-
<b>BG</b>	4 431	7 251	7 912	7 920	7 091
<b>CZ</b>	20 447	20 395	20 071	20 420	21 010
<b>DK</b>	31 168	37 216	34 131	32 330	31 917
<b>DE</b>	44 999	43 977	39 957	40 694	39 166
<b>EE</b>	778	475	654	573	420

IE	52 504	44 871	47 212	46 188	44 289
EL	113 188	114 888	121 971	120 982	106 575
ES	283 747	252 238	268 457	253 784	274 223
FR	237 451	238 249	236 439	203 017	206 870
HR	16 387	16 387	16 329	15 686	14 459
IT	180 988	157 865	162 325	153 626	164 127
CY	3 200	3 776	3 356	4 106	4 667
LV	729	583	517	549	546
LT	3 378	3 008	3 428	3 218	3 288
LU	-	-	-	-	-
HU	15 922	14 973	14 144	13 637	15 509
MT	8 589	6 727	5 619	6 881	2 954
NL	53 371	46 621	55 561	66 795	43 720
AT	2 539	2 087	2 141	2 167	2 909
PL	34 928	36 813	36 503	36 503	26 113
PT	7 471	7 352	6 727	8 225	9 166
RO	10 313	12 496	13 131	8 781	8 353
SI	1 354	1 315	1 308	778	1 397
SK	1 199	1 078	823	951	913
FI	13 030	13 439	13 627	11 771	11 277
SE	5 365	7 596	8 540	10 643	13 441
UK	174 200	179 843	196 603	201 364	198 968

### 1.1.2 Υδατοκαλλιέργειες σε Ευρώπη και Μεσόγειο

Τα τελευταία χρόνια, έχει παρατηρηθεί στον ευρωπαϊκό και ιδιαίτερα στο μεσογειακό χώρο, μεγάλο ενδιαφέρον για τις υδατοκαλλιέργειες κάθε τύπου και μορφής. Στην Ευρώπη συναντάμε τη μεγαλύτερη ποικιλία εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών όσον αφορά τα είδη και τους τύπους εκτροφής. Οι εκτροφές αυτές αρχικά αναπτύχθηκαν στα εσωτερικά νερά ενώ τις τελευταίες δεκαετίες ακολούθησε μια θεαματική ανάπτυξη των θαλάσσιων εκτροφών σε περιορισμένο όμως αριθμό ειδών, με αιχμή κυρίως τον σολομό του ατλαντικού, την τσιπούρα και το λαβράκι (FAO, 2009).

Η ελεγχόμενη εκτροφή ψαριών στην Ευρώπη θεωρείται ότι ξεκίνησε γύρω στα 1200 μ.Χ. με ψάρια του γλυκού νερού. Το 1500 μ.Χ. αρχίζει στην Ευρώπη η εκτροφή κυπρίνου, ο οποίος εισάγεται από την Κίνα. Το 1882 εισάγεται από τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής η ιριδίζουσα πέστροφα, η εκτροφή της οποίας αρχίζει ύστερα από την προσαρμογή της στις νέες συνθήκες καλλιέργειας (Φώτης, 2003). Από το 1900 και μετά, η ανάπτυξη των βιολογικών επιστημών και της τεχνολογίας, σε συνδυασμό με την όλο και αυξανόμενη ζήτηση σε προϊόντα υψηλής θρεπτικής αξίας, κατέστησαν τις ιχθυοκαλλιέργειες έναν σημαντικό κοινωνικο-οικονομικό παράγοντα.

Στις μέρες μας, η σχετική εξάντληση ορισμένων υπερπόντιων αλιευτικών πεδίων, η καθιέρωση των ζωνών αλιείας και της οικονομικής ζώνης των 200 μιλίων από τις περισσότερες χώρες, σε συνδυασμό με την αύξηση της αγοραστικής δύναμης των καταναλωτών των ευρωπαϊκών χωρών, αλλά και η ενίσχυση της τάσης για υγιεινή διατροφή, είναι αιτίες που ώθησαν στην ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών στην Ευρώπη.

Οι υδατοκαλλιέργειες στην Μεσόγειο, τα τελευταία 25 χρόνια έχουν εξελιχθεί και αναβαθμιστεί τεχνολογικά, εξαιτίας κυρίως μιας σημαντικής ερευνητικής προσπάθειας στα πεδία της αναπαραγωγής, της καλλιέργειας του γόνου, της παραγωγής ιχθυοτροφών και της γενετικής μηχανικής (FAO, 2009). Η συνολική παραγωγή της τσιπούρας και του λαβρακιού στις μεσογειακές χώρες έφθασε σύμφωνα με πρόσφατες εκτιμήσεις, στους 253.000 τόνους το 2010, δηλαδή το 61% για την τσιπούρα και 39% για το λαβράκι (<http><sup>1</sup>).

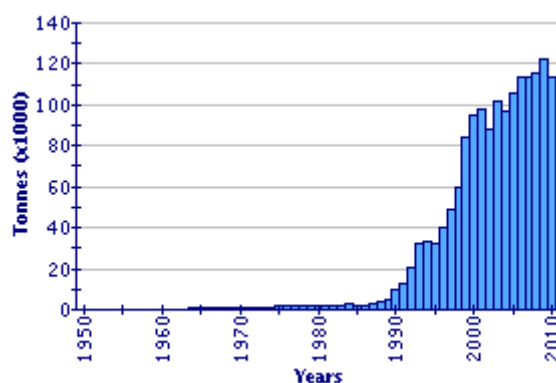
Σύμφωνα με τις προβλέψεις του (FAO), η παγκόσμια κατανάλωση ψαριών και γενικώς των θαλασσινών προβλέπεται να εξακολουθήσει να αυξάνεται, με αποτέλεσμα την υπεραλίευση και την πτώση των ορίων των αλιευτικών αποθεμάτων. Κατά συνέπεια, παρόλο που η αλιεία θα εξακολουθήσει να παρέχει μεγάλο μέρος των αλιευμάτων που απαιτούνται για την κάλυψη της παγκόσμιας κατανάλωσης, η αύξηση της ζήτησης δεν είναι δυνατό να καλυφθεί αποκλειστικά από άγρια ψάρια. Αυτά τα δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ευρωπαϊκή υδατοκαλλιέργεια θα γνωρίσει μεγάλη άνθηση, κάτι που είναι βέβαιο. Γι' αυτό και η Επιτροπή, ήδη από το 2002, εγκαινίασε την πρώτη στρατηγική για τη βιώσιμη ανάπτυξη της ευρωπαϊκής υδατοκαλλιέργειας, η οποία συνεισέφερε σε μεγάλο βαθμό στη διασφάλιση της οικονομικής βιωσιμότητας, της ασφάλειας και της ποιότητας της ευρωπαϊκής παραγωγής υδατοκαλλιεργειών. Σήμερα, η πλειονότητα των μέτρων που περιέχονται στη στρατηγική αυτή και εμπίπτουν στην αρμοδιότητα των ευρωπαϊκών δημόσιων αρχών έχουν ήδη τεθεί σε εφαρμογή. Είναι λοιπόν αναγκαίο να γίνουν νέα βήματα προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι προκλήσεις που τίθενται στην ευρωπαϊκή υδατοκαλλιέργεια. Αυτό είναι και το αντικείμενο μιας ανακοίνωσης που εγκρίθηκε το 2009 από την Επιτροπή και αφορά την ανανέωση της στρατηγικής για τη βιώσιμη ανάπτυξη της ευρωπαϊκής υδατοκαλλιέργειας. Η υγεία και η ευζωία των ζώων πρέπει να αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της στρατηγικής για μια σύγχρονη και αποδοτική υδατοκαλλιέργεια. Αυτό είναι απαραίτητο τόσο από οικονομικής άποψης (η καλή υγεία των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών είναι απαραίτητη για βέλτιστη



ανάπτυξη και ικανοποιητική παραγωγικότητα), αλλά και από εμπορικής (καλύτερη εικόνα του κλάδου της υδατοκαλλιέργειας) και φυσικά από την άποψη της δημόσιας υγείας και της προστασίας του περιβάλλοντος (FAO, 2009).

### 1.1.3 Υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα

Η Ελλάδα, από τον 5<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ είναι χώρα, με μεγάλη παράδοση στην παραγωγή ιχθύων υψηλής ποιότητας. Η εντατική εκτροφή ιχθύων στην Ελλάδα είναι από τους πιο σημαντικούς τομείς της ζωικής παραγωγής με σημαντικό ποσοστό εξαγωγών της παραγόμενης ποσότητας. Σήμερα, τα ελληνικά προϊόντα ιχθυοκαλλιέργειας αναγνωρίζονται παγκοσμίως. Οι υδατοκαλλιέργειες αποτελούν έναν από τους πιο γρήγορα αναπτυσσόμενους βιομηχανικούς κλάδους στην Ελλάδα (Γράφημα 1.1). Είκοσι χρόνια πριν, οι ιχθυοκαλλιέργειες ήταν πρακτικά ανύπαρκτες, ωστόσο από το 1981 και σαν αποτέλεσμα των καλών κλιματικών συνθηκών, των εθνικών και ευρωπαϊκών επενδύσεων στον τομέα, του καταρτισμένου ανθρώπινου δυναμικού μαζί με την επανάσταση στην τεχνολογία των εκκολαπτηρίων και της διατροφής, οι ιχθυοκαλλιέργειες γνώρισαν “άνθιση” (Stirling report, 2004).



Γράφημα 1.1. Παραγωγή υδατοκαλλιεργειών στην Ελλάδα (από το 1960) (Fao Fishery Statistic) (<http><sup>2</sup>).

Στην ανάπτυξη του κλάδου στην Ελλάδα συνέβαλαν σημαντικά οι κλιματολογικές και γεωμορφολογικές συνθήκες της χώρας που ευνοούν τη καλλιέργεια ευρύαλων ψαριών, το ανθρώπινο δυναμικό, οι επιδοτήσεις που δόθηκαν από το κράτος και τα προγράμματα στήριξης της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η μείωση των

αλιευτικών αποθεμάτων και οι περιορισμοί που έχουν επιβληθεί τα τελευταία χρόνια στην αλιεία. Σήμερα ο κλάδος καλύπτει πλήρως της ανάγκες της ελληνικής αγοράς και το μεγαλύτερο μέρος της παραγόμενης ποσότητας εξάγεται στις αγορές του εξωτερικού, με κυριότερες χώρες προορισμού την Ιταλία, την Ισπανία, την Γαλλία, την Τουρκία, την Αγγλία και την Πορτογαλία. Τα ψάρια, κυρίως το λαβράκι και η τσιπούρα αποτελούν τον δεύτερο μεγαλύτερο αγροτικό τομέα εξαγωγών, μετά το ελαιόλαδο και αντιμετωπίζεται ως στρατηγικό προϊόν από την ελληνική κυβέρνηση.

Η Ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια ευρύαλων ψαριών αντιπροσωπεύει το 65% περίπου της Ευρωπαϊκής και της Μεσογειακής παραγωγής. Η επιτυχία αυτή των υδατοκαλλιεργειών βασίζεται, κυρίως στις φυσικές συνθήκες της χώρας, όπως το ήπιο κλίμα, τα καθαρά νερά, τα περίπου 3.000 νησιά και την μεγάλη ακτογραμμή. Σήμερα, τα πιο σημαντικά εμπορικά είδη ιχθύων που εκτρέφονται και έχουν ευρεία απήχηση και αποδοχή στην ελληνική και παγκόσμια αγορά είναι η τσιπούρα, το λαβράκι και σε μικρότερες ποσότητες η πέστροφα, το ευρωπαϊκό χέλι και ο κυπρίνος (Stirling report, 2004).

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και η τσιπούρα (*Sparus aurata*) αποτελούν το 95% περίπου της συνολικής παραγωγής στην Ελλάδα, ενώ τα υπόλοιπα είδη, λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*), φαγκρί (*Pagrus pagrus*), μυλοκόπι (*Umbrina Cirrosa*), μυτάκι (*Puntazzo puntazzo*) και συκιός (*Sciaena umbra*), παράγονται σε μικρότερες ποσότητες. Υπάρχει επίσης μια σημαντική παραγωγή των οστρακοειδών και δίθυρων μαλάκιων, κυρίως μύδια, μικρότερης όμως οικονομικής αξίας.

Μια εκτίμηση της παραγωγής της τσιπούρας και του λαβρακιού της Ελλάδας ανέρχονταν για το 2010 στους 123.000 τόνους, εκ των οποίων 40.000 τόνοι ήταν λαβράκι και 83.000 τσιπούρα. Ο μέσος ετήσιος ρυθμός μεγέθυνσης της παραγωγής ήταν της τάξης του 7,4% από το 2000 μέχρι το 2009, και αποτέλεσε το σημαντικότερο παραγωγό τσιπούρας – λαβρακιού σε διεθνές επίπεδο, με μερίδιο 48,6% επί της συνολικής παραγωγής. Η θέση της Ελλάδας στην παραγωγή τσιπούρας ήταν ισχυρότερη, όπου συγκέντρωσε και το 54% περίπου της διεθνούς παραγωγής. Επιπλέον, αποτέλεσε το μεγαλύτερο εξαγωγέα τσιπούρας και λαβρακιού σε παγκόσμιο επίπεδο, με το σύνολο των εξαγωγών της να σημειώνει την περίοδο 2006-2009 μέσο ετήσιο ρυθμό μεγέθυνσης 11% και να φτάνει το 2009 τους 103.000 τόνους, από 75.600 τόνους το 2006 ([http<sup>1</sup>](#)).

Οι ιχθυοκαλλιέργειες αποτελούν πλέον ένα από τους δυναμικότερους παραγωγικούς κλάδους της χώρας μας, ο οποίος ενσωματώνει την υψηλή

τεχνογνωσία, συμβάλλει στη μείωση της υπεραλίευσης, στη μείωση των εισαγωγών ιχθύων, βελτιώνοντας το εμπορικό ισοζύγιο σε επίπεδο εθνικό αλλά και Ευρωπαϊκής Ένωσης. (Stirling report, 2004). Είναι επομένως κατανοητό ότι με την αύξηση της παραγωγής, αυξάνονται και οι απαιτήσεις της παραγωγής σε παρακολούθηση της υγείας των παραγόμενων ψαριών.

## **1.2 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΙΣ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ**

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που αντιμετωπίζουν σήμερα οι ιχθυοκαλλιέργειες σε παγκόσμιο επίπεδο είναι τα νοσήματα και η παθολογία των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών, καθώς επηρεάζουν την ανάπτυξη των ψαριών, προκαλούν μείωση της παραγωγής, αύξηση του κόστους και προβλήματα στην ευζωία των ψαριών. Η εντατικοποίηση της παραγωγής ψαριών έχει αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης μολυσματικών νοσημάτων παγκοσμίως. Τα παθολογικά περιστατικά που εμφανίζονται στις εκτροφές έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην παραγωγή, όχι μόνο εξαιτίας των μεγάλων απωλειών που επιφέρουν και των εξόδων που απαιτούνται για την θεραπεία τους, αλλά και εξαιτίας της υποβάθμισης της ποιότητας του τελικού προϊόντος (Ράγιας & Αθανασοπούλου, 2005). Τα νοσήματα αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους περιοριστικούς παράγοντες της οικονομικής σταθερότητας και ανάπτυξης των υδατοκαλλιεργειών, ενώ κάποιοι παθογόνοι μικροοργανισμοί των ψαριών αποτελούν κίνδυνο και για τη δημόσια υγεία. Τα περισσότερα νοσήματα των εκτρεφόμενων ψαριών προέρχονται από τους άγριους πληθυσμούς, καθώς η στενή επαφή μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων ψαριών οδηγεί στην ανταλλαγή παθογόνων.

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

Η εκδήλωση των νοσημάτων είναι συνήθως το αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης παθογόνων παραγόντων, ψαριών και συνθηκών περιβάλλοντος. Τα ψάρια στις

εντατικές καλλιέργειες επηρεάζονται συνεχώς από περιβαλλοντικές αλλαγές και πρακτικές διαχείρισης, όπως χειρισμοί, συνωστισμός, μεταφορά, κακή διατροφή, μεταβολές θερμοκρασίας, και κακή ποιότητα νερού. Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν στρες και να επηρεάσουν τους μηχανισμούς ομοιόστασης των ψαριών, ευαισθητοποιώντας τα ψάρια σε ένα πλήθος παθογόνων (<http><sup>3</sup>).

Οι προϋποθέσεις, που βοηθούν την εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων στα ψάρια, αν βέβαια υπάρχει ο παθογόνος παράγοντας (ιδιαίτερα σε υψηλές θερμοκρασίες νερού και σε συνθήκες μεγάλης ιχθυοπυκνότητας) είναι,

1. Η έλλειψη κατάλληλων συνθηκών διαβίωσης των ψαριών, όπως η υπερβολική ποσότητα τροφής, η έλλειψη τακτικής αλλαγής διχτυών κλπ. και
2. Η ευαισθησία του κάθε ψαριού στο παθογόνο, που επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων καταπόνησης, ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης και το είδος του ψαριού (Αθανασοπούλου, 2006).

Γενικά, από πλευράς ταξινόμησης, τα νοσήματα των ψαριών διακρίνονται ανάλογα με τα αίτια που τα προκαλούν σε:

- A) Νοσήματα από ιούς
- B) Νοσήματα από βακτήρια
- Γ) Νοσήματα από μύκητες
- Δ) Νοσήματα από παράσιτα (Πρωτόζωα, Έλμινθες, Μαλάκια, Αρθρόποδα)
- E) Νοσήματα που οφείλονται σε παράγοντες του περιβάλλοντος και της διαχείρισης
- Στ) Νοσήματα που οφείλονται σε διατροφικά σφάλματα και
- Z) Νεοπλάσματα

Στην παρούσα όμως μελέτη, επιβάλλεται μια αναλυτικότερη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, που αφορά τα βακτήρια και ειδικότερα τα «μυξοβακτηρίδια».

### **1.2.1 Νοσήματα που οφείλονται σε βακτήρια**

Τα βακτήρια είναι σημαντικοί παθογόνοι μικροοργανισμοί τόσο για τα άγρια όσο και για τα εκτρεφόμενα ψάρια και μπορούν να μολύνουν μεγάλο αριθμό ψαριών. Τα νοσήματα των ψαριών που οφείλονται σε βακτήρια, μεταδίδονται εύκολα, εμφανίζονται πολύ συχνά στις εντατικές ιχθυοκαλλιέργειες και προκαλούν μεγάλες απώλειες. Η αποτελεσματική αντιμετώπισή τους στηρίζεται στην έγκαιρη και άμεση διάγνωση και στην κατάλληλη θεραπευτική αγωγή (Noga, 2000). Η αποτελεσματικότητα εξαρτάται επομένως από την κατανόηση του τρόπου μετάδοσης των βακτηρίων και των συμπτωμάτων που προκαλούν.

Τα παθογόνα βακτήρια μολύνουν τον οργανισμό των ψαριών, μετά από την είσοδό τους μέσω των βραγχίων, του εντέρου ή μέσω του δέρματος, οπότε και προκαλούν συστηματική μόλυνση. Οι συστηματικές μολύνσεις των ψαριών εκδηλώνονται συνήθως με σηψαιμία, αιμορραγίες και νεκρώσεις εσωτερικών οργάνων. Κάποια βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν τοπικές επιφανειακές μολύνσεις π.χ. έλκη ή νέκρωση των πτερυγίων, οι οποίες αν δεν αντιμετωπιστούν έγκαιρα μπορεί να οδηγήσουν σε συστηματική μόλυνση. Ορισμένα παθογόνα εντοπίζονται μόνο σε μολύνσεις του δέρματος, όπως τα είδη *Aeromonas*, *Flexibacter* και *Vibrio* sp., ενώ υπάρχουν βακτήρια που μπορούν να μολύνουν ψάρια θαλασσινού νερού αλλά και ψάρια γλυκού νερού. Τα παθογόνα βακτήρια των ψαριών διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τα Gram θετικά και τα Gram αρνητικά βακτήρια. Τα περισσότερα παθογόνα βακτήρια που προσβάλλουν τα ψάρια ανήκουν στα Gram-αρνητικά βακτήρια (Noga, 2000).

Σχετικά με τα νοσήματα που προκαλούνται από τα βακτήρια στα θαλασσινά ψάρια, φαίνεται πως ένας σχετικά μικρός αριθμός βακτηρίων είναι υπεύθυνος για σημαντικές οικονομικές απώλειες στις ιχθυοκαλλιέργειες παγκοσμίως. Είναι σημαντικό επίσης να σημειωθεί πως νοσήματα που κλασικά θεωρούνται νοσήματα των ψαριών γλυκού νερού, όπως η δοθιήνωση (*Aeromonas salmonicida*), η βακτηριδιακή ασθένεια των νεφρών (BKD) (*Renibacterium salmoninarum*) και κάποιες μορφές στρεπτοκοκκίασης, προκαλούν σήμερα σημαντικά προβλήματα και στα θαλασσινά ψάρια. Τα κλινικά συμπτώματα (εξωτερικά και εσωτερικά) που προκαλούνται από το κάθε παθογόνο εξαρτώνται από το είδος ψαριού, την ηλικία και το στάδιο της νόσου (οξεία, χρόνια, υποκλινική). Επιπλέον, σε μερικές περιπτώσεις, δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ εξωτερικών και εσωτερικών συμπτωμάτων. Στην πραγματικότητα, συστηματικά νοσήματα (π.χ. παστερέλλωση) με υψηλή θνησιμότητα που προκαλούν βλάβες στα εσωτερικά όργανα των ψαριών, σπάνια προκαλούν αλλοιώσεις στην εξωτερική επιφάνεια. Αντιθέτως, νοσήματα με σχετικά χαμηλή θνησιμότητα (π.χ. μυξοβακτηριδίαση) προκαλούν κυρίως εξωτερικές αλλοιώσεις, όπως νεκρώσεις και έλκη, που καθιστούν τα ψάρια κυρίως μη εμπορεύσιμα. Οι παθογόνοι παράγοντες που περιγράφονται στα συστήματα ιχθυοκαλλιέργειας είναι συνήθως παρόντες και στους άγριους πληθυσμούς ψαριών. Ωστόσο, στο φυσικό περιβάλλον, σπάνια προκαλούν θνησιμότητα, εξαιτίας της αποφυγής πρόκλησης στρες που συμβαίνει συχνά σε συνθήκες εκτροφής (Toranzo et al., 2005).

Η εγκατάσταση του παθογόνου στα ψάρια απαιτεί τρία βασικά στάδια: (1) το στάδιο της διείσδυσης του παθογόνου στους ιστούς του ξενιστή μέσω χημειοτακτικής κίνησης, (2) τον μεγάλο πολλαπλασιασμό του στους ιστούς του ξενιστή, αξιοποιώντας κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του, όπως αυτά που αξιοποιούν το σίδηρο του ξενιστή (3) την τελική πρόκληση βλάβης στους ιστούς του ιχθύος μέσω της παραγωγής π.χ. εξωκυτταρικών προϊόντων, όπως είναι οι αιμολυσίνες και οι πρωτεάσες. Στον Πίνακα 1.3, παρουσιάζονται πληροφορίες για τα κυριότερα παθογόνα βακτήρια σε εκτρεφόμενα ψάρια παγκοσμίως, που προκαλούν σημαντικές οικονομικές απώλειες στις ιχθυοκαλλιέργειες.

**Πίνακας 1.3.** Αιτιολογικοί παράγοντες οικονομικά σημαντικών βακτηριδιακών νοσημάτων που προσβάλλουν εκτρεφόμενα θαλασσινά ψάρια (Toranzo et al., 2005).

Παράγοντας	Νόσημα	Κύριοι θαλασσινοί ξενιστές
<b>Gram αρνητικά βακτηρίδια</b>		
<i>Listonella anguillarum</i> (πρώην <i>Vibrio anguillarum</i> )	Δονακίωση	Σολομοειδή, καλκάνι, λαβράκι, χέλι, μπακαλιάρος, κόκκινη τσιπούρα
<i>Vibrio ordalii</i>	Δονακίωση	Σολομοειδή
<i>Vibrio salmonicida</i>	Δονακίωση	Σολομός του Ατλαντικού, μπακαλιάρος
<i>Vibrio vulnificus</i>	Δονακίωση	Χέλια
<i>Moritella viscosa</i> (πρώην <i>Vibrio viscosus</i> )	“Έλκος του χειμώνα”	Σολομός του Ατλαντικού
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (πρώην <i>Pasteurella piscicida</i> )	Φωτοβακτηριδίωση (Παστερέλλωση)	Τσιπούρα, λαβράκι, γλώσσα, ραβδωτή πέρκα
<i>Pasteurella skyensis</i>	Παστερέλλωση	Σολομός του Ατλαντικού
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	Δοθιήνωση	Σολομοειδή, καλκάνι
<i>Tenacibaculum maritimum</i> (πρώην <i>Flexibacter maritimus</i> )	Μυξοβακτηριδίαση	Καλκάνι, σολομοειδή, γλώσσα, λαβράκι, τσιπούρα, κόκκινη τσιπούρα
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	Ψευδομοναδίωση “Winter disease”	Τσιπούρα, χέλι, καλκάνι, γλώσσα
<b>Gram θετικά βακτηρίδια</b>		
<i>Lactococcus garvieae</i> (πρώην <i>Enterococcus seriolicida</i> )	Στρεπτοκοκκίαση ή λακτοκοκκίωση	<i>Seriola quinqueradiata</i> , χέλι
<i>Streptococcus iniae</i>	Στρεπτοκοκκίαση	<i>Seriola quinqueradiata</i> , καλκάνι, λαβράκι,

		μπαραμούντι
<i>Streptococcus parauberis</i>	Στρεπτοκοκκίαση	Καλκάνι
<i>Streptococcus phocae</i>	Στρεπτοκοκκίαση	Σολομός του Ατλαντικού
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	BKD (Βακτηριδιακή ασθένεια των νεφρών)	Σολομοειδή
<i>Mycobacterium marinum</i>	Μυκοβακτηριδίωση	Λαβράκι, καλκάνι, σολομός του Ατλαντικού
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	Ρικέτσια	Σολομοειδή

Γενικώς, τα βακτηριακά νοσήματα φαίνεται να αποτελούν το κυριότερο πρόβλημα των εντατικών ιχθυοκαλλιεργειών στις μέρες μας. Μεταξύ αυτών, η μυξοβακτηριδίαση που αποτελεί αντικείμενο έρευνας αυτής της διατριβής, αποτελεί σημαντικό παθογόνο παράγοντα πολλών θαλασσινών ψαριών σε διάφορες περιοχές της Ευρώπης, της Αμερικής και της Ιαπωνίας (McVicar & White, 1979,1982; Wakabayashi et al., 1986; Devesa et al., 1989; Pazos et al., 1993; Chen et al., 1995; Handlinger et al., 1997; Ostland et al., 1999; Santos et al., 1999; Avendaño-Herrera et al., 2004a, Choi et al., 2006; Jung et al., 2006; Sheu et al., 2007; Vatsos, 2007; Heindl et al., 2008; Wang et al., 2008; Piñeiro-Vidal et al., 2008a,b; Lee et al., 2009; Oh et al., 2012; Piñeiro-Vidal et al., 2012).

Σε κάποιες περιοχές η εκδήλωση της νόσου καθορίζει την τιμή ψαριών στην αγορά, διότι η υψηλή θνησιμότητα επηρεάζει την ποσότητα, άρα τις τιμές. Τα μυξοβακτηρίδια αποτελούν μία μεγάλη ομάδα βακτηριδίων που προσβάλλουν πολλά είδη ψαριών θαλασσινού και γλυκού νερού προκαλώντας συγκεκριμένες νοσολογικές καταστάσεις.

Στα θαλασσινά είδη κύριο αίτιο της νόσου μυξοβακτηριδίασης είναι το αρνητικό κατά Gram βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* (πρώην *Flexibacter maritimus*). Η νόσος έχει αναφερθεί στο ιαπωνικό φαγκρί (*Pagrus major*), την τσιπούρα (*Sparus aurata*), το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), το σαργό (*Diplodus sargus*), τη συναγρίδα (*Dentex dentex*), τον σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*), την γλώσσα (*Solea solea*), το καλκάνι (*Scophthalmus maximus*) και πολλά άλλα είδη σε όλο τον κόσμο, μεταξύ των οποίων η Ευρώπη και η Μεσόγειος. Η νόσος είναι πολύ συχνή παγκοσμίως, με μεγάλες θνησιμότητες σε όλες τις εντατικές καλλιέργειες, όμως στην Ελλάδα δεν υπάρχουν εκτεταμένες αναφορές της μέχρι σήμερα (Santos et al., 1999; Salati et al., 2005; Toranzo et al., 2005; Avendaño-Herrera et al., 2004b,2005; Vatsos, 2007; Kolygas et al., 2012).

### 1.3 ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΣΗ

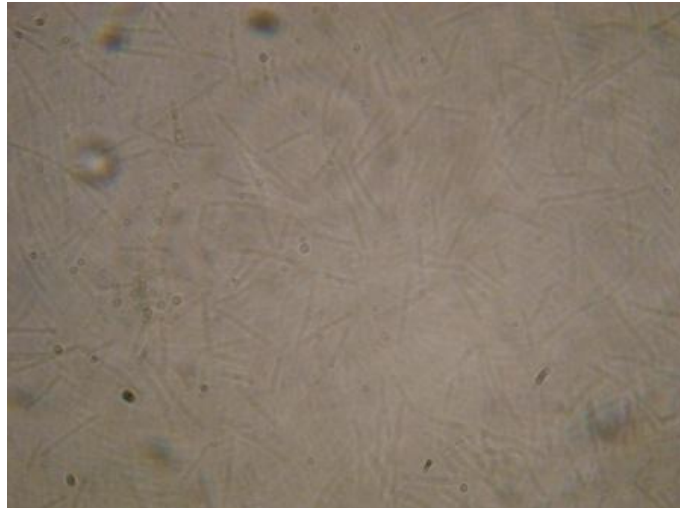
Ο όρος «Μυξοβακτηριδίαση» χρησιμοποιείται για να δηλώσει μια ομάδα βακτηριακών νοσημάτων που προσβάλλουν τα ψάρια γλυκού και θαλασσινού νερού, προκαλώντας συγκεκριμένες νοσολογικές καταστάσεις. Βιβλιογραφικά περιγράφονται τρία κύρια νοσήματα. Το “Σύνδρομο των ιχθυδίων της ιριδίζουσας πέστροφας-Rainbow trout fry syndrome”, η “Βακτηριακή νόσος των ψυχρών νερών-Bacterial cold water disease/saddleback syndrome” και η “Θαλάσσια Μυξοβακτηριδίαση-Eroded mouth syndrome”. Οι δύο πρώτες παθολογικές καταστάσεις αναφέρονται κυρίως στα σολομοειδή και άλλα ψάρια του γλυκού νερού και προκαλούνται από τα βακτήρια, *Flavobacterium psychrophilum* και *Flavobacterium columnare*. Η τρίτη, προσβάλλει τα Μεσογειακά, θαλασσινά ψάρια (Dipnet report, 2007).

Η Μυξοβακτηρίαση ή στηλώδης νόσος αναφέρεται επίσης στην ξένη βιβλιογραφία ως, marine tenacibaculosis, flexibacteriosis, salt water columnaris disease, gliding bacterial disease of sea fish, EMS (eroded mouth syndrome), BPN (black patch necrosis), Myxobacterial disease, peduncle disease, Saddleback, Fin rot και Cotton wool Disease (Santos et al., 1999; Noga, 2000; Toranzo et al., 2005).

Ανεξάρτητα ονοματολογίας της, από ασθένεια αρχικά γόνου τσιπούρας, εξελίχθηκε σε σημαντικό οικονομικό και περιοριστικό παράγοντα εκτροφής πολλών άλλων ειδών ψαριών στην Ευρώπη, την Αμερική και την Ιαπωνία (Wakabayashi et al. 1986; Pazos et al., 1996). Σήμερα η μυξοβακτηρίαση εμφανίζεται σε εκτρεφόμενα και άγρια ψάρια στην Ευρώπη, Ιαπωνία, Βόρεια Αμερική και Αυστραλία και επηρεάζει πολλά είδη θαλασσινών ψαριών (McVicar & White, 1979,1982; Wakabayashi et al., 1986; Devesa et al., 1989; Pazos et al., 1993; Chen et al., 1995; Handler et al., 1997; Ostland et al., 1999; Santos et al., 1999; Avendaño -Herrera et al., 2004a, Vatsos, 2007 Failde et al., 2013).

Το αίτιο της νόσου είναι το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum*, που είναι Gram αρνητικό βακτήριο, που μικροσκοπικά φαίνεται να σχηματίζει μακριά και λεπτά ραβδονημάτια, συνήθους μήκους 0.5μm επί 2-30μm, (Εικόνα 1.3.1.) ή περιστασιακά να φτάνουν τα 100μm, ανάλογα και με την ηλικία της καλλιέργειας. Σε παλιές καλλιέργειες, τα μικροβιακά κύτταρα εμφανίζονται μικρότερα με σφαιρική δομή διαμέτρου 0.5μm. Είναι υποχρεωτικώς αερόβιο βακτήριο με απουσία μικροκυστών και χαρακτηριστική ολισθητική ικανότητα (Pazos et al., 1996; Santos et al., 1999).





Εικόνα 1.3.1. Λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι *Tenacibaculum maritimum* σε νωπό επίχρισμα από αποικία του βακτηρίου (μεγέθυνση 100x). Προσωπικό αρχείο.

### 1.3.1 Αιτιολογικός Παράγοντας

Το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* (πρώην *Cytophaga marina*, *Flexibacter marinus* και *Flexibacter maritimus*) είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της μυξοβακτηρίασης στα θαλασσινά ψάρια (Wakabayashi et al., 1986; Devesa et al., 1989; Bernardet & Grimont, 1989; Chen et al., 1995; Pazos et al., 1996; Handler et al., 1997; Ostland et al., 1999; Santos et al., 1999; Suzuki et al., 2001). Το παθογόνο απομονώθηκε για πρώτη φορά (στην Ιαπωνία) το 1979, σε φαγκρί (*Pagrus major*) (Hikida et al., 1979), αλλά χαρακτηρίστηκε το 1986 από τον Wakabayashi και συνεργάτες, οι οποίοι ονόμασαν το βακτήριο *Flexibacter maritimus*. Πριν το 1986 οι ερευνητές χρησιμοποιούσαν για να περιγράψουν το παθογόνο τα ονόματα *Cytophaga marina* και *Flexibacter marinus* (Santos et al., 1999). Η πρώτη αναφορά του βακτηρίου στην Ευρώπη δημοσιεύτηκε το 1982, στο ψάρι γλώσσα (*Solea solea*) (Campbell & Buswell, 1982; Bernardet et al., 1990). Το 2001 αναταξινομήθηκαν τα βακτήρια *Flexibacter maritimus*, *F. amylolyticum*, *F. ovolyticum* και *F. mesophilum*, *F. skagerrakense*, *F. lutimaris* και αποτέλεσαν είδη του γένους *Tenacibaculum* (Suzuki et al., 2001). Το χαρακτηριστικό του γένους αυτού είναι η ύπαρξη μενακινόνης-6 στο γονίδιο της γυράσης-B (*gyrB*), η οποία εντοπίστηκε και στα προαναφερθέντα είδη. Το γένος *Tenacibaculum* ανήκει στην φυλογενετική ομάδα των θαλάσσιων MK-6 ειδών σύμφωνα με τις επίσημες ταξινομικές λίστες (Suzuki et al., 2001), ανήκει στην οικογένεια *Flavobacteriaceae* και σήμερα, περιλαμβάνει τα είδη: *Tenacibaculum adriaticum* (θαλάσσιο βρούζωο), *Tenacibaculum aestuarii*

(ιζήματα), *Tenacibaculum aiptasiae* (θαλάσσια ανεμώνη), *Tenacibaculum amylolyticum* (θαλάσσια μακροάλγη), *Tenacibaculum crassostreae* (στρείδια), *Tenacibaculum dicentrarchi* (λαβράκι), *Tenacibaculum discolor* (γλώσσα), *Tenacibaculum gallaicum* (καλκάνι), *Tenacibaculum japonica*, *Tenacibaculum litopenaei* (θαλάσσια γαρίδα), *Tenacibaculum litoreum* (ιζήματα), *Tenacibaculum lutimaris* (ιζήματα), *Tenacibaculum maritimum* (ασθενή ψάρια), *Tenacibaculum mesophilum* (σπόγγι), *Tenacibaculum onolyticum* (αυγά ψαριών), *Tenacibaculum skagerrakense* (θαλασσινό νερό), *Tenacibaculum soleae* (γλώσσα) *Tenacibaculum jejuense* (παράκτιο θαλασσινό νερό) (Wakabayashi et al., 1986; Hansen et al., 1992; Suzuki et al., 2001; Frette et al., 2004; Yoon et al., 2005; Choi et al., 2006; Jung et al., 2006; Sheu et al., 2007; Heindl et al., 2008; Wang et al., 2008; Piñeiro-Vidal et al., 2008a,b; Lee et al., 2009; Oh et al., 2012; Piñeiro-Vidal et al., 2012).

Τα μυξοβακτηρίδια κατά καιρούς περιγράφονταν ως *Sporocytophaga* spp. Παρόλα αυτά, η παρουσία μικροκυστών (κύριο διαγνωστικό στοιχείο αυτού του γένους) δεν μπορούσε να εντοπιστεί (Woo et al., 2003). Ο Davis για πρώτη φορά το 1922 εντόπισε μυξοβακτηρίδια σε ψάρια γλυκού νερού και τους έδωσε την ονομασία *Bacillus columnaris* από την κιονοειδή δομή που σχημάτιζαν τα βακτηριακά συνονθυλεύματα στους ιστούς. Οι Ordal και Rucker (1944) επέτυχαν για πρώτη φορά να απομονώσουν τον αιτιολογικό παράγοντα της ασθένειας. Βάση μορφολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών το εκχώρησαν στην οικογένεια των *Myxococcaceae* και μετονόμασαν το βακτήριο σε *Chondrococcus columnaris*. Κατά τις δεκαετίες 70-80 τα Μυξοβακτήρια (άνευ μικροκυστών) εντάσσονταν στην τάξη *Cytophagales* χωρίς όμως να είναι ξεκάθαρη η ταξινόμική τους υπόσταση καθώς οι διαφορές μεταξύ των γενών *Flexibacter* και *Cytophaga* παρέμεναν συγκεχυμένες (Bernardet et al., 1986). Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα ήταν η φαινοτυπική ομοιότητα με βακτήρια του γένους *Flavobacterium*. Η σύγχυση προέκυπε από το γεγονός πως ορισμένα βακτήρια που εντοπιζόνταν σε ψάρια του γλυκού νερού μπορούσαν να ανεχθούν μικρές συγκεντρώσεις σε NaCl, κατά την καλλιέργεια τους σε θρεπτικά υποστρώματα. Έτσι προέκυψε η πεποίθηση πως παρόμοιες εκδηλώσεις σε ψάρια θαλασσινού νερού είναι αποτέλεσμα του *Flexibacter columnaris* (Bernardet et al., 1990). Το 1986 ο Wakabayashi, (1986) πρότεινε την μετονομασία των θαλασσινών μυξοβακτηριδίων σε *Flexibacter maritimus*, θέτοντας αυτόματα και έναν φραγμό στην σύγχυση που επικρατούσε ως τότε. Το 2001 το γένος μετονομάστηκε σε

*Tenacibaculum* από τον Suzuki και συνεργάτες, (2001) και υπό αυτήν την ονομασία χαρακτηρίζεται έως και σήμερα.

### 1.3.2 Ευπάθεια φορέων και Ξενιστές

Το *T. maritimum* δεν χρησιμοποιεί εξειδικευμένους ξενιστές. Τόσο τα ενήλικα άτομα όσο και οι λάρβες είναι ευπαθείς στην μυξοβακτηρίαση, παρόλα αυτά, τα πιο νεαρά ψάρια φαίνεται πως είναι περισσότερο ευαίσθητα στην ασθένεια. Μπορούν να επιβιώσουν στο υδάτινο περιβάλλον για αρκετό καιρό, όμως δεν μπορούν να αναπαραχθούν μακριά από τους ξενιστές τους. Ο παρασιτισμός μπορεί για κάποιο εύλογο χρονικό διάστημα να μην επηρεάσει τον ξενιστή όμως συνήθως μετά από κάποιες σημαντικές αλλαγές στην φυσιολογία του ατόμου η ασθένεια εκδηλώνεται. Η δυνητικότητα της νόσου ενισχύεται από περιβαλλοντικούς και άλλους παράγοντες (Roberts 2001).

Ο τρόπος της μετάδοσης και μόλυνσης της ασθένειας είναι ακόμα απροσδιόριστος. Οι φυσικές δεξαμενές του παθογόνου είναι άγνωστες αλλά το βακτήριο έχει απομονωθεί τόσο από το νερό όσο και από τη λάσπη της θάλασσας (Santos et al., 1999, Salati et al., 2005; Choi et al., 2006; Jung et al., 2006). Η μετάδοση του βακτηρίου μέσω του θαλασσινού νερού καθώς και η απευθείας μετάδοση από ψάρι σε ψάρι αποτελούν πιθανούς τρόπους μόλυνσης καθώς και η κατάποση με την τροφή, στα σολομοειδή (Mitchell & Rodger, 2011). Επιπλέον, η εμπλοκή διαφορετικών ειδών μέδουσας καθώς και η θαλάσσια ψείρα, ως φορείς του βακτηρίου έχουν προταθεί πρόσφατα (Ferguson et al., 2010). Οι Ferguson και συνεργάτες (2010), απέδειξαν ότι μέδουσες (*Phylarella quadrata*) μετέφεραν το βακτήριο σε σολομούς και ότι οι μέδουσες μπορούν να λειτουργούν σαν φορέας του βακτηρίου.

Παρατηρείται συχνότερη παρουσία του βακτηρίου και εκδήλωση της ασθένειας σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 15<sup>0</sup>C, ενώ αυξάνεται παράλληλα και η ένταση της νόσου (Santos et al., 1999). Εκτός από την θερμοκρασία του νερού, το στρες στα ψάρια μπορεί να επηρεάσει επίσης σημαντικά την εκδήλωση της ασθένειας. Νερά με υψηλό οργανικό φορτίο, κανιβαλισμός, μεγάλες αλλαγές στην θερμοκρασία, υψηλή ιχθυοφόρτιση, μεταφορές και χειρισμοί αποτελούν φυσικοχημικές και περιβαλλοντικές συνιστώσες οι οποίες ενισχύουν την εκδήλωση της ασθένειας.

Τέτοιες παράμετροι είναι συνήθεις στα συστήματα υδατοκαλλιεργειών (Magariños et al., 1995; Roberts 2001).

Στην **Ευρώπη**, το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* έχει απομονωθεί από γλώσσες (*Solea solea*; *Solea senegalensis*, *Dicologloss cuneata*), λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), τσιπούρα (*Sparus aurata*), κέφαλο (*Mugil cephalus*), ιαπωνικό φαγκρί (*Pagrus major*), μεσογειακό φαγκρί (*Pagrus pagrus*), μυτάκι (*Puntazzo puntazzo*), συναγρίδα (*Dentex dentex*), μυλοκόπι (*Umbrina cirrosa*), καπόνι-χελιδονά (*Chelidonichthys lucernus*), καλκάνι (*Scophthalmus maximus*), σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar* L.) και από τον σολομό coho (*Oncorhynchus kisutch*). Στην **Ιαπωνία** η ασθένεια αναφέρθηκε σε ιαπωνικό φαγκρί (*Pagrus major*), μαύρη τσιπούρα (*Acanthopagrus schlegeli*), ψευδόγλωσσα (*Paralichthys olivaceous*), μαγιάτικο (*Seriola quinqueradiata*), σαργό (*Diplodus sargus*) και μυτάκι (*Diplodus puntazzo*). Στην **Αμερική** απομονώθηκε από σκίαινα (*Atractoscion nobilis*),σαρδέλα του Ειρηνικού (*Sardinops sagax*), αντζούγιες (*Engraulis mordax*) και το είδος *Orplegnathus fasciatus*. Στην **Αυστραλία**, τα κύρια είδη που προσβάλλονται είναι ο σολομός του Ατλαντικού (*Salmo salar*) και η ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*). Η πρώτη μεγάλη εκδήλωση της ασθένειας έγινε το 1988/89 σε κλουβιά εκτροφής σολομού (*Salmo salar*). Έκτοτε αναφέρθηκαν μαζικές μολύνσεις κυρίως σε θαλάσσιες εγκαταστάσεις εκτροφής με σημαντικές απώλειες (Handler et al., 1997). Πειραματικές μολύνσεις σε πρασινόγλωσσα (*Rhombosolea tapirina*) υπέδειξαν μικρή ευαισθησία στο παθογόνο (Baxa et al., 1986; Wakabayashi et al., 1986; Bernardet et al., 1990; Chen et al., 1995; Soltani et al., 1996; Santos et al., 1999; Cepeda & Santos, 2002; Salati et al., 2005; Toranzo et al., 2005; Avendaño-Herrera et al., 2004b, 2005; Magi et al., 2006; van Gelderen et al., 2009). Τελευταία εντοπίστηκε και σε ψάρια ενυδρείου, στην Αίγυπτο στα είδη: Picasso Tigger Fish (*Rhinecanthus assasi*) και Black damsel fish (*Neoglyphieodon meles*), όπως αναφέρεται από τους Mohamed και συνεργάτες (2011), προκαλώντας αιμορραγικές, ελκωτικές αλλοιώσεις και 55-65% θνησιμότητα (Mohamed et al., 2011).

Στην Μ. Βρετανία έχουν αναφερθεί υψηλές θνησιμότητες σε εκτρεφόμενους σολομούς, σε θαλάσσιους κλωβούς με κλινική εικόνα, την εκτεταμένη νέκρωση και θρόμβους στα βράγχια. Μετά από μικροβιολογική ανάλυση δειγμάτων, οι συγκεκριμένες θνησιμότητες αποδόθηκαν στην παρουσία του βακτηρίου *T. maritimum*. Κατά την περίοδο έξαρσης του φαινομένου, παρατηρήθηκε ότι υπήρχε

αυξημένη παρουσία μικρών μεδουσών (*Phylalella quardata*) οι οποίες έφεραν το συγκεκριμένο βακτήριο ως ασυμπτωματικοί φορείς (Ferguson et al., 2010).

### 1.3.3 Ποικιλία Στελεχών

Μέχρι και το 1999, το βακτήριο *T. maritimum* θεωρούνταν βιοχημικά και ορολογικά ομοιογενές (Ostland et al., 1999). Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες, χρησιμοποιώντας ορολογικές και μοριακές μεθόδους, έχουν αποδείξει την παρουσία ευδιάκριτων ορολογικών ομάδων μέσα στο είδος (Pazos et al., 1997; Santos et al., 1999; Ostland et al., 1999). Την τελευταία δεκαετία, έχουν ανιχνευθεί τουλάχιστον τρεις ορότυποι (**O**) (Avendaño-Herrera et al., 2004a). Σε αυτούς τους ορότυπους έχει εντοπιστεί εξειδίκευση φορέων δηλαδή συγκεκριμένα ήδη ψαριών είναι μολυσμένα με συγκεκριμένο ορότυπο του παθογόνου και vice versa (Avendaño-Herrera et al., 2004a). Η πλειονότητα των παθογόνων που απομονώθηκε από την γλώσσα (*Solea solea*) και την τσιπούρα (*Sparus aurata*) χαρακτηρίζεται από όμοιο ορότυπο (**O<sub>1</sub>**), ωστόσο, διαφορετικό από εκείνο (**O<sub>2</sub>**) του καλκανιού (*Scophthalmus maximus*) (Toranzo et al., 2005) και εκείνου (**O<sub>3</sub>**) που απομονώθηκε στο καπόνι (*Chelidonichthys lucernis*) (Magi et al., 2006). Ωστόσο, αυτές οι ορολογικές διαφορές θα πρέπει να αναζητηθούν σε περαιτέρω μελέτες, που να περιλαμβάνουν περισσότερα στελέχη *T. maritimum* απομονωμένα από διαφορετικούς ξενιστές και περιοχές. Η λεπτομερής έρευνα των αντιγόνων του *T. maritimum* είναι σημαντική τόσο από επιδημιολογικής πλευράς, όσο και από πλευράς γνώσεων, εξαιτίας αυτής της αντιγονικής ετερογένειας.

Αυτή η αντιγονική ετερογένεια θα μπορούσε να αποτελεί έναν επιδημιολογικό δείκτη για αυτά τα είδη ψαριών. Την ενδοειδική αυτή γενετική μεταβλητότητα του *T. maritimum* έχουν υποδείξει αναλύσεις με RAPD-PCR ανεξαρτήτως της αλληλουχίας των ειδικών εκκινητών (Toranzo et al., 2005). Σε μοριακό επίπεδο, χρησιμοποιώντας randomly amplified polymorphic DNA-PCR, απέδειξαν την ύπαρξη αντιγονικής ποικιλίας του *T. maritimum* και έδειξαν ότι τουλάχιστον 3 κύριες O-ορολογικές ομάδες, που φαίνεται να σχετίζονται με το είδος ξενιστή, μπορούν να ανιχνευτούν (Avendaño-Herrera et al. 2004b, 2004c, 2005b).

Όμως, παρά την σύμφωνη καθομολογία απόψεων για την ύπαρξη αυτών των ορότυπων, παρατηρούνται ασυμφωνίες πάνω στο θέμα, πιθανότατα εξαιτίας των διαφορετικών αντιγόνων και αντιορών και τεχνικών όπου χρησιμοποιήθηκαν από

τους διάφορους ερευνητές (Pazos et al.,1997; Santos et al., 1999; Ostland et al., 1999).

Οι πρώτες ορολογικές μελέτες που περιγράφηκαν από τον Wakabayashi και συνεργάτες (1984) και Pazos και συνεργάτες (1993), ανέφεραν αντιγονική ομοιογένεια του *T. maritimum*, ανεξάρτητα από την προέλευση και την πηγή των απομονώσεων. Περαιτέρω μελέτες από τους Pazos (1997) και Ostland και συνεργάτες (1997), έδειξαν αντιγονικές διαφορές μεταξύ των απομονώσεων του *T. maritimum*, υποδεικνύοντας ότι αυτός ο μικροοργανισμός δεν είναι τόσο ομοιογενής όσο πιστευόταν. Ωστόσο, καμία συμφωνία επιτεύχθηκε μεταξύ των ορολογικών ομάδων από αυτούς τους συγγραφείς, ίσως εξαιτίας των διαφορών στα αντιγόνα, στους αντιορούς και στις χρησιμοποιούμενες τεχνικές. Εξαιτίας αυτών των διαφωνιών, είναι απαραίτητες επιπλέον μελέτες, καθώς ένας πλήρης ορισμός της αντιγονικής γνώσης αυτού του βακτηρίου, είναι κρίσιμης σημασίας για την μελλοντική ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου (Romalde et al., 2005). Υπογραμμίζεται λοιπόν η αναγκαιότητα για περαιτέρω μελέτες πάνω στον συσχετισμό μεταξύ των διαφόρων αντιγονικών ομάδων και των ξενιστών ή/και της γεωγραφικής κατανομής του βακτηρίου (Avendaño-Herrera et al.,2004a).

#### **1.3.4 Κλινική Εικόνα**

Τα προσβεβλημένα με μυξοβακτηρίαση άτομα (νεαρά ή ενήλικα) παρουσιάζουν ελκωτικές και αιμορραγικές αλλοιώσεις στο δέρμα, στο στόμα και νεκρωτικές διαβρώσεις στα πτερύγια και την ουρά. Η μόλυνση γίνεται μέσω των εξωτερικών επιφανειών του ψαριού (Magariños et al., 1995). Τόσο τα ενήλικα όσο και τα νεαρά ψάρια μπορούν να προσβληθούν από την μυξοβακτηριδίαση, παρόλο που τα νεαρά ψάρια φαίνεται πως είναι πιο ευαίσθητα στην ασθένεια και εμφανίζουν την σοβαρή μορφή της νόσου, ειδικά μετά από χειρισμούς που προκαλούν καταπόνηση. Αυξημένη θερμοκρασία νερού, παράγοντες καταπόνησης καθώς και η κατάσταση της επιφάνειας του δέρματος παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου (Toranzo et al., 2005).

Στα νεαρά παρατηρείται ερυθρότητα του στόματος με παράλληλη αιμορραγία στις γνάθους που καλύπτονται από ένα παχύ στρώμα ωχροκίτρινης βλέννας (Avendaño-Herrera et al., 2004a). Οι προσβεβλημένες περιοχές μπορεί να εμφανίζονται ωχροκίτρινες, εξαιτίας της παρουσίας μεγάλου αριθμού των βακτηρίων.

Οι διαβρώσεις στο δέρμα μπορεί να είναι μικρές και επιφανειακές ενώ μπορεί να παρατηρηθεί και σκούρος χρωματισμός από την βάση του ουραίου πτερυγίου έως και τα άκρα των ακτινών του πτερυγίου, καθώς επίσης και απώλεια του επιθηλίου του δέρματος. Αιμορραγία στις γνάθους, έχει επίσης παρατηρηθεί σε ορισμένα ψάρια. Σε μερικές περιπτώσεις παρατηρείται εστιακή νέκρωση στα βράγχια μαζί με υπερβολική παραγωγή βλέννας (Pazos et al., 1996; Santos et al., 1999) Εικόνες 1.3.5.1. & 1.3.5.2. Συστηματική νόσος μπορεί επίσης να αναπτυχθεί πιο σπάνια στα νεαρά ψάρια, προσβάλλοντας διάφορα εσωτερικά όργανα, προκαλώντας συμφόρηση του σπλήνα και του εντέρου.

Ανάλογα με την λοιμογόνο δύναμη του βακτηριακού στελέχους προκαλείται χρόνια ή οξεία νόσος. Κατά την οξεία μορφή δεν παρατηρούνται εμφανή εξωτερικά συμπτώματα και αλλοιώσεις αλλά η εξέλιξη της νόσου είναι γρήγορη και παρατηρούνται θάνατοι (Schaperclaus, 1992). Εξαιτίας των ελκωτικών διαβρώσεων στην επιφάνεια του δέρματος των ψαριών, άλλα βακτήρια και παράσιτα μπορούν να εισέλθουν στον οργανισμό και να προκαλέσουν δευτερογενώς επιμόλυνση. Συνεπώς είναι συχνή η εμφάνιση της μυξοβακτηριδίασης ως μεικτής μόλυνσης καθώς προκύπτουν δευτερεύουσες βακτηριακές επιμολύνσεις π.χ. από *Vibrio* spp. και διάφορα βλεφαριδοφόρα βακτήρια (Devesa et al., 1989; Avendaño-Herrera et al., 2004a). Η λοίμωξη εντοπίζεται κυρίως στην εξωτερική επιφάνεια των ψαριών στο δέρμα και στα βράγχια. Μερικές φορές είναι δυνατόν να προσβληθούν και εσωτερικά όργανα τα οποία παρουσιάζουν έντονη φλεγμονή. Μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης της νόσου έχει παρατηρηθεί σε περιόδους όπου εντοπίστηκαν οι υψηλότερες θερμοκρασίες στο θαλασσινό νερό (> 15°C) (Pazos et al. 1996; Santos et al., 1999).

Έχει παρατηρηθεί επίσης, από μια μελέτη από τον Mouriño και συνεργάτες (2008), πως πάνω από το 60% των θνησιμοτήτων στο μεταλαρβικό στάδιο, σε εκκολαπτήρια γαρίδας (*Litopenaeus vannamei*) συσχετίζονται με την παρουσία μεγάλων αριθμών ραβδόμορφων βακτηρίων. Οι νεκρές λάρβες παρουσιάζουν μελανώσεις και αλλοιώσεις σε διάφορα μέρη του σώματος, αποχρωματισμό των βραγχίων, δυσμορφισμό των προσαρτημάτων και της γαστρικής χώρας. Οι επιζήσασες λάρβες, εκτός από τις προαναφερόμενες αλλοιώσεις, παρουσιάζουν επίσης μείωση στην αύξηση, στην μεταμόρφωση, την κινητικότητα και στην όρεξη (Mouriño et al., 2008).

Σύμφωνα με την μελέτη αυτή, το παθογόνο βακτήριο *T. maritimum* είναι υπεύθυνο για αυτές της απώλειες στο μεταλαρβικό στάδιο της γαρίδας *Litopenaeus*



*vannamei*, προκαλώντας την παραπάνω κλινική εικόνα. Ωστόσο τα αποτελέσματα της μελέτης είναι διφορούμενα (Avendaño-Herrera, 2009), γεγονός που αφήνει αμφιβολίες για τον εάν τελικά το βακτήριο *T. maritimum* προσβάλλει το συγκεκριμένο είδος γαρίδας.



Εικόνα 1.3.5.1. Λαβράκι. Προσβεβλημένο με μυξοβακτηριδίαση. Ωχροκίτρινη, δερματική αλλοίωση και νέκρωση του ουραίου πτερυγίου. Προσωπικό αρχείο.



Εικόνα 1.3.5.2. Λαβράκι. Προσβεβλημένο με μυξοβακτηριδίαση. Ωχροκίτρινες, νεκρωτικές διαβρώσεις του ουραίου πτερυγίου.

### 1.3.5 Κινητικότητα

Η ικανότητα κίνησης των μυξοβακτηριδίων αποτελεί ακόμη και σήμερα μυστήριο, χωρίς να έχει διευκρινιστεί ο ιθύνων βιολογικός μηχανισμός. Κάτω από παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο τα μυξοβακτηρίδια παρουσιάζουν μια ολισθητική κίνηση χαρακτηριζόμενη ως οφιοειδής (Spormann et al., 1999), η οποία έχει ταχύτητα περί τα 4-8 $\mu\text{m}/\text{min}$  (Wakabayashi et al., 1986). Στα ανακαλλιεργούμενα στελέχη περιορίζεται τόσο η ταχύτητα όσο και το σχήμα των βακτηρίων (Avendaño-Herrera et al., 2004b). Η μετακίνηση επιτυγχάνεται χωρίς την



ύπαρξη κάποιου ουραίου εξαρτήματος (μαστιγίου ή νηματίου), ως μηχανισμός προώθησης του βακτηρίου. Αντί αυτού, η κίνηση προκύπτει από το ίδιο το βακτήριο μέσω δύο διαφορετικών, αλλά διακριτών μεταξύ τους, μηχανισμών κίνησης. Ο πρώτος τύπος κίνησης ονομάζεται A (adventurous) και ο δεύτερος S (social) (Kaiser, 2000), με τους δύο αυτούς τύπους κινήσεων να εντοπίζονται συνεργικά στα Μυξοβακτήρια. Τα A<sup>-</sup>S<sup>-</sup> βακτήρια δεν είναι κινητά, και η μετατόπιση τους δεν ξεπερνά το ¼ του κυτταρικού μήκους. Τα A<sup>-</sup>S<sup>+</sup> και τα A<sup>+</sup>S<sup>-</sup> βακτήρια είναι κινητά, πάραυτα, η σημιουργία των δομών και των αναλογιών τους διαφέρει σημαντικά από τα A<sup>+</sup>S<sup>+</sup> βακτήρια στα οποία εντάσσονται και τα μυξοβακτηρίδια μετά από μελέτη στην κίνηση των μυξοβακτηριδίων του είδους *M. xanthus* (Hodgkin και Kaiser et al., 1979).

Η θεωρία που έχει αναπτυχθεί από έρευνες σχετικά με την κινητικότητα αυτών των βακτηρίων, υποδεικνύει τους πιθανούς κυτταρικούς μηχανισμούς που πυροδοτούν αυτές τις αντιδράσεις στην κίνηση. Η κίνηση S προκύπτει από σμήριγγες τύπου IV (pili IV) που θεωρείται πως προεκτείνονται, συνδέονται των γειτονικών κυττάρων και μετά απότομα συστέλλονται, τραβώντας τα κύτταρα μεταξύ τους (Kaiser, 2000). Η pilT έχει θεωρηθεί η εναρκτήρια πρωτεΐνη της σύσπασης των σμηριγγών (Merz et al., 2000). Η θεωρία της κίνησης A είναι λιγότερο σαφής και υποδεικνύει κάποια οργανίδια ώσεως παρομοιαζόμενα με ακροφύσια που εντοπίστηκαν στα Κυανοβακτήρια ως υπεύθυνα αυτού του τύπου κίνησης (Hoiczuk, 2000). Γενικότερα για τον τύπο A, η βλέννα που εκκρίνεται από τα οργανίδια αυτά, συνδέεται με το φαινόμενο της ελαστικοταξίας (Spormann et al., 1999) οπότε και αποτελεί πιθανώς το μέσο που καθορίζει την κατεύθυνση του βακτηρίου. Με τον όρο ελαστικοταξία χαρακτηρίζεται η ικανότητα ορισμένων βακτηρίων στο να αντιλαμβάνονται και να αντιδρούν στις ελαστικές δυνάμεις που ασκούνται από το υπόστρωμα προς τις βακτηριακές τους μάζες.

Η σύσταση της βλέννας δεν είναι στο σύνολο της γνωστή. Ένα μεγάλο μέρος της ωστόσο αποτελείται από πολύ-ηλεκτρολυτική γέλη. Οι δυνάμεις οσμωτικής πίεσης όπου αναπτύσσονται από τα οργανίδια ώσεως καθώς εκκρίνουν την βλέννα, προκαλούν την διαστολή της βλεννώδους μάζας η οποία σπρώχνει το βακτήριο προς τα εμπρός. Τέτοια οργανίδια ώσεως εντοπίζονται σε όλο τον κορμό του βακτηρίου με την πλειονότητα να βρίσκεται στους πόλους. Καθώς η βλέννα συναντά το εξωτερικό, υδάτινο, υποτονικό περιβάλλον, μέρος αυτού εισέρχεται μέσα της και προκαλεί την διαστολή της οσμωτικά (Wolgemuth et al., 2002).

### 1.3.6 Μηχανισμοί Λοιμογόνου δύναμης

Απαραίτητη προϋπόθεση για τον επιτυχή αποικισμό των ιστών του ξενιστή, είναι η ικανότητα προσκόλλησης. Αυτή μπορεί να οδηγήσει σε μια ειδική ή μια μη-ειδική μορφή σύνδεσης (Ofek & Doyle, 1994). Η ειδική προσκόλληση επιτυγχάνεται με ειδικά συστατικά στην επιφάνεια του βακτηρίου, τα οποία κολλάνε σε υποδοχείς που υπάρχουν στους ιστούς του ξενιστή. Η μη-ειδική προσκόλληση στηρίζεται σε υδροφοβικές ή ιονικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε συγκεκριμένες δομές στην επιφάνεια του βακτηρίου και στο υπόστρωμα στήριξης.

Οι Burchard και συνεργάτες (1990) ανέφεραν ότι η ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων του *Tenacibaculum maritimum* αυξάνεται σημαντικά σε υποστρώματα με χαμηλή ενεργειακή επιφάνεια (υδρόφοβο). Επιπλέον, το βακτήριο παράγει ένα σημαντικό ποσό εξωκυτταρικών πολυμερών ή 'βλέννα', επιτρέποντας του να προσκολλάται πιο σταθερά στις υδρόφοβες επιφάνειες, παρά στις υδρόφιλες. Οι αλλαγές στις ιδιότητες της επιφάνειας των κυττάρων δεν επηρεάζουν την ικανότητα ολίσθησης. Αυτά τα χαρακτηριστικά του *T. maritimum* μπορούν να εξηγήσουν γιατί τα κύτταρα συστηματικά προσκολλώνται σε διαφορετικά σημεία των εξωτερικών ιστών των ψαριών, από την στιγμή που μια μόλυνση έχει γίνει.

Η ικανότητα προσκόλλησης αυτού του παθογόνου δεν μπορεί να εξηγηθεί μόνο από τις υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις. Οι Sorongon και συνεργάτες (1991), απέδειξαν με *in vitro* μελέτες, ότι οι συνθήκες ανάπτυξης και η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές αλλαγές στην υδροφοβία και σύνδεση του *T. maritimum*, οι οποίες συνοδεύονται από αλλαγές στις συστοιχίες των επιφανειακών πρωτεϊνών

Η ικανότητα της αιμοσυγκόλλησης, σε συνδυασμό με τις ιδιότητες της υδρόφοβης επιφάνειας, μπορούν να σχετιστούν με λοιμογόνο δράση. Ο Pazos (1997) ανέφερε πως κύτταρα *T. maritimum* συγκολλούν ένα ευρύ φάσμα ερυθροκυττάρων. Πρόσθετες κατασκευές, όπως ινίδια, κροσσοί και μαστίγια που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την προσκόλληση και τον αποικισμό άλλων βακτηρίων (Toranzo et al., 2005) δεν έχουν παρατηρηθεί στο *T. maritimum*. Μελέτες ωστόσο, έχουν δείξει, ότι στελέχη *T. maritimum*, ανεξάρτητα από τον ορότυπο τους, διαθέτουν κάψα (Avendaño-Herrera et al. 2005).

Η προσκόλληση του παθογόνου στους ιστούς του ξενιστή εξαρτάται από την ικανότητα του να εξουδετερώνει ή να αποφεύγει το αμυντικό σύστημα του ψαριού, όπως η βακτηριοκτόνος δράση της βλέννας (λυσοζύμη), που αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας. Οι

Magariños και συνεργάτες (1995) ανέφεραν ότι το *T. maritimum*, ανεξάρτητα από την προέλευση του, προσκολλάται ισχυρά στην βλέννα του δέρματος τριών ειδών ψαριών (καλκάνι, τσιπούρα, λαβράκι), επομένως μια πιθανή οδός εισόδου του βακτηρίου είναι το δέρμα. Σχετικά με την παραγωγή τοξινών από το *T. maritimum*, οι Baxa και συνεργάτες (1988b) πραγματοποίησαν *in vivo* πειράματα σε ψάρια και συμπέραναν ότι η παθογένεια αυτού του παθογόνου μπορεί να αποδοθεί στην συνεργική αλληλεπίδραση τοξινών και ενζύμων που υπάρχουν στα εξωκυτταρικά προϊόντα (ECP), τα οποία διευκολύνουν την μεταβολή των ιστών του ξενιστή και συμβάλλουν στον αποικισμό από το βακτήριο. Τα ECP αυτού του είδους εμφανίζουν υψηλή πρωτεολυτική δραστηριότητα, με ικανότητα να αφομοιώνουν την ζελατινάση, αμυλάση, καζεΐνη και νουκλεάσες (Pazos, 1997), καθώς και θετική κυτταροτοξική δράση σε διάφορες κυτταρικές σειρές ψαριών.

Είναι γνωστό ότι οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) είναι υπεύθυνοι για κάποια από τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της νόσου σε μολύνσεις, εξαιτίας των Gram αρνητικών βακτηρίων. Η ανάλυση των LPS του *T. maritimum* αποκάλυψε μια Ο-αλυσίδα που αποτελείται από ένα δισακχαρίτη που φέρει ένα ασυνήθιστο δεσμό (R-2-υδροξυγλουταρικό οξύ), που φαίνεται να είναι ειδικό για αυτό το βακτήριο. Έχει προταθεί ότι αυτή η Ο-αλυσίδα, μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη βιοφίλμ από το βακτήριο στους ιστούς των ψαριών (Vinogradov et al., 2003).

Η ικανότητα πρόσληψης σιδήρου κατά την διάρκεια της μόλυνσης, είναι επίσης ουσιαστικός παράγοντας για την παθογένεια των βακτηρίων. Ωστόσο, τα επίπεδα του ελεύθερου σιδήρου μέσα στον ξενιστή είναι συχνά μειωμένα, επειδή ο σίδηρος είναι ισχυρά προσκολλημένος σε πρωτεΐνες του ξενιστή. Για να αποκτήσουν αυτό τον σίδηρο, τα περισσότερα παθογόνα βακτήρια έχουν αναπτύξει συστήματα πρόσληψης σιδήρου.

Ένας άλλος μηχανισμός λοιπόν, λοιμογόνου δύναμης που έχει μελετηθεί στο *T. maritimum* είναι οι μηχανισμοί συγγένειας πρόσληψης σιδήρου, οι οποίοι μπορούν να ανταγωνιστούν τις πρωτεΐνες σύνδεσης σιδήρου του ξενιστή. Οι Avendaño-Herrera και συνεργάτες (2005c) απέδειξαν ότι το βακτήριο, ανεξάρτητα από τον ορότυπο, αναπτύσσεται στην παρουσία του παράγοντα αιθυλενοδιαμίνη-δι-(ο-υδροξυφαινιλικό οξικό οξύ) (EDDHA) χρησιμοποιώντας, τουλάχιστον 2 διαφορετικά συστήματα απόκτησης σιδήρου. Ένας μηχανισμός περιλαμβάνει την παραγωγή σιδεροφόρων, που είναι είτε φαινολικού είτε υδροξαμικού τύπου, όπως αποδείχθηκε σε chromoazuroI S (CAS) άγαρ. Ο δεύτερος μηχανισμός επιτρέπει την χρήση ομάδων αίμης, σαν πηγή σιδήρου για απευθείας

σύνδεση. Επιπλέον, έχει επίσης αναφερθεί πως η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση αίμης, πριν την πειραματική μόλυνση, αύξησε την θνησιμότητα από το παθογόνο (Avendaño-Herrera et al. 2005c).

### 1.3.7 Μέθοδοι Διάγνωσης

Η κλινική εικόνα μαζί με την μικροσκοπική εξέταση των λεπτών επιμήκων βακίλων, είτε νωπών παρασκευασμάτων είτε παρασκευασμάτων μετά από χρώση Gram από τις επιδερμικές αλλοιώσεις των ψαριών και τα βράγχια, αποτελούν το πρώτο βήμα διάγνωσης της νόσου (Toranzo et al., 2005). Ωστόσο, η αδυναμία εύρεσης του *T. maritimum* σε αρχικές αλλοιώσεις και το σχετικά υψηλό ποσοστό δευτερογενών βακτηριακών μολύνσεων, όπως από *Vibrio* spp. (Hikida et al., 1979; Handlinger et al., 1997) και σαπροφυτικούς οργανισμούς, κυρίως πρωτόζωα (Devesa et al., 1989) όπως *Trichodina* και *Uronema* spp. (Chen et al., 1995; Handlinger et al., 1997), καθιστούν την διάγνωση και απομόνωση δύσκολη και αυξάνουν την πιθανότητα της λάθος διάγνωσης. Για την επιβεβαίωση της αρχικής διάγνωσης γίνεται καλλιέργεια και απομόνωση του υπεύθυνου βακτηρίου στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα ή μοριακή διάγνωση με απομόνωση γενετικού υλικού DNA απευθείας από δείγματα ιστών των μολυσμένων ψαριών. Η διάγνωση μπορεί επίσης να υποστηριχθεί και με άλλες ορολογικές τεχνικές όπως ο φθορισμός αντισωμάτων (Santos et al., 1999). Με βάση τα φαινοτυπικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, το *T. maritimum* θεωρείται ότι εμφανίζει ομοιογένεια. Η απομόνωση του παθογόνου και η εξέταση του βιοχημικού του προφίλ μπορούν να επαληθεύσουν την διάγνωση (Santos et al., 1999). Η βιοχημική ταυτοποίηση του βακτηρίου στηρίζεται στην πραγματοποίηση διάφορων βιοχημικών τεστ (Suzuki et al., 2001; Avendaño-Herrera et al. 2004a).

Ωστόσο για βακτήρια που εντάσσονται στις ομάδες Cytophaga-Flavobacteria- Myxobacteria είναι προτιμότερη η ταυτοποίηση μέσω μοριακών τεχνικών απομόνωσης γενετικού υλικού για σαφή συμπεράσματα.

#### 1.3.7.1 Καλλιέργεια

Το *T. maritimum* μπορεί να αναπτυχθεί μόνο σε συγκεκριμένα θρεπτικά υποστρώματα καθώς έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις σε θαλασσινό νερό και σε χαμηλή συγκέντρωση σε θρεπτικά συστατικά. Η απομόνωση του βακτηρίου σε κλασσικά

θρεπτικά υποστρώματα είναι δύσκολη, εξαιτίας της αργής του ανάπτυξης και της υπερανάπτυξης των άλλων ετερότροφων βακτηρίων. Διάφορα θρεπτικά υποστρώματα όπως: Anacker & Ordal άγαρ (AOA) (Anacker & Ordal, 1959) ή παραλλαγές αυτού του άγαρ, με προσθήκη 70% θαλασσινού νερού (Bullock et al., 1986; Santos et al., 1999), *Flexibacter maritimus* medium (FMM) (Pazos et al., 1996), Selective *Flexibacter* medium (SFM) ή Hsu και Shotts medium που περιέχει νεομυκίνη (Bullock et al., 1986; Chen et al., 1995), Marine Agar (MA) θαλάσσιο άγαρ (Frerichs, 1993) και Hsu-Shotts agar (με προσθήκη 50% θαλασσινό νερό) (Chen et al., 1995) έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη και απομόνωση του *T. maritimum*. Επιπλέον, διάφορα εκλεκτικά υποστρώματα που περιέχουν αντιβιοτικά (π.χ. νεομυκίνη, φλουμεκίνη) έχουν περιγραφεί επίσης για την απομόνωση των Μυξοβακτηριδίων από ψάρια γλυκού νερού (Bullock et al., 1986). Το θρεπτικό υπόστρωμα FMM φαίνεται να είναι το πιο αποτελεσματικό για την καλλιέργεια του *T. maritimum* (Pazos et al., 1996; Avendaño-Herrera et al., 2005).

Η επώαση γίνεται συνήθως στους 20<sup>0</sup>C–25<sup>0</sup>C για 48-72 h. Σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα FMM και AOA, οι τυπικές αποικίες του βακτηρίου είναι ομοιόμορφα επίπεδες, ωχροκίτρινες και λεπτές με άνισες προεκτάσεις και ισχυρή προσκόλληση στο υπόστρωμα (Avendaño-Herrera et al., 2004c), ενώ σε στατικό υγρό θρεπτικό υπόστρωμα η επιφάνεια ανάπτυξης έχει την μορφή υμένα (Pazos et al., 1996; Santos et al., 1999).

Στα περισσότερα θρεπτικά υποστρώματα, FMM, AOA και SFM οι αποικίες έχουν τα χαρακτηριστικά που προαναφέρθηκαν (ομοιόμορφα επίπεδες, ωχροκίτρινες λόγω ζεαξανθίνης και λεπτές με άνισες προεκτάσεις), ενώ στο MA (θαλάσσιο άγαρ) οι αποικίες είναι στρογγυλές και κίτρινες (Pazos et al., 1996). Σύμφωνα επίσης με την NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), προτείνονται δύο πρωτόκολλα θρεπτικών υποστρωμάτων που έχουν ως βάση το Mueller- Hinton άγαρ (dMHA) για την απομόνωση του βακτηρίου *T. maritimum* (NCCLS 2003). Η επιλεκτικότητα αυτού του υποστρώματος ωστόσο αμφισβητείται καθώς σε πολλές περιπτώσεις έχει αποτύχει η *in vitro* καλλιέργεια του παθογόνου (Avendaño-Herrera et al., 2005).

Για να προκύψει η ανάπτυξη του παθογόνου είναι αναγκαία η χρήση θαλασσινού νερού στο θρεπτικό υπόστρωμα. Το διάλυμα NaCl ως αντικαταστάτης του θαλασσινού νερού δεν ενδείκνυται αν και μαζί με το KCl αποτελούν αναγκαία άλατα για την καλλιέργεια του *T. maritimum* (Santos et al., 1999). Σε συνθήκες

εργαστηρίου ωστόσο είναι δυνατή η αντικατάσταση του θαλασσινού νερού με διάλυμα (4% w/v) θαλασσινών αλάτων τα οποία κυκλοφορούν στο εμπόριο (Avendaño-Herrera et al., 2005). Παράλληλα προτείνονται χαμηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών αλάτων εξαιτίας του χαμηλού ρυθμού ανάπτυξης που τα χαρακτηρίζει (Toranzo et al., 2005). Τα δισθενή ιόντα  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  βοηθούν στην ανάπτυξη των βακτηρίων, ενώ τα ανιόντα  $SO_4^{2-}$  λειτουργούν περιοριστικά (Wakabayashi et al., 1986).

### 1.3.7.2 Βιοχημικές Διαγνωστικές Μέθοδοι

Το βιοχημικό προφίλ αποτελεί ισχυρό εργαλείο για την ταυτοποίηση ενός παθογόνου. Στην περίπτωση του *T. maritimum* έχουν γίνει προσπάθειες από διάφορους ερευνητές για τον χαρακτηρισμό του παθογόνου μέσω ενός μοναδικού βιοχημικού προφίλ από το οποίο θα είναι ικανή η ταυτοποίηση του βακτηρίου (Wakabayashi et al., 1986; Bernardet & Grimont, 1989; Chen et al., 1995). Παρά την αρχική ομοιογένεια σε αυτά τα προφίλ μεταξύ των διαφόρων απομονωθέντων στελεχών, πρόσφατες έρευνες μεγαλύτερης ενδελέχειας μέσω μοριακών και ορολογικών τεχνικών, υπέδειξαν την ύπαρξη διαφορετικών ορότυπων μεταξύ του *T. maritimum* (Avendaño-Herrera et al., 2004a).

Ωστόσο, η παρατηρούμενη ομοιογένεια των βιοχημικών ιδιοτήτων του *T. maritimum* διευκολύνει την χρήση συστημάτων βιοχημικής ταυτοποίησης, όπως το API 20E, API ZYM, API 50CH για την ταυτοποίησή του (Bernardet & Grimont, 1989; Pazos et al., 1993; Bernardet et al., 1994; Chen et al., 1995; Ostland et al., 1999, Avendaño-Herrera et al., 2004b). Στην πραγματικότητα, η πλειοψηφία των απομονώσεων, στο API ZYM εμφανίζουν ένα χαρακτηριστικό προφίλ (θετικά αποτελέσματα στις πρώτες 11 ενζυματικές αντιδράσεις), ενώ στο API 50CH δεν παρατηρείται αφομοίωση των υδρογονανθράκων από τα στελέχη *T. maritimum*. Το *T. maritimum* δεν υδρολύει το άγαρ, την κυτταρίνη, την εσκουλίνη και την χιτίνη (Santos et al., 1999). Είναι θετικό στην καταλάση, οξειδάση και απορροφά το κόκκινο του Congo (Avendaño-Herrera et al., 2004a).

Αναγάγει τα νιτρικά σε νιτρόδη και δεν παράγει υδρόθειο ( $H_2S$ ) (Bernardet et al., 1990; Ostland et al., 1999), ωστόσο είναι πιθανό ορισμένα στελέχη του *T. maritimum* να είναι αρνητικά στην δοκιμή των νιτρικών και να παράγουν υδρόθειο (Chen et al., 1995; Avendaño-Herrera et al., 2004a). Διάφορα αποτελέσματα έχουν

αναφερθεί για την ζελατινάση, το υδρόθειο και τα νιτρικά (Avendaño-Herrera et al., 2006). Η μέση τιμή του αθροίσματος Γουανίνης- Κυτοσίνης(G+C) στο DNA κυμαίνεται από 29% - 32.5% (Santos et al., 1999), απουσία μικροκυστών (Cepeda et al.,2003). Δεν ζυμώνουν τα σάκχαρα γλυκόζη, γαλακτόζη, φρουκτόζη, μανόζη, λακτόζη, σουκρόζη, σορμπόζη, μαλτόζη, κυτταροβιόζη, τριαλόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, ραφινόζη, δεξτρίνη, γλυκογόνο, ινουλίνη, γλυκερόλη, αδονιτόλη, μανιτόλη, ντουλσιτόλη, σορβιτόλη, ινοσιτόλη ή σαλικίνη (Hikida et al.,1979; Wakabayashi et al.,1986).

Ωστόσο, όλες αυτές οι τεχνικές που βασίζονται στην καλλιέργεια, απομόνωση και βιοχημική ταυτοποίηση είναι χρονοβόρες, γι' αυτό οι μοριακές τεχνικές για την γρήγορη ταυτοποίηση του παθογόνου είναι σημαντικές για την αποτελεσματική διαχείριση της νόσου στις θαλάσσιες ιχθυοκαλλιέργειες.

### **1.3.7.3 Μοριακές Διαγνωστικές Μέθοδοι**

Ένα από τα κυριότερα προβλήματα για την μελέτη του *T. maritimum* αποτελεί η όχι εύκολη διάκριση του από άλλα φυλογενετικά και φαινοτυπικά, παρόμοια με αυτό, είδη, κυρίως εκείνα των γενών *Flavobacterium* και *Cytophaga* (Suzuki et al., 2001). Η παραδοσιακή μέθοδος διάγνωσης μέσω της καλλιέργειας σε θρεπτικό υπόστρωμα και ο μετέπειτα χαρακτηρισμός του βιοχημικού προφίλ του βακτηρίου, αποτελούν τα κύρια βήματα ταυτοποίησης, διαρκούν ωστόσο αρκετές ημέρες έως ότου προκύψει αποτέλεσμα. Ακόμα ένας περιορισμός είναι η δυσκολία να απομονωθεί και να καλλιεργηθεί σε θρεπτικό υπόστρωμα καθώς ο μικρός ρυθμός ανάπτυξης που το χαρακτηρίζει δίνει την ευκαιρία σε λοιπά ευκαιριακά βακτήρια να το υποβάλλουν (Avendaño-Herrera et al., 2004a). Έτσι, η εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών μεθόδων είναι αναγκαία καθώς μειώνεται σημαντικά ο χρόνος διάγνωσης και αυξάνεται η ακρίβεια της ταυτοποίησης. Η τεχνική PCR παρέχει ένα γρήγορο τρόπο αναγνώρισης και διαφοροποίησης βακτηριακών στελεχών από τις αποικίες αλλά και απευθείας από τους ιστούς των ψαριών, επιτρέποντας την παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA.

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι σημαντική για την ακριβή και έγκυρη ταυτοποίηση του παθογόνου (Toranzo et al., 2005), αντικαθιστώντας τις παραδοσιακές διαγνωστικές μεθόδους. Μέχρι σήμερα, δύο μελέτες έχουν υποδείξει πρωτόκολλα PCR χρησιμοποιώντας το 16S ριβοσωμικό

RNA (rRNA) γονίδιο ως στόχο για την διάγνωση της μυξοβακτηρίασης (Toyama et al., 1996; Bader & Shotts et al., 1998). Σύμφωνα με τον Toyama (1996), χρησιμοποιούνται οι εκκινητές MAR<sub>1</sub> (5'-AATGGCATCGTTTAAA-3') με θέση 190-206 και MAR<sub>2</sub> (5'-CGCTCTCTGTTGCCAGA-3') με θέση 1262-1278 (στο σύστημα αρίθμησης της *Escherichia coli* 16S rRNA) από τους οποίους προκύπτει ένα αμπλικόνιο μεγέθους 1088bp. Κατά τους Bader και Shotts (1998) χρησιμοποιούνται οι εκκινητές Mar<sub>1</sub> (5'-TGTAGCTTGCTACAGATGA-3'), με θέση 77-98 και Mar<sub>2</sub> (5'-AAATACCTACTCGTAGGTACG-3'), με θέση 456-476, από τους οποίους προκύπτει ένα αμπλικόνιο μεγέθους 400bp. Μια συγκριτική μελέτη της ευαισθησίας και της ειδικότητας των δύο πρωτοκόλλων, κατέστησε σαφές πως το πρωτόκολλο που παρουσιάζεται στην μελέτη του Toyama (1996) είναι πιο ικανοποιητικό για την ανίχνευση του *T. maritimum*, τόσο σε επίπεδο διαγνωστικής παθολογίας όσο και επιδημιολογικών μελετών (Avendaño-Herrera et al., 2004b).

Η απλή λήψη βακτηριακού υλικού από την βλέννα της επιδερμίδας τόσο από συμπτωματικούς όσο και από ασυμπτωματικούς φορείς της ασθένειας, χωρίς αυτοί να θανατωθούν, θεωρείται επαρκής βακτηριακή ποσότητα για να διαγνωστεί με μοριακές μεθόδους το παθογόνο (Avendaño-Herrera 2004c). Παρόλο που αυτή η μέθοδος αποδείχθηκε χρήσιμη στην έγκαιρη διάγνωση των μολύνσεων από *T. maritimum*, το επίπεδο της ευαισθησίας δεν ήταν αρκετό για να ανιχνεύσει το παθογόνο σε χαμηλούς αριθμούς σε ασυμπτωματικούς ψάρια-φορείς. Με σκοπό να αυξηθεί η ευαισθησία, μια μέθοδος nested PCR αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε σε πειραματικά μολυσμένους ιστούς ψαριών (Avendaño-Herrera et al., 2004a,c). Το υψηλό επίπεδο του *T. maritimum*, που βρέθηκε σε δείγματα βλέννας (10<sup>3</sup>cfu/ml) αποδεικνύει ότι αυτή η μέθοδος είναι πολύ χρήσιμη για την ειδική και γρήγορη διάγνωση (7 ώρες) της μυξοβακτηριδίασης.

Σύμφωνα με τον Cepeda (2003), ο χρόνος ταυτοποίησης μπορεί να μειωθεί στις 4h από την στιγμή της απομόνωσης του DNA, μετά από τροποποίηση στο πρωτόκολλο της PCR των Bader και Shotts (1998), η αποτελεσματικότητα ωστόσο της μεθόδου αμφισβητείται (Avendaño-Herrera et al., 2004b).

### 1.3.8 Παθογένεια της μόλυνσης

Παρά την σημασία του *T. maritimum*, στην βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών, σχετικά λίγα είναι γνωστά για την παθογένεια αυτού του



βακτηρίου. Διάφορες πειραματικές μολύνσεις έχουν πραγματοποιηθεί με ποικίλα αποτελέσματα στην θνησιμότητα, ανάλογα κάθε φορά με την μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για να μολύνει κάθε είδος ψαριού (Wakabayashi et al., 1984; Baxa et al., 1987; Bernardet et al., 1994; Soltani et al., 1996, Powell et al. 2004). Αυτό καθιστά δύσκολη την πλήρη κατανόηση του τρόπου μετάδοσης και της οδού μόλυνσης του παθογόνου. Οι περισσότερες διαθέσιμες πληροφορίες έχουν περιγραφεί από φυσικά μολυσμένα ψάρια. Οι φυσικές δεξαμενές του παθογόνου δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί, καθώς ελάχιστα δεδομένα πάνω στην οικολογία των μικροοργανισμών υπάρχουν. Ωστόσο, μπορεί να απομονωθεί από το ίζημα, την επιφάνεια των δεξαμενών και από δείγματα νερού που έχουν εκτεθεί σε μολυσμένα δείγματα (Santos et al., 1999).

Κάποιοι συγγραφείς έχουν αναφέρει πως φυσικές εξάρσεις της μυξοβακτηριδίασης, συμβαίνουν μερικές εβδομάδες μετά την μεταφορά ψαριών από τις δεξαμενές των εκκολαπτηρίων στους κλωβούς στην θάλασσα (McVicar & White, 1979; Wakabayashi et al., 1984), υποδηλώνοντας πως το βακτήριο μπορεί να προσβάλει τον ξενιστή με οριζόντια μετάδοση στο θαλασσινό νερό. Ωστόσο, πειράματα με το *T. maritimum*, χρησιμοποιώντας τον μικρόκοσμο κάτω από φυσικές συνθήκες, έδειξαν μια ανασταλτική επίδραση της φυσικής υδρόβιας μικροχλωρίδας στην ανάπτυξη και επιβίωση αυτού του βακτηρίου. Σε αυτά τα πειράματα, το παθογόνο παρέμεινε καλλιεργήσιμο μόνο για 5 ημέρες (Avendaño-Herrera et al., 2006a). Μια πιθανή εξήγηση γι' αυτό είναι ότι όλα τα κύτταρα έπαθαν λύση από την αυτόχθονη μικροβιακή χλωρίδα και ακολούθησε αποδόμηση του DNA. Αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται να δείχνουν πως το θαλασσινό νερό δεν αποτελεί σημαντική οδό μετάδοσης του *T. maritimum*.

Είναι πολύ καλά γνωστό, ότι οι αρχικές εστίες μόλυνσης με το *T. maritimum*, είναι οι επιφάνειες του σώματος, όπως το κεφάλι, η στοματική κοιλότητα, τα πτερύγια και οι πλευρές. Αυτό το παθογόνο προσκολλάται ισχυρά στο δέρμα και στην βλέννα των ψαριών (Magariños et al., 1995). Η εντόπιση του βακτηρίου μέσα στο στρώμα της βλέννας, υποδεικνύει πως το *T. maritimum* μπορεί να αποτελεί μέρος του αυτόχθονου πληθυσμού του δέρματος του ψαριού, και επομένως το βακτήριο μπορεί να παραμείνει στο υδάτινο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα, χρησιμοποιώντας το δέρμα σαν δεξαμενή (Avendaño-Herrera, 2005b).

Στην περίπτωση των σολομοειδών, η παρουσία του βακτηρίου στα μάτια και στα βράγχια, όπου μια νεκρωτική βρογχίτιδα μπορεί να συμβεί, είναι συνήθης (Chen

et al., 1995; Handlinger et al. 1997). Οι Powell και συνεργάτες (2004) εμβολίασαν μια μεγάλη συγκέντρωση βακτηρίων ( $4 \times 10^{11}$  με  $10^{12}$  κύτταρα ανά ψάρι) σε βράγχια σολομού, προκαλώντας ποικίλες θνησιμότητες στα ψάρια και παρατήρησαν πως η αναπνευστική διαταραχή ήταν αποτέλεσμα της τριβής των βραγχιών, παρά της μόλυνσης με το βακτήριο. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν πως τα βράγχια δεν αποτελούν μια σημαντική οδό μόλυνσης με το *T. maritimum*.

Το *T. maritimum* δεν εμφανίζει ειδικότητα ξενιστή. Επομένως η μυξοβακτηριδίαση μπορεί να προσβάλλει πολλά είδη ανάδρομων και θαλάσσιων ψαριών, στα οποία η νόσος δεν έχει ακόμη περιγραφεί. Παρόλο που και τα ενήλικα ψάρια αλλά και τα νεαρά ιχθύδια μπορούν να προσβληθούν, κάποιιοι συγγραφείς επισημαίνουν πως υπάρχουν διαφορές στην ευαισθησία κάποιων ειδών ψαριών (γλώσσα, λαβράκι, σολομοειδή, καλκάνι) στην νόσο, ανάλογα με την ηλικία των ψαριών. Έτσι, ψάρια με βάρος από 2-80gr εμφανίζουν την μεγαλύτερη συχνότητα προσβολής και μια πιο σοβαρή μορφή της νόσου, ενώ ψάρια πάνω από 100gr εμφανίζονται ανθεκτικά (McVicar & White, 1979; Wakabayashi et al., 1984; Bernardet et al., 1994; Handlinger et al., 1997; Avendaño-Herrera, 2005). Αυτό οφείλεται στην μεγαλύτερη ευαισθησία των μικρών ψαριών στο *T. maritimum* (Bernardet et al., 1994), όπου η σοβαρή καταστροφή των μολυσμένων ιστών μπορεί να εξελιχθεί σε προχωρημένες ελκωτικές αλλοιώσεις μέσα σε λίγες ημέρες.

Μέχρι σήμερα, πολλές από τις μελέτες στην μετάδοση της νόσου, υποστηρίζουν την υπόθεση ότι το *T. maritimum* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο που αρχικά προκαλεί εκτεταμένη βλάβη στο δέρμα και φθορά των βραγχιών με αποτέλεσμα την συστηματική μόλυνση τελικά.

Ένα αυξημένο ποσοστό εμφάνισης και σοβαρότητα της νόσου έχει αναφερθεί σε υψηλότερες θερμοκρασίες (πάνω από 15°C) και αλατότητα (30 με 35‰) καθώς και σε χαμηλή ποιότητα νερού. Ωστόσο, χειμερινές εξάρσεις της νόσου έχουν επίσης αναφερθεί (Wakabayashi et al., 1984; Bernardet et al., 1994; Soltani et al., 1996). Επιπλέον με αυτούς τους παράγοντες, η νόσος επηρεάζεται από ένα πλήθος περιβαλλοντικών παραγόντων (στρες, υπερβολική χρήση UV ακτινοβολίας), παραγόντων διαχείρισης (υψηλή ιχθυοπυκνότητα, υποβαθμισμένη διατροφή) και παραγόντων των ξενιστών-ψαριών (κατάσταση της επιφάνειας δέρματος) (McVicar & White, 1979; Wakabayashi et al., 1984; Chen et al., 1995; Handlinger et al., 1997). Σε αυτές τις δυσμενείς συνθήκες, η συστηματική μορφή της νόσου που περιλαμβάνει διάφορα εσωτερικά όργανα, εμφανίζεται πιο συχνά (Alsina & Blanch, 1993; Cepeda

& Santos, 2002; Avendaño-Herrera et al., 2004b), υποδεικνύοντας ότι το *T. maritimum* έχει ισχυρούς μηχανισμούς λοιμογόνου δύναμης.

Σχετικά με τον τρόπο πρόκλησης της μόλυνσης, αρκετοί ερευνητές έχουν μελετήσει διαφορετικές μεθόδους για να προκαλέσουν την νόσο σε διάφορα είδη ψαριών, καθώς και να σταθεροποιήσουν ένα αποτελεσματικό τρόπο πειραματικής μόλυνσης. Οι Wakabayashi και συνεργάτες (1984) και οι Baxa και συνεργάτες (1987) έδειξαν ότι η μόλυνση με εμβάπτιση δεν αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο πρόκλησης της νόσου, εκτός και αν το δέρμα έχει προηγουμένως χαραχθεί η τριφτεί (Bernardet et al., 1994) ή το στέλεχος του βακτηρίου έχει πρώτα ανακαλλιεργηθεί (Handler et al., 1997). Ωστόσο, θανατηφόρες μολύνσεις προκλήθηκαν όταν τα ψάρια εκτέθηκαν σε τοπική εφαρμογή του *T. maritimum* στην επιφάνεια του στόματος ή της ουράς (Wakabayashi et al., 1984). Η ενδομυϊκή και ενδοπεριτοναϊκή οδός έχουν αναφερθεί ως μη αποτελεσματικές στην πρόκληση της μυξοβακτηριδίασης σε πειραματικά μολυσμένες τσιπούρες, λαβράκι ή καλκάνι (Wakabayashi et al., 1984; Alsina & Blanch, 1993; Avendaño-Herrera et al., 2006b). Χρησιμοποιώντας την nested PCR, αποδείχθηκε ότι η πλειοψηφία των βακτηρίων του *T. maritimum* που εμβολιάστηκαν στο καλκάνι, αποβάλλονται στο νερό στις πρώτες 6 ώρες μετά την έγχυση (Avendaño-Herrera et al., 2006b). Αυτός φαίνεται να είναι ο λόγος γιατί η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση δεν είναι αποτελεσματική οδός μόλυνσης.

Οι Avendaño-Herrera και συνεργάτες (2006), μετά από ερευνητικές προσπάθειες πρότειναν ένα μοντέλο πρόκλησης της μόλυνσης με *T. maritimum* στο καλκάνι. Χρησιμοποιώντας παρατεταμένη εμβάπτιση των ψαριών για 18 ώρες με το παθογόνο στέλεχος, σε θερμοκρασία νερού 18-20°C, η νόσος μπόρεσε εύκολα να εκδηλωθεί με τα ψάρια να εμφανίζουν τα κλασσικά συμπτώματα και αλλοιώσεις της μυξοβακτηριδίασης. Αυτό το μοντέλο πειραματικής μόλυνσης μπορεί να είναι χρήσιμο για μελλοντικές επιδημιολογικές μελέτες και ουσιαστικό για την ανάπτυξη επαρκών μέτρων πρόληψης και/ή ελέγχου της νόσου. Συμπερασματικά, είναι κατανοητό πως στο φυσικό υδάτινο περιβάλλον το *T. maritimum* εισέρχεται τον ξενιστή με ένα συνδυασμό οδών που περιλαμβάνουν και την οριζόντια μετάδοση μέσω της τροφής, όπως περιγράφεται από τον Chen και συνεργάτες (1995).

### 1.3.9 Θεραπεία - Πρόληψη

Η εμφάνιση της νόσου μπορεί να περιοριστεί εάν δοθεί προσοχή στην ιχθυοπυκνότητα ανά κλωβό ή ανά δεξαμενή. Μείωση της ιχθυοπυκνότητας και μείωση του στρες βοηθούν τόσο στην ύφεση της νόσου όσο και στην πρόληψη. Η ποσότητα της χορηγούμενης τροφής παίζει επίσης σημαντικό ρόλο καθώς το υπερβολικό τάϊσμα αυξάνει άμεσα ή έμμεσα το οργανικό φορτίο της δεξαμενής με αποτέλεσμα να αυξάνεται το ενδεχόμενο μόλυνσης των ψαριών από μυξοβακτηρίαση (Santos et al., 1999).

Σε περιπτώσεις που η μόλυνση επιμένει, θα πρέπει να καθοριστούν οι παράγοντες στρες που προκαλούν ανοσοκαταστολή στα ψάρια, όπως έλεγχος της ποιότητας νερού, διατροφής, υγιεινή, και σωστές πρακτικές διαχείρισης. Σε πολλές περιπτώσεις είναι απαραίτητη η ταυτόχρονη αντιμετώπιση των καταστάσεων που συνυπάρχουν και ενισχύουν την μόλυνση με *T. maritimum*. Τέτοιες καταστάσεις είναι: η απομάκρυνση των παρασίτων, η βελτίωση των συνθηκών και της ποιότητας του νερού και η εφαρμογή συνθηκών υγιεινής.

Στις περιπτώσεις όπου η μόλυνση περιορίζεται στην επιδερμίδα των ψαριών, ενδείκνυται παρατεταμένη εμβάπτιση σε υπερμαγγανικό κάλιο, θειικό χαλκό ή τεταρτοταγές αμμώνιο (Noga 2000). Η επιλογή των ανωτέρω θεραπειών ωστόσο, εξαρτάται κάθε φορά από τις επιτρεπόμενες προς χρήση χημικές ουσίες.

Μελέτες σχετικά με την ευαισθησία του παθογόνου σε διάφορα αντιβιοτικά σκευάσματα υπέδειξαν πως όλα τα μικροβιακά στελέχη, ανεξαρτήτως γεωγραφικού εντοπισμού και είδος ξενιστή, χαρακτηρίζονται από παρόμοιο προφίλ ευαισθησίας στην χλωραμφαινικόλη, τις τετρακυκλίνες (οξυτετρακυκλίνη), τις νιτροφουράνες, πενικιλλίνες (αμοξυκιλλίνη), ερυθρομυκίνη, τριμεθοπρίμη, και τις σουλφοναμίδες ενώ παρουσιάζουν αντίσταση στην κολιστίνη, καναμυκίνη, νεομυκίνη, στις κινολόνες (ενροφλοξακίνη), στο οξολινικό οξύ και την φλουμικίνη (Baxa et al., 1988c; Pazos et al., 1993; Chen et al., 1995; Santos et al., 1999; Avendaño-Herrera et al., 2004b, 2005a, 2006, 2008). Επίσης, μέχρι σήμερα οι περισσότερες θεραπείες που έχουν προταθεί για την αντιμετώπιση της μυξοβακτηριδίασης, βασίζονται στην χορήγηση αντιβιοτικών στην τροφή.

Στην πράξη, διάφορα αποτελέσματα έχουν επιτευχθεί, χρησιμοποιώντας την θεραπεία με χορήγηση από το στόμα και/ή την θεραπεία με εμβάπτιση. Τα πρώτα αποτελέσματα, σχετικά με την θεραπεία της μυξοβακτηριδίασης με χρήση φαρμάκων αναφέρθηκαν από τους McVicar & White (1979) στην Σκωτία. Μετά από την χρήση

ενός μεγάλου φάσματος αντιβιοτικών στην γλώσσα (π.χ. τεραμυκίμη, καναμυκίνη, σουλφοναμίδες-τριμεθοπρίμη) με χορήγηση από το στόμα, οι συγγραφείς δεν παρατήρησαν καμία μείωση στην θνησιμότητα. Σε αντίθεση, η χορήγηση των αντιβιοτικών με εμβάπτιση αποδείχθηκε αποτελεσματική (McVicar & White, 1979). Είναι γνωστό, πώς όταν μια μόλυνση συμβεί τα ψάρια γίνονται ανορεξικά και δεν τρώνε, επιπλέον η θεραπεία με εμβάπτιση φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική όπως αναφέρεται και από τον Soltani και συνεργάτες (1996). Οι ίδιοι συγγραφείς απέδειξαν με πειραματικές μολύνσεις ότι η χορήγηση αμοξυκιλίνης και τριμεθοπρίμης (από το στόμα ή με εμβάπτιση) αποτελούν μια αποτελεσματική θεραπεία εναντίον του *T. maritimum*, στα σολομοειδή (Soltani et al., 1996).

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ταχεία και συνδυαζόμενη αντίσταση στις κινολόνες εξαιτίας της ευρείας χρήσης τους σε μονάδες υδατοκαλλιέργειας (Toranzo et al., 1993). Η αντίσταση αυτή είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων στα γονίδια της γυράσης των βακτηρίων (Avendaño-Herrera et al., 2008). Σύμφωνα με τους Avendaño-Herrera και συνεργάτες (2008) η θεραπεία με χορήγηση ενροφλοξακίνης 30 ppm, με εμβάπτιση για 1 ώρα και για 3 συνεχόμενες ημέρες, είναι πολύ αποτελεσματική. Η αντίσταση των στελεχών του *T. maritimum* είναι πολύ πιθανό πως προκύπτει από παρόμοιους μηχανισμούς μιας και δεν έχουν παρατηρηθεί πλασμίδια ή έτερες ομοιομερείς δομές (Avendaño-Herrera et al., 2006). Σε in vivo εργαστηριακές μελέτες, η χορήγηση νιτροφουράνων είτε από το στόμα είτε με εμβάπτιση στα πρώτα στάδια εκδήλωσης της νόσου μπορεί να είναι αποτελεσματική (Santos et al., 1999), η χρήση ωστόσο αυτού του φαρμάκου δεν επιτρέπεται στις υδατοκαλλιέργειες στην πλειονότητα των χωρών. Επιπλέον η αυξανόμενη χρήση των αντιβιοτικών και η υψηλή συχνότητα των θεραπειών μπορούν να δημιουργήσουν ανθεκτικά στελέχη ως προς τα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά. Στην Ισπανία, έχουν ήδη απομονωθεί στελέχη ανθεκτικά στις τετρακυκλίνες και τις σουλφοναμίδες (Santos et al., 1999).

Στην καλλιέργεια των σολομοειδών η μόλυνση από μυξοβακτήρια μπορεί να προκαλέσει την απώλεια έως και του 30% του ζωικού κεφαλαίου (Handlinger et al., 1997). Η θεραπεία αν και ενδεδειγμένη αποτελεί πραγματική πρόκληση. Η τριμεθοπρίμη η οποία συνίσταται σε αυτές τις περιπτώσεις, έχει χρόνο αναμονής για τα σολομοειδή 500 βαθμοημέρες, όμως σε συνδυασμό με τις θερμοκρασιακές συνιστώσες εκτροφής, ο χρόνος αναμονής μπορεί να είναι μεγαλύτερος από τον χρόνο εκτροφής (van Gelderen et al., 2009). Η αμοξικιλίνη χρησιμοποιείται όταν τα ψάρια που έχουν μολυνθεί βρίσκονται κοντά στο εμπορικό μέγεθος μιας και έχει

χρόνο αναμονής 50 βαθμοημέρες, ωστόσο δεν είναι εξίσου αποτελεσματική (Cameron et al., 1993; Handlinger et al., 1997). Η οξυτετρακυκλίνη αν και έχει καλά αποτελέσματα έναντι της μυξοβακτηρίασης, είναι υπεύθυνη για διάφορες επιβλαβείς μακροχρόνιες συνέπειες (Soltani et al., 1996)

Τα αντιβιοτικά επίσης χρησιμοποιούνται μετά την εμφάνιση της νόσου, ενώ επιθυμητή θα ήταν η πρόληψη της νόσου, με την χρήση εμβολίων (van Gelderen et al., 2009). Μέχρι πρόσφατα, δεν υπήρχε κάποιο εμβόλιο για την πρόληψη της ασθένειας (Bernardet, 1997). Απόπειρες για παραγωγή εμβολίου κατά του *T. maritimum* στα σολομοειδή, έδωσαν μεικτά αποτελέσματα καθώς αν και προέκυψαν σχετικά υψηλές τιμές σε (Relative Percent Survival-RPS) σχετικό ποσοστό επιβίωσης (79-80%) η θνησιμότητα ήταν μεγάλη (Carson et al, 1993,1994; van Gelderen et al., 2009), συνεπώς εμβόλιο κατά του *T. maritimum*, στα σολομοειδή δεν είναι ακόμη διαθέσιμο. Στην Ιαπωνία παρόμοιες έρευνες για το φαγκρί (*Pagrus major*) και την ψευδόγλωσσα (*Paralichthys olivaceous*) υπέδειξαν αντιγονική ετερογένεια στελεχών μεταξύ των δύο ειδών καθώς τα αυτεμβόλια τους δεν προκάλεσαν διασταυρούμενη ανοσία, γεγονός που ενισχύει την πεποίθηση πολλαπλών ορότυπων (Kato et al., 2007). Στο φαγκρί (*Pagrus major*) πειραματικό εμβόλιο με εμβάπτιση κατάφερε να δώσει ικανοποιητικές τιμές στο ποσοστό επιβίωσης RPS (Kato et al., 2006). Στην Ιταλία έγιναν έρευνες για την δημιουργία ενός εμβολίου κατά της μυξοβακτηρίασης για το λαβράκι (*D. labrax*) κατασκευασμένο από πολυσακχαρίτες του στελέχους, με το οποίο επιτεύχθηκε αυξημένη ανοσοενίσχυση (Salati et al., 2005).

Σήμερα, κυκλοφορεί μόνο ένα εμπορικό εμβολιακό σκεύασμα (FM-95) ως πατέντα του πανεπιστημίου Santiago de Compostela της Ισπανίας για την αποτελεσματική πρόληψη της μυξοβακτηρίασης στο καλκάνι (Santos et al., 1999). Η ασθένεια στο καλκάνι εντοπίζεται τόσο στα νεαρά όσο και στα ενήλικα άτομα για τον λόγο αυτό το συγκεκριμένο εμβόλιο γίνεται με εμβάπτιση ,στα 1-2gr. και αργότερα ενέσιμα όταν τα ψάρια φτάσουν τα 20-30gr. Το ποσοστό προστασίας μετά την εμβάπτιση ανέρχεται στο 50%. Όταν το εμβόλιο χορηγείται ενέσιμα, ενδοπεριτοναϊκά το ποσοστό προστασίας είναι πάνω από 85% (Toranzo et al., 2005).

Φυσικά το προαναφερθέν εμβολιακό σκεύασμα δεν είναι ικανό να προστατέψει άλλα είδη ψαριών, εκτός από το καλκάνι, από την μυξοβακτηρίαση και αυτό γιατί όπως προαναφέρθηκε οι τρεις διαφορετικοί ορότυποι έχουν εξειδίκευση ξενιστών. Στην παρούσα φάση μελετάται ένα νέο πειραματικό εμβόλιο, στην γλώσσα

το οποίο εργαστηριακά μέχρι στιγμής φαίνεται να παρέχει προστασία στους εξειδικευμένους ξενιστές του ορότυπου 2 πάνω από 95% (Romalde et al., 2005).

Οι τρεις ορότυποι έχουν μεικτή λοιμογόνο δύναμη ενώ οι παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν τους μηχανισμούς παθογένειας της νόσου δεν έχουν διασαφηνιστεί. Ορισμένες συνεργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τοξίνων των εξωκυτταρικών υγρών και της αιμολυσίνης ίσως να εμπλέκονται σε αυτούς τους μηχανισμούς (Baxa et al., 1988), ωστόσο τελευταίες μελέτες εστιάζουν στην ικανότητα των μυξοβακτηριδίων να απορροφούν σίδηρο, γεγονός που ενδέχεται να καθορίζει σε ένα βαθμό την παθογένεια του βακτηρίου (Avendaño-Herrera et al., 2005). Το είδος *T. maritimum* διατηρεί τουλάχιστον δύο μηχανισμούς απορρόφησης σιδήρου από τους ξενιστές του. Ο πρώτος μηχανισμός συνδέεται με την σύνθεση σιδηροφόρων και ο δεύτερος με την εκμετάλλευση του μορίου της αίμης ως κύρια πηγή σιδήρου (Avendaño-Herrera et al., 2005).

### **1.3.10 Άλλα προφυλακτικά μέτρα**

Μια εναλλακτική μέθοδος στην χρήση φαρμάκων αποτελεί η χρήση, επιφανειακών αντισηπτικών που χορηγούνται με εμβάπτιση, όπως η φορμόλη και τα ιωδιούχα διαλύματα. Θεραπείες με φορμόλη (30-40 ppm μπάνιο για 6 ώρες) αποδείχθηκαν αποτελεσματικές στον έλεγχο της μυξοβακτηριδίασης στην γλώσσα, *Dover sole* (McVicar & White, 1979). Ωστόσο, παρατηρήθηκαν προβλήματα στα βράγχια που σχετίζονται με την παρατεταμένη χρήση αυτών των συστατικών και ανησυχία σχετικά με την επίδραση αυτών στο περιβάλλον, ενώ η φορμόλη είναι δύσκολη στην χρήση και αποθήκευση της. Από την άλλη πλευρά, τα οργανικά ιωδιούχα διαλύματα, έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως για την απολύμανση των αυγών και του εξοπλισμού (Hirazawa et al., 1999; Cipriano et al., 2001; Costello et al., 2001; Tendencia, 2001).

Το υπερμαγγανικό κάλιο έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο εξάρσεων της νόσου σε λαβράκια στην Μάλτα (Bernardet, 1998). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) έχει λάβει ιδιαίτερη προσοχή, λόγω της αποτελεσματικής χρήσης του στον έλεγχο πολλών εξωτερικών παθογόνων των ψαριών. Στην περίπτωση του *T. maritimum*, ο Avendaño-Herrera (2005), πρότεινε την χρήση του  $H_2O_2$  σε συγκέντρωση 240 ppm σαν γενικότερη απολυμαντική μέθοδο για το νερό και την επιφάνεια των δεξαμενών πριν την είσοδο των ψαριών.

Το 2012, οι Mohamed και συνεργάτες απέδειξαν επίσης πειραματικά πως η προσθήκη της καρβακρόλης (ως κύριο συστατικό της ρίγανης με αντιβακτηριαδικές ιδιότητες), σε συγκέντρωση 100 ppm στην τροφή για 14 ημέρες, είναι αποτελεσματική στην θεραπεία της νόσου καθώς μπορεί να μειώσει σημαντικά τα συμπτώματα της νόσου και την θνησιμότητα. Οι χειρισμοί της θερμοκρασίας και/ή της αλατότητας μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για να μειώσουν την νοσηρότητα από το *T. maritimum* στα σολομοειδή. Οι Soltani & Bucker (1994) πρότειναν την διατήρηση της θερμοκρασίας στους 15°C και αλατότητα κάτω από 10g/l. Παρόλο που όλα αυτά τα μέτρα βοηθούν στην πρόληψη της νόσου, η ανοσοπροφύλαξη με την ανάπτυξη εμβολίων θεωρείται ο καλύτερος τρόπος για την πρόληψη.

#### **1.4. ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) & ΧΛΩΡΑΜΙΝΗ-T**

##### **1.4.1 Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Η χρήση ουσιών με αντιβακτηριδιακή δράση σε μολυσματικές ασθένειες στα ψάρια ως μέσο πρόληψης και ως μέσο αντικατάστασης των παραδοσιακών μεθόδων θεραπείας είναι μια επιτακτική ανάγκη για την μείωση της χορήγησης των αντιβιοτικών στους εκτρεφόμενους οργανισμούς αλλά και μια προσπάθεια να μην αναπτυχθούν μέσω της επιλογής ανθεκτικά στελέχη έναντι των κοινών ασθενειών τους.

Τέλος σε περιπτώσεις που οι μολύνσεις με βακτήρια στα ψάρια εκδηλώνονται κυρίως με εξωτερικές δερματικές αλλοιώσεις η άμεση αντιμετώπιση με τοπικά απολυμαντικά μπορεί να επιβραδύνει την εξέλιξη της συστηματικής μόλυνσης. Σκευάσματα όπως το αλάτι, η φορμαλίνη και η χλωραμίνη-T χρησιμοποιούνται σε επίπεδο ρουτίνας για την θεραπεία του σολομού του Ατλαντικού και άλλων ψαριών που προσβάλλονται από εξωτερικά παράσιτα, μύκητες και βακτήρια. Σε μελέτες που έγιναν με θεραπευτικά λουτρά διάρκειας 60 min για 3 ημέρες, η φορμαλίνη (250 ppm), το αλάτι (0.5-0.9%) και η χλωραμίνη-T (15 ppm) αξιολογήθηκαν για την αποτελεσματικότητά τους απέναντι σε εξωτερικές μολύνσεις που προκαλούνται από την *A. salmonicida* (Cirriano et al, 1996b). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χλωραμίνη-T ήταν πιο αποτελεσματική απέναντι στην *A. salmonicida* σε σχέση με το αλάτι ή την φορμαλίνη.



Η φορμαλίνη ήδη χρησιμοποιείται για τον έλεγχο μολύνσεων από μύκητες και παράσιτα, ωστόσο η χρήση της προκαλεί ανησυχία σχετικά με την ασφάλεια των καταναλωτών και του περιβάλλοντος. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου έχει αρχίσει επίσης να χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των μολύνσεων .

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου αρχικά, χρησιμοποιήθηκε σαν χαμηλής προτεραιότητας αντισηπτικό και μυκητοκτόνο (Bowker et al., 2008; Mitchell & Rodger, 2011). Πειράματα που έγιναν σε είδη πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus clarki*), που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου, έδειξαν ότι τα ιχθύδια εμφάνισαν αυξημένη θνησιμότητα (>20%) κατά την εμβάπτιση με: 420-540 ppm για 30 έως 60 min και >170 ppm για 120 min. Η μεσαία θανατηφόρα συγκέντρωση (LC50), και για τα δύο είδη πέστροφας, καθορίστηκε μεταξύ 514–636 ppm για εμβάπτιση διάρκειας 30 min και 322–506 ppm για 60 min εμβάπτιση. Βλάβη στον ιστό των βραγχίων, παρατηρήθηκε μόνο μεταξύ των ψαριών, που δεν επιβίωσαν στην αρχική έκθεση στο υπεροξείδιο του υδρογόνου. Σύμφωνα επίσης, με την ίδια μελέτη, σε θερμοκρασία νερού 15°C, η συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 280 ppm για εμβάπτιση, διάρκειας 30 min (Arndt & Wagner, 1997).

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), χρησιμοποιείται συχνά ως αντισηπτικό διάλυμα για την περιποίηση τραυμάτων στον άνθρωπο. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στις ιχθυοκαλλιέργειες, με την μορφή εμβαπτίσεων, έναντι πολλών διαφορετικών νοσημάτων που προκαλούνται από μικροοργανισμούς, όπως: εξωτερικά παράσιτα, βακτήρια και μύκητες σε διαφορετικά είδη και στάδια ανάπτυξης των ψαριών (Kiemer & Black, 1997; Treasurer & Grant, 1997; McAndrew et al., 1998; Treasurer et al., 2000).

Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά (1922) αποτελεσματικά για να αντιμετωπίσει εξωτερικά πρωτόζωα και μονογενή παράσιτα των ψαριών. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι οι αποτελεσματικές δόσεις κατά αυτών των εξωτερικών παρασίτων διέφεραν και αρκετές ήταν τοξικές για τα ψάρια. Από το 1990 έχει επίσης χρησιμοποιηθεί κατά του *Lepeophtheirus salmonis* (ψείρα του σολομού, *Salmo salar*) και μυκήτων των ψαριών και των αυγών τους (Treasurer & Grant, 1997; Treasurer et al., 2000; Grant, 2002). Για την αντιμετώπιση της ψείρας του σολομού, έχουν πραγματοποιηθεί πειραματικές εμβαπτίσεις σε συγκεντρώσεις ακόμη και ως 1500 ppm (Treasurer & Grant, 1997). Η αποτελεσματικότητα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> κατά της ψείρας είναι σχετικά περιορισμένη αλλά δίνει υποσχόμενα αποτελέσματα κατά των

μυκήτων, ειδικά στα αυγά. Θεραπείες με 50 ως 250 ppm για έκθεση ως 60 min είναι αποτελεσματικές κατά των μυκήτων και μη τοξικές για τα αυγά των ψαριών. Κάποιες μελέτες έδειξαν επίσης ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την βακτηριακή νόσο των βραγχίων των σολομοειδών, από 50 ως 100 ppm για 30 ή 60 min. Τα ψάρια που ανήκουν στο είδος (Walleye) είναι τα πιο ευαίσθητα (178 ppm είναι η μεσαία θανατηφόρα συγκέντρωση που σκοτώνει το 50% των ψαριών) και τα γατόψαρα των καναλιών είναι τα λιγότερο ευαίσθητα είδη ψαριών (2010 ppm).

Τελευταία αρχίζουν να εφαρμόζονται και λουτρά με υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), σε όλα τα είδη και όλα τα στάδια ανάπτυξης των ψαριών, και τα αυγά: 250-500 mg/l (Noga, 2000). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου κυκλοφορεί σαν διάλυμα 3% ( $30 \text{ mg } H_2O_2/\text{ml} = 30.000 \text{ ppm}$ ) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί: 1) Θεραπεία οξείας περιβαλλοντικής υποξίας. Παρατεταμένη εμβάπτιση – 0,25 ml 3%  $H_2O_2$  διάλυμα/l νερού. 2) Αντιπαρασιτικό για πρωτόζωα εξωπαράσιτα. Πολλά ψάρια δεν αντέχουν αυτή την θεραπεία. Λουτρά – 10 ml 3%  $H_2O_2$  διάλυμα/l νερού για 10-15 min. 3) Μυκητοκτόνο για απολύμανση αυγών. Λουτρά – 0,71 έως 1,42 ml 35%  $H_2O_2$  διάλυμα/l νερού (250 – 500 ppm) για 15 min (Noga, 2000).

Το  $H_2O_2$  έχει πρόσφατα λάβει μεγάλη προσοχή, εξαιτίας της αποτελεσματικής του χρήσης στον έλεγχο πολλών εξωτερικών παθογόνων των ψαριών, ειδικά αυτών που ανήκουν στα γένη *Flavobacterium* και *Cytophaga* (Thomassen, 1993; Arndt & Wagner, 1997; Rach et al., 1997; Lumsden et al., 1998; Derksen et al., 1999; Thomas-Jinu & Goodwin, 2004), τα οποία είναι φαινοτυπικά όμοια με το *T. maritimum*. Το  $H_2O_2$  το οποίο παράγεται φυσιολογικά κατά την διάρκεια του οξειδωτικού μεταβολισμού στα κύτταρα, είναι ένα σύνθετος βακτηριοστατικό, χημικό συστατικό, στο περιβάλλον. Αποτελεί μια πιθανή πηγή για τις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), όπως είναι το υπεροξείδιο, το υπεροξυδύλιο και οι ρίζες υδροξυλίου, ενώ είναι ικανό να προκαλέσει υπεροξειδωση των λιπιδίων, καταστροφή των πρωτεϊνών και του DNA, καθώς και την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση ενζύμων (Gilbert et al., 1984; Vroegop et al., 1995). Συνεπώς, τα παθογόνα βακτήρια θα πρέπει να ξεπεράσουν το τοξικό αποτέλεσμα των ROS για να προκαλέσουν μόλυνση (Díaz-Rosales et al., 2003). Επιπλέον το  $H_2O_2$  αποτελεί μια πιο φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση, καθώς διασπάται σε νερό και οξυγόνο (Kiemer & Black, 1997).

Οι Avendaño-Herrera και συνεργάτες (2006), σε μια *in vitro* μελέτη τους, εξέτασαν αν το υπεροξείδιο του υδρογόνου, ως αντισηπτικό διάλυμα, σε

συγκεντρώσεις από 30 έως 240 ppm έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει το *T. maritimum*. Επιπλέον, οι ίδιοι, Avendaño-Herrera και συνεργάτες (2006), με σκοπό να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε συνθήκες μόλυνσης: μολύνανε πειραματικά με στέλεχος *T. maritimum* 10<sup>6</sup> κύττατα/ml, καλκάνια (*Scophthalmus maximus*) (8-10gr) με εμβάπτιση και έπειτα πραγματοποίησαν θεραπευτικά λουτρά με υπεροξείδιο του υδρογόνου, σε συγκέντρωση από 30 έως 240 ppm. Η μελέτη τους απέδειξε πως σε in vitro συνθήκες, όλες οι συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν ήταν αποτελεσματικές στο να εξουδετερώσουν μεγάλο ποσοστό του *T. maritimum*, στο θαλασσινό νερό μετά από 30min έκθεσης. Στην περίπτωση της αποτελεσματικότητας του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στην βλέννα του δέρματος, η συγκέντρωση των 30 ppm στην αντιμετώπιση του βακτηρίου, μετριάστηκε από την παρουσία της βλέννας, αποδεικνύοντας πως η θεραπεία με υψηλότερη συγκέντρωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 240 ppm είναι απαραίτητη για να σκοτώσει το βακτήριο. Παρόλο που αυτές οι συγκεντρώσεις δεν ήταν τοξικές για τα ψάρια, φαίνεται πως δεν ήταν και ολοκληρωτικά αποτελεσματικές για την θεραπεία των πειραματικά μολυσμένων καλκανιών, εξαιτίας πιθανόν της αύξησης του στρες, που επιτάχυνε την εξέλιξη της νόσου.

Οι ίδιοι συγγραφείς, συμπερασματικά πρότειναν την χρήση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, σε συγκέντρωση 240 ppm ως αντισηπτική προληπτική μέθοδο για την απολύμανση του νερού και των τοιχωμάτων των δεξαμενών πριν την είσοδο των ψαριών (Avendaño-Herrera et al., 2006a).

Ιδιότητες. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) είναι ένα υψηλά ενεργό, ισχυρό οξειδωτικό συστατικό, που μπορεί να προκαλέσει διάβρωση σε συγκεντρώσεις άνω του 20%. Έχει αρκετές ιατρικές και μη ιατρικές χρήσεις, εξαιτίας αυτών των ιδιοτήτων του. Όταν προστίθεται στο νερό, διασπάται σε οξυγόνο και νερό και η παραγωγή αυτών των δύο υπο-προϊόντων είναι ο κύριος λόγος που θεωρείται ασφαλές για το περιβάλλον. Προκαλεί επίσης οξείδωση του ελεύθερου χλωρίου σε ιόντα χλωρίου, νερό και οξυγόνο καθώς και οξείδωση της οργανικής ύλης. Αναστέλλει την ανάπτυξη των αλγών. Η ισχυρή δραστική του φύση, παρόμοια σε ορισμένες πτυχές με την δράση του υπερμαγγανικού καλίου, το καθιστά ιδανικό για χρήση στις ιχθυοκαλλιέργειες έναντι πολλών οργανισμών που προκαλούν νόσο στα ψάρια. Το εγκεκριμένο προϊόν από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), κυκλοφορεί ως 35% PEROX-AID® (35% = 35gr/100ml). Το προϊόν που προορίζεται για ανθρώπινη χρήση, συνήθως κυκλοφορεί σε συγκέντρωση 3% (Yanong, 2011).

Ένας αριθμός διαφόρων παραγόντων, ενζύμων και συστατικών, καθώς επίσης και το φως, η θερμότητα και το υψηλό pH μπορούν να επιταχύνουν την διάσπαση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Είναι σημαντικό να γίνει κατανοητή η σταθερότητα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μέσα στο νερό, καθώς η τοξικότητα μπορεί να επιφέρει ένα ανεπιθύμητο αποτέλεσμα.

Στους 15°C και 20°C, αρχικές συγκεντρώσεις του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 και 100 mg/L μέσα σε νερό δεξαμενής, δεν ήταν δυνατό να μετρηθούν μετά από 2-3 μέρες, με παρουσία αερισμού και οργανικής ύλης. Σε συνθήκες χωρίς αερισμό ή οργανική ύλη συγκεντρώσεις του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> δεν ήταν δυνατό να μετρηθούν μετά από 10 ημέρες.

Σε μια ακόμη μελέτη, σχετικά με την σταθερότητα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο νερό, σε δεξαμενές με διακοσμητικά ψάρια γλυκού νερού, αποδείχθηκε ότι το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> διασπάται σχετικά γρήγορα με την παρουσία αερισμού και οργανικής ύλης, ωστόσο η ευαισθησία των ειδών ψαριών και οι αρχικές συγκεντρώσεις θα καθορίσουν επίσης την τοξικότητα στα ψάρια. (Russo et al., 2007). Στην ίδια μελέτη τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χρήση 3.1 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 1 h μπορεί να είναι αποτελεσματική για τον έλεγχο εξωτερικών βακτηρίων, και η χρήση 6.5 mg/L για 1 h μπορεί να είναι αποτελεσματική για τον έλεγχο εξωτερικών παρασίτων, όπως τα *Ichthyobodo* sp., *Trichodina* sp. και *Gyrodactylus* sp. (Russo et al., 2007).

Το 2007, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ως 35% PEROX-AID® (Eka Chemicals, Marietta, Georgia) εγκρίθηκε από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για τον έλεγχο της θνησιμότητας των ψαριών, στις ιχθυοκαλλιέργειες: (1) Σε αυγά ψαριών γλυκού νερού, λόγω μόλυνσης με σαπρολεγνίαση (μια συχνή μυκητίαση), (2) Σε σολομοειδή με βακτηριακή νόσο των βραγχίων, λόγω μόλυνσης από το βακτήριο *Flavobacterium branchiophilum*, και (3) Σε ψάρια γλυκού νερού και γατόψαρα λόγω μόλυνσης από το βακτήριο *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*). Μια περίληψη των εγκεκριμένων δόσεων για το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, φαίνεται στον Πίνακα 1.4.

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 35% PEROX-AID® μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και σε άλλα είδη ψαριών και για άλλες περιπτώσεις νοσημάτων, αρκεί να τηρούνται οι εγκεκριμένες προϋποθέσεις για την χρήση του. Πολύ σημαντική είναι σε αυτές τις περιπτώσεις, η σχέση μεταξύ του κτηνιάτρου, ιχθυοπαθολόγου και του ιδιοκτήτη των ψαριών-παραγωγού, ώστε να τηρούνται οι απαραίτητες προϋποθέσεις που αφορούν την δημόσια υγεία. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> εκτός από τις παραπάνω ενδείξεις, έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον έλεγχο

νοσημάτων των ψαριών που οφείλονται σε παράσιτα, όπως πρωτόζωα και μονογενή παράσιτα.

**Πίνακας 1.4.** Εγκεκριμένες από τον FDA δόσεις για το 35% PEROX-AID® (35% w/w υπεροξειδίο του υδρογόνου) (Yanong, 2011).

Είδη ψαριών και Στάδιο ανάπτυξης	Νόσημα, παθογόνος παράγοντας	Δοσολογία	Διάρκεια	Συχνότητα
Αυγά ψαριών γλυκού νερού, ψυχρά νερά	Σαπρολεγνίαση, Saprolegnia	500–1000 mg/L	15 min	Μία φορά την ημέρα ή μέρα παρά μέρα μέχρι την εκκόλαψη
Αυγά ψαριών γλυκού νερού, θερμά νερά	Σαπρολεγνίαση, Saprolegnia	750–1000 mg/L	15 min	Μία φορά την ημέρα ή μέρα παρά μέρα μέχρι την εκκόλαψη
Σολομοειδή γλυκού νερού	Βακτηριακή νόσος των βραγχίων ( <i>Flavobacterium branchiophilum</i> )	100 mg/L με συνεχή ροή ή εμβάπτιση	30 min	Μία φορά κάθε δεύτερη μέρα για 3 θεραπείες
Σολομοειδή γλυκού νερού	Βακτηριακή νόσος των βραγχίων ( <i>Flavobacterium branchiophilum</i> )	50–100 mg/ με συνεχή ροή ή εμβάπτιση	60 min	Μία φορά κάθε δεύτερη μέρα για 3 θεραπείες
Ιχθύδια και ενήλικα ψάρια γλυκού νερού, ψυχρά νερά	Νόσος Columnaris ( <i>Flavobacterium columnare</i> )	50–75 mg/ με συνεχή ροή ή εμβάπτιση	60 min	Μία φορά κάθε δεύτερη μέρα για 3 θεραπείες
Γόνος γλυκού νερού, ψυχρά νερά	Νόσος Columnaris ( <i>Flavobacterium columnare</i> )	50 mg/L με συνεχή ροή ή εμβάπτιση	60 min	Μία φορά κάθε δεύτερη μέρα για 3 θεραπείες
Ιχθύδια και ενήλικα γατόψαρα των	Νόσος Columnaris ( <i>Flavobacterium</i>	50–75 mg/ με συνεχή ροή ή εμβάπτιση	60 min	Μία φορά κάθε δεύτερη μέρα για 3 θεραπείες

καναλιών	<i>columnare</i> )			
Γόνος, γατόψαρα των καναλιών	Νόσος Columnaris ( <i>Flavobacterium columnare</i> )	50 mg/ με συνεχή ροή ή εμβάπτιση	60 min	Μία φορά κάθε δεύτερη μέρα για 3 θεραπείες

Μια περίληψη μη εγκεκριμένων δόσεων και ενδείξεων για το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, που έχουν χρησιμοποιηθεί από τους ερευνητές, σε είδη ψαριών που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, φαίνονται στον Πίνακα 1.5.

**Πίνακας 1.5.** Μη εγκεκριμένες, πειραματικές χρήσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου που έχουν αναφερθεί σε είδη ψαριών που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση ή σε παθογόνα ψαριών (Yanong, 2011).

Είδη ψαριών και Στάδιο ανάπτυξης	Νόσημα, παθογόνος παράγοντας	Δοσολογία	Διάρκεια	Συχνότητα	Αναφορά
Ιχθύδια ιριδίζουσας πέστροφας	<i>Ambiphrya</i> (άμισχα βλεφαριδοφόρα πρώτιστα) <i>Gyrodactylus</i> (μονογενή)	170, 280, ή 560 mg/L εμβάπτιση	30 min	Μία φορά	Rach et al. 2000
Ιχθύδια Pacific threadfin ( <i>Polydactylus sexfilis</i> )	<i>Amyloodinium</i> (δινωμαστιγωτά)	75–100 mg/L εμβάπτιση	30 min	Μία φορά	Montgomery-Brock et al. 2001
Ιχθύδια Pacific threadfin ( <i>Polydactylus sexfilis</i> )	<i>Amyloodinium</i> (δινωμαστιγωτά)	75 mg/L εμβάπτιση	30 min	Δύο θεραπείες, 6 μέρες διαφορά	Montgomery-Brock et al. 2001
Δεν υπάρχει ξενιστής ψάρι	<i>Uronema</i> (βλεφαριδοφόρα πρώτιστα)	250 or 500 mg/L εμβάπτιση	60 min	Μία φορά	Crosbie and Munday 1999
Ιχθύδια, Kingfish ( <i>Seriola lalandi</i> )	<i>Zeuxapta seriola</i> (μονογενή)	300 mg/L εμβάπτιση	10 min	Μία φορά	Mansell et al. 2005
Δεν υπάρχει ξενιστής ψάρι	<i>Tenacibaculum maritimum</i> (βακτήρια)	30–240 mg/L εμβάπτιση	30 min	Μία φορά	Avendano-Herrera et al. 2006

Όπως με κάθε φάρμακο ή χημικό στις ιχθυοκαλλιέργειες, η μη σωστή χρήση μπορεί να οδηγήσει σε αναποτελεσματική θεραπεία. Η υποδοσολογία, η τοξικότητα από υπερδοσολογία και η ανοχή ή αντίσταση του παθογόνου είναι κάποια από τα πιθανά προβλήματα που μπορούν να οδηγήσουν σε αναποτελεσματικότητα της θεραπείας. Κάποια είδη ψαριών έχει αποδειχθεί ότι είναι πολύ ευαίσθητα. Σε κάθε περίπτωση, μια δοκιμή αποτελεσματικότητας και ασφάλειας σε μικρό αριθμό ψαριών θα πρέπει να προηγείται, πριν την χορήγηση σε όλο τον πληθυσμό που νοσεί. Διαφορές στα είδη των ψαριών, στην ηλικία και στο μέγεθος, καθώς και διαφορές στις παραμέτρους ποιότητας του νερού μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα και την τοξικότητα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα ψάρια. Η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει την τοξικότητα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα ψάρια.

Όπως συμβαίνει και με άλλα διαλύματα, οι απαραίτητες προφυλάξεις θα πρέπει να λαμβάνονται κατά την χρήση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, για την διαφύλαξη της υγείας του χρήστη, αποφεύγοντας περιπτώσεις ερεθισμού και εγκαυμάτων του δέρματος και προβλήματα στην αναπνοή ή στην κατάποση. Πριν από κάθε χρήση, η συμβουλή ενός κτηνιάτρου ιχθυοπαθολόγου συνιστάται. Οι δοσολογίες και οι ενδείξεις για τα διάφορα είδη ψαριών μπορεί να διαφέρουν, κάθε φορά.

Μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης έχει αναφερθεί σε ψάρια στα οποία έγινε θεραπεία με υψηλές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Speare et al., 1999). Επιπλέον, βλάβη στα βράγχια έχει αναφερθεί σε ορισμένα είδη ψαριών, όταν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> χορηγήθηκε σε υψηλές ή θανατηφόρες συγκεντρώσεις. Για παράδειγμα, στους 22°C, εμφανίστηκε 50% θνησιμότητα, μετά από 3 h σε γατόψαρα καναλιών που εκτέθηκαν σε 238 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και σε ψάρια bluegill που εκτέθηκαν σε 460 mg/L (Rach et al., 1997; Speare et al., 1999). Οι Rach και συνεργάτες (1997) επίσης παρατήρησαν ότι τα νεαρά στάδια ανάπτυξης της ιριδίζουσας πέστροφας, μπορούσαν να ανεχτούν πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (μεγαλύτερες από 1132 mg/L) από τα μεγαλύτερα σε ηλικία ψάρια. Αυτό μπορεί να οφείλεται στις διαφορές στην λειτουργία και ανατομία των βραγχίων μεταξύ των ψαριών διαφορετικών ηλικιών και μεγεθών.

Οι Mansell και συνεργάτες (2005) παρατήρησαν επίσης σημαντικές αλλαγές σε κάποιες παραμέτρους του αίματος (ωσμωτικότητα, pH) στο ψάρι kingfish, μετά την θεραπεία με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Διάφορα είδη ψαριών (paddlefish, walleye) είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, και η χρήση του μπορεί να είναι τοξική γι' αυτά τα είδη. Ως γενικός κανόνας,

το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για θεραπεία σε συνδυασμό με άλλα χημικά διαλύματα.

Σύμφωνα με τον Cruz-Lacierda και συνεργάτες (2012), το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 200 ppm για 1h αποδείχθηκε αποτελεσματικό για να αντιμετωπίσει το μονογενές παράσιτο των βραγχίων *P. lantauensis* σε ιχθύδια ψαριού *E. Coioides*, χωρίς να προκαλέσει κάποια ανεπιθύμητη ενέργεια στα ψάρια. Επίσης η LC50 του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> καθορίστηκε στα 298 ppm, στους 28°C (Cruz-Lacierda et al., 2012).

#### 1.4.2 Χλωραμίνη-T

Η χλωραμίνη-T έχει θεωρηθεί το φάρμακο επιλογής, σε περιπτώσεις σολομοειδών, πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*), στουργιόνι (*Acipenser oxyrhynchus*) και άλλα είδη που προσβάλλονται από την Βακτηριακή νόσο των βραγχίων (BGD) ή την Μυξοβακτηριδίαση (flexibacteriosis) των ψαριών του γλυκού νερού. Αυτά τα νοσήματα μπορούν να αποτελέσουν σοβαρή απειλή για τα ψάρια στις εντατικές ιχθυοκαλλιέργειες. Έρευνες έχουν δείξει ότι η θεραπευτική χορήγηση 10-20 mg/L χλωραμίνης-T για 60min, με εμβάπτιση 3 εμβαπτίσεις μέρα παρά μέρα, αποδεικνύεται αποτελεσματική σε πειραματικές δοκιμές. Η θεραπεία σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, ή όταν γίνονται λιγότερες εμβαπτίσεις, επίσης είναι αποτελεσματική, αλλά σε μικρότερο βαθμό από την προηγούμενη (Powell & Perry 1997; Harris et al., 2004, 2005; Leef et al. 2007).

Σύμφωνα με τον Bowker και συνεργάτες (2000) για την χρήση της χλωραμίνης-T για τον έλεγχο της θνησιμότητας σε ιχθύδια πέστροφας, η προτεινόμενη, μέγιστη, θεραπευτική συγκέντρωση είναι 20 mg/L χλωραμίνης-T για 60min, με εμβάπτιση 3 εμβαπτίσεις μέρα παρά μέρα και θερμοκρασία νερού 14°C. Επιπλέον για τα ιχθύδια πέστροφας, και σε θερμοκρασία νερού 14°C, το εύρος της ασφάλειας στην έκθεση στην χλωραμίνη-T εκτείνεται μεταξύ 40-60 mg/L. Όσα από τα ιχθύδια επιβιώνουν από την έκθεση σε μεγαλύτερη συγκέντρωση >60 mg/L είναι ικανά επίσης να αναρρώσουν από τα τοξικά αποτελέσματα μιας τέτοιας έκθεσης (Bowker et al., 2000). Πρόσφατες έρευνες σε πέστροφες, επίσης απέδειξαν ότι η χρήση της χλωραμίνης-T, σε συγκέντρωση 10-20 mg/L, είναι πολύ αποτελεσματική στην πρόληψη ή θεραπεία εξωτερικών παρασίτων και βακτηριακών μολύνσεων (Boran & Altinok, 2013).



Οι ιχθυοκαλλιέργειες απαιτούν αυστηρούς κανόνες υγιεινής για την πρόληψη νοσημάτων και την αποφυγή μεγάλων οικονομικών απωλειών. Η χλωραμίνη-Τ, που κυκλοφορεί με την εμπορική ονομασία Halamid<sup>®</sup>, αποτελεί το κατάλληλο ευέλικτο απολυμαντικό προϊόν για την διατήρηση της υγιεινής στις ιχθυοκαλλιέργειες. Πολύ αποτελεσματική κατά των παθογόνων μικροοργανισμών των ψαριών και γαριδών, θεωρείται απαραίτητη στις ιχθυοκαλλιέργειες από το στάδιο του γόνου έως τις δεξαμενές πάχυνσης των ψαριών και εμφανίζει μεγάλη εφαρμογή στις ιχθυοκαλλιέργειες πέστροφας.

Η χλωραμίνη-Τ, έχει χρησιμοποιηθεί κατά παθογόνων βακτηρίων, όπως αυτών που προκαλούν την Βακτηριακή νόσο των βραγχίων (BGD) ή την Στηλώδη νόσο (*columnaris*) (Bullock et al., 1991). Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί κατά πολλών παρασίτων που σχετίζονται με την βιομηχανία των ιχθυοκαλλιεργειών, όπως *Ichthyophthirius multifiliis* (white spot disease), *Gyrodactylus* και *Neoparamoeba pemaquidensis* (Αμοιβάδωση των βραγχίων). Η απολύμανση με χλωραμίνη-Τ, των ενυδρείων και δεξαμενών, των διχτυών, του εξοπλισμού, των τοιχωμάτων των σκαφών, των μονάδων επεξεργασίας των ψαριών και άλλων κατά την διαδικασία παραγωγής των ψαριών, εξασφαλίζει ότι παθογόνοι μικροοργανισμοί (βακτήρια, ιοί και παράσιτα) καταστρέφονται γρήγορα και αποτελεσματικά ([http<sup>4</sup>](http)).

Επιπλέον, η χλωραμίνη-Τ εμφανίζει μεγάλο εύρος δράσης, δεν είναι διαβρωτική σε διαλύματα για τα υλικά, είναι εύκολη στην χρήση, σταθερή και εύκολα βιοαποικοδομήσιμη. Επίσης δεν έχει τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικών μικροοργανισμών. Η χλωραμίνη-Τ, πάντα χορηγείται αραιωμένη μέσα σε υδατικό διάλυμα με νερό, στην κατάλληλη συγκέντρωση. Η συνήθης συγκέντρωση για θεραπεία των ψαριών είναι 10-20 ppm (10-20 g/m<sup>3</sup>), με εμβάπτιση για 1 h και στην συνέχεια προστίθεται καθαρό νερό για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα (Πίνακας). Αυτό μπορεί να επαναληφθεί έως 4 φορές, σε συνεχόμενες ή εναλλακτικές ημέρες. Σε σταθερές λίμνες γλυκού νερού, η χλωραμίνη-Τ προστίθεται σε συγκέντρωση 3 ppm (3 g/m<sup>3</sup>) μια φορά την εβδομάδα (Leef et al., 2007).

Η χλωραμίνη-Τ συνιστάται από τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) για την απολύμανση της *Artemia nauplii* σε συγκέντρωση 60 ppm, με εμβάπτιση για 3 min και στην συνέχεια ξέπλυμα με καθαρό νερό. Για την απολύμανση των αυγών, τα αυγά μπορούν να βυθιστούν σε διάλυμα 1 g/l χλωραμίνης-Τ για 10 min και στην συνέχεια ξέπλυμα με καθαρό νερό. Στον Πίνακα 1.7, φαίνονται οι χρήσεις της χλωραμίνης-Τ, έναντι μικροοργανισμών που εμφανίζονται στις ιχθυοκαλλιέργειες και

μπορούν να προκαλέσουν νόσημα και στον Πίνακα 1.8, οι προτεινόμενες συγκεντρώσεις της Χλωραμίνης-T (Leef et al., 2007).

**Πίνακας 1.7.** Μικροοργανισμοί για την αντιμετώπιση των οποίων έχει προταθεί η χρήση της χλωραμίνης-T (Leef et al., 2007).

<b>Βακτήρια</b>	<b>Ιοί</b>	<b>Μύκητες</b>	<b>Παράσιτα</b>
<i>Aeromonas salmonicida</i> (Furunculosis)	Infectious Pancreatic Necrosis (IPN)	Saprolegnia	<i>Gyrodactylus salaris</i>
<i>Tenacibaculum maritimum</i> (Tenacibaculosis)	Infectious Salmon Anaemia (ISA)		<i>Ichthyobodo necator</i> (Costia)
<i>Flavobacterium branchiophilum</i> (BGD)			<i>Ichthyophthirius multifiliis</i> (White spot)
<i>Flavobacterium columnaris</i> (Columnaris)			<i>Neoparamoeba pemaquidensis</i> (Amoebic Gill Disease)
<i>Listonella anguillarum</i> (Vibriosis)			Τρηματώδη
<i>Vibrio harveyi</i>			
<i>Vibrio salmonicida</i>			
<i>Yersinia ruckeri</i> (Redmouth disease)			

**Πίνακας 1.8.** Προτεινόμενες συγκεντρώσεις της Χλωραμίνης-T (Leef et al., 2007).

<b>Εφαρμογή</b>	<b>Συγκέντρωση</b>	<b>Σημείωση</b>
Απολύμανση ενυδρείων και δεξαμενών	1%-2%	
Απολύμανση εξοπλισμού	1%	
Απολύμανση διχτύων	1%	
Απολύμανση σκαφών	1%-2%	
Ποδόλουτρα	2%	Επανάληψη τόσο συχνά, όσο χρειάζεται
Απολύμανση νερού-δεξαμενές γλυκού νερού με ανακύκλωση	10-20 ppm για 60min	Μπορεί να επαναληφθεί ως 4 φορές, συνεχόμενες ή εναλλακτικές ημέρες
Απολύμανση νερού-δεξαμενές γλυκού νερού χωρίς ανακύκλωση	3 ppm μια φορά την εβδομάδα	

Η χλωραμίνη-T (n-χλωρο-παρα-τολουαλο άλας νατρίου σουλφοναμιδίου), συγκεντρωτικά χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση εξωτερικών βακτηριακών μολύνσεων στις ιχθυοκαλλιέργειες σολομοειδών ("Bacterial Gill Disease"; Bullock et

al., 1991). Έχει επίσης αναφερθεί, ότι είναι αποτελεσματική για την αντιμετώπιση μονογενών τρηματωδών παρασίτων (δέρμα, βράγχια) (Debuf, 1991), ενώ η ίδια μελέτη αναφέρει ότι υψηλές δόσεις μπορεί να είναι τοξικές για το ψάρι κοί. Η χλωραμίνη-T διασπάται αργά σε υποχλωριώδες οξύ και απελευθερώνει οξυγόνο και χλώριο (Booth & McDonald, 1988). Το ενεργό συστατικό είναι το π-τολουολο σουλφοναμίδιο. Το ηλιακό φως επιταχύνει αυτή την διάσπαση, γι' αυτό η χορήγηση στις δεξαμενές δεν θα πρέπει να γίνεται παρουσία άπλετου ηλιακού φωτός και η σκόνη της χλωραμίνης-T θα πρέπει να αποθηκεύεται στο σκοτάδι. Η τοξικότητα και η αποτελεσματική δόση κάθε φορά, εξαρτάται από την θερμοκρασία και το pH του νερού (Rach et al., 1988) ([http<sup>5</sup>](#)).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>**

### **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

**2.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΟΧΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΟ *Tenacibaculum maritimum* ΣΕ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ**

**2.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Tenacibaculum maritimum* ΣΕ ΙΧΘΥΔΙΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ**

**2.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΙΝΗΣ Τ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΗΣ ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΣΗΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΣΕ ΤΣΙΠΟΥΡΕΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΑ**

**2.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (LC50) ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΙΝΗΣ Τ, ΣΕ ΙΧΘΥΔΙΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ**

## **2.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΟΧΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΟ *Tenacibaculum maritimum* ΣΕ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ**

### **Η ΔΙΚΗ ΜΑΣ ΕΡΕΥΝΑ**

#### **2.1.1 Σκοπός της δικής μας έρευνας**

Σκοπός της έρευνας ήταν να διερευνηθεί η παρουσία του βακτηρίου *Tenacibaculum maritimum* σε επτά (7) εκτρεφόμενα είδη θαλάσσιων ψαριών σε δύο χαρακτηριστικές περιοχές της Ελλάδας και να εκτιμηθεί η κατάσταση της μυξοβακτηριδίασης. Συλλέχθηκαν στελέχη του βακτηρίου *T. maritimum*, από τα εκτρεφόμενα ψάρια με σκοπό να διερευνηθεί και αν τα στελέχη εμφανίζουν παρόμοιο βιοχημικό προφίλ, εντός των ελληνικών συνόρων. Οι πληροφορίες αυτές, μέχρι σήμερα δεν ήταν διαθέσιμες καθώς δεν έχει πραγματοποιηθεί παρόμοια έρευνα σε ένα μεγάλο αριθμό εκτρεφόμενων ειδών θαλάσσιων ψαριών, στην Ελλάδα.

Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν τέσσερες (4) εποχικές δειγματοληψίες (άνοιξη, καλοκαίρι, φθινόπωρο, χειμώνας), με στόχο την μελέτη του ποσοστού μόλυνσης, της εποχικότητας και της παθολογίας των μυξοβακτηριδίων σε εκτρεφόμενα είδη όπως: το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), η τσιπούρα (*Sparus aurata*), το λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*), το φαγκρί (*Pargus pargus*), το μυλοκόπι (*Umbrina Cirrosa*), το μυτάκι (*Diplodus puntazzo*), και ο συκιός (*Sciaena umbra*). Τα βακτήρια απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν βιοχημικά και μοριακά, ελέγχθηκε η λοιμογόνος δύναμή τους και στη συνέχεια κωδικοποιήθηκαν και αποθηκεύτηκαν.

Ελήφθησαν δείγματα από εκτρεφόμενα λαβράκια, τσιπούρες, λυθρίνια, φαγκριά, μυλοκόπια, μυτάκια και συκιοί, από δύο αντιπροσωπευτικές περιοχές της Ελλάδας (Αιγαίο & Ιόνιο πέλαγος). Τα δείγματα αυτά ήταν από ψάρια διαφορετικού μεγέθους τα οποία εκτρέφονταν είτε σε κλωβούς, είτε σε χερσαίες εγκαταστάσεις. Όλες οι εργαστηριακές εξετάσεις, πραγματοποιήθηκαν στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Ιχθυολογίας – Ιχθυοπαθολογίας σε συνεργασία με το εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

#### **2.1.2 Δειγματοληψίες**

### 2.1.2.1 Περιοχή δειγματοληψίας

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στην περιοχή του διαύλου Ωρεών-Τρίκερι, στον Μαλιακό Κόλπο (Στυλίδα) και στον Βόρειο Ευβοϊκό κόλπο (Εικόνα 2.1) όσον αφορά το Αιγαίο πέλαγος και στην περιοχή Σαγιάδα (Εικόνα 2.2), του νομού Θεσπρωτίας, όσον αφορά το Ιόνιο πέλαγος. Οι περιοχές αυτές θεωρήθηκαν αντιπροσωπευτικές εξαιτίας του μεγάλου αριθμού ιχθυοκαλλιεργητικών μονάδων που έχουν αναπτυχθεί και της σημαντικής δραστηριότητας στον τομέα της εντατικής καλλιέργειας υδρόβιων ειδών (Εικόνα 2.3).

Ο Ευβοϊκός κόλπος εκτείνεται ανάμεσα από τα ανατολικά παράλια της Αττικοβοιωτίας και από τα δυτικά παράλια της Εύβοιας. Διαχωρίζεται σε βόρειο και νότιο Ευβοϊκό κόλπο από τα στενά της Αυλίδας και του Ευρίπου. Η επικοινωνία του Ευβοϊκού με το Αιγαίο πέλαγος γίνεται στα βόρεια με το διάυλο Ωρεών-Τρίκερι, ενώ στα νότια με τον κόλπο των Πεταλιών. Ο διάυλος Ωρεών-Τρίκερι έχει έκταση 232km και βάθος μικρότερο από 95km. Έχει χαρακτηριστεί από χαμηλό ρυθμό ιζηματογένεσης, ενώ η παρουσία ρευμάτων δικαιολογεί την ύπαρξη χονδρόκοκκης φάσης ιζημάτων βιολογικής προέλευσης στην επιφάνεια του πυθμένα. Επιπλέον, στην περιοχή απουσιάζουν οι μεγάλες πόλεις ή βιομηχανικής κλίμακας εγκαταστάσεις, ενώ συνήθως συναντάμε κωμοπόλεις, χωριά και παραθεριστικά θέρετρα (Στεργίου, 1991).

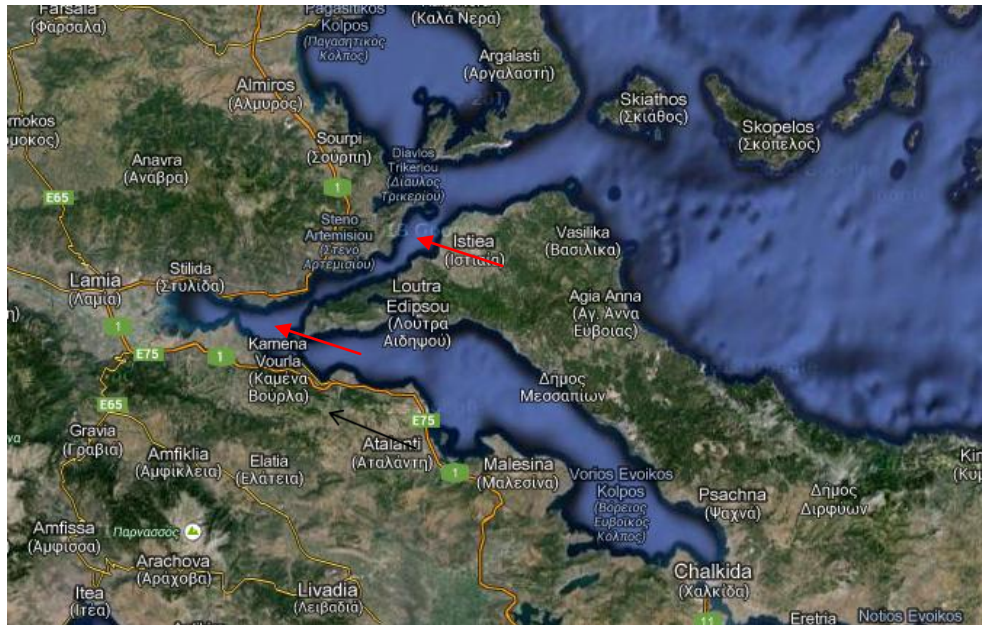
Ο Βόρειος Ευβοϊκός κόλπος είναι ένας από τους δύο μεγάλους κόλπους που σχηματίζονται ανάμεσα στην Εύβοια και την Στερεά Ελλάδα. Ο κόλπος καταλήγει στο στενό του Ευρίπου στην περιοχή της Χαλκίδας, όπου ενώνονται τα νερά του με τα νερά του Νότιου Ευβοϊκού. Ο Βόρειος Ευβοϊκός δεν έχει πολλά νησιά στο εσωτερικό του. Στην είσοδό του βρίσκεται η συστάδα Λιχάδες ενώ στην δυτική του ακτή κοντά στην Αταλάντη υπάρχουν οι νησίδες Γαΐδαρος και Αταλαντονήσι ([http<sup>6</sup>](http://)). Ο Μαλιακός κόλπος είναι ένας κόλπος του Αιγαίου Πελάγους στην Ανατολική Στερεά Ελλάδα, που εισχωρεί στο Νομό Φθιώτιδας από ανατολικά προς δυτικά κατά 8 ως 12 μίλια (15 ως 22 km), ανάλογα με τον καθορισμό των εξωτερικών του ορίων. Η περιοχή βρίσκεται στο ανατολικό τμήμα της Κεντρικής Ελλάδας. Τα όριά της βρίσκονται στην περιφερειακή ζώνη του Εθνικού Δρυμού της Οίτης και γειτνιάζει με τα όρη Τυμφρηστός και Βαρδούσια. Στην περιοχή διακρίνονται γενικότερα τρία τμήματα: α) ο Μαλιακός κόλπος, β) οι εκβολές του Σπερχειού ποταμού και οι γύρω περιοχές και γ) η κοιλάδα του Σπερχειού ποταμού και οι πηγές του. Ο Μαλιακός κόλπος καλύπτει 90.000 στρέμματα. Είναι ένας μικρός κλειστός κόλπος που

συνδέεται με το Αιγαίο πέλαγος και τον Β. Ευβοϊκό κόλπο, στο ανατολικό άκρο του, μέσω δύο μικρών διαύλων. Στο εξωτερικό ανατολικό τμήμα του, το μέσο βάθος είναι 30m, ενώ στο εσωτερικό δυτικό του τμήμα δεν ξεπερνά τα 25m. Ο πυθμένας του καλύπτεται ως επί το πλείστον από μαλακό ίζημα. Ο Σπερχειός συναντά την θάλασσα στο ΝΔ άκρο του κόλπου. Ο Μαλιακός κόλπος υποστηρίζει σημαντική παραγωγή σε ψάρια και δίθυρα μαλάκια. Το τελευταίο τμήμα των εκβολών του Σπερχειού, κοντά στο στόμιο του ποταμού και εκεί που η ξηρά συναντά τη θάλασσα, σχηματίζει έναν ρηχό κόλπο σαν λιμνοθάλασσα, που ονομάζεται Λιβάρι. Το βάθος στο μεγαλύτερο τμήμα του είναι πέντε μέτρα και αποτελεί ένα φυσικό θαλάσσιο πάρκο για την αναπαραγωγή ψαριών και την ανάπτυξη των νεαρών ιχθυδίων ([http<sup>7</sup>](#)).

Η ακριβέστερη οριοθέτηση του Μαλιακού κόλπου τοποθετεί τα όρια του στα ακρωτήρια Χιλιομίλι (νοτιοανατολικά) και Καραβοφάναρα (βορειοανατολικά). Στην περίπτωση αυτή έχει άνοιγμα 2,8km. Το μέγιστο βάθος του είναι 27 μέτρα. Πρακτικά το μοναδικό λιμάνι του Μαλιακού Κόλπου είναι η Στυλίδα στη βόρεια ακτή του, αλλά και αυτό ακόμα απαίτησε την εκβάθυνση με τη δημιουργία διαύλου, εξαιτίας του αβαθούς της θάλασσας. Η Στυλίδα είναι το επίνειο της Λαμίας.

Μέσα στον Μαλιακό Κόλπο δημιουργούνται μικροί όρμοι, όπως της Αγίας Τριάδας (νότια ακτή) και της Στυλίδας. Ο μοναδικός ποταμός που χύνεται στον Μαλιακό Κόλπο είναι ο Σπερχειός, ο οποίος με τις προσχώσεις του μειώνει τις τελευταίες δεκάδες χιλιάδες χρόνια αργά αλλά συνεχώς την έκταση του κόλπου. Επίσης υπάρχει ο χείμαρρος Δριστελόρρεμα, που πηγάζει από την Όθρυς, και μερικοί άλλοι.

Η ονομασία του Μαλιακού Κόλπου οφείλεται στους Μαλιείς, αρχαίους κατοίκους της Μάλιδος. Κατά τα μέσα του περασμένου αιώνα συνηθιζόταν και το όνομα Λαμιακός Κόλπος **η** Κόλπος της Λαμίας για το εσωτερικό του τμήμα. Η πόλη της Λαμίας απέχει 8,5 χιλιόμετρα σε ευθεία γραμμή από το εγγύτατο σημείο της ακτής του κόλπου ([http<sup>8</sup>](#)).



Εικόνα 2.1. Περιοχή Μαλιακού κόλπου και Βόρειου Ευβοϊκού κόλπου (Μονάδα Εκτροφής 1-Α, Αιγαίο πέλαγος). Περιοχή δειγματοληψιών (κόκκινα βέλη).

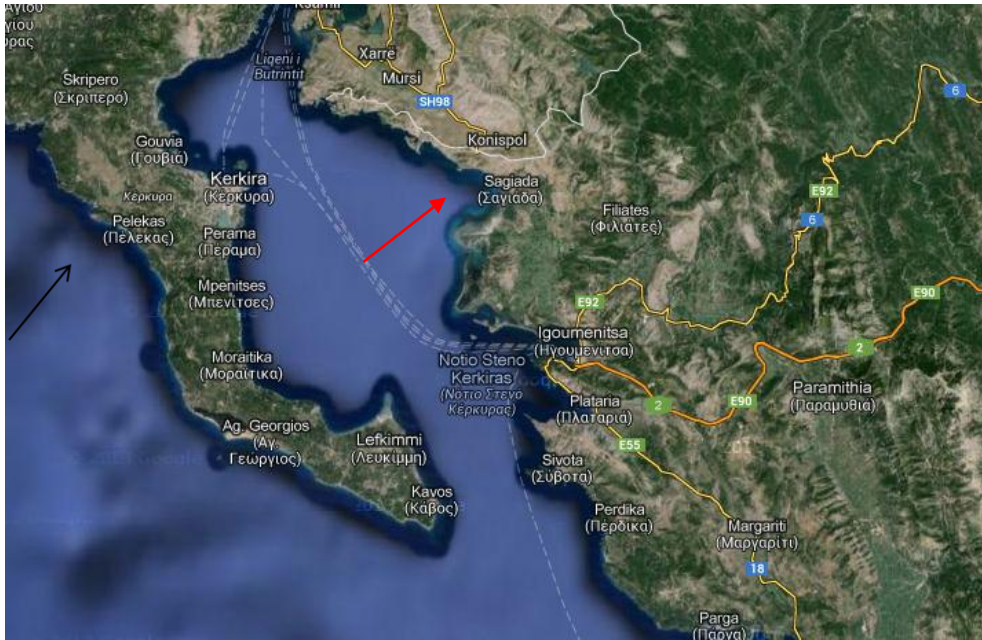
Ένας από τους δυναμικότερα αναπτυσσόμενους σήμερα κλάδους του πρωτογενούς τομέα, η ιχθυοκαλλιέργεια αναπτύσσεται σημαντικά τα τελευταία χρόνια και στον νομό Θεσπρωτίας. Ο Νομός Θεσπρωτίας, είναι ο βορειοδυτικότερος νομός της ηπειρωτικής Ελλάδας και πιο συγκεκριμένα ένας από τους τέσσερις νομούς της γεωγραφικής και διοικητικής περιφέρειας της Ηπείρου. Ανήκει στους ακριτικούς νομούς της χώρας, καταλαμβάνει την παράλια περιοχή βόρεια των παλαιών εκβολών του ποταμού Καλαμά μέχρι την Ελληνοαλβανική μεθόριο. Συνορεύει βόρεια με την Αλβανία, ανατολικά με το Νομό Ιωαννίνων, νότια με το νομό Πρεβέζης και δυτικά βρέχεται από το Ιόνιο Πέλαγος. Έχει συνολική έκταση 1.515 τετραγωνικά χλμ. Είναι ένας από του ποιο αραιοκατοικημένους νομούς, ενώ πρωτεύουσα του νομού είναι η Ηγουμενίτσα.

Η ακτογραμμή του νομού Θεσπρωτίας εκτείνεται από βόρεια, βορειοδυτικά (αλβανικά σύνορα), ακρωτήριο Στύλος, προς νότια, νότια ανατολικά, ακρωτήριο Βαρλαάμ, συνεχίζοντας στο νομό Πρεβέζης με τις ακόλουθες εγκολπώσεις - διαμορφώσεις από βορρά προς νότο: όρμος Αετού, λιμένες Παγανιάς, όρμος Χαλκιάς, ακρωτήριο Στροβίλι, όρμος Σαγιάδας, ακρωτήριο Καλαμάς και προ αυτού η νησίδα Ξεράδι, όρμος Βάλτου, όπου παρατηρούνται μεγάλες προσχώσεις από τις εκβολές του ποταμού Καλαμά, ακρωτήριο Βατάτσας, με την έναντι νησίδα Πρασσοῦδι. Στη συνέχεια ακολουθεί ο μεγάλος όρμος Ηγουμενίτσας, και ο λιμένες Ηγουμενίτσας. Ακολουθεί ο όρμος Πλαταριάς, με την έναντι νησίδα Χειρονήσι και νοτιότερα οι νησίδες Άγιος Νικόλαος και Μαύρο Όρος, Τέλος ακολουθεί νοτιότερα το ακρωτήριο Βαρλαάμ, λίγο μετά του οποίου συνεχίζεται η ακτογραμμή του νομού Πρεβέζης. Το κλίμα του νομού, γενικά στα παράλια είναι μεσογειακό, και βαθμιαία στο εσωτερικό ηπειρωτικό. Στην περιοχή του Νομού Θεσπρωτίας και κατά μήκος της



ακτογραμμής λειτουργεί σήμερα ένας σημαντικός αριθμός μονάδων εκτροφής θαλασσινών ψαριών. Οι σημαντικότερες πλωτές μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας έχουν ιδρυθεί και παραμένουν στην περιοχή Σαγιάδας και στον κόλπο της Ηγουμενίτσας ([http<sup>6</sup>](#)).

Η Σαγιάδα βρίσκεται στο άκρο της βορειοδυτικής Ελλάδας, στα βορειοδυτικά του νομού Θεσπρωτίας (τελευταίο χωριό πριν από τα σύνορα) απέναντι από την πόλη της Κέρκυρας, ανήκει στον δήμο Φιλιατών της Περιφερειακής Ενότητας Θεσπρωτίας. Ο δήμος Σαγιάδας έχει (πραγματικό) πληθυσμό 2.160 κατοίκους και βρίσκεται σε υψόμετρο 40 μέτρα από την επιφάνεια της θάλασσας ([http<sup>9</sup>](#)).



Εικόνα 2.2. Περιοχή Σαγιάδας (Μονάδα Εκτροφής 2-B, Ιόνιο πέλαγος). Περιοχή δειγματοληψιών (κόκκινο βέλος).



Εικόνα 2.3. Περιοχές δειγματοληψιών (μαύρες κουκίδες). Μονάδα Εκτροφής 1-A, Αιγαίο πέλαγος & Μονάδα Εκτροφής 2-B, Ιόνιο πέλαγος.

### 2.1.2.2 Πρωτόκολλο δειγματοληψιών

Σε εκτρεφόμενα ψάρια πραγματοποιήθηκαν τέσσερες (4) εποχιακές δειγματοληψίες από δύο, γειτονικές μονάδες εκτροφής, που αναφέρονται μαζί ως Μονάδα Εκτροφής 1-A, στο Αιγαίο πέλαγος και από μια μονάδα εκτροφής, που αναφέρεται ως Μονάδα Εκτροφής 2-B, στο Ιόνιο πέλαγος. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά οκτώ δειγματοληψίες, οι οποίες διήρκησαν από την άνοιξη του 2011 έως και το χειμώνα του 2012. Σε κάθε δειγματοληψία λαμβανόταν δείγμα συνολικά 200 ψαριών, αντιπροσωπεύοντας το 0.5% του συνολικού αριθμού ψαριών. Στον Πίνακα 2.1, φαίνονται οι εποχιακές δειγματοληψίες και το σύνολο ψαριών ανά δειγματοληψία.

Σε κάθε μονάδα (Μονάδα Εκτροφής 1-A & Μονάδα Εκτροφής 2-B) λαμβανόταν δείγμα από 100 λαβράκια, 100 τσιπούρες, 80 λυθρίνια, και 40 φαγκριά. Στην Μονάδα Εκτροφής 1-A, λαμβανόταν επίσης δείγμα από 60 μυλοκόπια και 40 συκιούς, γιατί αυτά τα είδη ψαριού δεν καλλιεργούνταν στην Μονάδα Εκτροφής 2-B. Αντίστοιχα στην Μονάδα Εκτροφής 2-B λαμβανόταν δείγμα από 60 μυτάκια. Στον Πίνακα 2.2, φαίνονται οι εποχιακές δειγματοληψίες ανά είδος εκτρεφόμενων ψαριών και ανά εκτροφή.

Στον Πίνακα 2.3, φαίνονται αναλυτικά τα είδη και ο ακριβής αριθμός των εκτρεφόμενων ψαριών σε κάθε εποχιακή δειγματοληψία.

Τα δείγματα ελήφθησαν τυχαία από τους ίδιους κλωβούς και χερσαίες εγκαταστάσεις και τα βάρη τους φαίνονται στους Πίνακες 2.4 και 2.5. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν καθ' όλη την διάρκεια του έτους, με έμφαση την περίοδο όπου διαπιστώθηκε αυξημένη θνησιμότητα. Ως δείγματα λαμβάνονταν είτε πρόσφατα νεκρά ψάρια είτε βαμβακοφόροι στειλεοί (swabs) με δείγμα από αλλοιώσεις στο δέρμα των ψαριών. Οι τέσσερες εποχιακές δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε φαινομενικά υγιή ψάρια αλλά και την περίοδο όπου διαπιστώθηκε αυξημένος αριθμός θνησιμοτήτων, έως και 30% και εμφανείς μακροσκοπικές αλλοιώσεις στα ψάρια, με κλινική εκδήλωση νόσου παρόμοιας με εκείνης της μυξοβακτηρίασης,

**Πίνακας 2.1.** Εποχιακές δειγματοληψίες και σύνολο ψαριών ανά δειγματοληψία.

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ	ΜΟΝΑΔΑ ΕΚΤΡΟΦΗΣ 1-A	ΜΟΝΑΔΑ ΕΚΤΡΟΦΗΣ 2-B	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΣΥΝΟΛΟ ΨΑΡΙΩΝ
1 <sup>η</sup> ΑΝΟΙΞΗ 2011	16/3/2011	24/4/2011	(13-15°C)	200
2 <sup>η</sup> ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ 2011	06/06/2011	06/07/2011	(16-17°C)	200
3 <sup>η</sup> ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ 2011	01/09/11- 06/09/11	18/10/11- 02/11/11	(17-19°C)	200
4 <sup>η</sup> ΧΕΙΜΩΝΑΣ 2012	16/01/2012	20/02/12	(12-14°C)	200
				800

**Πίνακας 2.2.** Εποχιακές δειγματοληψίες ανά είδος εκτρεφόμενων ψαριών και ανά εκτροφή.

Είδος Ψαριού	Μονάδα Εκτροφής 1-A	Μονάδα Εκτροφής 2-B	Σύνολο Ψαριών
ΛΑΒΡΑΚΙ	100	100	200
ΤΣΙΠΟΥΡΑ	100	100	200
ΛΥΘΡΙΝΙ	80	80	160
ΦΑΓΚΡΙ	40	40	80
ΜΥΛΟΚΟΠΙ	60	-	60
ΜΥΤΑΚΙ	-	60	60
ΣΥΚΙΟΣ	40	-	40
	420	380	800

**Πίνακας 2.3.** Τα είδη και ο ακριβής αριθμός των εκτρεφόμενων ψαριών σε κάθε εποχιακή δειγματοληψία.

Είδος Ψαριού	Μονάδα Εκτροφής 1				Μονάδα Εκτροφής 2				ΣΥΝΟΛΟ
	1 <sup>η</sup> Δ.	2 <sup>η</sup> Δ.	3 <sup>η</sup> Δ.	4 <sup>η</sup> Δ.	1 <sup>η</sup> Δ.	2 <sup>η</sup> Δ.	3 <sup>η</sup> Δ.	4 <sup>η</sup> Δ.	
ΛΑΒΡΑΚΙ	25	25	25	25	25	25	25	25	200
ΤΣΙΠΟΥΡΑ	25	25	25	25	25	25	25	25	200
ΛΥΘΡΙΝΙ	20	20	20	20	20	20	20	20	160
ΦΑΓΚΡΙ	10	10	10	10	10	10	10	10	80
ΜΥΛΟΚΟΠΙ	15	15	15	15	-	-	-	-	60
ΜΥΤΑΚΙ	-	-	-	-	15	15	15	15	60
ΣΥΚΙΟΣ	10	10	10	10	-	-	-	-	40
ΣΥΝΟΛΟ	105	105	105	105	95	95	95	95	800

**Πίνακας 2.4.** Μέσα βάρη ανά είδος εκτρεφόμενων ψαριών στην Μονάδα Εκτροφής 1.

Είδος Ψαριού	Μονάδα Εκτροφής 1 – Βάρη ψαριών				Κωδικός
	1 <sup>η</sup> Δ. (gr)	2 <sup>η</sup> Δ. (gr)	3 <sup>η</sup> Δ. (gr)	4 <sup>η</sup> Δ. (gr)	
ΛΑΒΡΑΚΙ	0.5-3 (15)	0.5-3 (25)	0.5-3 (25)	50-80 (25)	LVa
	50-60 (10)				
ΤΣΙΠΟΥΡΑ	0.5-5 (25)	0.5-5 (25)	0.5-5 (25)	0.5-2 (25)	TSa
ΛΥΘΡΙΝΙ	40-50 (20)	40-60 (20)	30-50 (20)	40-60 (20)	La
ΦΑΓΚΡΙ	10-15 (10)	10-20 (10)	10-20 (10)	10-20 (10)	Pa
ΜΥΛΟΚΟΠΗ	300-350 (15)	300-350 (15)	350-400 (15)	350-400 (15)	MUC
ΜΥΤΑΚΙ	-	-	-	-	-
ΣΥΚΙΟΣ	250-260 (10)	260-280 (10)	280-290 (10)	280-300 (10)	SU

**Πίνακας 2.5.** Μέσα βάρη ανά είδος εκτρεφόμενων ψαριών στην Μονάδα Εκτροφής 2.

Είδος Ψαριού	Μονάδα Εκτροφής 2 – Βάρη ψαριών				Κωδικός
	1 <sup>η</sup> Δ. (gr)	2 <sup>η</sup> Δ. (gr)	3 <sup>η</sup> Δ. (gr)	4 <sup>η</sup> Δ. (gr)	
ΛΑΒΡΑΚΙ	0.5-3 (25)	6-10 (25)	30-35 (25)	0.5-3 (25)	LVb
ΤΣΙΠΟΥΡΑ	15-30 (25)	20-30 (25)	20-25 (25)	40-50 (25)	TSb
ΛΥΘΡΙΝΙ	80-100 (20)	80-100 (20)	50-60 (20)	80-100 (20)	Lb
ΦΑΓΚΡΙ	10-15 (10)	10-20 (10)	20-25 (10)	10-15 (10)	Pb
ΜΥΛΟΚΟΠΗ	-	-	-	-	-
ΜΥΤΑΚΙ	10-15 (15)	10-15 (15)	250-300 (15)	250-300 (15)	M
ΣΥΚΙΟΣ	-	-	-	-	-

Όλα τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, μεταφέρθηκαν σε κιβώτια με πάγο, εντός το πολύ 5 ωρών από τις περιοχές δειγματοληψίας στο εργαστήριο Ιχθυολογίας-Ιχθυοπαθολογίας του τμήματος Κτηνιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στην Καρδίτσα. Αρχικά εξετάστηκαν μακροσκοπικά για

την εκτίμηση της εξωτερικής τους εικόνας και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν όλες οι μικροβιολογικές, παρασιτολογικές, ιστολογικές και μοριακές εξετάσεις.

### **2.1.2.3 Μακροσκοπική και Νεκροτομική εξέταση**

Όλα τα δείγματα των ιχθύων μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο, τοποθετήθηκαν στον πάγκο του εργαστηρίου όπου σημειώθηκε η ημερομηνία και ο κωδικός αριθμός του κάθε ιχθύος. Στην συνέχεια, μετρήθηκε το σωματικό βάρος και το μήκος κάθε ιχθύος και πραγματοποιήθηκε η εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας των ιχθύων για τυχόν αλλοιώσεις.

Στην πορεία και για να αποφευχθεί η επιμόλυνση του πεδίου ακολούθησε η δειγματοληψία για τις βακτηριολογικές εξετάσεις. Η εξέταση των εσωτερικών οργάνων πραγματοποιήθηκε σε επόμενη φάση (Kimberley, 2004).

### **2.1.2.4 Βακτηριολογική εξέταση**

Η λήψη υλικού για την πραγματοποίηση των μικροβιολογικών εξετάσεων προηγήθηκε των υπολοίπων, προκειμένου να ελαττωθεί κάθε πιθανότητα επιμόλυνσης. Όλα τα δείγματα ελήφθησαν με άσηπτο τρόπο. Αρχικά ελήφθησαν δείγματα από το δέρμα και τα βράγχια των ιχθύων που έφεραν εμφανείς αλλοιώσεις ή εμφανίζονταν φυσιολογικά.

Για την καλλιέργεια και την απομόνωση των βακτηρίων, πραγματοποιήθηκε αρχικά συλλογή δειγμάτων από το δέρμα και τα βράγχια, τα οποία εξετάστηκαν και μικροσκοπικά (νωπά επιχρίσματα, χρώση Gram, μεγέθυνση x400), σύμφωνα με την μέθοδο που έχουν περιγράψει οι Roberts (1989), Frerichs (1993), Kimberley (2004). Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των μυξοβακτηριδίων ήταν: τροποποιημένο Anacker και Ordal agar (AOA), *Flexibacter maritimus* medium (FMM), και τα δύο παρασκευάστηκαν με προσθήκη 50% θαλασσινό νερό και Marine agar (MA), (Πίνακας 2.6). Τα υποστρώματα αυτά χαρακτηρίζονται ως τα καταλληλότερα για την ανάπτυξη του μυξοβακτηριδίου *Tenacibaculum maritimum* και παρασκευάστηκαν σύμφωνα με μεθόδους που έχουν περιγραφεί προγενέστερα από τους Frerichs (1993), Pazos et al. (1996), Avendaño-Herrera et al. (2005) με την μόνη διαφορά ότι στην έρευνά μας, για την παρασκευή των τροποποιημένων AOA και FMM, χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες, 40%, 50%,

70% και 100% θαλασσινό νερό, ενώ οι Pazos και συνεργάτες (1996) αναφέρουν μόνο την προσθήκη 100% θαλασσινό νερό. Για την παρασκευή του MA, χρησιμοποιήθηκε αποσταγμένο νερό. Κάποια από τα δείγματα επίσης ενοφθαλμίστηκαν σε FMM broth.

Σύμφωνα με τους Avendaño-Herrera και συνεργάτες (2008) τα μυξοβακτηρίδια είναι ανθεκτικά στις κινολόνες και στην φλουμεκίνη, ενώ σύμφωνα με τον Pazos και συνεργάτες (1996) η χρήση νεομυκίνης συνιστάται για την απομόνωση του βακτηρίου. Έτσι, κατά τις πρώτες προσπάθειες καλλιέργειας, με σκοπό να εκτιμηθεί πιο θρεπτικό υπόστρωμα είναι πιο αποτελεσματικό και αναστέλλει την ανάπτυξη ανταγωνιστικών βακτηρίων, προστέθηκαν φλουμεκίνη συγκέντρωσης 2 ppm (2mg/lit) και νεομυκίνη συγκέντρωσης 4 ppm (4mg/lit) τόσο στο M.A όσο και στο F.M.M. και επώαστηκαν στους 19<sup>0</sup>C.

Αμέσως μετά τις πρώτες προσπάθειες καλλιέργειας, χρησιμοποιώντας ως διαλύτες, 40%, 70% και 100% θαλασσινό νερό για τα τροποποιημένα AOA και FMM υποστρώματα, αναπτύχθηκαν σωρείες κινητών και ακίνητων βακτηρίων με σχήμα κόκκων-κοκκοβάκιλων χωρίς να εμφανίζονται μυξοβακτηρίδια. Ενώ τα τροποποιημένα υποστρώματα AOA και FMM, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη 50% θαλασσινό νερό εμφάνισαν σαφώς βελτιωμένα αποτελέσματα από τις πρώτες 48 ώρες, καθώς παρατηρήθηκαν αρκετές αποικίες μυξοβακτηριδίων. Για αυτό το λόγο στην συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης μόνο 50% θαλασσινό νερό στο πρωτόκολλο παρασκευής των θρεπτικών υποστρωμάτων AOA και FMM.

Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 19 με 20<sup>0</sup>C, αντί για 25<sup>0</sup>C (Pazos et al., 1996), για 48 έως 72 ώρες, έως ότου αναπτυχθούν αποικίες. Η θερμοκρασία αυτή 19-20<sup>0</sup>C επιλέχθηκε, καθώς ήταν παρόμοια με την θερμοκρασία νερού στις μονάδες εκτροφής από όπου προήρθαν τα ψάρια και τα περισσότερα κλινικά περιστατικά ψαριών ύποπτων σε μυξοβακτηριδίαση, συλλέχθηκαν από κλωβούς/δεξαμενές με θερμοκρασία νερού από 16<sup>0</sup>C- 19<sup>0</sup>C. Βιβλιογραφικά αναφέρεται πως οι αποικίες εμφανίζονται 1-3 ημέρες μετά την σπορά (Pazos et al., 1996). Για αυτό τον λόγο ο μέγιστος χρόνος αναμονής για την εμφάνιση αποικιών μετά την σπορά ορίστηκε στις 7 ημέρες, χρόνος σχεδόν διπλάσιος της μέγιστης επώασης, για την εμφάνιση του φαινομένου. Μετά την αρχική καλλιέργεια, μεμονωμένες αποικίες τυπικές του *T. maritimum* ανακαλλιεργήθηκαν στις ίδιες συνθήκες επώασης. Όσα βακτήρια δεν εμφάνισαν αποικισμό στα θρεπτικά υποστρώματα, απορρίφθηκαν από την μελέτη ενώ τα υπόλοιπα όπου εμφάνισαν αποικισμό σε ένα, δύο ή σε όλα τα υποστρώματα, ανακαλλιεργήθηκαν. Οι καθαρές αποικίες του βακτηρίου, συλλέχθηκαν και

ακολούθησε η ταυτοποίηση με βάση τα φαινοτυπικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, σύμφωνα με τον Avendaño-Herrera και συνεργάτες (2004a) καθώς και η μοριακή ταυτοποίηση, σύμφωνα με τον Toyama και συνεργάτες (1996).

Ακολούθησε η διάνοιξη της κοιλιακής κοιλότητας με άσηπτη μέθοδο και η συλλογή δείγματος με αποστειρωμένο κρίκο από τον νεφρό και τον σπλήνα.

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι βακτηριολογικές εξετάσεις τα εν λόγω δείγματα νεφρού και σπλήνα, ενοφθαλμίστηκαν σε Tryptone Soy Agar (TSA)+2%NaCl, Thiosulphate Citrate Bile Salt Agar (TCBS), τροποποιημένο Anacker και Ordal agar (AOA), *Flexibacter maritimus* medium (FMM) και Marine agar (MA) (Williams et al., 1989).

Μετά την απόκτηση των καθαρών αποικιών από ανακαλλιέργειες, με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, ακολούθησαν δοκιμές για την ταυτοποίηση των βακτηριδίων (τεστ κινητικότητας, χρώση Gram & Giemsa, βιοχημική και μοριακή ταυτοποίηση), σύμφωνα με τις μεθόδους που έχουν περιγράψει οι Bernardet & Grimont (1989), Pazos και συνεργάτες (1993), Chen και συνεργάτες (1995), Kimberley (2004), Avendaño-Herrera και συνεργάτες (2004b).

Τα στελέχη των καθαρών καλλιεργειών μυξοβακτηριδίων, μετά την απομόνωση τους και την ταυτοποίησή τους, διατηρήθηκαν στην κατάψυξη, στους -80°C σε FMM broth με προσθήκη 18% (v/v) γλυκερόλη, σε τροποποιημένο AOA broth με προσθήκη 18% (v/v) γλυκερόλη και σε TSB broth με προσθήκη 18% (v/v) γλυκερόλη, με σκοπό την δημιουργία Τράπεζας Αναφοράς Μυξοβακτηριδίων από τις Ελληνικές, θαλάσσιες ιχθυοκαλλιέργειες.

**Πίνακας 2.6.** Σύσταση σε (g/l) των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη.

<b>Θρεπτικά Υποστρώματα</b>									
Συστατικά	FMM	FMM +F	FMM +N	MA	MA +F	MA +N	AOA	TSA +2%NaCl	TCBS
Tryptone	-			-			0.5		
Casein peptone								15.0	5.0
Soya peptone								5.0	5.0
Meat peptone									5.0
Yeast peptone									5.0
Peptone	5.0			5.0			-		
Yeast extract	0.5			1.0			0.5		
Gelatin	-			-			-		
Beef extract	-			-			0.2		

Sodium citrate									10.0
Sodium acetate	0.01			-			0.2		
Magnesium chloride	-			8.8			-		
Sodium chloride	-			19.45			-	5.0+20.0	10.0
Calcium chloride	-			1.8			-		
Potassium chloride	-			0.55			-		
Sodium bicarbonate	-			0.16			-		
Ferric citrate	-			0.1			-		1.0
Sodium sulphate	-			3.24			-		10.0
Potassium bromide	-			0.08			-		
Strontium chloride	-			0.034			-		
Boric acid	-			0.022			-		
Sodium silicate	-			0.004			-		
Sodium fluoride	-			0.0024			-		
Ammonium nitrate	-			0.0016			-		
Dipotassium phosphate									
Disodium phosphate	-			0.008			-		
Neomycin sulphate	-			-			-		
Flumiquine	-			-					
Ox bile									5.0
Sodium Cholate									3.0
Sucrose									20.0
Dextrose									
Brom thymol blue									0.04
Agar	15			15			15	15	14
Diluent	Θαλασσινό νερό 50%	Θαλασσινό νερό 50%	Θαλασσινό νερό 50%	Γλυκό νερό	Γλυκό νερό	Γλυκό νερό	Θαλασσινό νερό 50%	Γλυκό νερό	Γλυκό νερό
pH	7.2-7.4	7.2-7.4	7.2-7.4	7.2-7.4	7.2-7.4	7.2-7.4	7.2-7.4	7.2-7.4	8.5-8.7

Η αποστείρωση των θρεπτικών υποστρωμάτων πραγματοποιούνταν σε κλίβανο. FMM: *Flexibacter maritimus* medium, MA: Marine agar, AOA: τροποποιημένο Anacker και Ordal agar, F: φλουμεκίνη, N: νεομυκίνη, TSA: Tryptone Soy Agar, TCBS: Thiosulphate Citrate Bile Salt Agar



### 2.1.2.5 Μικροσκοπική εξέταση νωπών επιχρισμάτων και επιχρισμάτων μετά από χρώση Gram

#### Χρώση Gram

Για την καλύτερη μικροσκοπική παρατήρηση των μυξοβακτηριδίων και την πραγματοποίηση της Gram χρώσης, έγινε λήψη υλικού από σημεία του σώματος των ψαριών (δέρμα, βράγχια) καθώς και από τις αποικίες, την καλλιέργεια του προς ταυτοποίηση βακτηρίου. Για την Gram χρώση πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω στάδια:

1. Στέγνωμα του επιχρίσματος
2. Υδατικό διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους (1 min)
3. Ξέπλυμα με H<sub>2</sub>O απεσταγμένο
4. Διάλυμα ιωδίου (Lugol) (1 min)
5. Ξέπλυμα με H<sub>2</sub>O
6. Αποχρωματισμός με οινόπνευμα : ακετόνη, 1:1 (<10 sec)
7. Ξέπλυμα με H<sub>2</sub>O
8. Μεταχρωματισμός με υδατικό διάλυμα σαφρανίνης ( 1 min)
9. Ξέπλυμα με H<sub>2</sub>O
10. Στέγνωμα
11. Μικροσκόπηση (x 100 με καταδυτικό φακό)

Σημαντική η παρατήρηση πολλών οπτικών πεδίων (> 20) (Roberts, 1989)

Σε ορισμένα δείγματα από τις αποικίες των μυξοβακτηριδίων, πραγματοποιήθηκε και χρώση Giemsa.

#### Χρώση Giemsa (για νωπά παρασκευάσματα)

1. Στέγνωμα του επιχρίσματος
2. Μεθανόλη 2min
3. Χρώση σε αραιωμένο διάλυμα Giemsa (1 μέρος Giemsa σε 9 μέρη ρυθμιστικό διάλυμα, pH 6.8) για 1 ώρα
4. Ξέπλυμα με Μεθανόλη για 4 sec
5. Απιονισμένο νερό για 2-5min
6. Μεθανόλη για μερικά sec
7. 70% αλκοόλη για 1-2 min
8. Στέγνωμα

## 9. Μικροσκόπηση (x 100) με καταδυστικό φακό

Ρυθμιστικό διάλυμα:

Όξινο φωσφορικό δινάτριο 0.68gr

Δισόξινο φωσφορικό κάλιο 0.32gr

Απιονισμένο νερό 1000cm<sup>3</sup>

### 2.1.2.6 Βιοχημική ταυτοποίηση

Για τη ταυτοποίηση του βιοχημικού προφίλ των βακτηρίων επιλέχθηκαν καθαρές αποικίες από θυγατρικές καλλιέργειες. Προτιμήθηκαν αποικίες από το τρίτο και τέταρτο τεταρτημόριο των τριβλίων της ανακαλλιέργειας και όχι από το πρώτο ή δεύτερο τεταρτημόριο απ' όπου ξεκίνησε αρχικά η σπορά. Με αυτόν τον τρόπο, για κάθε περίπτωση λαμβάνεται δείγμα πιο εύκολα μιας και η επιλογή της αποικίας δεν γίνεται εντός του συνονθυλεύματος αποικιών του πρώτου και δευτέρου τεταρτημορίου και αφετέρου ελέγχεται το μέγεθος της αποικίας. Πριν από την έναρξη κάθε βιοχημικού ελέγχου, έγινε μικροσκοπικός και μακροσκοπικός έλεγχος των αποικιών για εξεταστούν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των αποικιών (χρώμα, υφή, μέγεθος και κινητικότητα των βακτηρίων, χρώση Gram), σύμφωνα με τους Bernardet et al. (1990) και Ostland et al. (1999).

Για τον έλεγχο του βιοχημικού προφίλ των βακτηρίων και τις βιοχημικές δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά αντιδραστήρια API 20E, API ZYM and API 50CH (biométrieux), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, με κάποιες τροποποιήσεις, που αφορούσαν την θερμοκρασία επώασης και τον διαλύτη του βακτηριακού εναιωρήματος. Αποστειρωμένο θαλασσινό νερό 50% χρησιμοποιήθηκε σαν διαλύτης, ενώ οι ταινίες επώαστηκαν στους 19°C και 25°C για 48 ώρες. Πρόκειται για τυποποιημένα συστήματα γρήγορης ταυτοποίησης, για αρνητικά κατά χρώση Gram βακτήρια, τα οποία χρησιμοποιούν έναν αριθμό μικρής κλίμακας βιοχημικών τεστ τα αποτελέσματα των οποίων συγκρίνονται με μια βάση δεδομένων. Στην περίπτωση του *T. maritimum* η βάση δεδομένων τόσο για το API 20E όσο και για τα υπόλοιπα δεν περιέχει το βακτήριο στις καταχωρήσεις, έτσι τα αποτελέσματα που θα προκύψουν, θα συγκριθούν τόσο μεταξύ τους όσο και βιβλιογραφικά για να επαληθευτεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων (Suzuki et al., 2001; Buller, 2004; Mouriño et al., 2008); Avendaño-Herrera, 2009), με σκοπό την διερεύνηση μιας

δυνατής ταξινόμησης των μυξοβακτηριδίων μέσω μοναδικών βιοχημικών χαρακτηριστικών.

Κάθε τέτοιο σύστημα ταυτοποίησης εξετάζει ξεχωριστά ένα σύνολο βιοχημικών συνιστωσών. Ωστόσο, κάποια από αυτά τα μεμονωμένα βιοχημικά τεστ συναντώνται σε δύο ή και παραπάνω συστήματα ταυτοποίησης (π.χ. GLU και MAN συναντώνται τόσο στο API 20E όσο και στο API ZYM). Συνολικά λοιπόν πραγματοποιήθηκε έλεγχος για 90 βιοχημικές αντιδράσεις. Εκτός από τις 90 βιοχημικές αντιδράσεις και τα συστήματα API έγινε περαιτέρω έλεγχος για χρώση Gram, τεστ κινητικότητας, τεστ οξειδάσης, τεστ καταλάσης, μείωση νιτρικών, απορρόφηση κόκκινου του Congo (με τοποθέτηση στις αποικίες 0.01% υδατικού διαλύματος της χρώσης) (Buller, 2004).

#### **2.1.2.6.1 API 20 E**

Το σύστημα βιοχημικής ταυτοποίησης API 20E, έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση κυρίως βακτηρίων Enterobacteriaceae και άλλων Gram αρνητικών βακτηρίων και πλέον χρησιμοποιείται πολύ συχνά για την ταυτοποίηση παθογόνων βακτηρίων των ψαριών.

Για τις βιοχημικές εξετάσεις τόσο για το API 20E όσο και για τα υπόλοιπες δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν ανακαλλιέργειες μικρού χρόνου επώασης (18-24h). Το τεστ API 20E περιλαμβάνει 20 βιοχημικές δοκιμές. Πρόκειται για τεστ με υποστρώματα και το οποίο μετά την εκτέλεση της δοκιμής και τη βαθμολόγησή της επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση του μικροβίου, σύμφωνα με τους Buller (2004), Avendaño-Herrera et al. (2004b, 2009).

Έγινε λήψη μιας και μόνο καλά ανεπτυγμένης αποικίας του προς ταυτοποίηση βακτηρίου και ενοφθαλμισμός σε σωλήνα 5ml, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη διάλυμα NaCl 0.85% ή NaCl 2% ή αποστειρωμένο θαλασσινό νερό 50%. Ακολούθησε συνεχής ανάδευση έως ότου την πλήρη ομογενοποίηση του εναιωρήματος. Στην συνέχεια, με μια αποστειρωμένη πιπέτα γεμίσαμε με το εναιώρημα όλες τις θήκες με τα αντιδραστήρια μέχρι το κοίλο μέρος χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες. Στα αντιδραστήρια ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S και URE πληρούμε τους σωληνίσκους μέχρι τον κορμό και καλύπτουμε με παραφίνη για να δημιουργηθούν αναερόβιες συνθήκες. Κλείσαμε τον δίσκο με το καπάκι και επώασαμε σε 2 θερμοκρασίες, 27°C και 19°C για 24h και 48h.

Μετά το πέρας του χρόνου επώασης καταγράψαμε όλα τα αποτελέσματα εκτός των τεστ TDA, IND και VP, στα οποία προσθέτουμε τα ανάλογα αντιδραστήρια σύμφωνα με τον κατασκευαστή για να προκύψει ο χρωματισμός που θα καθορίσει και το αποτέλεσμα της αντίδρασης. Εάν ο αριθμός των θετικών (+) αντιδράσεων είναι μικρότερος του 3 (συμπεριλαμβανομένου και της Γλυκόζης (GLU), τότε επωάζουμε για άλλες 24h. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ένας επταψήφιος αριθμός χαρακτηριστικός για το υπό μελέτη βακτήριο. Τα τεστ διαχωρίζονται σε ομάδες των 3 και δηλώνεται η τιμή 1, 2 ή 4 για κάθε τριάδα. Προσθέτοντας μαζί τις τιμές που ανταποκρίνονται στις θετικές αντιδράσεις για κάθε τριπλέτα, προκύπτει και ο επταψήφιος αριθμός από τα 20 συνολικά τεστ. Το τεστ οξειδάσης (OX) αποτελεί το 21ο τεστ και έχει την τιμή 4 εάν είναι θετικό. Στο τέλος προέκυψε ένας επταψήφιος αριθμός ο οποίος και προσδιόρισε το μικροβιακό στέλεχος, σύμφωνα και με τις οδηγίες χρήσης του κατασκευαστή (Porovic et al., 2007).

#### **2.1.2.6.2 API ZYM**

Το βιοχημικό σύστημα API ZYM έχει ξεκινήσει και αυτό να αποτελεί σημαντικό βιοχημικό εργαλείο για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών ωστόσο δεν αποτελεί κοινή πρακτική. Είναι χρήσιμο για βακτήρια κυρίως του γένους *Pasteurella* και ως διαγνωστικό εργαλείο είναι ικανό να διαφοροποιήσει ακόμα και είδη του ίδιου γένους βακτηρίων όταν ο φαινοτυπικός έλεγχος είναι αμφίβηλος.

Αποτελείται από 19 βιοχημικά τεστ (+ μάρτυρας) τα οποία παρουσιάζουν το ενζυματικό προφίλ του προς υπό εξέταση βακτηρίου. Η μέθοδος δεν βασίζεται τόσο στον χρωματισμό των αντιδραστηρίων όσο στην ένταση του χρώματος του αντιδραστηρίου. Για αυτό τον λόγο είναι πολύ σημαντική τόσο η ομογενοποίηση του αρχικού βακτηριακού διαλύματος όσο και η συγκέντρωση του. Συνίσταται συγκέντρωση  $48 \times 10^8$  CFU/ml (MacFarland 6).

Η προετοιμασία του δίσκου και των αντιδραστηρίων είναι παρόμοια με το βιοχημικό σύστημα API 20 E. Πρόκειται για ένα τεστ με γρήγορα αποτελέσματα καθώς ο χρόνος επώασης στους 25<sup>0</sup>C είναι 24h. (Sakai et al., 1993).

### **2.1.2.6.3 API 50CH**

Το βιοχημικό σύστημα API 50CH αποτελείται από 49 βιοχημικά τεστ από τα οποία προκύπτει η τάση των υπό μελέτη βακτηρίων για ζυμωτικές δραστηριότητες των υδρογονανθράκων. Με αυτόν τον τρόπο αυτό είναι ικανή ή παρατήρηση όχι μόνο της οξείδωσης που προκύπτει στους υδρογονάνθρακες αλλά και η αφομοίωση των υδρογονανθράκων από τα βακτήρια ως θρεπτικό μέσο ανάπτυξης.

Για την προετοιμασία των αντιδραστηρίων ακολουθείται παρόμοια διαδικασία με εκείνη για το API 20E και API ZYM, ωστόσο υπάρχουν κάποιες σημαντικές διαφορές. Αρχικά γίνεται προετοιμασία του δίσκου με προσθήκη 10ml αποσταγμένου νερού στην βάση του. Γίνεται καταγραφή του κωδικού του υπό εξέταση βακτηρίου με αδιάβροχο μαρκαδόρο και στην συνέχεια γίνεται διαχωρισμός της πλάκας με τα 49 αντιδραστήρια (+ μάρτυρας) σε πέντε πλάκες των 10 αντιδραστηρίων. Όλα μαζί τοποθετούνται στον δίσκο όπου και γίνεται ο ενοφθαλμισμός των θαλαμίσκων.

Η μεθοδολογία για την παρασκευή του βακτηριακού διαλύματος διαφοροποιείται των προηγούμενων μεθόδων. Από το θρεπτικό μέσο της ανακαλλιέργειας συγκομίζουμε όλες τις αποικίες από το τριβλίο με μάρτρο (swab) και τις μεταφέρουμε σε 10 ml διαλύματος API CHB/E Medium. Το τελικό βακτηριακό διάλυμα που πρέπει να προκύψει σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή πρέπει να έχει συγκέντρωση  $6 \times 10^8$  XFU/ml (θολερότητα 2 Macfarland) οπότε εάν χρειαστεί επεμβαίνουμε με διαδοχικές αραιώσεις.

Κατά τον ενοφθαλμισμό των 49 αντιδραστηρίων είναι σημαντικό να διατηρηθούν αναερόβιες συνθήκες. Οι σωληνίσκοι πρέπει να γεμίσουν πλήρως με βακτηριακό διάλυμα (κορμός και θόλος) ενώ κατά το τελευταίο στάδιο πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στο να μην δημιουργηθεί μηνίσκος στον τρούλο του θόλου του σωληνίσκου. Η επώαση γίνεται στους 30<sup>0</sup>C, για 48 ώρες (Porovic et al., 2007).

### **2.1.2.7 Παρασιτολογική εξέταση**

Τα ψάρια υποβλήθηκαν επίσης σε παρασιτολογική εξέταση. Κατά την παρασιτολογική εξέταση, εξετάστηκαν για παρασιτικούς οργανισμούς τα βράγχια, το δέρμα και ορισμένα εσωτερικά όργανα (εντερικός σωλήνας & χοληδόχος κύστη). Η παρασιτολογική εξέταση των ιχθύων πραγματοποιήθηκε σε νωπά και μονιμοποιημένα παρασκευάσματα σύμφωνα με τις μεθόδους που έχουν περιγράψει οι Roberts (1989) και Athanassopoulou (1990). Η ταυτοποίηση των παρασίτων έγινε

αμέσως μετά την ανεύρεσή τους, με την μικροσκοπική παρατήρηση των νωπών παρασκευασμάτων και σε συνδυασμό με τα μονιμοποιηθέντα παρασκευάσματα με βάση τις κλείδες των Yamagouti (1963), Athanassopoulou (1990).

### **2.1.2.8 Ιστοπαθολογική εξέταση**

Για την πραγματοποίηση της ιστοπαθολογικής εξέτασης, ιστοί από όλα τα εσωτερικά όργανα (καρδιά, έντερο, ήπαρ, νεφρούς και σπλήνα), το δέρμα, τα βράγχια, το κεφάλι και τους μυς των ιχθύων μονιμοποιήθηκαν με 10% ουδέτερη φορμόλη (Roberts, 1989). Μετά από γρήγορη απασβεστοποίηση και τον εμποτισμό των ιστών σε κύβους παραφίνης παρασκευάστηκαν ιστολογικές τομές οι οποίες, χρωματίστηκαν με χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη, σύμφωνα με γνωστή μεθοδολογία (Roberts, 1989). Σε ορισμένες περιπτώσεις όπου κρίθηκε απαραίτητο σε ιστολογικές τομές νεφρού και βραγχίων πραγματοποιήθηκαν και οι χρώσεις Giemsa και Gram, σύμφωνα με τους Drury & Wallington (1980). Στη συνέχεια και μετά την αφυδάτωση, διαύγαση και εμποτισμό τους σε παραφίνη (στάδια που πραγματοποιούνται με την συσκευή της ιστοκινέτας), εγκλείονται σε κύβους παραφίνης. Από τους κύβους αυτούς λαμβάνονται με την βοήθεια μικροτόμου τομές ιστών πάχους 3-5  $\mu\text{m}$ . Η χρώση που χρησιμοποιείται για την παρατήρηση στο μικροσκόπιο κοινού φωτισμού είναι αυτή της αιματοξυλίνης-εωσίνης (H&E) και Giemsa. Τα παρασκευάσματα χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη-εωσίνη και εξετάστηκαν στο μικροσκόπιο για εύρεση αλλοιώσεων.

#### Αιματοξυλίνη – Εωσίνη (για ιστολογικές τομές)

1. Εμβάπτιση σε ξυλόλη για 5 min.
2. Εμβάπτιση σε ξυλόλη για 5 min.
3. Εμβάπτιση σε απόλυτη αλκοόλη για 5 min.
4. Εμβάπτιση σε απόλυτη αλκοόλη για 5 min.
5. Εμβάπτιση σε αλκοόλη 96° για 1 min.
6. Εμβάπτιση σε αλκοόλη 96° για 1 min.
7. Εμβάπτιση σε αλκοόλη 70° για 1 min.
8. Ξέπλυμα με νερό για 1 min.
9. Χρώση με αιματοξυλίνη για 12 min.
10. Ξέπλυμα με νερό (τρεχούμενο) για 5 min.

11. Ώξινη αλκοόλη 1% για 1-2 εμβαπτίσεις.
12. Ξέπλυμα με νερό (τρεχούμενο) για 5 min.
13. Χρώση με εωσίνη για 10 min.
14. Ξέπλυμα με νερό βρύσης.
15. Αλκοόλη 70° για 1 εμβαπτίση.
16. Αλκοόλη 96° για 1 εμβαπτίση.
17. Αλκοόλη 96° για 2 εμβαπτίσεις.
18. Εμβάπτιση σε απόλυτη αλκοόλη για 2 min.
19. Απόλυτη αλκοόλη για 2 min.
20. Εμβάπτιση σε ξυλόλη για 2 min.
21. Ξυλόλη για 5 min. (Roberts, 1989)

#### **2.1.2.9 Αντιβιόγραμμα**

Για να διαπιστωθεί η ευαισθησία των μυξοβακτηριδίων στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκαν αντιβιογράμματα, από απομονωμένα στελέχη του *T. maritimum* σε επτά διαφορετικά αντιβιοτικά, για το λαβράκι και την τσιπούρα και για τις τέσσερες δειγματοληψίες.

Το αντιβιόγραμμα αποτελεί ένα είδος δοκιμασίας για την ταυτοποίηση των βακτηρίων, καθώς δίνεται η δυνατότητα να προσδιοριστεί η ανθεκτικότητα ή η ευαισθησία του μικροβιακού στελέχους σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά, καθώς και το κατάλληλο αντιβιοτικό που πρέπει να χορηγηθεί, αποφεύγοντας έτσι την αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών που οδηγεί στη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών. Ο έλεγχος της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά ενός στελέχους που απομονώνεται, συνήθως απαιτείται για τον αποτελεσματικό έλεγχο των μολύνσεων. Το αντιβιόγραμμα είναι απαραίτητο γιατί η ευρεία χρήση και αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών για την θεραπεία έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών. Το πρόβλημα της ανάπτυξης ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών στα αντιβιοτικά θεωρείται παγκόσμιο (Avendaño-Herrera, 2005a).

Κατά την εκτέλεση του αντιβιογράμματος δημιουργήθηκε ομογενοποιημένο εναιώρημα με δείγμα των μυξοβακτηριδίων με υλικό από καθαρή καλλιέργεια σε φυσιολογικό ορό. Στην συνέχεια, τοποθετήθηκε σε τρυβλία με τα θρεπτικά υπόστρωμα FMM, MA, τροποποιημένο AOA, ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο απομονώθηκε το κάθε στέλεχος και στην πορεία αφαιρέθηκε η περίσσεια

του διαλύματος. Σύμφωνα με τους Avendaño-Herrera και συνεργάτες (2005a) το FMM, θεωρείται ιδανικό υπόστρωμα για την πραγματοποίηση του αντιβιογράμματος, ωστόσο στην δική μας έρευνα, επιλέχθηκε κάθε φορά για το αντιβιογράμμα, το αντίστοιχο υπόστρωμα, στο οποίο απομονώθηκε το κάθε στέλεχος. Ακολούθησε η τοποθέτηση των δίσκων (Biomerieux) οι οποίοι ήταν εμποτισμένοι με αντιβιοτικό, διαμετρικά ώστε να υπάρχει χώρος δράσης για όλα τα αντιβιοτικά.

Η αντίσταση των στελεχών του *T. maritimum* καθορίστηκε με βάση το μέγεθος διαμέτρου του κύκλου αναστολής γύρω από το κάθε δίσκο. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν, σύμφωνα με τις οδηγίες της Εθνικής Επιτροπής για Κλινικά Εργαστηριακά Πρότυπα (NCCLS, 2001) ήταν:

1. Οξυτετρακυκλίνη (10μg) (TE10)
2. Τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (25μg) (SXT25)
3. Οξολινικό οξύ (2μg) (OA2)
4. Φλουμεκίνη (30μg) (UB30)
5. Νεομυκίνη (30μg) (N)
6. Βιμπριοστατικό, Vibriostatic (0.129)
7. Αμοξυκιλλίνη (10μg) (AML)

Τα τρυβλία επώαστηκαν ανεστραμμένα για 24-48 ώρες, στους 19-21°C και μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος ελέχθησαν οι κύκλοι αναστολής και μετρήθηκε η διάμετρος τους, σε mm. Το αντιβιοτικό με τον μεγαλύτερο κύκλο (δακτύλιο με μεγαλύτερη διάμετρο) ήταν και το καταλληλότερο και ανθεκτικότερο για τα μυξοβακτηρίδια. Ένα στέλεχος θεωρούνταν ανθεκτικό σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό, όταν δεν παρατηρούνταν κύκλος αναστολής, γύρω από το δίσκο.

#### **2.1.2.10 Απομόνωση Γενετικού υλικού**

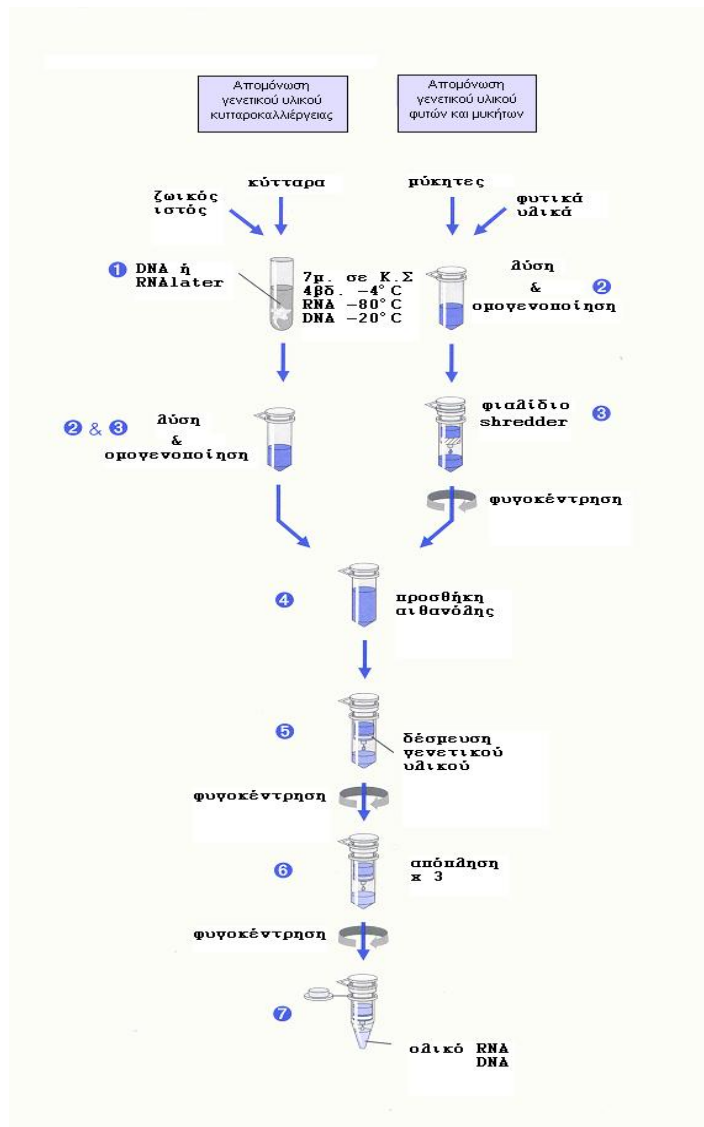
Η μοριακή ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιώντας ένα μοριακό πρωτόκολλο PCR. Το γενετικό υλικό (DNA) απομονώθηκε από καθαρές αποικίες καθώς και από δείγματα από εξωτερικές αλλοιώσεις, όπως δέρμα, βλεννογόνοι και βράγχια, με βαμβακοφόρο στείλεό ή με αποστειρωμένη λεπίδα.

Μετά την ανακαλλιέργεια, μεμονωμένες αποικίες τυπικές του *T. maritimum*, συγκομίστηκαν σύμφωνα με τον Toyama (1996), και διαλύθηκαν πλήρως σε διάλυμα ATL με πλήρη ομογενοποίηση. Η διαδικασία είναι παρόμοια ακόμη και στην περίπτωση όπου αντί για μεμονωμένες αποικίες χρησιμοποιούνται ιστοί (δέρμα,



βράγχια) των ψαριών. Λαμβάνεται μικρό μέρος ιστού από την μολυσμένη περιοχή και τοποθετείται σε φιαλίδιο Eppendorf όπου και ομογενοποιείται πλήρως. Στην συνέχεια προστίθενται 20μl πρωτεϊνάσης K. Απαιτούνται 2 περίπου ώρες για να δράσει η πρωτεϊνάση K. Στην συνέχεια το διάλυμα χρησιμοποιείται για απομόνωση του DNA χρησιμοποιώντας το εμπορικό DNeasy Tissue Kit της Qiagen. Το απομονωμένο πλέον DNA του κάθε βακτηρίου επαναδιαλύθηκε σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα όγκου 200μl, μέσα σε κρυοφιαλίδιο το οποίο και φυλάχτηκε στους -20°C. Σε όλη την διαδικασία χρησιμοποιείται αρνητικός μάρτυρας (απεσταγμένο νερό) και θετικός, μοριακά ταυτοποιημένος μάρτυρας, στέλεχος από προηγούμενη απομόνωση από λαβράκι (PROP.B4.LV) (Kolygas et al., 2012) και ένα στέλεχος αναφοράς (NCIMB 2154<sup>T</sup>) από την Εθνική Συλλογή Βιομηχανικών και Θαλάσσιων Βακτηρίων ,Αγγλία (NCIMB, Aberdeen, UK). Σε περίπτωση επιμόλυνσης στον αρνητικό μάρτυρα η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

Η μεθοδολογία, ακολουθήθηκε βάση του πρωτοκόλλου που εμπεριέχονταν στο εγχειρίδιο χρήσης του εμπορικού kit σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή (Σχεδιάγραμμα 2.1).



Σχεδιάγραμμα 2.1. Μεθοδολογία απομόνωσης γενετικού υλικού (Qiagen Handbook)

### 2.1.2.11 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση βακτηρίων *Tenacibaculum maritimum*

Μετά την απομόνωση του DNA ακολούθησε η ποσοτική ενίσχυση αυτού, δημιουργώντας αντίγραφα και μετατρέποντας το από αμελητέα μάζα σε επεξεργάσιμη ποσότητα μέσα από την τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).

Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εκείνοι οι οποίοι προτείνονται από τους Toyama και συνεργάτες (1996) και όχι από τους Bader- Shotts και συνεργάτες (1998), καθώς προκύπτουν καθαρά αμπλικόνια με λίγα τεχνάσματα (artifacts) (Avendaño-Herrera et al., 2004c). Στην περίπτωση της PCR για το *T.*

*maritimum* χρησιμοποιήθηκαν δύο δημοσιευμένα πρωτόκολλα (Avendaño-Herrera et al., 2004b και Toyama et al., 1996) στο οποίο έγιναν οι παρακάτω μετατροπές: Εν συντομία, χρησιμοποιήθηκαν 1.2μl Dmsο, Taq DNA πολυμεράση 0.3μl, 1μl εκκινητών, dNTP 0.5μl, PCR buffer 10x 2.5μl, MgCl<sub>2</sub> 1μl και 1μl από το απομονωμένο DNA. Στο μείγμα συμπληρώθηκε αποσταγμένο νερό (16.5μl) για τελικό όγκο διαλύματος 25μl.

Σε ότι αφορά την διαδικασία, προβλέπεται αρχικά συνεχής θέρμανση στους 94°C για 2 λεπτά, με σκοπό να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου και να ξεκινήσει η διαδικασία της αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA. Στην συνέχεια η PCR αποτελείται από 40 κύκλους **α)** 120 δευτέρων στους 94°C για την αποδιάταξη, **β)** 90 δευτέρων στους 45°C για την υβριδοποίηση και **γ)** 120 δευτέρων στους 72°C για την προέκταση και πλήρη σύνθεση του επιλεγμένου τμήματος DNA. Για τους διάφορους θερμοκύκλους της PCR χρησιμοποιήθηκε ο εγκεκριμένων προδιαγραφών θερμοκυκλοποιητής Centurion, Scientific Ltd.

Η επιλογή των εκκινητών έγινε βάση δημοσιευμένου πρωτοκόλλου (Toyama et al., 1996) το οποίο προέβλεπε χρήση των ολιγονουκλεοτιδίων **MAR<sub>1</sub>** (5'-AATGGCATCGTTTTAAA-3') και **MAR<sub>2</sub>** (5'-CGCTCTCTGTTGCCAGA-3') με μοριακά βάρη 2239 και 2167 αντίστοιχα. Οι δύο αυτοί εκκινητές ενισχύουν ένα τμήμα DNA (κλάσμα) 1088 νουκλεοτιδίων και σχεδιάστηκαν για την ανίχνευση του *T. maritimum*, χρησιμοποιώντας το 16S ριβοσωμικό RNA γονίδιο σαν στόχο.

Αποδιάταξη	Υβριδοποίηση	Προέκταση	Θερμικοί κύκλοι
120sec. στους 94°C	90sec. στους 45°C	120sec. στους 72°C	40

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί πως κατά τον οποιοδήποτε χειρισμό του γενετικού υλικού πριν και μετά την έναρξη της PCR, λαμβάνονταν ειδικά μέτρα προφύλαξης αφενός μεν της ακεραιότητας των δειγμάτων και αφετέρου του χειριστή, ώστε να μηδενιστεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης των δειγμάτων. Όλα τα υλικά απαιτείται να είναι αποστειρωμένα και ο πάγκος εργασίας απόλυτα καθαρός. Συνίσταται η χρήση στείρων αναλώσιμων πιπετών και ρυγχών πιπέτας (tips) με φίλτρο. Όλα αυτά τα μέτρα λαμβάνονται για να μειωθούν οι πιθανότητες επιμόλυνσης από κάποιο εξωγενές γενετικό υλικό, που θα μπορούσε κατά την PCR να αυξηθεί ποσοτικά και να προκαλέσει τεχνήματα, π.χ μη ειδική ενίσχυση. Μετά την PCR ακολούθησε η

ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων ποσοτικά δειγμάτων, σε 1% γέλη αγαρόζης και χρωματισμός με βρωμιούχο αιθίδιο (0.5 μg/mL) (Bio-Rad).

#### 2.1.2.12 Ηλεκτροφόρηση των DNA αμπλικονίων (PCR)

Ο εξοπλισμός που απαιτείται για την ηλεκτροφόρηση γέλης αγαρόζης είναι σχετικά απλός και περιλαμβάνει:

- Τον θάλαμο φόρτωσης και ηλεκτρικό τροφοδότη
- Μήτρα, χτένι
- Σκόνη αγαρόζης
- Δείκτη (ιχνηθέτης μεγέθους-ladder) 100bp
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-acetate-EDTA (TAE)
- Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει γλυκερόλη και μπλε της βρωμοφαινόλης (loading buffer). Το διάλυμα αυτό συνοδεύει τα κλάσματα, διευκολύνοντας τα να βυθιστούν μέσα στους θαλαμίσκους της γέλης και ταυτόχρονα να χρωματιστούν.
- Φθορίζουσα βαφή βρωμιούχου αιθιδίου
- Πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας (Transilluminator)

Αρχικά, για την δημιουργία της γέλης (1% κ.β), διαλύθηκαν 1gr σκόνης αγαρόζης σε 100ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE, TAE 1X (Tris 0.04 M, EDTA 0.001 M, pH 8), και προστέθηκαν 5μl βρωμιούχου αιθιδίου για να μπορούν τα αμπλικόνια μετά την ηλεκτροφόρηση να φθορίζουν κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Στην συνέχεια το μείγμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου να διαλυθεί η αγαρόζη πλήρως. Το καυτό πλέον διάλυμα αγαρόζης χύνεται μέσα στη μήτρα για να στερεοποιηθεί και να δημιουργηθεί το πήκτωμα. Σημειώνεται πως θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί επαρκής ποσότητα διαλύματος αγαρόζης για πήκτωμα πάχους 3-4 mm. Αφού κρύωσε και είχε πλέον μετατραπεί σε συνεκτική μάζα, βυθίστηκε στο θάλαμο φόρτωσης σε πλήρη εμβάπτιση ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1X. Στην συνέχεια αφαιρέθηκε προσεκτικά το χτένι και άρχισε η διαδικασία φόρτωσης των αμπλικονίων. 20μl από κάθε αμπλικόνιο αναμίχθηκε με 3μl loading Buffer, και τα 23μl συνολικά μεταφέρθηκαν στους θαλαμίσκους φόρτωσης του πηκτώματος. Στον τελευταίο εναπομείναντα θαλαμίσκο φορτώθηκαν 8μl δείκτη ladder (ιχνηθέτη

μεγέθους). Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ξεκίνησε με την παροχή ηλεκτρικού ρεύματος στο σύστημα.

Τα αμπλικόνια του DNA έχουν αρνητικό συνολικό φορτίο έτσι όταν βρεθούν μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο πολώνονται και κινούνται προς την άνοδο μέσα από την γέλη. Όπως είναι φυσικό τα αμπλικόνια με μεγάλο μοριακό βάρος κινούνται πιο αργά μέσα από την γέλη, συγκριτικά με τα μικρότερα κλάσματα. Έτσι μετά την πάροδο χρόνου επιτυγχάνεται διωλισμός αυτών.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρθηκε κάτω από πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας όπου τα φθορίζοντα αμπλικόνια συγκρίθηκαν με τον δείκτη. Ο δείκτης αποτελούνταν από 11 διαφορετικού μοριακού βάρους κλάσματα μεταξύ 100 και 1500bp. Τα αμπλικόνια εκείνα που ήταν αρνητικά αυτόματα απορρίφθηκαν και η έρευνα πλέον συνεχίστηκε με την μελέτη μόνο των θετικών δειγμάτων. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρθηκε κάτω από πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας 302nm για να εμφανιστούν τα φθορίζοντα αμπλικόνια. Με μια χειρουργική λεπίδα προσεκτικά απομονώνεται η περιοχή του πηκτώματος που περιέχει το αμπλικόνιο του σωστού μεγέθους προσέχοντας να μην συμπαρασυρθούν παρακείμενα γενετικά θραύσματα είτε από την ίδια στήλη είτε από γειτονικές. Για τον διαχωρισμό και την τελική απόσταξη του DNA από την πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό QIAquick Gel extraction kit της Qiagen.

## **2.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Tenacibaculum maritimum* ΣΕ ΙΧΘΥΔΙΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ**

### **2.2.1 Σκοπός των πειραματικών μολύνσεων**

Οι πειραματικές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τον έλεγχο της παθογόνου δράσης των απομονωμένων βακτηριδιακών στελεχών *T. maritimum* στα πιο ευαίσθητα είδη. Οι πειραματικές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού, με στελέχη καθαρών μυξοβακτηριδίων, που απομονώθηκαν κατά τις εποχιακές δειγματοληψίες.

### 2.2.2 Εξέταση των ψαριών πριν την έναρξη των πειραμάτων

Για τον σκοπό αυτό, μεταφέρθηκαν και προσαρμόστηκαν υγιή ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού στις δεξαμενές και στα ενυδρεία του εργαστηρίου Ιχθυοπαθολογίας. Όλα τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες των πειραμάτων, μεταφέρθηκαν στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου της Κτηνιατρικής Σχολής στην Καρδίτσα από μια μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας στην περιοχή της Φθιώτιδας και αρχικά εγκλιματίστηκαν για 10 ημέρες. 10% του συνολικού αριθμού των ιχθυδίων αυτών, υποβλήθηκαν σε πλήρη ιχθυοπαθολογικό έλεγχο. Πριν την έναρξη των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογική (δέρμα, βράγχια, νεφρός) και παρασιτολογική εξέταση (Roberts, 1989), όπου και διαπιστώθηκε ότι τα ψάρια είναι υγιή και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις πειραματικές διαδικασίες. Τα ψάρια εγκλιματίστηκαν γρήγορα και δέχθηκαν την ξηρά τροφή. Όλες οι ομάδες των πειραμάτων ακολούθησαν το ίδιο διατροφικό πρωτόκολλο, ταΐζονταν καθημερινά σε ποσότητα, 1.5% του σωματικού τους βάρους.

### 2.2.3 Πειραματική μόλυνση ιχθύων με τα παθογόνα στελέχη *Tenacibaculum maritimum*

Για την πραγματοποίηση των πειραματικών μολύνσεων και για να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση βακτηρίων, πραγματοποιήθηκαν από τα στελέχη που προκάλεσαν τις περισσότερες αλλοιώσεις και θνησιμότητα (τα πιο λοιμογόνα) κατά τις εποχιακές δειγματοληψίες, διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού δείγματος.

Για τις πειραματικές μολύνσεις χρησιμοποιήθηκαν υγιείς τσιπούρες και λαβράκια. Τα ψάρια χωρίστηκαν σε ομάδες, με κατάλληλους μάρτυρες αντίστοιχα. Η πειραματική μόλυνση έγινε από τις καθαρές ταυτοποιημένες καλλιέργειες των μικροβίων μετά από κατάλληλη ανακαλλιέργεια. Για κάθε ένα από τα βακτήρια έγινε δοκιμαστική καταμέτρηση με τη μέθοδο των πολλαπλών αραιώσεων και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πάλι ανακαλλιέργεια υπό τις ίδιες συνθήκες. Έγιναν κατάλληλες αραιώσεις και στη συνέχεια οι ενοφθαλμισμοί/εμβαπτύνσεις των ψαριών σε προκαθορισμένες συγκεντρώσεις βακτηριδίων. Ο ακριβής αριθμός των ενοφθαλμισμένων βακτηριδίων έγινε με βάση την διεθνή βιβλιογραφία (Jandlinger et al., 1997; Avendano-Herrera et al., 2006a). Τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις δοκιμές της λοιμογόνου δύναμης αναπτύχθηκαν από αυτά που προέκυψαν από τα

ετοιμοθάνατα ψάρια των κλινικών περιστατικών (δίοδοι για την ανάκτηση της παθογένειας).

Επιλέχθηκαν καθαρές ταυτοποιημένες καλλιέργειες των μυξοβακτηριδίων και με την μέθοδο των πολλαπλών αραιώσεων, πραγματοποιήθηκαν οι ενοφθαλμισμοί των ιχθυδίων σε προκαθορισμένες συγκεντρώσεις βακτηριδίων. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν αρχικά πειραματικές μολύνσεις σε μικρό αριθμό ιχθυδίων με στελέχη καθαρών μυξοβακτηριδίων.

Τους μήνες: Μάιο, Ιούνιο και Ιούλιο του 2012, πραγματοποιήθηκαν οι πειραματικές μολύνσεις στα ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού στις δεξαμενές και στα ενυδρεία του εργαστηρίου Ιχθυοπαθολογίας, με στελέχη καθαρών μυξοβακτηριδίων. Τον μήνα Μάιο πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μολύνσεις σε μικρό αριθμό ιχθυδίων (10 τσιπούρες, 10 λαβράκια) με στελέχη καθαρών μυξοβακτηριδίων, σε προκαθορισμένες συγκεντρώσεις βακτηριδίων,  $1.0 \times 10^6$  *Tenacibaculum maritimum* cells/ml. Οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση και με εμφύσηση. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τις δοκιμές της λοιμογόνου δύναμης είναι αυτά που απομονώθηκαν από τα ετοιμοθάνατα ψάρια των κλινικών περιστατικών (δίοδοι για την ανάκτηση της παθογένειας) και προκάλεσαν τις περισσότερες παθολογικές αλλοιώσεις και θνησιμότητα.

Στηριζόμενοι, στα πρώτα αποτελέσματα πειραματικών μολύνσεων του Μαΐου, τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από πειραματικές μολύνσεις σε ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού, που είχαν διάρκεια από 10-06-12 έως 15-07-12. Για αυτούς τους πειραματισμούς τα ιχθύδια χωρίστηκαν σε ομάδες, με τους κατάλληλους μάρτυρες αντίστοιχα, ενώ καθημερινά καταγράφονταν η θερμοκρασία του νερού, το διαλυμένο οξυγόνο, το pH, η αμμωνία και η θνησιμότητα των ιχθυδίων.

### **2.2.3.1 1<sup>η</sup> Πειραματική Μόλυνση**

Για τις ανάγκες του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 30 ιχθύδια τσιπούρας, βάρους 4-10gr. Τα ιχθύδια χωρίστηκαν σε 3 ομάδες, από 10 ιχθύδια η κάθε ομάδα. Στο πρώτο πείραμα πραγματοποιήθηκε πειραματική μόλυνση σε 20 ιχθύδια τσιπούρας με το στέλεχος 4TS16/01/12a.10 M.A.-SKIN-4.5 που είχε απομονωθεί κατά την 4<sup>η</sup> δειγματοληψία.

Στην 1<sup>η</sup> ομάδα πραγματοποιήθηκε μόλυνση με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση, 0.1ml NS (φυσιολογικό ορό), με συγκέντρωση βακτηρίων από  $1.0 \times 10^6$  cells/ml έως  $1.5 \times 10^6$  cells/ml κύτταρα του βακτηρίου σε 10 ιχθύδια τσιπούρας. Προηγήθηκε αναισθητοποίηση με φαινοξυαιθανόλη, σε δόση 0.2-0.3ml/lit. Στην 2<sup>η</sup> ομάδα πραγματοποιήθηκε μόλυνση με εμβάπτιση για 18 ώρες, από  $1.0 \times 10^6$  cells/ml έως  $1.5 \times 10^6$  cells/ml σε 10 ιχθύδια τσιπούρας. Κατά την διάρκεια της εμβάπτισης, υπήρχε παροχή οξυγόνου στο νερό με το διάλυμα της εμβάπτισης. Η εμβάπτιση πραγματοποιήθηκε με την τοποθέτηση των ψαριών μέσα σε μια δεξαμενή με θαλασσινό νερό το οποίο περιείχε ζωντανά βακτήρια στη συγκέντρωση που αναφέρθηκε. Η 3<sup>η</sup> ομάδα, αποτελούνταν από 10 ιχθύδια στα οποία δεν έγινε πειραματική μόλυνση και αποτέλεσαν τον μάρτυρα.

Κάθε ομάδα, διατηρήθηκε σε ενυδρεία των 250lt νερού, με σύστημα ανακύκλωσης του νερού και βιολογικά φίλτρα (Εικόνες 2.2.3.1.1. & 2.2.3.1.2.). Η θερμοκρασία του νερού ήταν  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Η διάρκεια παρακολούθησης της πειραματικής μόλυνσης για κλινικά συμπτώματα και θνησιμότητα, ήταν 10 ημέρες, από 20/05/12 έως 30/05/12.



Εικόνες 2.2.3.1.1. & 2.2.3.1.2. Ενυδρεία των 250lt νερού, που χρησιμοποιήθηκαν για τις πειραματικές μολύνσεις

Στο πρώτο πείραμα πραγματοποιήθηκε επίσης πειραματική μόλυνση σε 30 ιχθύδια λαβρακιού, βάρους 2-4gr με το στέλεχος 4LV16/01/12a.7 FMM-GILLS- K4 που είχε απομονωθεί κατά την 4<sup>η</sup> δειγματοληψία. Τα ιχθύδια χωρίστηκαν σε 3 ομάδες, από 10 ιχθύδια η κάθε ομάδα. Στην 1<sup>η</sup> ομάδα πραγματοποιήθηκε μόλυνση με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση, 0.1ml NS (φυσιολογικό ορό), με συγκέντρωση βακτηρίων από  $1.0 \times 10^6$  cells/ml έως  $1.5 \times 10^6$  cells/ml κύτταρα του βακτηρίου σε 10 ιχθύδια λαβρακιού. Προηγήθηκε αναισθητοποίηση με φαινοξυαιθανόλη. Στην 2<sup>η</sup> ομάδα



πραγματοποιήθηκε μόλυνση με εμβάπτιση για 18 ώρες, από  $1.0 \times 10^6$  cells/ml έως  $1.5 \times 10^6$  cells/ml σε 10 ιχθύδια λαβρακιού. Η 3<sup>η</sup> ομάδα, αποτελούνταν από 10 ιχθύδια στα οποία δεν έγινε πειραματική μόλυνση και αποτέλεσαν τον μάρτυρα.

Κάθε ομάδα, διατηρήθηκε σε ενυδρεία των 250lt νερού (Εικόνα 2.2.3.1.3). Η θερμοκρασία του νερού ήταν  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  και για τις 3 ομάδες. Η διάρκεια παρακολούθησης της πειραματικής μόλυνσης για κλινικά συμπτώματα και θνησιμότητα, ήταν 10 ημέρες, από 20/05/12 έως 30/05/12.



Εικόνα 2.2.3.1.3. Ενυδρείο των 250lt νερού, που χρησιμοποιήθηκε για τις πειραματικές μολύνσεις

### 2.2.3.2 2<sup>η</sup> Πειραματική Μόλυνση

Για τις ανάγκες του δεύτερου πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 80 ιχθύδια τσιπούρας, βάρους 4-10gr. Τα ιχθύδια χωρίστηκαν σε 2 ομάδες, από 40 ιχθύδια η κάθε ομάδα. Πιο συγκεκριμένα, στο δεύτερο πείραμα, με βάση τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος, πραγματοποιήθηκε πειραματική μόλυνση σε 40 ιχθύδια τσιπούρας, βάρους 4-10gr με το στέλεχος 4TS16/01/12a.10 M.A.-SKIN-4.5 που είχε απομονωθεί κατά την 4<sup>η</sup> δειγματοληψία. Στην 1<sup>η</sup> ομάδα πραγματοποιήθηκε μόλυνση με εμβάπτιση για 18 ώρες, από  $1.0 \times 10^6$  cells/ml έως  $1.5 \times 10^6$  cells/ml, σε 40 ιχθύδια τσιπούρας. Η 2<sup>η</sup> ομάδα, αποτελούνταν από 40 υγιή ιχθύδια στα οποία δεν έγινε πειραματική μόλυνση και αποτέλεσαν τον μάρτυρα.

Κάθε ομάδα, διατηρήθηκε σε ενυδρεία των 250lt νερού. Η θερμοκρασία του νερού ήταν  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  °C και στις δύο περιπτώσεις. Η διάρκεια παρακολούθησης της πειραματικής μόλυνσης για κλινικά συμπτώματα και θνησιμότητα, ήταν 30 ημέρες, από 15/06/12 έως 15/07/12.

Για τις ανάγκες του δεύτερου πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν επίσης 80 ιχθύδια λαβρακιού. Τα ιχθύδια χωρίστηκαν σε 2 ομάδες, από 40 ιχθύδια η κάθε

ομάδα. Με βάση τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος, πραγματοποιήθηκε επίσης πειραματική μόλυνση σε 40 ιχθύδια λαβρακιού, βάρους 2-4gr με το στέλεχος 4LV16/01/12a.7 FMM-GILLS-K4 που είχε απομονωθεί κατά την 4<sup>η</sup> δειγματοληψία. Στην 1<sup>η</sup> ομάδα πραγματοποιήθηκε μόλυνση με εμβάπτιση για 18 ώρες, από  $1.0 \times 10^6$  cells/ml έως  $1.5 \times 10^6$  cells/ml, σε 40 ιχθύδια λαβρακιού. Η 2<sup>η</sup> ομάδα, αποτελούνταν από 40 υγιή ιχθύδια στα οποία δεν έγινε πειραματική μόλυνση και αποτέλεσαν τον μάρτυρα.

Κάθε ομάδα, διατηρήθηκε σε ενυδρεία των 250lt νερού. Η θερμοκρασία του νερού ήταν  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  και στις δύο περιπτώσεις. Η διάρκεια παρακολούθησης της πειραματικής μόλυνσης για κλινικά συμπτώματα και θνησιμότητα, ήταν 30 ημέρες, από 15/06/12 έως 15/07/12 (Πίνακας 2.7).

**Πίνακας 2.7.** Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου μόλυνσης με το μυξοβακτηρίδιο *T. maritimum* σε ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού.

<b>1<sup>η</sup> πειραματική μόλυνση</b>		
	30 ιχθύδια τσιπούρας, 4-10gr	30 ιχθύδια λαβρακιού, 2-4gr
1 <sup>η</sup> ομάδα: Ενδοπεριτοναϊκή έγχυση	10	10
2 <sup>η</sup> ομάδα: Εμβάπτιση για 18 ώρες	10	10
3 <sup>η</sup> ομάδα: Μάρτυρας	10	10
<b>2<sup>η</sup> πειραματική μόλυνση</b>		
	80 ιχθύδια τσιπούρας, 4-10gr	80 ιχθύδια λαβρακιού, 2-4gr
1 <sup>η</sup> ομάδα: Εμβάπτιση για 18 ώρες	40	40
2 <sup>η</sup> ομάδα: Μάρτυρας	40	40

#### 2.2.4 Εξέταση των πειραματικά μολυσμένων ιχθύων

Όλα τα νεκρά ψάρια απομακρύνονταν από κάθε ενυδρείο, καταγράφονταν και υποβάλλονταν σε μικροβιολογική εξέταση για να επιβεβαιωθεί ότι το *T.maritimum* ήταν το υπεύθυνο αίτιο της θνησιμότητας, σύμφωνα με την μέθοδο που έχει περιγράψει ο Avendaño-Herrera και συνεργάτες (2004, 2006a). Από τα ψάρια που

ήταν ετοιμοθάνατα, στις πειραματικές μολύνσεις θα απομονωθεί εκ νέου ο αντίστοιχος παθογόνος παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε επιβεβαιώνοντας την παθογονικότητά του.

Η ταυτοποίηση των στελεχών μυξοβακτηριδίων από τις πειραματικές μολύνσεις των ψαριών, πραγματοποιήθηκε με τις κλασσικές, βιοχημικές και μοριακές μεθόδους, με τελικό σκοπό, την ταυτοποίηση, κωδικοποίηση και ταξινόμηση των απομονωθέντων μυξοβακτηριδίων.

Επιχρίσματα, νωπά ή μετά από χρώση Gram από δέρμα, βράγχια και αλλοιώσεις υποβλήθηκαν σε μικροσκοπική εξέταση. Δείγματα από δέρμα, βράγχια και νεφρό ενοφθαλμίστηκαν σε FMM, MA και τροποποιημένο AOA και επώαστηκαν στους 19-20°C, για 48 έως 72 ώρες, σύμφωνα με την μέθοδο των Pazos et al. (1996) και Avendaño-Herrera et al. (2004c).

Για να εκτιμηθεί η πιθανή απελευθέρωση του *T. maritimum* από τα ψάρια που μολύνθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση, λαμβάνονταν επίσης δείγματα νερού από το κάθε ενυδρείο. Τα δείγματα νερού λαμβάνονταν από τα ενυδρεία, 6 ώρες μετά την εμφάνιση των ψαριών, για βακτηριολογική ανάλυση. Το νερό σε κάθε ενυδρείο άλλαζε μετά την δειγματοληψία για βακτηριολογική ανάλυση, καθώς και μέρα παρά μέρα για την απομάκρυνση των περιττωμάτων.

Επίσης, δείγματα από ιστούς των ψαριών (δέρμα, βλέννα, βράγχια) και από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν υποβλήθηκαν σε απομόνωση DNA και PCR για την ανίχνευση και ταυτοποίηση του *T. maritimum*, σύμφωνα με τους Cepeda et al (2003) και Avendano-Herrera et al. (2004c). Για την μοριακή ταυτοποίηση χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης γενετικού υλικού από το *T. maritimum* όπως προκύπτει από τον Toyama (1996). Η επιλογή των εκκινητών έγινε βάση δημοσιευμένου πρωτοκόλλου (Toyama et al., 1996) το οποίο προέβλεπε χρήση των ολιγονουκλεοτιδίων **MAR<sub>1</sub>** (5'-AATGGCATCGTTTAAA-3') και **MAR<sub>2</sub>** (5'-CGCTCTCTGTTGCCAGA-3') με μοριακά βάρη 2239 και 2167 αντίστοιχα. Οι δύο αυτοί εκκινητές ενισχύουν ένα τμήμα DNA (κλάσμα) 1088 νουκλεοτιδίων.

Επιπλέον από τα μολυσμένα ιχθύδια, λαμβάνονταν δείγματα για ιστοπαθολογικές εξετάσεις με σκοπό την ιστοπαθολογική διερεύνηση των πειραματικά μολυσμένων ψαριών και για να εκτιμηθεί η ιστοπαθολογική εικόνα των αλλοιώσεων που προκαλούν τα μυξοβακτηρίδια στα πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια. Για την ιστοπαθολογική διερεύνηση των πειραματικών ψαριών, ελήφθησαν για ιστοπαθολογικές εξετάσεις δείγματα από δέρμα, βράγχια και νεφρό. Στη συνέχεια

και μετά την αφυδάτωση, διαύγαση και εμπότισή τους με παραφίνη, (στάδια που πραγματοποιούνται με τη συσκευή Histokinette), εγκλείστηκαν σε κύβους παραφίνης. Από τους κύβους αυτούς ελήφθησαν με τη βοήθεια μικροτόμου τομές ιστών πάχους 3-5μm. Η χρώση που χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση στο μικροσκόπιο κοινού φωτισμού είναι αυτή της Αιματοξυλίνης-Εωσίνης και Giemsa (Drury & Wallington, 1980; Roberts, 1989).

Ελήφθησαν επίσης φωτογραφίες από τις μακροσκοπικές αλλοιώσεις των ψαριών καθώς και από τα ιστολογικά παρασκευάσματα, με σκοπό την τελική εκτίμηση τους.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η κωδικοποίηση για τα ταυτοποιημένα, παθογόνα στελέχη μυξοβακτηριδίων καθώς και η αποθήκευσή τους στους -80°C. Τα παθογόνα βακτηρίδια που ταυτοποιήθηκαν με όλες τις μεθόδους που αναφέρθηκαν και στα οποία αποδείχτηκε η παθογονικότητά τους αποθηκεύτηκαν σε Cryo-bille tubes και διατηρήθηκαν στην κατάψυξη στους -80°C και κάποια σε λυοφιλοποιημένη μορφή. Για την κωδικοποίηση χρησιμοποιήθηκε το βακτηριδιακό είδος και οι κωδικοί που χρησιμοποιήθηκαν για το αντίστοιχο περιστατικό.

## **2.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΙΝΗΣ Τ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΗΣ ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΣΗΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΣΕ ΤΣΙΠΟΥΡΕΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΑ**

### **2.3.1 Σκοπός των πειραματικών εμβαπτίσεων με υπεροξείδιο του υδρογόνου και χλωραμίνη-T**

Η παρούσα μελέτη εξετάζει αν το υπεροξείδιο του υδρογόνου και η χλωραμίνη-T μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση της μυξοβακτηριδίασης σε πειραματικά μολυσμένα ψάρια, με σκοπό την χρήση αυτών των 2 αντισηπτικών διαλυμάτων για την πρόληψη και/ή έλεγχο εξάρσεων του νοσήματος στα ψάρια. Για τη διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης και των αποτελεσμάτων του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T, διενεργήθηκαν δυο κύριοι πειραματισμοί, σε ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού.

Κατά τον πρώτο πειραματισμό εξετάστηκε η επίδραση των 2 αντισηπτικών σε ιχθύδια τσιπούρας και κατά τον δεύτερο πειραματισμό εξετάστηκε η επίδραση τους σε ιχθύδια λαβρακιού.

Η χρήση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T δοκιμάζονται ως υποσχόμενες μέθοδοι για την αντιμετώπιση της νόσου, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν απολυμαντικά, αντισηπτικά για την αντιμετώπιση πολλών εξωπαρασίτων, βακτηρίων και μυκήτων των ψαριών σύμφωνα με τον Avendaño-Herrera et al. (2006a).

Στα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας για την έρευνα της αποτελεσματικότητας των 2 ουσιών, επιλέξαμε τις τσιπούρες και τα λαβράκια, τα οποία καλλιεργούνται σε ευρεία κλίμακα στις θαλάσσιες ιχθυοκαλλιέργειες, στην Ελλάδα.

Με σκοπό τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των δύο διαλυμάτων (υπεροξείδιο υδρογόνου, χλωραμίνη-T), στην αντιμετώπιση της μυξοβακτηριδίασης, πραγματοποιήθηκαν εμβαπτίσεις με τις δύο ουσίες, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στα πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια. Με βάση την βιβλιογραφία, σχετικά με την χρήση και τις δοσολογίες του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T για την αντιμετώπιση νοσημάτων στα ψάρια, πραγματοποιήθηκαν εμβαπτίσεις πειραματικά μολυσμένων ιχθυδίων τσιπούρας (2 επαναλήψεις) και λαβρακιών (3 επαναλήψεις) με: υπεροξείδιο του υδρογόνου στην δόση: 200ppm/30min και χλωραμίνη-T στην δόση: 12-15ppm/60min, με εμβάπτιση (Rach et al. 1997; Speare et al. 1999; Bowker et al., 2000; Montgomery-Brock et al. 2001; Mansell et al. 2005; Avendaño-Herrera et al., 2006a; Russo et al. 2007; Cruz-Lacierda et al., 2012) (Πίνακας 2.8).

**Πίνακας 2.8.** Επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T, στην αντιμετώπιση της νόσου της μυξοβακτηριδίασης, μετά από πειραματικές μολύνσεις σε τσιπούρες και λαβράκια.

<b>1<sup>η</sup> πειραματική μόλυνση</b> 60 ιχθύδια τσιπούρας, 4.5-7gr		<b>2<sup>η</sup> πειραματική μόλυνση</b> 120 ιχθύδια λαβρακιού, 2-4gr	
<b>1<sup>η</sup> Ομάδα: 2</b> εμβαπτίσεις με υπεροξείδιο του υδρογόνου, σε	10 μολυσμένα ιχθύδια τσιπούρας	<b>1<sup>η</sup> Ομάδα: 3</b> εμβαπτίσεις με υπεροξείδιο του υδρογόνου, ανά 2	40 μολυσμένα ιχθύδια λαβρακιού

διάστημα 10 ημερών μεταξύ τους		ημέρες μεταξύ τους	
<b>2<sup>η</sup> Ομάδα:</b> 2 εμβαπτίσεις με χλωραμίνη-T, σε διάστημα 10 ημερών μεταξύ τους	10 μολυσμένα ιχθύδια τσιπούρας	<b>2<sup>η</sup> Ομάδα:</b> 3 εμβαπτίσεις με χλωραμίνη-T, ανά 2 ημέρες μεταξύ τους	40 μολυσμένα ιχθύδια λαβρακιού
<b>3<sup>η</sup> Ομάδα:</b> Θετικός Μάρτυρας (T.POSITIVE = T.P), δεν έγινε καμία θεραπεία με εμβάπτιση	10 μολυσμένα ιχθύδια τσιπούρας	<b>3<sup>η</sup> Ομάδα:</b> Θετικός μάρτυρας, στα οποία δεν έγινε καμία θεραπεία με εμβάπτιση	40 μολυσμένα ιχθύδια λαβρακιού
<b>4<sup>η</sup> Ομάδα:</b> Αρνητικός Μάρτυρας (T.NEGATIVE = T.N.H), έγινε θεραπεία με υπεροξειδίο του υδρογόνου	10 υγιή ιχθύδια τσιπούρας		
<b>5<sup>η</sup> Ομάδα:</b> Αρνητικός Μάρτυρας (T.NEGATIVE = T.N.C), έγινε θεραπεία με χλωραμίνη-T	10 υγιή ιχθύδια τσιπούρας		
<b>6<sup>η</sup> Ομάδα:</b> Μάρτυρας (ΜΑΡΤΥΡΕΣ: T.M)	10 υγιή ιχθύδια τσιπούρας		

### 2.3.1.1 1<sup>η</sup> Πειραματική Μόλυνση

Με την πειραματική μόλυνση και εμβάπτιση, εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα των δύο αντισηπτικών διαλυμάτων, του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T στην θεραπευτική αντιμετώπιση πειραματικά μολυσμένων ιχθυδίων τσιπούρας. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 60 ιχθύδια τσιπούρας, βάρους 4.5-7gr, τα οποία χωρίστηκαν σε 6 ομάδες, από 10 ιχθύδια η κάθε ομάδα. Πραγματοποιήθηκε πειραματική μόλυνση με εμβάπτιση για 18 ώρες, από  $1.0 \times 10^6$  cells/ml έως  $1.5 \times 10^6$  cells/ml, στα 30 ιχθύδια τσιπούρας, βάρους 4.5-7gr με το στέλεχος 4TS16/01/12a.10 M.A.-SKIN-4.5 που είχε απομονωθεί κατά την 4<sup>η</sup>

δειγματοληψία, στις 15/06/12. Τα 30 μολυσμένα ιχθύδια χωρίστηκαν σε 3 ομάδες, από 10 ιχθύδια η κάθε ομάδα.

Στην 1<sup>η</sup> ομάδα με τα 10 μολυσμένα ιχθύδια τσιπούρας, πραγματοποιήθηκαν 2 εμβαπτίσεις με υπεροξείδιο του υδρογόνου, σε διάστημα 10 ημερών μεταξύ τους. Στην 2<sup>η</sup> ομάδα με τα 10 μολυσμένα ιχθύδια τσιπούρας, πραγματοποιήθηκαν 2 εμβαπτίσεις με χλωραμίνη-T, σε διάστημα 10 ημερών μεταξύ τους. Η 3<sup>η</sup> ομάδα, αποτελούνταν από 10 μολυσμένα με μυξοβακτηρίδια ιχθύδια τσιπούρας, τα οποία αποτέλεσαν τον θετικό μάρτυρα (T.POSITIVE = T.P) και στα οποία δεν έγινε καμία θεραπεία με εμβάπτιση. Η 4<sup>η</sup> ομάδα, αποτελούνταν από 10 υγιή ιχθύδια τσιπούρας, τα οποία αποτέλεσαν τον αρνητικό μάρτυρα (T.NEGATIVE = T.N.H) και στα οποία έγινε θεραπεία με υπεροξείδιο του υδρογόνου, εφαρμόζοντας το ίδιο πρωτόκολλο. Η 5<sup>η</sup> ομάδα, αποτελούνταν από 10 υγιή ιχθύδια τσιπούρας, τα οποία αποτέλεσαν τον αρνητικό μάρτυρα (T.NEGATIVE = T.N.C) και στα οποία έγινε θεραπεία με χλωραμίνη-T, εφαρμόζοντας το ίδιο πρωτόκολλο, με παραπάνω. Η 6<sup>η</sup> ομάδα, αποτελούνταν από 10 υγιή ιχθύδια τσιπούρας, τα οποία αποτέλεσαν τον Μάρτυρα (MARTYPEΣ: T.M).

**1<sup>η</sup> Ομάδα:** 10 μολυσμένα ιχθύδια τσιπούρας, 2 εμβαπτίσεις με υπεροξείδιο του υδρογόνου, σε διάστημα 10 ημερών μεταξύ τους.

**2<sup>η</sup> Ομάδα:** 10 μολυσμένα ιχθύδια τσιπούρας, 2 εμβαπτίσεις με χλωραμίνη-T, σε διάστημα 10 ημερών μεταξύ τους.

**3<sup>η</sup> Ομάδα:** 10 μολυσμένα με μυξοβακτηρίδια ιχθύδια τσιπούρας, Θετικός Μάρτυρας (T.POSITIVE = T.P), στα οποία δεν έγινε καμία θεραπεία με εμβάπτιση.

**4<sup>η</sup> Ομάδα:** 10 υγιή ιχθύδια τσιπούρας, Αρνητικός Μάρτυρας (T.NEGATIVE = T.N.H), στα οποία έγινε θεραπεία με υπεροξείδιο του υδρογόνου, εφαρμόζοντας το ίδιο πρωτόκολλο.

**5<sup>η</sup> Ομάδα:** 10 υγιή ιχθύδια τσιπούρας, Αρνητικός Μάρτυρας (T.NEGATIVE = T.N.C), στα οποία έγινε θεραπεία με χλωραμίνη-T, εφαρμόζοντας το ίδιο πρωτόκολλο.

**6<sup>η</sup> Ομάδα:** 10 υγιή ιχθύδια τσιπούρας, Μάρτυρας (MARTYPEΣ: T.M).

- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (35% = 35gr - 100ml), 1ppm = 1mg/1lt

1<sup>η</sup> Εμβάπτιση: 20/06/12. 200ppm/40min = 200mg - 1lt/40min

2<sup>η</sup> Εμβάπτιση: 30/06/12. 200ppm/30min

- Χλωραμίνη-Τ

1<sup>η</sup> Εμβάπτιση: 20/06/12. 15ppm/60min = 15mg - 1lt/60min

2<sup>η</sup> Εμβάπτιση: 30/06/12. 12ppm/60min = 12mg - 1lt/60min

Από την 4<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> ομάδα των μαρτύρων δεν προέκυψαν νεκρά ιχθύδια, σε όλη την διάρκεια της παρακολούθησης του πειράματος. Κάθε ομάδα, διατηρήθηκε σε ενυδρεία των 250lt νερού. Η θερμοκρασία του νερού ήταν 21±2°C. Η διάρκεια παρακολούθησης της πειραματικής μόλυνσης για κλινικά συμπτώματα και θνησιμότητα, ήταν 20 ημέρες, από 20/06/12 έως 10/07/12.

### 2.3.1.2 2<sup>η</sup> Πειραματική Μόλυνση

Κατά την δεύτερη πειραματική μόλυνση και εμβάπτιση, εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα των δύο αντισηπτικών διαλυμάτων, του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-Τ στην θεραπευτική αντιμετώπιση πειραματικά μολυσμένων ιχθυδίων λαβρακιού. Για τον λόγο αυτό, 120 ιχθύδια λαβρακιού, βάρους 2-4gr χωρίστηκαν σε 3 ομάδες, από 40 ιχθύδια η κάθε ομάδα. Πραγματοποιήθηκε πειραματική μόλυνση με εμβάπτιση για 18 ώρες, από 1.0x10<sup>6</sup> cells/ml έως 1.5x10<sup>6</sup> cells/ml, στα 120 ιχθύδια λαβρακιού, με το στέλεχος 4LV16/01/12a.7 FMM-GILLS-K4 που είχε απομονωθεί κατά την 4<sup>η</sup> δειγματοληψία, στις 15/06/12. Στην 1<sup>η</sup> ομάδα με τα 40 μολυσμένα ιχθύδια λαβρακιού, πραγματοποιήθηκαν 3 εμβαπτίσεις με υπεροξείδιο του υδρογόνου, ανά 2 ημέρες μεταξύ τους. Στην 2<sup>η</sup> ομάδα με τα 40 μολυσμένα ιχθύδια λαβρακιού, πραγματοποιήθηκαν 3 εμβαπτίσεις με χλωραμίνη-Τ, ανά 2 ημέρες μεταξύ τους. Η 3<sup>η</sup> ομάδα, αποτελούνταν από 40 μολυσμένα με μυξοβακτηρίδια ιχθύδια λαβρακιού, τα οποία αποτέλεσαν τον θετικό μάρτυρα και στα οποία δεν έγινε καμία θεραπεία με εμβάπτιση.

**1<sup>η</sup> Ομάδα:** 40 μολυσμένα ιχθύδια λαβρακιού, 3 εμβαπτίσεις με υπεροξείδιο του υδρογόνου, ανά 2 ημέρες μεταξύ τους.

**2<sup>η</sup> Ομάδα:** 40 μολυσμένα ιχθύδια λαβρακιού, πραγματοποιήθηκαν 3 εμβαπτίσεις με χλωραμίνη-Τ, ανά 2 ημέρες μεταξύ τους.

**3<sup>η</sup> Ομάδα:** 40 μολυσμένα με μυξοβακτηρίδια ιχθύδια λαβρακιού, Θετικός μάρτυρας, στα οποία δεν έγινε καμία θεραπεία με εμβάπτιση.

- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (35% = 35gr - 100ml), 1ppm = 1mg/1lt



1<sup>η</sup> Εμβάπτιση: 15/06/12. 200ppm/40min = 200mg - 1lt/40min

2<sup>η</sup> Εμβάπτιση: 17/06/12. 200ppm/30min

3<sup>η</sup> Εμβάπτιση: 19/06/12. 200ppm/30min

- Χλωραμίνη-Γ

1<sup>η</sup> Εμβάπτιση: 15/06/12. 15ppm/60min = 15mg - 1lt/60min

2<sup>η</sup> Εμβάπτιση: 17/06/12. 12ppm/60min = 12mg - 1lt/60min

3<sup>η</sup> Εμβάπτιση: 19/06/12. 12ppm/60min = 12mg - 1lt/60min

Κάθε ομάδα, διατηρήθηκε σε ενυδρεία των 250lt νερού. Η θερμοκρασία του νερού ήταν  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Η διάρκεια παρακολούθησης της πειραματικής μόλυνσης για κλινικά συμπτώματα και θνησιμότητα, ήταν 30 ημέρες, από 15/06/12 έως 15/07/12.

### 2.3.2 Εξέταση των πειραματικά μολυσμένων ιχθύων, μετά τις εμβαπτίσεις των ουσιών

Τα ψάρια παρατηρούνταν για αλλαγές στην συμπεριφορά και θνησιμότητα. Όλα τα νεκρά ψάρια απομακρύνονταν από κάθε ενυδρείο, καταγράφονταν και υποβάλλονταν σε μικροβιολογική εξέταση για να διαπιστωθεί η παρουσία ή απουσία του *T. maritimum*, σύμφωνα με την μέθοδο που έχει περιγράψει ο Avendaño-Herrera και συνεργάτες (2004, 2006a). Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με τα δύο αντισηπτικά διαλύματα, υπολογίστηκε με βάση τον αριθμό των νεκρών ψαριών, συγκριτικά με τους μάρτυρες.

Επιχρίσματα, νωπά ή μετά από χρώση Gram από δέρμα, βράγχια και αλλοιώσεις των νεκρών και ετοιμοθάνατων ψαριών, υποβλήθηκαν σε μικροσκοπική εξέταση. Δείγματα από δέρμα και βράγχια ενοφθαλμίστηκαν σε FMM, MA και τροποποιημένο AOA και επώαστηκαν στους  $19-20^{\circ}\text{C}$ , για 48 έως 72 ώρες σύμφωνα με τους Pazos et al. (1996), Avendaño-Herrera et al. (2004c). Λαμβάνονταν επίσης δείγματα νερού από το κάθε ενυδρείο, για βακτηριολογική ανάλυση.

Επιπλέον από τα ιχθύδια, ελήφθησαν δείγματα για ιστοπαθολογικές εξετάσεις με σκοπό την ιστοπαθολογική διερεύνηση των πειραματικά μολυσμένων ψαριών και για να εκτιμηθεί η ιστοπαθολογική εικόνα των αλλοιώσεων (Drury & Wallington, 1980; Roberts, 1989).

## **2.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (LC50) ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΙΝΗΣ Τ, ΣΕ ΙΧΘΥΔΙΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ**

### **2.4.1 Σκοπός των πειραματικών εμβαπτίσεων με υψηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου και χλωραμίνης-T, για τον προσδιορισμό της (LC50)**

Πραγματοποιήθηκαν πειραματικές εμβαπτίσεις σε ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού, με σκοπό τον έλεγχο της μέγιστης, θανατηφόρας συγκέντρωσης των δύο φαρμακευτικών ουσιών (υπεροξείδιο υδρογόνου, χλωραμίνη-T). Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν εμβαπτίσεις με υψηλές συγκεντρώσεις των δύο ουσιών, ώστε να διαπιστωθεί η μέγιστη συγκέντρωση που είναι ικανή να προκαλέσει τον θάνατο σε 50% ενός πληθυσμού ιχθυδίων δοκιμής.

Προσδιορίστηκε η μεσαία θανατηφόρα συγκέντρωση (Lethal Concentration 50) (LC50), των δύο αντισηπτικών διαλυμάτων, του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T, δηλ. η συγκέντρωση των δύο διαλυμάτων στην οποία πεθαίνει το 50% ενός πληθυσμού ιχθυδίων δοκιμής κατά την διάρκεια ενός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος. Η μεσαία θανατηφόρα συγκέντρωση (LC50) σε διαφορετικές περιόδους έκθεσης και συγκεντρώσεις, υπολογίστηκε με βάση την μέθοδο Reed & Muench (1938). Τα ψάρια τα οποία επιβίωσαν στο τέλος των πειραμάτων, σκοτώθηκαν με υπερβολική χορήγηση αναισθητικού διαλύματος. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων, καταγράφονταν επίσης και οι παράμετροι του νερού.

#### **2.4.1.1 1<sup>η</sup> Πειραματική Εμβάπτιση**

Για τον λόγο αυτό, 30 ιχθύδια τσιπούρας, βάρους 8.5-12gr χωρίστηκαν σε 3 ομάδες, από 10 ιχθύδια η κάθε ομάδα. Στην 1<sup>η</sup> ομάδα, πραγματοποιήθηκαν εμβαπτίσεις με υψηλή συγκέντρωση με υπεροξείδιο του υδρογόνου. Στην 2<sup>η</sup> ομάδα, πραγματοποιήθηκαν εμβαπτίσεις με υψηλή συγκέντρωση με χλωραμίνη-T. Η 3<sup>η</sup> ομάδα, αποτελούνταν από 10 υγιή ιχθύδια τσιπούρας, τα οποία αποτέλεσαν τον θετικό μάρτυρα.

Προηγήθηκαν πειράματα σε μικρό αριθμό ιχθυδίων τσιπούρας, 6 ιχθύδια σε κάθε ομάδα, στην οποία δοκιμάζονταν η κάθε συγκέντρωση, με διαφορετικές συγκεντρώσεις των 2 ουσιών σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Rach et al. 1997; Speare

et al. 1999; Bowker et al., 2000; Montgomery-Brock et al. 2001; ; Mansell et al. 2005; Avendaño-Herrera et al., 2006a; Russo et al. 2007; Cruz-Lacierda et al., 2012) για να καταλήξουμε στην συγκέντρωση που θεωρήθηκε θανατηφόρος. Συγκεκριμένα για το Υπεροξειδίο Υδρογόνου, η συγκέντρωση άρχισε από τα 480ppm έως 700ppm, ενώ για την Χλωραμίνη T, η συγκέντρωση άρχισε από τα 50ppm έως 120ppm.

**1<sup>η</sup> Ομάδα:** 10 ιχθύδια τσιπούρας, εμβαπτίσεις με υψηλή συγκέντρωση με υπεροξειδίο του υδρογόνου.

**2<sup>η</sup> Ομάδα:** 10 ιχθύδια τσιπούρας, εμβαπτίσεις με υψηλή συγκέντρωση με χλωραμίνη-T.

**3<sup>η</sup> Ομάδα:** 10 υγιή ιχθύδια τσιπούρας, θετικός μάρτυρας.

- Υπεροξειδίο του υδρογόνου (35% = 35gr - 100ml), 1ppm = 1mg/1lt  
Θεραπευτική συγκέντρωση: 200ppm/30-40min = 200mg - 1lt/40min

- Χλωραμίνη-T  
Θεραπευτική συγκέντρωση: 12-15ppm/60min = 15mg - 1lt/60min

Κάθε ομάδα, διατηρήθηκε σε ενυδρεία των 250lt νερού. Η θερμοκρασία του νερού ήταν  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Η διάρκεια παρακολούθησης του πειράματος, ήταν 10 ημέρες, από 10/09/12 έως 20/09/12.

#### 2.4.1.2 2<sup>η</sup> Πειραματική Εμβάπτιση

Κατά την 2<sup>η</sup> πειραματική εμβάπτιση, προσδιορίστηκε η μεσαία θανατηφόρα συγκέντρωση (Lethal Concentration 50) (LC50), των δύο αντισηπτικών διαλυμάτων, του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T, δηλ. η συγκέντρωση των δύο διαλυμάτων στην οποία πεθαίνει το 50% ενός πληθυσμού ιχθυδίων λαβρακιού δοκιμής κατά την διάρκεια ενός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος. Στηριζόμενοι στα αποτελέσματα της 1<sup>ης</sup> πειραματικής εμβάπτισης, στα ιχθύδια τσιπούρας για τις 48 h, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συγκεντρώσεις: για το υπεροξειδίο του υδρογόνου, τα 640ppm/30min και για την χλωραμίνη-T, τα 80ppm/60min., με σκοπό να διερευνηθεί

αν αυτές οι ίδιες συγκεντρώσεις προκαλούν επίσης το θάνατο σε 50% του πληθυσμού των λαβρακιών, στις 48 h.

Για τον λόγο αυτό, 60 ιχθύδια λαβρακιού, βάρους 4.5-8gr χωρίστηκαν σε 3 ομάδες, από 20 ιχθύδια η κάθε ομάδα. Στην 1<sup>η</sup> ομάδα, πραγματοποιήθηκαν εμβαπτίσεις με υψηλή συγκέντρωση με υπεροξειδίο του υδρογόνου. Στην 2<sup>η</sup> ομάδα, πραγματοποιήθηκαν εμβαπτίσεις με υψηλή συγκέντρωση με χλωραμίνη-T. Η 3<sup>η</sup> ομάδα, αποτελούνταν από 20 υγιή ιχθύδια λαβρακιού, τα οποία αποτέλεσαν τον θετικό μάρτυρα.

Προηγήθηκαν πειράματα σε μικρό αριθμό ιχθυδίων λαβρακιού, 6 ιχθύδια σε κάθε ομάδα, στην οποία δοκιμάζονταν η κάθε συγκέντρωση, με διαφορετικές συγκεντρώσεις των 2 ουσιών σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Rach et al. 1997; Speare et al. 1999; Bowker et al., 2000; Montgomery-Brock et al. 2001; Mansell et al. 2005; Avendaño-Herrera et al., 2006a; Russo et al. 2007; Cruz-Lacierda et al., 2012) για να καταλήξουμε στην συγκέντρωση που θεωρήθηκε θανατηφόρος. Συγκεκριμένα για το Υπεροξειδίο Υδρογόνου, η συγκέντρωση άρχισε από τα 480ppm έως 700ppm, ενώ για την Χλωραμίνη T, η συγκέντρωση άρχισε από τα 50ppm έως 120ppm.

**1<sup>η</sup> Ομάδα:** 20 ιχθύδια λαβρακιού, εμβαπτίσεις με υψηλή συγκέντρωση με υπεροξειδίο του υδρογόνου.

**2<sup>η</sup> Ομάδα:** 20 ιχθύδια λαβρακιού, εμβαπτίσεις με υψηλή συγκέντρωση με χλωραμίνη-T.

**3<sup>η</sup> Ομάδα:** 20 υγιή ιχθύδια λαβρακιού, θετικός μάρτυρας.

- Υπεροξειδίο του υδρογόνου (35% = 35gr - 100ml), 1ppm = 1mg/1lt  
Θεραπευτική συγκέντρωση: 200ppm/30-40min = 200mg - 1lt/40min

- Χλωραμίνη-T  
Θεραπευτική συγκέντρωση: 12-15ppm/60min = 15mg - 1lt/60min

Κάθε ομάδα, διατηρήθηκε σε ενυδρεία των 250lt νερού. Η θερμοκρασία του νερού ήταν  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Η διάρκεια παρακολούθησης του πειράματος, ήταν 10 ημέρες, από 10/09/12 έως 20/09/12 (Πίνακας 2.9).

**Πίνακας 2.9.** Προσδιορισμός της θανατηφόρου συγκέντρωσης (LC50) του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T, σε ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού.

<b>1<sup>η</sup> πειραματική εμφύπτιση</b>		<b>2<sup>η</sup> πειραματική εμφύπτιση</b>	
30 ιχθύδια τσιπούρας, 8.5-12gr		60 ιχθύδια λαβρακιού, 4.5-8gr	
<b>1<sup>η</sup> ομάδα:</b> εμβάπτισεις με υψηλή συγκέντρωση με υπεροξείδιο του υδρογόνου	10 ιχθύδια	<b>1<sup>η</sup> ομάδα:</b> εμβάπτισεις με υψηλή συγκέντρωση με υπεροξείδιο του υδρογόνου	20 ιχθύδια
<b>2<sup>η</sup> ομάδα:</b> εμβάπτισεις με υψηλή συγκέντρωση με χλωραμίνη-T	10 ιχθύδια	<b>2<sup>η</sup> ομάδα:</b> εμβάπτισεις με υψηλή συγκέντρωση με χλωραμίνη-T	20 ιχθύδια
<b>3<sup>η</sup> ομάδα:</b> υγιή ιχθύδια θετικό μάρτυρα	10 ιχθύδια	<b>3<sup>η</sup> ομάδα:</b> υγιή ιχθύδια θετικό μάρτυρα	20 ιχθύδια

## 2.5 Εφαρμογή στην πράξη

Με βάση τα πρώτα αποτελέσματα από τις πειραματικές μολύνσεις και εμφάπτισεις, εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της χλωραμίνης-T στην θεραπευτική αντιμετώπιση μολυσμένων με μυξοβακτηρίδια ιχθυδίων τσιπούρας, σε μια μονάδα εκτροφής, στην περιοχή της Στυλίδας, με βάση τα αποτελέσματα των πειραματικών μας μολύνσεων. Η εφαρμογή της θεραπείας με εμφάπτισεις με χλωραμίνη-T πραγματοποιήθηκε σε μια δεξαμενή, χωρητικότητας 50m<sup>3</sup> που περιείχε περίπου 25.000 ιχθύδια τσιπούρας, βάρους 1gr. Τα ιχθύδια τσιπούρας εμφάνισαν θνησιμότητα 2% και έπειτα από την πραγματοποίηση μικροβιολογικών εξετάσεων αποδείχθηκε πως ήταν μολυσμένα με μυξοβακτηρίδια.

Πραγματοποιήθηκαν 2 εμφάπτισεις με χλωραμίνη-T ανά 2 ημέρες, σε συγκέντρωση 12ppm/60min. Η θερμοκρασία του νερού ήταν 17-18°C. Η διάρκεια παρακολούθησης των πειραματικών εμφάπτισεων για κλινικά συμπτώματα και θνησιμότητα, ήταν 10 ημέρες, από 16/02/13 έως 26/02/13.

- Χλωραμίνη-T

1<sup>η</sup> Εμφάπτιση: 16/02/13. 12ppm/60min = 12mg - 1lt/60min

2<sup>η</sup> Εμφάπτιση: 18/02/13. 12ppm/60min = 12mg - 1lt/60min

## 2.6 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκαν η Ανάλυση της Διακύμανσης (ANOVA), ο έλεγχος τετραγώνου X παράγοντα (Chi square-test) και ο έλεγχος t-test. Το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε στο  $\alpha=0.05$ . Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα Statistix. 8.1 και οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές για  $P < 0.05$ .

Ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των στατιστικά σημαντικών διαφορών των επιπέδων προσβολής από το μυξοβακτηρίδιο *T. maritimum* σε εκτρεφόμενους πληθυσμούς θαλάσσιων ψαριών στην Ελλάδα και προκειμένου να εκτιμηθεί η στατιστική σημαντικότητα στις αλλαγές του ποσοστού μόλυνσης από το *T. maritimum* ανάλογα με την εποχικότητα.

Για να εκτιμηθεί η σύνδεση παρουσίας και η συσχέτιση εμφάνισης του βακτηρίου *T. maritimum* ανά εποχική δειγματοληψία (4 εποχιακές δειγματοληψίες) και ανά είδος ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση, με σκοπό να διαπιστωθεί πως μεταβλήθηκαν τα ποσοστά προσβολής χρονικά ανά δειγματοληψία στα ίδια είδη ψαριών. Έπειτα εκτιμήθηκε η συσχέτιση εμφάνισης του ποσοστού προσβολής του βακτηρίου με τη παράλληλη εμφάνιση παρασίτων καθώς και το ποσοστό εμφάνισης του βακτηρίου *T. maritimum* για το σύνολο των υπό εξέταση ιχθύων αλλά και για το κάθε είδος χωριστά (λαβράκι, τσιπούρα, λυθρίνι, φαγκρί, μυλοκόπι, μυτάκι, συκιός).

Για την σύγκριση του μεγέθους, βάρους των ψαριών και του ποσοστού προσβολής από το βακτήριο (λαβράκι, τσιπούρα, λυθρίνι) πραγματοποιήθηκε έλεγχος τετραγώνου X παράγοντα (Chi square-test).

Επίσης εκτιμήθηκαν στατιστικά τα ποσοστά διαφοροποίησης του βιοχημικού προφίλ του βακτηρίου στο σύνολο των ιχθύων, ανεξάρτητα από το είδος όπου εντοπίστηκε.

Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα των θρεπτικών υποστρωμάτων, καταγράφηκαν οι μέσοι συντελεστές ικανότητας απομόνωσης που παρουσίασαν τα θρεπτικά υποστρώματα σε κάθε δειγματοληψία, για κάθε είδος και μονάδα ξεχωριστά. Για την σύγκριση ικανότητας απομόνωσης του *T. maritimum* από τα θρεπτικά υποστρώματα ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή Δειγματοληψίας και για να εξασφαλιστούν με ασφάλεια τα αποτελέσματα της μηδενικής υπόθεσης, διενεργήθηκαν 2 ξεχωριστοί έλεγχοι (t-test). Στον πρώτο έλεγχο συγκρίθηκαν τα

αποτελέσματα για τα είδη όπου μόνο σε αυτά υπήρχαν δεδομένα και από τις δύο περιοχές, ενώ στον δεύτερο έλεγχο συμπεριελήφθησαν όλα τα είδη.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση, για την σύγκριση ικανότητας απομόνωσης του *T. maritimum* από τα θρεπτικά υποστρώματα ανάλογα με το όργανο απομόνωσης (δέρμα, βράγχια, σπλήνας, νεφρός) και έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης παραγόντων με αλληλεπίδραση για την τελική σύγκριση δειγματοληψιών ανά όργανο απομόνωσης.

Όσον αφορά τις πειραματικές μολύνσεις στα ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού, πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι t-test δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις, για την σύγκριση της αποτελεσματικότητας του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T, με σκοπό να εκτιμηθεί αν υπάρχει σημαντικά στατιστική διαφορά μεταξύ των θνησιμοτήτων των ιχθυδίων.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>**

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



### **3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΟΧΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΟ *Tenacibaculum maritimum* ΣΕ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ**

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τεσσάρων (4) εποχιακών δειγματοληψιών που έγιναν σε εκτρεφόμενα είδη θαλάσσιων ψαριών σε διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, με σκοπό να εκτιμηθεί η κατάσταση της μυξοβακτηριδίασης στην χώρα μας, να διερευνηθεί η παρουσία του βακτηρίου *T. maritimum* ανά εποχή και ανά είδος ψαριού, καθώς επίσης και αν αυτά τα στελέχη εμφανίζουν παρόμοιο βιοχημικό προφίλ, εντός των ελληνικών συνόρων.

#### **3.1.1 Μακροσκοπική και Νεκροτομική εξέταση**

Κατά την μακροσκοπική και νεκροτομική εξέταση, τα ασθενή ιχθύδια και δείγματα ψαριών που έφεραν αλλοιώσεις, κατά τις τέσσερες (4) εποχιακές δειγματοληψίες, εμφάνισαν κοινή συμπτωματολογία. Τα κλινικά συμπτώματα και αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στα ψάρια ήταν: ανορεξία, καχεξία, λήθαργος, ερυθρότητα του στόματος, αιμορραγίες στις γνάθους, αιμορραγική στοματίτιδα, αποχρωματισμός δέρματος, ωχροκίτρινες νεκρωτικές αλλοιώσεις στο δέρμα, στα πτερύγια και στην ουρά, υπεραιμία στα πτερύγια, διάβρωση της ουράς και των πτερυγίων και σε ορισμένες περιπτώσεις νέκρωση στα βράγχια (Εικόνες 3.1.1.1.-3.1.1.23.) Σε όλα τα δείγματα, δεν παρατηρήθηκαν, αλλοιώσεις σε εσωτερικά όργανα, με εξαίρεση τα δείγματα από το μυλοκόπι. Στο μυλοκόπι, το έντερο εμφάνισε εικόνα εντερίτιδας με ορώδες κίτρινο περιεχόμενο, σε ένα μεγάλο αριθμό ιχθύων (36/60) από κάθε δειγματοληψία.

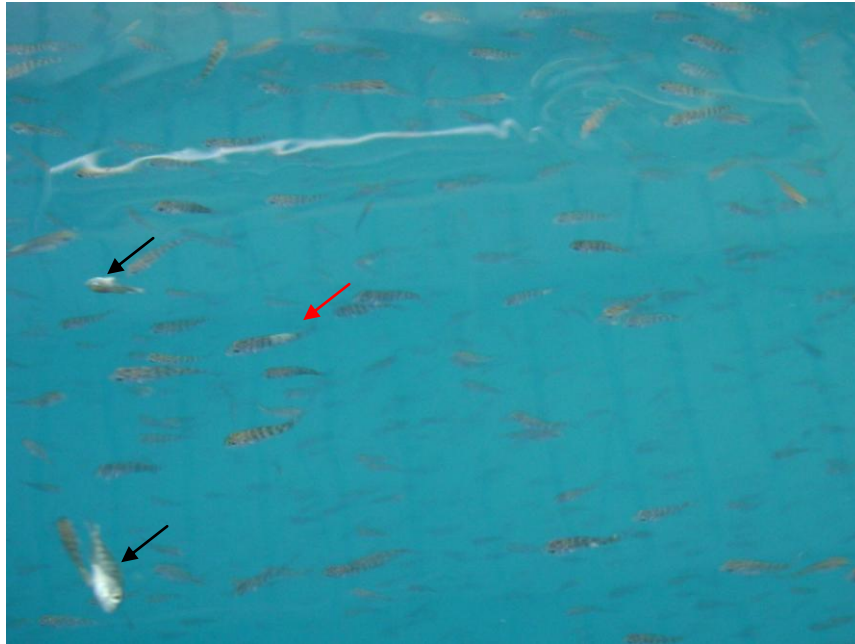
Η θνησιμότητα, στις περιπτώσεις εμφάνισης της νόσου κυμαίνονταν 5-10%, φτάνοντας το 20-30% σε κάποιες περιπτώσεις, επί του συνολικού αριθμού των ψαριών ανά δεξαμενή.



Εικόνα 3.1.1.1. Ιχθύδιο λαβρακιού, προσβεβλημένο με μυξοβακτηριδίαση. Ωχροκίτρινη δερματική αλλοίωση στην περιοχή της κεφαλής.



Εικόνα 3.1.1.2. Λαβράκια, προσβεβλημένα με μυξοβακτηριδίαση. Ωχροκίτρινες, φαιές δερματικές αλλοιώσεις στην περιοχή του ουραίου πτερυγίου.



Εικόνα 3.1.1.3. Ιχθύδια τσιπούρας, προσβεβλημένα με μυξοβακτηριδίαση. Φαίες δερματικές αλλοιώσεις στην περιοχή του ουραίου πτερυγίου (κόκκινο βέλος). Νεκρά ιχθύδια (μαύρο βέλος).



Εικόνες 3.1.1.4., 3.1.1.5. Ιχθύδια τσιπούρας προς εξέταση, κατά τις δειγματοληψίες.





Εικόνες 3.1.1.6., 3.1.1.7. Ιχθύδια λαβρακιού και φαγκριού προς εξέταση, κατά τις δειγματοληψίες.



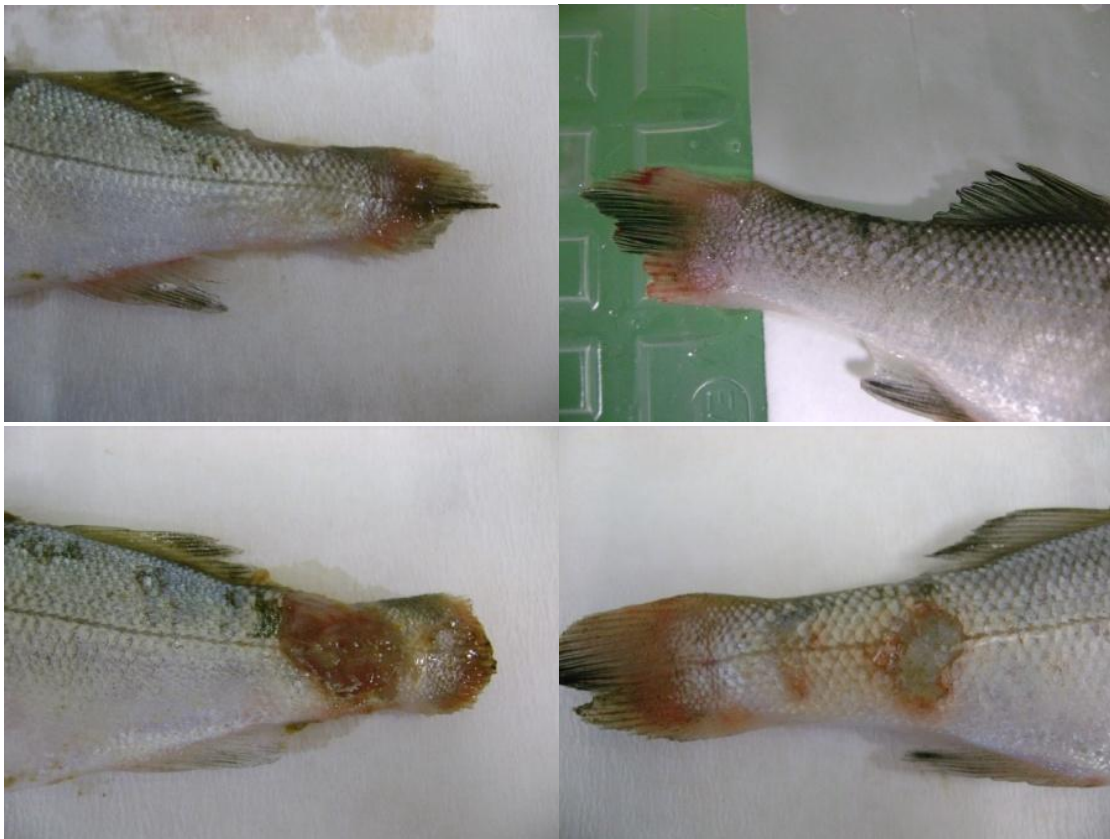
Εικόνες 3.1.1.8., 3.1.1.9. Λυθρίνια και μυλοκόπια προς εξέταση, κατά τις δειγματοληψίες.



Εικόνες 3.1.1.10., 3.1.1.11. Μυτάκια και συκιοί προς εξέταση, κατά τις δειγματοληψίες.



Εικόνα 3.1.1.12. Λαβράκι. Προσβεβλημένο με μυξοβακτηριδίαση. Ελκωτική, διαβρωτική αλλοίωση και νέκρωση του ουραίου πτερυγίου.



Εικόνα 3.1.1.13 έως 3.1.1.16. Λαβράκια. Προσβεβλημένα με μυξοβακτηριδίαση. Ωχροκίτρινες, νεκρωτικές διαβρώσεις του ουραίου πτερυγίου.

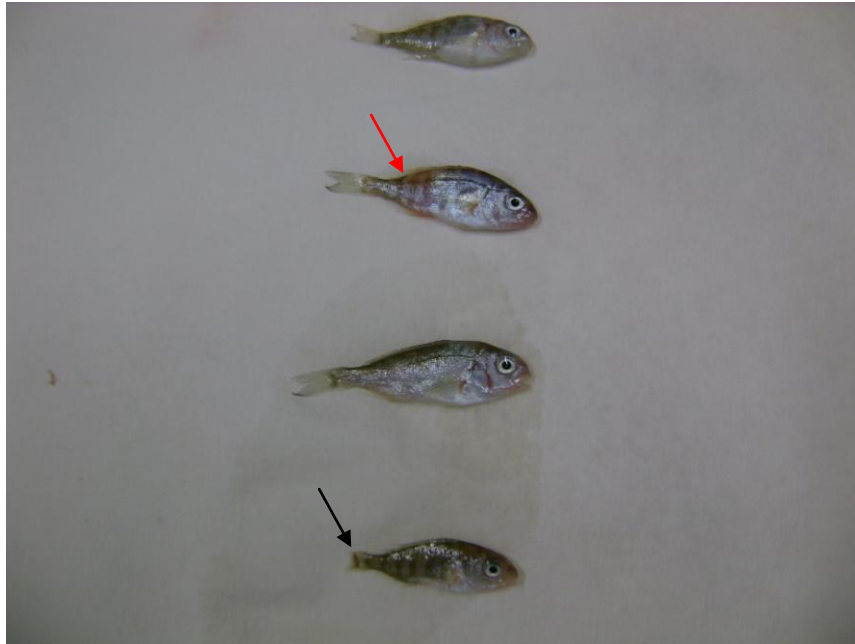


Εικόνα 3.1.1.17. Λαβράκια. Προσβεβλημένα με μυξοβακτηριδίαση. Διακρίνεται η νέκρωση του ουραίου πτερυγίου, σε όλα τα ψάρια.



Εικόνα 3.1.1.18. Λαβράκια. Προσβεβλημένα με μυξοβακτηριδίαση. Ερυθρότητα στόματος, αιμορραγία στις γνάθους, αιμορραγική στοματίτιδα.





Εικόνα 3.1.1.19. Ιχθύδια τσιπούρας. Προσβεβλημένα με μυξοβακτηριδίαση. Νέκρωση του ουραίου πτερυγίου (μαύρο βέλος). Αιμορραγική δερματική αλλοίωση στο πίσω μέρος του σώματος (κόκκινο βέλος).



Εικόνα 3.1.1.20. Ιχθύδιο τσιπούρας. Προσβεβλημένο με μυξοβακτηριδίαση. Αιμορραγική στοματίτιδα και ερυθρότητα στόματος.

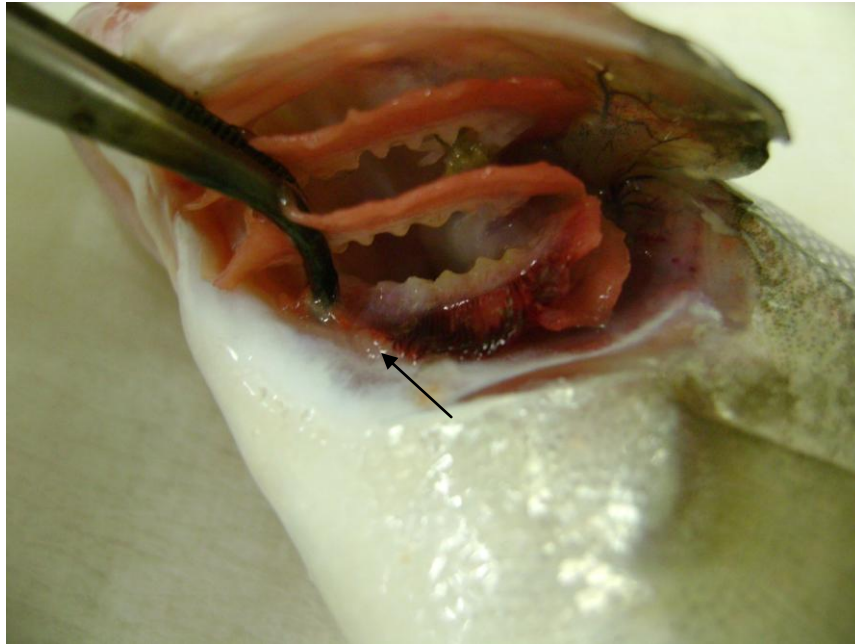


Εικόνα 3.1.1.21. Μυλοκόπι. Προσβεβλημένο με μυξοβακτηριδίαση. Αιμορραγικές αλλοιώσεις στο δέρμα και στις γνάθους.



Εικόνα 3.1.1.22. Μυλοκόπι. Προσβεβλημένο με μυξοβακτηριδίαση. Διάβρωση του ουραίου πτερυγίου.

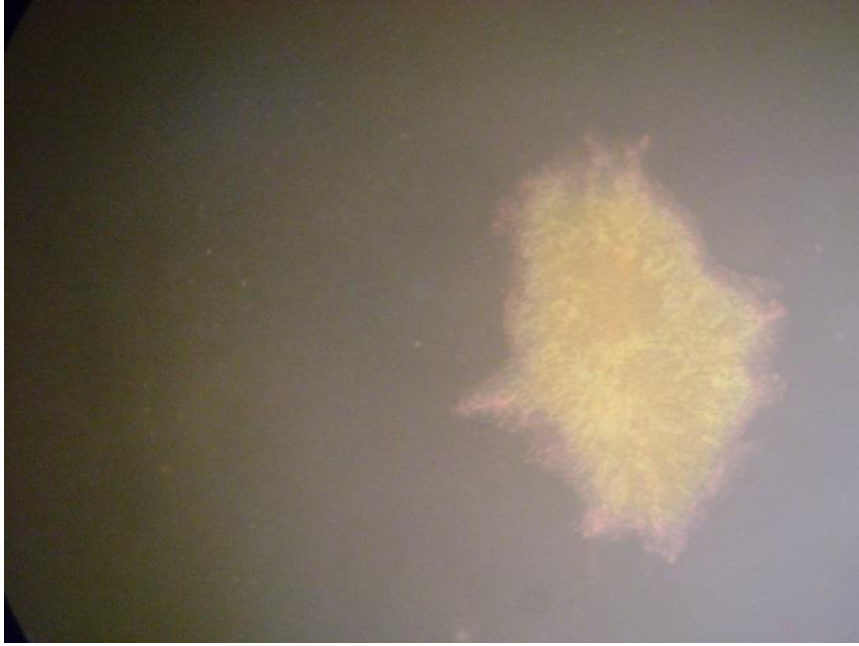




Εικόνα 3.1.1.23. Λαβράκι. Προσβεβλημένο με μυξοβακτηριδίαση. Αιμορραγική νέκρωση στα βράγχια (μαύρο βέλος).

### 3.1.2 Βακτηριολογική εξέταση

Όσον αφορά τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών εξετάσεων για τα δείγματα από το δέρμα και βράγχια, μετά από επώαση 3 ημερών, στο FMM θρεπτικό υπόστρωμα αναπτύχθηκαν αποικίες επίπεδες, υποκίτρινες, ακανόνιστες με άνισες προεκτάσεις και ισχυρή προσκόλληση στο υπόστρωμα, τυπικές αποικίες του *T. maritimum* στο FMM (Εικόνες 3.1.2.1.-3.1.2.4.). Στο Μ.Α αναπτύχθηκαν αποικίες στρογγυλές, κίτρινες και ημιδιαφανείς και οι οποίες ταυτοποιήθηκαν μορφολογικά ως αποικίες μυξοβακτηριδίων (Εικόνες 3.1.2.5.-3.1.2.7.). Οι αποικίες στο τροποποιημένο με 50% θαλασσινό νερό ΑΟΑ ήταν ωχροκίτρινες – πορτοκαλί, ακανόνιστες με άνισες προεκτάσεις και ισχυρή προσκόλληση στο υπόστρωμα και οι οποίες αντιστοιχούσαν στο βακτήριο *T. maritimum*, υπεύθυνο μικροβιακό παράγοντα πρόκλησης της μυξοβακτηριδίασης στους ιχθύες (Εικόνες 3.1.2.8.-3.1.2.9.).



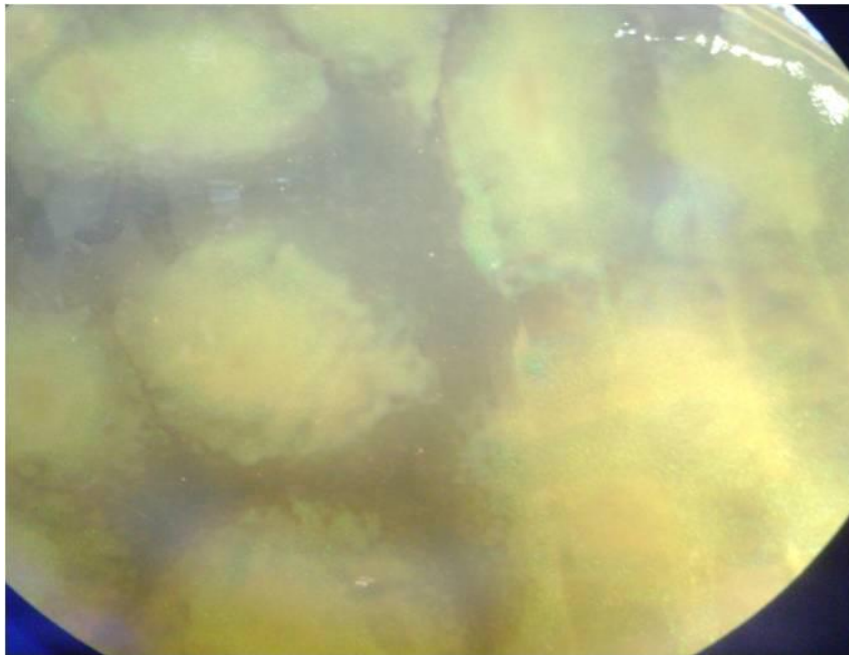
Εικόνα 3.1.2.1. Αποικία, ωχροκίτρινη με άνισες προεκτάσεις *Tenacibaculum maritimum* σε FMM θρεπτικό υπόστρωμα.



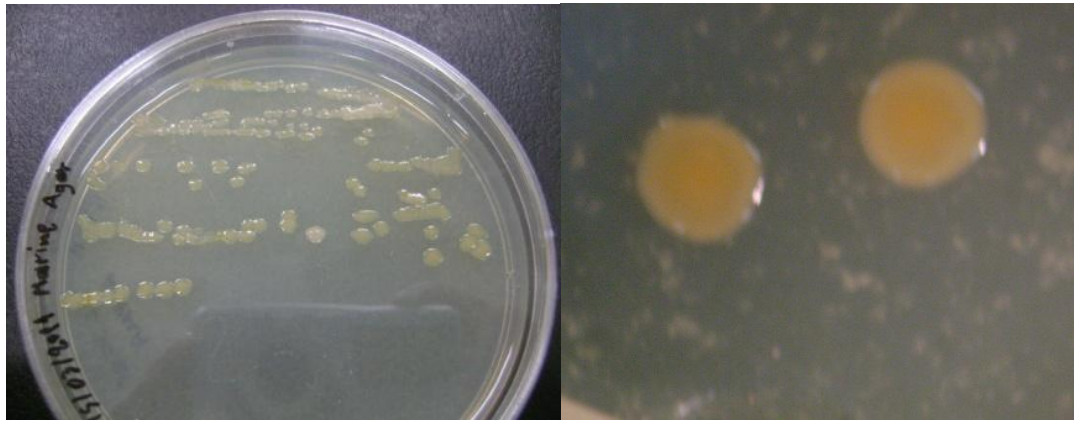
Εικόνα 3.1.2.2. Αποικίες, ωχροκίτρινες με άνισες προεκτάσεις *Tenacibaculum maritimum* σε FMM θρεπτικό υπόστρωμα (μαύρα βέλη) ανάμεσα σε λευκές αποικίες από αλλόφιλα, ετερότροφα βακτήρια.



Εικόνα 3.1.2.3. Αποικίες, κίτρινες *Tenacibaculum maritimum* από δέρμα σε FMM θρεπτικό υπόστρωμα.



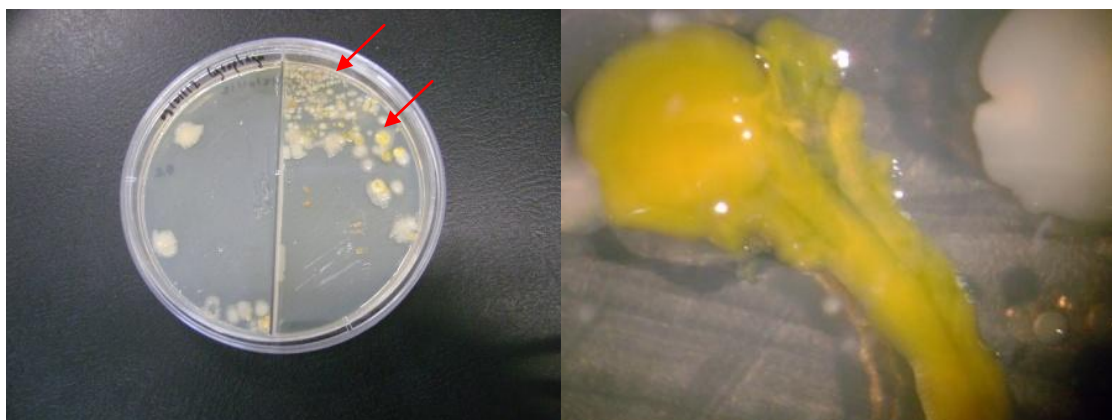
Εικόνα 3.1.2.4. Αποικίες *Tenacibaculum maritimum* ,υποκίτρινες με άνισες προεκτάσεις σε FMM θρεπτικό υπόστρωμα.



Εικόνα 3.1.2.5.&3.1.2.6. Αποικίες στρογγυλές και κίτρινες *Tenacibaculum maritimum* σε ΜΑ θρεπτικό υπόστρωμα.



Εικόνα 3.1.2.7. Αποικίες *Tenacibaculum maritimum*, στρογγυλές, κίτρινες και ημιδιαφανείς σε ΜΑ θρεπτικό υπόστρωμα.



Εικόνα 3.1.2.8 & 3.1.2.9. Αποικίες *Tenacibaculum maritimum*, κίτρινες με άνισες προεκτάσεις σε τροποποιημένο ΑΟΑ θρεπτικό υπόστρωμα (κόκκινα βέλη).

Για τα δείγματα νεφρού και σπλήνα, μετά την επώαση στα θρεπτικά υποστρώματα TSA+2%NaCl και TCBS διαπιστώθηκε η ανάπτυξη πλήθους κινητών και ακίνητων βακτηρίων με σχήμα κόκκων-κοκκοβάκιλων, όπως π.χ. η ανάπτυξη αποικιών του *Listonella (Vibrio) anguillarum*, που ταυτοποιήθηκε βιοχημικά με την εκτέλεση του API 20E. Ωστόσο, στα δείγματα από νεφρό και σπλήνα που ενοφθαλμίστηκαν σε TSA+2%NaCl, TCBS, τροποποιημένο AOA, FMM και MA, δεν αναπτύχθηκαν αποικίες του *T. maritimum*. Να σημειωθεί επίσης ότι η απομόνωση του *Listonella anguillarum* από το μυλοκόπι, από δείγμα νεφρού έγινε για πρώτη φορά. Οι ανακαλλιέργειες αναπτύχθηκαν πιο εύκολα σε FMM. Επίσης, οι αποικίες αναπτύχθηκαν πιο γρήγορα στο δέρμα σε σχέση με τα βράγχια (FMM, MA, AOA).

Ωστόσο, στα περισσότερα από τα εξωτερικά δείγματα, και άλλα είδη βακτηρίων αναπτύχθηκαν σε FMM και MA, εξαιτίας της χαρακτηριστικής αργής ανάπτυξης του *T. maritimum* και της υπερανάπτυξης των άλλων βακτηρίων που συνυπάρχουν στα εξωτερικά δείγματα. Τα περισσότερα βακτήρια που απομονώθηκαν, αναγνωρίστηκαν ως είδη που ανήκουν στο γένος *Vibrio*, καθώς επίσης και βακτήρια που ανήκουν στα είδη, *L. anguillarum*, *A. salmonicida* και κινητά είδη *Aeromonas* περιστασιακά απομονώθηκαν.

Η προσθήκη των αντιβιοτικών φλουμεκίνη, σε συγκέντρωση 2ppm (2mg/l) και νεομυκίνη, σε συγκέντρωση 4ppm (4mg/l) τόσο στο M.A όσο και στο F.M.M., μετά από επώαση στους 19<sup>0</sup>C, δεν ευνόησαν την ανάπτυξη των μυξοβακτηριδίων. Ένα μόνο στέλεχος, αποδείχθηκε ανθεκτικό στην φλουμεκίνη και αναπτύχθηκε στο M.A με την προσθήκη φλουμεκίνης. Συνεπώς, στα θρεπτικά υποστρώματα: FMM+Fl, FMM+N, M.A.+Fl, M.A.+N δεν μπόρεσαν να αναπτυχθούν μυξοβακτηρίδια και δεν χρησιμοποιήθηκαν στις επόμενες 3 δειγματοληψίες.

Το FMM θρεπτικό υπόστρωμα και το τροποποιημένο AOA ήταν τα πιο αποτελεσματικά θρεπτικά υποστρώματα για την ανάπτυξη του *T. maritimum* από τα δείγματα του δέρματος και των βραγχιών αντίστοιχα (αποδεικνύεται και στατιστικά). Επιπλέον, ο μεγαλύτερος αριθμός στελεχών του *T. maritimum* απομονώθηκε από δείγματα δέρματος σε FMM θρεπτικό υπόστρωμα (n=108) και από δείγματα βραγχιών σε τροποποιημένο AOA (n=76). Το MA αποδείχθηκε αποτελεσματικό για την ανάπτυξη του *T. maritimum*, ιδιαίτερα στην περίπτωση των δειγμάτων από την τσιπούρα.

Η παρασκευή των υποστρωμάτων FMM & AOA πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 50% θαλασσινό νερό.

Στους Πίνακες 3.1.1-3.1.28, διακρίνεται και συγκρίνεται η αποτελεσματικότητα των θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης (Δέρμα, Βράγχια, Νεφρός, Σπλήνας) για το λαβράκι, την τσιπούρα, το λυθρίνι, το φαγκρί, το μυλοκόπι, το μυτάκι και τον σκυϊό για τις 4 εποχικές δειγματοληψίες και τον συνολικό αριθμό των δειγμάτων (n=800).

**Πίνακας 3.1.1.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το λαβράκι, 1<sup>η</sup> δειγματοληψία.

x: Δεν αναπτύχθηκε τίποτα

+: αποικίες *T.maritimum*

ο: Gram (-) βάκλιοι, κόκκοι

1 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΛΑΒΡΑΚΙ										
Υποστρώματα	όργανα	FMM	FMM +F	FMM +N	MA	MA+F	MA+N	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>										
1.LVa	Δ	ο	x		ο	x		ο	ο	
	B	x			ο			ο		
	N	x						x	x	
	Σ								x	
2.LVa	Δ	+		x	ο		x	ο		
	B	ο			ο			+		
	N				ο				ο	x
	Σ									
3.LVa	Δ	ο			ο			ο		
	B	x	x		ο	x		ο		
	N	x							x	
	Σ									
4.LVa	Δ	ο			ο			ο		
	B	ο		x	ο		x	+		
	N				x				x	X
	Σ									
5.LVa	Δ	ο	x		ο	x		ο	ο	
	B	ο			+			+		
	N	x						ο	ο	
	Σ								ο	
6.LVa	Δ	ο		x	ο		x	ο		
	B	ο			ο			ο		
	N				x				x	X
	Σ									
7.LVa	Δ	ο			ο			ο		
	B	ο	ο		ο	x		ο		
	N	x							x	
	Σ									
8.LVa	Δ	+			ο			ο		
	B	ο		x	ο		x	+		
	N				ο				ο	X
	Σ									
9.LVa	Δ	ο	x		ο	x		ο		
	B	ο			ο			ο		
	N	x						x	x	
	Σ									



<b>10.LVa</b>	$\Delta$	o		x	o		x	+	o	
	B	o			o			+		
	N				x			x	x	x
	$\Sigma$								x	
11.LVa	$\Delta$	o			o			o		
	B	o	x		o	x		o		
	N	x							x	
	$\Sigma$									
<b>12.LVa</b>	$\Delta$	+			o			+		
	B	x		x	o		x	+		
	N				x				x	x
	$\Sigma$									
<b>13.LVa</b>	$\Delta$	+	x		+	x		o		
	B	x			o			+		
	N	x							x	
	$\Sigma$									
14.LVa	$\Delta$	o		o	o		x	o		
	B	o			o			o		
	N				x				x	x
	$\Sigma$									
15.LVa	$\Delta$	o			o			o	o	
	B	o	o		o	x		o		
	N	x						x	o	
	$\Sigma$								x	
<b>16.LVb</b>	$\Delta$	+			o			+		
	B	o		x	o		x	+		
	N				o				o	x
	$\Sigma$									
<b>17.LVb</b>	$\Delta$	o	o		+	+		o		
	B	o			o			+		
	N	x							x	
	$\Sigma$									
18.LVb	$\Delta$	o		o	o		x	o		
	B	o			o			x		
	N				x				o	o
	$\Sigma$									
<b>19.LVb</b>	$\Delta$	+			o			o		
	B	o	x		o	x		+		
	N	x							x	
	$\Sigma$									
20.LVb	$\Delta$	o			o			o	o	
	B	o		x	o		x	x		
	N				x			o	o	o
	$\Sigma$								x	
21.LVb	$\Delta$	o	x		o	x		o		
	B	o			o			o		
	N	x							x	
	$\Sigma$									
<b>22.LVb</b>	$\Delta$	+		x	o		x	o		
	B	o			o			+		
	N				o				o	x
	$\Sigma$									
23.LVb	$\Delta$	o			o			o		
	B	o	x		o	x		o		
	N	o							x	
	$\Sigma$									
<b>24.LVb</b>	$\Delta$	+			+			+		
	B	o		x	o		x	+		
	N				x				x	x
	$\Sigma$									
<b>25.LVb</b>	$\Delta$	+	x		o	x		o	o	
	B	o			o			+		
	N	x						x	o	

	Σ								○	
ΜΟΝΑΔΑ Β										
Υποστρώματα	όργανα	FMM	FMM+F	FMM+N	MA	MA+F	MA+N	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>1.LV</b>	Δ	+	x		○	x		+	○	
	B	○			○			+		
	N	x						x	○	
	Σ								x	
2.LV	Δ	○		x	○		x	○		
	B	○			○			○		
	N				○				○	○
	Σ									
<b>3.LV</b>	Δ	+			○			○		
	B	○	x		○	x		+		
	N	x							x	
	Σ									
<b>4.LV</b>	Δ	+			○			○		
	B	○		x	○		x	+		
	N				○				x	x
	Σ									
<b>5.LV</b>	Δ	+	x		+	x		+		
	B	○			+			+		
	N	○						○	○	
	Σ								○	
6.LV	Δ	○		x	○		x	○		
	B	○			○			○		
	N				○				○	○
	Σ									
<b>7.LV</b>	Δ	+			+			○		
	B	○	x		○	x		+		
	N	x							x	
	Σ									
<b>8.LV</b>	Δ	○			○			○		
	B	○		x	○		x	+		
	N				x				x	x
	Σ									
9.LV	Δ	○	x		○	x		○		
	B	○			○			○		
	N	x							○	
	Σ									
<b>10.LV</b>	Δ	+		x	○		x	○	○	
	B	○			○			+		
	N				○			○	○	○
	Σ								○	
11.LV	Δ	○			○			○		
	B	○	x		○	x		○		
	N	x							○	
	Σ									
<b>12.LV</b>	Δ	+			○			○		
	B	+		x	○		x	+		
	N				x				x	x
	Σ									
<b>13.LV</b>	Δ	+	x		+	x		+		
	B	+			+			+		
	N	○							x	
	Σ									
<b>14.LV</b>	Δ	+		x	○		x	+		
	B	○			○			○		
	N				○				x	x
	Σ									
15.LV	Δ	○			○			○		



	B	○	x		○	x		○		
	N	x						x	○	
	Σ								○	
16.LV	Δ	○			○			○		
	B	○		x	○		x	○		
	N				x				x	x
	Σ									
17.LV	Δ	+	x		○	x		+		
	B	○			○			○		
	N	x							○	
	Σ									
18.LV	Δ	○		x	○		x	○		
	B	○			○			○		
	N				○				○	○
	Σ									
19.LV	Δ	+			○			+		
	B	○	x		○	x		+		
	N	○							○	
	Σ									
20.LV	Δ	+			○			○	○	
	B	+		x	○		x	+		
	N				○			○	○	○
	Σ								○	
21.LV	Δ	○	x		○	x		○		
	B	○			○			+		
	N	x							x	
	Σ									
22.LV	Δ	+		x	○		x	○		
	B	○			○			+		
	N				x				x	x
	Σ									
23.LV	Δ	○			○			○		
	B	○	x		○	x		○		
	N	x							○	
	Σ									
24.LV	Δ	+			○			+		
	B	○		x	○		x	○		
	N				x				x	x
	Σ									
25.LV	Δ	○	x		○	x		○		
	B	○			○			○		
	N	x						x	x	
	Σ								x	

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα A 13(25) - Μονάδα B 16(25)

**Πίνακας 3.1.2.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για την τσιπούρα, 1<sup>η</sup> δειγματοληψία.

1 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΤΣΙΠΟΥΡΑ										
Υποστρώματα	όργανα	FMM	FMM +F	FMM +N	MA	MA+F	MA+N	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>										
1.TSa	Δ	+	x		+	x		+		
	B	x			○			+		
	N	x						x	x	
	Σ								x	

2.TSa	$\Delta$	o		x	o		x	o		
	B	x			o			o		
	N				x				x	x
	$\Sigma$									
3.TSa	$\Delta$	o			o			o		
	B	o	x		o	x		o		
	N	x							x	
	$\Sigma$									
4.TSa	$\Delta$	o			o			o		
	B	x		o	o		x	o		
	N				x				x	x
	$\Sigma$									
5.TSa	$\Delta$	+	x		+	x		o		
	B	x			o			+		
	N	x						x	x	
	$\Sigma$								x	
6.TSa	$\Delta$	o		x	o		x	o		
	B	o			o			o		
	N				x				x	x
	$\Sigma$									
7.TSa	$\Delta$	o			o			o		
	B	x	x		o	x		o		
	N	x							o	
	$\Sigma$									
8.TSa	$\Delta$	+			+			o		
	B	o		x	+		x	o		
	N				x				x	x
	$\Sigma$									
9.TSa	$\Delta$	o	x		o	x		o		
	B	x			o			o		
	N	x							x	
	$\Sigma$									
10.TSa	$\Delta$	+		x	+		x	o		
	B	x			+			+		
	N				o			x	o	o
	$\Sigma$								o	
11.TSa	$\Delta$	o			o			o		
	B	o	x		o	x		o		
	N	x							x	
	$\Sigma$									
12.TSa	$\Delta$	o			o			x		
	B	x		x	x		x	x		
	N				x				x	x
	$\Sigma$									
13.TSa	$\Delta$	o	x		o	x		o		
	B	o			x			o		
	N	x							x	x
	$\Sigma$									
14.TSa	$\Delta$	o		x	o		x	o		
	B	o			o			o		
	N				o				o	o
	$\Sigma$									
15.TSa	$\Delta$	o			o			o		
	B	x	x		o	x		o		
	N	x						x	x	
	$\Sigma$								x	
16.TSa	$\Delta$	o			o			o		
	B	o		x	o		x	o		
	N				o					
	$\Sigma$								o	o
17.TSa	$\Delta$	o	o		o	x		o		
	B	o			o			o		
	N	x							x	
	$\Sigma$									

18.TSa	Δ	○		x	+		x	○		
	B	○			+			○		
	N				x				○	x
	Σ									
19.TSa	Δ	○			○			○		
	B	○	x		○	x		○		
	N	x							x	
	Σ									
20.TSa	Δ	○			○			○		
	B	x		x	x		x	x		
	N				x			x	x	x
	Σ								x	
21.TSa	Δ	○	x		x	x		x		
	B	x			○			x		
	N	x							x	
	Σ									
22.TSa	Δ	○		x	○		x	○		
	B	x			○			x		
	N				○				○	x
	Σ									
23.TSa	Δ	○			○			○		
	B	x	x		○	x		x		
	N	x							x	
	Σ									
24.TSa	Δ	○			○			○		
	B	x		x	○		x	x		
	N								x	x
	Σ									
25.TSa	Δ	○	x		○	x		○		
	B	○			○			○		
	N	x						x	x	
	Σ								x	
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>										
Υποστρ ώματα	όρ γα να	FMM	FMM +F	FMM +N	MA	MA+F	MA+ N	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
1.TSb	Δ	○	x		○	x		○		
	B	x			○			x		
	N	x						x	x	x
	Σ								x	
2.TSb	Δ	○		x	○		x	○		
	B	x			○			x		
	N				x				x	
	Σ									
3.TSb	Δ	○			○			○		
	B	○	x		○	x		○		
	N	x							x	
	Σ									
4.TSb	Δ	○			○			○		
	B	x		x	○		x	x		
	N	x			○				○	
	Σ									
5.TSb	Δ	○	x		+	x		○		
	B	x			○			○		
	N	x						x	x	x
	Σ								x	
6.TSb	Δ	○		x	○		x	○		
	B	x			○			○		
	N				x				x	
	Σ									
7.TSb	Δ	○			○			x		
	B	x	x		○	x		x		

	N	x							x	
	$\Sigma$									
8.TSb	$\Delta$	o			o		o			
	B	x		x	o		x	x		
	N				x				x	
	$\Sigma$									
9.TSb	$\Delta$	o	x		o	x		o		
	B	x			o			o		
	N	x							x	
	$\Sigma$									
10.TSb	$\Delta$	o		x	o		x	o		
	B	o			o			o		
	N				x			x	x	x
	$\Sigma$								x	
11.TSb	$\Delta$	o			o			o		
	B	o	x		o	x		o		
	N	x							x	
	$\Sigma$									
12.TSb	$\Delta$	o			+			o		
	B	x		x	o		x	+		
	N				x				x	
	$\Sigma$									
13.TSb	$\Delta$	o	x		o	x		x		
	B	o			o			o		
	N	x							x	
	$\Sigma$									
14.TSb	$\Delta$	o		x	o		x	o		
	B	x			o			o		
	N				x				x	
	$\Sigma$									
15.TSb	$\Delta$	o			o			x		
	B	o	x		o	x		o		
	N	x						x	x	
	$\Sigma$								x	x
16.TSb	$\Delta$	o			o			x		
	B	x		x	o		x	x		
	N				x				x	
	$\Sigma$									
17.TSb	$\Delta$	o	x		o	x		x		
	B	x			o			o		
	N	x							x	
	$\Sigma$									
18.TSb	$\Delta$	o		x	o		x	o		
	B	o			o			o		
	N				x				x	
	$\Sigma$									
19.TSb	$\Delta$	x			o			x		
	B	o	x		o	x		x		
	N	x							o	
	$\Sigma$									
20.TSb	$\Delta$	o			o			o		
	B	x		x	o		x	o		
	N				x			x	x	
	$\Sigma$								x	x
21.TSb	$\Delta$	o	x		o	x		o		
	B	x			o			x		
	N	x							x	
	$\Sigma$									
22.TSb	$\Delta$	+		x	+		x	o		
	B	o			+			o		
	N				x				x	
	$\Sigma$									
23.TSb	$\Delta$	o			o			o		
	B	o	x		o	x		o		

	N	x							x	
	Σ									
24.TSb	Δ	ο			ο			x		
	B	x		x	ο		x	x		
	N				x				x	
	Σ									
25.TSb	Δ	ο	x		ο	x		ο		
	B	x			ο			ο		
	N	x						x	ο	x
	Σ								ο	

Δ: Δέρμα, Β:Βράγχια, Ν:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα Α 5(25) - Μονάδα Β 3(25)

**Πίνακας 3.1.3.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το λυθρίνι, 1<sup>η</sup> δειγματοληψία.

1 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΛΥΘΡΙΝΙ										
Υποστρώματα	όργανα	FMM	FMM +F	FMM +N	MA	MA+F	MA+N	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>										
1.La	Δ	x	x		x	x		x		
	B	ο			ο			ο		
	N	x						x	x	x
	Σ								x	
2.La	Δ	x		x	ο		x	ο		
	B	ο			ο			ο		
	N				x				x	
	Σ									
3.La	Δ	x			ο			x		
	B	ο	x		ο	x		ο		
	N	x							x	
	Σ									
4.La	Δ	x			x			x		
	B	ο		x	ο		x	x		
	N				x				x	
	Σ									
5.La	Δ	x	x		x	x		x		
	B	ο			ο			x		
	N	x						x	x	x
	Σ								x	
6.La	Δ	x		x	x		x	x		
	B	ο			ο			ο		
	N				x				x	
	Σ									
7.La	Δ	x			x			x		
	B	ο	x		ο	x		x		
	N	x							x	
	Σ									
8.La	Δ	x			x			x		
	B	ο		x	ο		x	x		
	N				x				x	
	Σ									
9.La	Δ	x	x		ο	x		x		
	B	ο			ο			ο		
	N	x							x	
	Σ									
10.La	Δ	x		x	+		x	x		
	B	ο			ο			+		
	N				x			x	x	x

11.La	Σ								X	
	Δ	x			x			x		
	B	o	x		o	x		x		
	N	x							x	
Σ										
12.La	Δ	x			x			x		
	B	o		x	o		x	o		
	N				x				x	
	Σ									
13.La	Δ	x	x		x	x		x		
	B	o			o			x		
	N	x							o	
	Σ									
14.La	Δ	x		x	x		x	x		
	B	o			o			o		
	N				x				x	
	Σ									
15.La	Δ	x			x			x		
	B	o	x		o	x		x		
	N	x						x	x	x
	Σ								x	
16.La	Δ	x			x			x		
	B	x		x	o		x	x		
	N				x				x	
	Σ									
17.La	Δ	x	x		o	x		x		
	B	o			o			o		
	N	x							x	
	Σ									
18.La	Δ	+		x	+		x	x		
	B	o			o			+		
	N				x				o	
	Σ									
19.La	Δ	x			x			x		
	B	o	x		o	x		o		
	N	x							x	
	Σ									
20.La	Δ	x			o			x		
	B	o		x	o		x	o		
	N				x			x	x	x
	Σ								x	

**ΜΟΝΑΔΑ Β**

Υποστρώματα	όργανα	FMM	FMM +F	FMM +N	MA	MA+F	MA+N	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
1.Lb	Δ	x	x		o	x		x		
	B	o			o			o		
	N	x						x	x	x
	Σ								x	
2.Lb	Δ	x		x	o		x	x		
	B	o			o			o		
	N				x				x	
	Σ									
3.Lb	Δ	o			o			x		
	B	o	x		o	x		o		
	N	x							x	
	Σ									
4.Lb	Δ	x			o			x		
	B	o		x	o		x	o		
	N				x				x	
	Σ									
5.Lb	Δ	x	x		o	x		x		

	B	x			x			x		
	N	x						x	x	x
	Σ								x	
6.Lb	Δ	o		x	o		x	x		
	B	o			o			x		
	N				x				x	
	Σ									
7.Lb	Δ	x			o			x		
	B	x	x		o	x		o		
	N	x							x	
	Σ									
8.Lb	Δ	+			+			x		
	B	o		x	o		x	+		
	N				x				x	
	Σ									
9.Lb	Δ	x	x		o	x		x		
	B	o			o			o		
	N	x							o	
	Σ									
10.Lb	Δ	x		x	o		x	x		
	B	o			o			o		
	N				x			x	x	x
	Σ								x	
11.Lb	Δ	x			x			x		
	B	o	x		o	x		x		
	N	x							x	
	Σ									
12.Lb	Δ	x			x			x		
	B	o		o	o		x	x		
	N				x				x	
	Σ									
13.Lb	Δ	x	x		x	x		x		
	B	o			o			x		
	N	x							x	
	Σ									
14.Lb	Δ	x		x	x		x	x		
	B	x			x			x		
	N				x				x	
	Σ									
15.Lb	Δ	x			o			x		
	B	o	x		o	x		o		
	N	x						x	x	x
	Σ								x	
16.Lb	Δ	x			o			x		
	B	o		x	o		x	o		
	N				x				x	
	Σ									
17.Lb	Δ	x	x		x	x		x		
	B	o			o			x		
	N	x							x	
	Σ									
18.Lb	Δ	x		x	x		x	x		
	B	o			o			x		
	N				x				x	
	Σ									
19.Lb	Δ	x			x			x		
	B	o	x		o	x		o		
	N	x							x	
	Σ									
20.Lb	Δ	x			o			x		
	B	o		o	o		x	o		
	N				x			x	x	x
	Σ								x	

Δ: Δέρμα, Β:Βράγχια, Ν:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα Α 2(20) - Μονάδα Β 1(20)

**Πίνακας 3.1.4.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το φαγκρί, 1<sup>η</sup> δειγματοληψία.

<b>1<sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΦΑΓΚΡΙ</b>										
Υποστρώματα	όργανα	FMM	FMM +F	FMM +N	MA	MA+F	MA+N	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>										
1.Pa	Δ	x	x		o	x		x		
	B	x			o			o		
	N	x						x	x	x
	Σ								x	
2.Pa	Δ	o		x	o		x	o		
	B	o			o			o		
	N				o				o	
	Σ									
3.Pa	Δ	o			o			o		
	B	o	x		o	x		o		
	N	x							x	
	Σ									
4.Pa	Δ	+			+			o		
	B	+		x	+		x	o		
	N				+				x	
	Σ									
5.Pa	Δ	o	x		o	x		o		
	B	o			+			+		
	N	x						x	o	
	Σ								o	x
6.Pa	Δ	o		x	o		x	x		
	B	o			o			o		
	N				x				x	
	Σ									
7.Pa	Δ	o			+			o		
	B	x	x		+	x		o		
	N	x							x	
	Σ									
8.Pa	Δ	o			o			o		
	B	o		x	o		x	o		
	N				o				o	
	Σ									
9.Pa	Δ	+	x		+	x		o		
	B	+			o			+		
	N	+							x	
	Σ									
10.Pa	Δ	+		x	+		x	o		
	B	+			o			o		
	N				x			x	x	
	Σ								x	x
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>										
Υποστρώματα	όργανα	FMM	FMM +F	FMM +N	MA	MA+F	MA+N	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
1.Pb	Δ	o	x		o	x		o		
	B	o			o			o		
	N	x						x	x	x
	Σ								x	
2.Pb	Δ	x		x	o		x	x		



	B	x			o			o		
	N				o					
	Σ									
3.Pb	Δ	o			o			o		
	B	o	x		o	x		o		
	N	x								
	Σ									
4.Pb	Δ	o			o			o		
	B	o		x	o		x	o		
	N				x					
	Σ									
5.Pb	Δ	x	x		x	x		o		
	B	x			o			x		
	N	x						x	x	x
	Σ								x	
6.Pb	Δ	o		x	o		x	x		
	B	o			o			o		
	N				x					
	Σ									
7.Pb	Δ	x			o			x		
	B	x	x		o	x		o		
	N	x								
	Σ									
8.Pb	Δ	+			+			o		
	B	+		x	o		x	o		
	N				x				x	
	Σ									
9.Pb	Δ	x	x		o	x		x		
	B	x			o			x		
	N	x								
	Σ									
10.Pb	Δ	o		x	+		x	o		
	B	x			+			o		
	N				x			x	x	x
	Σ								x	

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα A 5(10) - Μονάδα B 2(10)

**Πίνακας 3.1.5.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το μυλοκόπι, 1<sup>η</sup> δειγματοληψία.

1 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΜΥΛΟΚΟΠΗ										
Υποστρώματα	όργανα	FMM	FMM +F	FMM +N	MA	MA+F	MA+N	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>										
1.MUC	Δ	o	x		o	x		o		
	B	o			o			o		
	N	x						o	o	x
	Σ								o	
2.MUC	Δ	o		x	+		x	o		
	B	o			o			+		
	N				o				o	
	Σ									
3.MUC	Δ	o			o			o		
	B	o	x		o	x		o		
	N	x							x	
	Σ									
4.MUC	Δ	+			+			+		

	B	+		x	o		x	+		
	N				o				o	
	Σ									
5.MUC	Δ	o	x		o	x		o		
	B	o			o			o		
	N	o						o	o	o
	Σ								o	
6.MUC	Δ	o		x	o		x	o		
	B	o			o			o		
	N				o				x	
	Σ									
7.MUC	Δ	+			+			+		
	B	+	x		+	x		+		
	N	+							x	
	Σ									
8.MUC	Δ	o			o			o		
	B	o		x	o		x	o		
	N				o				o	
	Σ									
9.MUC	Δ	+	x		+	x		+		
	B	o			o			+		
	N	o							x	
	Σ									
10.MU C	Δ	o		o	o		x	o		
	B	o			o			o		
	N				o			x	o	x
	Σ								x	
11.MU C	Δ	o			o			o		
	B	o	x		o	o		o		
	N	x							x	
	Σ									
12.MU C	Δ	+			+			+		
	B	+		o	o		x	+		
	N				o				o	
	Σ									
13.MU C	Δ	+	x		+	x		+		
	B	+			o			+		
	N	o							x	
	Σ									
14.MU C	Δ	+		x	+		x	+		
	B	+			+			+		
	N				+				o	
	Σ									
15.MU C	Δ	o			o			o		
	B	o	x		o	x		o		
	N	x						x	o	x
	Σ								o	

Δ: Δέρμα, Β:Βράγχια, Ν:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα Α 7(15)

**Πίνακας 3.1.6.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το μυτάκι, 1<sup>η</sup> δειγματοληψία.

1 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΜΥΤΑΚΙ										
Υποστρ ώματα	όρ γα να	FMM	FMM +F	FMM +N	MA	MA+F	MA+ N	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>										
1.M	Δ	x	x		o	x		o		
	B	o			o			o		

	N	x						x	x	x
	Σ									
2.M	Δ	o		x	x		x	o		
	B	o			x			o		
	N				x					
	Σ									
3.M	Δ	o			o			o		
	B	x	x		x	x		o		
	N	x								
	Σ								x	
4.M	Δ	o			x			x		
	B	x		x	x		x	o		
	N				x					
	Σ									
5.M	Δ	+	x		o	x		+		
	B	o			o			+		
	N	x						x	x	x
	Σ									
6.M	Δ	o		x	o		x	+		
	B	o			o			+		
	N				o					
	Σ									
7.M	Δ	+			o			+		
	B	o	x		+	x		+		
	N	x							x	
	Σ									
8.M	Δ	x			o			o		
	B	o		x	o		x	o		
	N				x					
	Σ									
9.M	Δ	o	x		x	x		o		
	B	o			x			o		
	N	x							x	
	Σ									
10.M	Δ	o		x	o		x	o		
	B	o			o			o		
	N				o			x		x
	Σ									
11.M	Δ	o			x			x		
	B	x	x		x	x		o		
	N	x							x	
	Σ									
12.M	Δ	o			x			o		
	B	o		x	x		x	o		
	N				x					
	Σ									
13.M	Δ	o	x		x	x		x		
	B	x			x			o		
	N	x							x	
	Σ									
14.M	Δ	+		x	o		x	+		
	B	o			o			+		
	N				x					
	Σ									
15.M	Δ	o			x			o		
	B	o	x		x	x		o		
	N	x						x	x	x
	Σ									

Δ: Δέρμα, Β:Βράγχια, Ν:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα Β 4(15)

**Πίνακας 3.1.7.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για τον συκίο, 1<sup>η</sup> δειγματοληψία.

1 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΣΥΚΙΟΣ										
Υποστρώματα	όργανα	FMM	FMM+F	FMM+N	MA	MA+F	MA+N	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>										
1.SU	Δ	ο	x		ο	x		ο		
	B	ο			ο			ο		
	N	x						ο	ο	x
	Σ									
2.SU	Δ	ο		x	ο		x	ο		
	B	x			x			ο		
	N				x				x	
	Σ									
3.SU	Δ	+			+			+		
	B	+	x		ο	x		ο		
	N	x							x	
	Σ									
4.SU	Δ	+			+			+		
	B	ο		x	ο		x	+		
	N				x				x	
	Σ									
5.SU	Δ	+	x		+	x		ο		
	B	ο			ο			ο		
	N	x						x	x	x
	Σ									
6.SU	Δ	ο		x	ο		x	ο		
	B	x			x			ο		
	N				ο				ο	
	Σ									
7.SU	Δ	ο			ο			ο		
	B	ο	x		x	x		ο		
	N	x							x	
	Σ									
8.SU	Δ	ο			ο			ο		
	B	x		x	ο		x	ο		
	N				x				x	
	Σ									
9.SU	Δ	+	x		+	x		+		
	B	ο			ο			+		
	N	x							x	
	Σ									
10.SU	Δ	ο		x	ο		x	ο		
	B	ο			ο			ο		
	N				x			x	x	x
	Σ									

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα Α 4(10)

Στις επόμενες 3 Δειγματοληψίες που ακολούθησαν τα θρεπτικά υποστρώματα: FMM+F, FMM+N, MA+F, MA+N δεν χρησιμοποιήθηκαν, καθώς σε αυτά δεν αναπτύχθηκαν Μυξοβακτηρίδια στην 1<sup>η</sup> Δειγματοληψία και σε όλα τα είδη ψαριών, γι' αυτό θεωρήθηκαν μη αποτελεσματικά για την απομόνωση των Μυξοβακτηριδίων.

**Πίνακας 3.1.8.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το λαβράκι, 2<sup>η</sup> δειγματοληψία.

<b>2<sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΛΑΒΡΑΚΙ</b>						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
<b>1.LVa</b>	Δ	+	ο	ο		
	B	ο	ο	+		
	N	x		x	x	x
	Σ					
<b>2.LVa</b>	Δ	+	ο	+		
	B	+	ο	+		
	N		ο			
	Σ					
<b>3.LVa</b>	Δ	+	ο	+		
	B	x	ο	+		
	N	x			x	
	Σ					
<b>4.LVa</b>	Δ	+	ο	+		
	B	ο	ο	+		
	N		x			
	Σ					
<b>5.LVa</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x		x	x	x
	Σ					
<b>6.LVa</b>	Δ	+	+	ο		
	B	x	ο	+		
	N		x			
	Σ					
<b>7.LVa</b>	Δ	+	+	+		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
<b>8.LVa</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	+		
	N		x			
	Σ					
<b>9.LVa</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
<b>10.LVa</b>	Δ	+	+	ο		
	B	x	ο	x		
	N		x	x		x
	Σ					
<b>11.LVa</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
<b>12.LVa</b>	Δ	+	ο	+		
	B	ο	ο	+		
	N		x			
	Σ					
<b>13.LVa</b>	Δ	+	ο	+		
	B	+	ο	+		
	N	+			x	
	Σ					
<b>14.LVa</b>	Δ	+	+	+		
	B	ο	ο	ο		

	N		x			
	Σ					
15.LVa	Δ	+	ο	ο		
	B	ο	ο	+		
	N	x		x	x	x
	Σ					
16.LVa	Δ	+	ο	+		
	B	ο	ο	+		
	N		ο			
	Σ					
17.LVa	Δ	+	+	+		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
18.LVa	Δ	+	ο	ο		
	B	ο	ο	+		
	N		x			
	Σ					
19.LVa	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
20.LVa	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x	x		x
	Σ					
21.LVa	Δ	ο	ο	x		
	B	x	ο	x		
	N	x			ο	
	Σ					
22.LVa	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N		ο			
	Σ					
23.LVa	Δ	+	ο	ο		
	B	ο	ο	+		
	N	x			x	
	Σ					
24.LVa	Δ	+	ο	+		
	B	ο	ο	+		
	N		x			
	Σ					
25.LVa	Δ	+	ο	+		
	B	ο	ο	+		
	N	x		x	x	x
	Σ					
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
1.LVb	Δ	+	ο	ο		
	B	ο	ο	+		
	N	x		x	x	x
	Σ					
2.LVb	Δ	+	+	+		
	B	ο	ο	ο		
	N		ο			
	Σ					
3.LVb	Δ	+	ο	+		
	B	+	ο	+		
	N	x			x	
	Σ					
4.LVb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			

	$\Sigma$					
<b>5.LVb</b>	$\Delta$	o	o	o		
	B	+	o	+		
	N	x		x	x	x
	$\Sigma$					
<b>6.LVb</b>	$\Delta$	+	+	+		
	B	o	o	+		
	N		x			
	$\Sigma$					
<b>7.LVb</b>	$\Delta$	o	o	o		
	B	o	o	+		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
<b>8.LVb</b>	$\Delta$	+	o	o		
	B	o	o	+		
	N		x			
	$\Sigma$					
9.LVb	$\Delta$	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
<b>10.LVb</b>	$\Delta$	+	+	o		
	B	o	+	o		
	N		+	x		x
	$\Sigma$					
11.LVb	$\Delta$	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
<b>12.LVb</b>	$\Delta$	+	o	+		
	B	+	o	+		
	N		x			
	$\Sigma$					
<b>13.LVb</b>	$\Delta$	+	o	+		
	B	o	o	+		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
14.LVb	$\Delta$	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N		x			
	$\Sigma$					
15.LVb	$\Delta$	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N	x		x	x	x
	$\Sigma$					
<b>16.LVb</b>	$\Delta$	+	o	o		
	B	+	o	o		
	N		x			
	$\Sigma$					
<b>17.LVb</b>	$\Delta$	+	+	o		
	B	o	+	o		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
<b>18.LVb</b>	$\Delta$	+	o	o		
	B	+	o	+		
	N		x			
	$\Sigma$					
19.LVb	$\Delta$	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
20.LVb	$\Delta$	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N		x	x		x

	Σ					
21.LVb	Δ	ο	ο	x		
	B	x	x	ο		
	N	x			x	
	Σ					
22.LVb	Δ	+	ο	+		
	B	ο	ο	+		
	N		x			
	Σ					
23.LVb	Δ	+	ο	+		
	B	ο	ο	+		
	N	x			x	
	Σ					
24.LVb	Δ	ο	ο	x		
	B	x	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
25.LVb	Δ	ο	ο	x		
	B	ο	ο	ο		
	N	x		x	x	x
	Σ					

Δ: Δέρμα, Β:Βράγχια, Ν:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα Α 18(25) – Μονάδα Β 15(25)

**Πίνακας 3.1.9.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για την τσιπούρα, 2<sup>η</sup> δειγματοληψία.

2 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΤΣΙΠΟΥΡΑ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	ΜΑ	ΑΟΑ	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
1.TSa	Δ	ο	+	ο		
	B	ο	+	ο		
	N	x		x	x	x
	Σ					
2.TSa	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
3.TSa	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
4.TSa	Δ	+	+	+		
	B	ο	+	+		
	N		x			
	Σ					
5.TSa	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x		x	x	x
	Σ					
6.TSa	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
7.TSa	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
8.TSa	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		ο			



	$\Sigma$					
<b>9.TSa</b>	$\Delta$	+	+	○		
	B	○	+	○		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
<b>10.TSa</b>	$\Delta$	○	+	○		
	B	x	○	○		
	N		x	x		x
	$\Sigma$					
<b>11.TSa</b>	$\Delta$	○	○	○		
	B	x	○	○		
	N	x			○	
	$\Sigma$					
<b>12.TSa</b>	$\Delta$	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	$\Sigma$					
<b>13.TSa</b>	$\Delta$	+	+	○		
	B	○	+	○		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
<b>14.TSa</b>	$\Delta$	○	○	○		
	B	x	○	x		
	N		○			
	$\Sigma$					
<b>15.TSa</b>	$\Delta$	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x		x	x	x
	$\Sigma$					
<b>16.TSa</b>	$\Delta$	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	$\Sigma$					
<b>17.TSa</b>	$\Delta$	+	+	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
<b>18.TSa</b>	$\Delta$	○	○	○		
	B	x	○	○		
	N		x			
	$\Sigma$					
<b>19.TSa</b>	$\Delta$	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			○	
	$\Sigma$					
<b>20.TSa</b>	$\Delta$	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x	x		x
	$\Sigma$					
<b>21.TSa</b>	$\Delta$	○	○	○		
	B	x	○	x		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
<b>22.TSa</b>	$\Delta$	+	+	○		
	B	○	+	+		
	N		+			
	$\Sigma$					
<b>23.TSa</b>	$\Delta$	+	+	+		
	B	x	○	+		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
<b>24.TSa</b>	$\Delta$	○	○	○		
	B	○	○	○		

	N		x			
	Σ					
<b>25.TSa</b>	Δ	+	+	ο		
	B	x	ο	+		
	N	x		x	x	x
	Σ					
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>						
<b>Υποστρώματα</b>	<b>όργανα</b>	<b>FMM</b>	<b>MA</b>	<b>AOA</b>	<b>TSA+2%NaCl</b>	<b>TCBS</b>
<b>1.TSb</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x		x	x	x
	Σ					
<b>2.TSb</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
<b>3.TSb</b>	Δ	ο	+	ο		
	B	ο	+	ο		
	N	x			x	
	Σ					
<b>4.TSb</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		ο			
	Σ					
<b>5.TSb</b>	Δ	+	+	ο		
	B	x	+	+		
	N	x		x	x	x
	Σ					
<b>6.TSb</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	x	ο		
	N		x			
	Σ					
<b>7.TSb</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
<b>8.TSb</b>	Δ	ο	+	ο		
	B	x	+	ο		
	N		ο			
	Σ					
<b>9.TSb</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
<b>10.TSb</b>	Δ	+	+	ο		
	B	x	ο	x		
	N		x	x		x
	Σ					
<b>11.TSb</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
<b>12.TSb</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
<b>13.TSb</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
<b>14.TSb</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		ο			
	Σ					

15.TSb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					
16.TSb	Δ	○	○	○		
	B	x	○	○		
	N		x			
	Σ					
17.TSb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
18.TSb	Δ	○	○	○		
	B	x	○	x		
	N		x			
	Σ					
19.TSb	Δ	+	+	○		
	B	○	+	○		
	N	x			x	
	Σ					
20.TSb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x	x		x
	Σ					
21.TSb	Δ	○	+	○		
	B	○	+	○		
	N	x			x	
	Σ					
22.TSb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
23.TSb	Δ	○	○	○		
	B	x	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
24.TSb	Δ	○	○	○		
	B	x	○	x		
	N		x			
	Σ					
25.TSb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα A 9(25) – Μονάδα B 6(25)

**Πίνακας 3.1.10.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το λυθρίνι, 2<sup>η</sup> δειγματοληψία.

2 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΛΥΘΡΙΝΙ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
1.La	Δ	x	x	x		
	B	○	○	x		
	N	x		x	x	x
	Σ					
2.La	Δ	○	○	x		
	B	○	○	○		
	N		x			

	$\Sigma$					
3.La	$\Delta$	x	x	x		
	B	o	o	o		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
4.La	$\Delta$	x	o	x		
	B	o	o	o		
	N		x			
	$\Sigma$					
5.La	$\Delta$	x	o	x		
	B	o	o	o		
	N	x		x	x	x
	$\Sigma$					
6.La	$\Delta$	x	x	x		
	B	o	o	x		
	N		x			
	$\Sigma$					
7.La	$\Delta$	+	+	x		
	B	o	o	+		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
8.La	$\Delta$	x	x	x		
	B	o	o	x		
	N		x			
	$\Sigma$					
9.La	$\Delta$	x	x	x		
	B	o	o	x		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
10.La	$\Delta$	x	x	x		
	B	o	o	x		
	N		x	x		x
	$\Sigma$					
11.La	$\Delta$	x	+	x		
	B	o	o	+		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
12.La	$\Delta$	o	+	x		
	B	o	o	o		
	N		x			
	$\Sigma$					
13.La	$\Delta$	x	o	x		
	B	o	o	o		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
14.La	$\Delta$	x	x	x		
	B	o	o	x		
	N		x			
	$\Sigma$					
15.La	$\Delta$	x	o	x		
	B	o	o	o		
	N	x		x	x	x
	$\Sigma$					
16.La	$\Delta$	x	x	x		
	B	o	o	x		
	N		x			
	$\Sigma$					
17.La	$\Delta$	+	+	x		
	B	o	o	+		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
18.La	$\Delta$	x	x	x		
	B	o	o	x		
	N		x			

	Σ					
19.La	Δ	x	ο	x		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
20.La	Δ	ο	+	x		
	B	ο	+	+		
	N		x	x		x
	Σ					
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>						
<b>Υποστρώματα</b>	<b>όργανα</b>	<b>FMM</b>	<b>MA</b>	<b>AOA</b>	<b>TSA+2%NaCl</b>	<b>TCBS</b>
1.Lb	Δ	x	ο	x		
	B	ο	ο	ο		
	N	x		x	x	x
	Σ					
2.Lb	Δ	x	x	x		
	B	ο	ο	x		
	N		x			
	Σ					
3.Lb	Δ	x	x	x		
	B	x	x	x		
	N	x			x	
	Σ					
4.Lb	Δ	x	x	x		
	B	ο	ο	x		
	N		x			
	Σ					
5.Lb	Δ	x	ο	x		
	B	ο	ο	ο		
	N	x		x	x	x
	Σ					
6.Lb	Δ	x	x	x		
	B	ο	ο	x		
	N		x			
	Σ					
7.Lb	Δ	x	x	x		
	B	ο	ο	x		
	N	x			x	
	Σ					
8.Lb	Δ	x	ο	x		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
9.Lb	Δ	x	x	x		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
10.Lb	Δ	x	x	x		
	B	ο	ο	x		
	N		x	x		x
	Σ					
11.Lb	Δ	x	x	x		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
12.Lb	Δ	x	+	x		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
13.Lb	Δ	x	x	x		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
14.Lb	Δ	x	ο	x		

	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
15.Lb	Δ	x	○	x		
	B	○	○	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					
16.Lb	Δ	x	x	x		
	B	○	○	x		
	N		x			
	Σ					
17.Lb	Δ	x	○	x		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
18.Lb	Δ	x	x	x		
	B	x	○	x		
	N		x			
	Σ					
19.Lb	Δ	+	+	x		
	B	○	○	+		
	N	x			x	
	Σ					
20.Lb	Δ	x	x	x		
	B	x	x	x		
	N		x	x		x
	Σ					

Δ: Δέρμα, Β:Βράγχια, Ν:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα Α 5(20) – Μονάδα Β 2(20)

**Πίνακας 3.1.11.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το φαγκρί, 2<sup>η</sup> δειγματοληψία.

2 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΦΑΓΚΡΙ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
1.Pa	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					
2.Pa	Δ	x	○	○		
	B	x	x	x		
	N		x			
	Σ					
3.Pa	Δ	x	x	○		
	B	x	○	x		
	N	x			○	
	Σ					
4.Pa	Δ	○	x	x		
	B	x	+	+		
	N		x			
	Σ					
5.Pa	Δ	x	+	○		
	B	x	+	x		
	N	x		x	x	x
	Σ					
6.Pa	Δ	x	○	x		
	B	x	○	○		
	N		○			
	Σ					
7.Pa	Δ	+	+	+		

	B	+	+	+		
	N	+			○	
	Σ					
<b>8.Pa</b>	Δ	○	+	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
<b>9.Pa</b>	Δ	+	+	○		
	B	+	○	○		
	N	x			○	
	Σ					
<b>10.Pa</b>	Δ	+	+	○		
	B	+	+	○		
	N		x	x		x
	Σ					
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>1.Pb</b>	Δ	+	+	○		
	B	+	○	+		
	N	x		x	x	x
	Σ					
<b>2.Pb</b>	Δ	+	+	○		
	B	+	○	○		
	N		x			
	Σ					
3.Pb	Δ	x	○	x		
	B	x	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
4.Pb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		○			
	Σ					
5.Pb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					
6.Pb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
<b>7.Pb</b>	Δ	+	+	○		
	B	+	+	○		
	N	x			x	
	Σ					
8.Pb	Δ	○	○	x		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
<b>9.Pb</b>	Δ	○	+	○		
	B	x	+	○		
	N	x			x	
	Σ					
<b>10.Pb</b>	Δ	○	○	○		
	B	○	+	+		
	N		x	x		x
	Σ					

Δ: Δέρμα, Β: Βράγχια, Ν: Νεφρός, Σ: Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα Α 6(10) – Μονάδα Β 5(10)

**Πίνακας 3.1.12.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το μυλοκόπι, 2<sup>η</sup> δειγματοληψία.

<b>2<sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΜΥΛΟΚΟΠΗ</b>						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
<b>1.MUC</b>	Δ	+	+	+		
	B	ο	ο	ο		
	N	x		ο	ο	ο
	Σ				ο	
<b>2.MUC</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		ο			
	Σ					
<b>3.MUC</b>	Δ	+	+	+		
	B	+	+	+		
	N	ο			x	
	Σ					
<b>4.MUC</b>	Δ	ο	+	ο		
	B	ο	ο	+		
	N		ο			
	Σ					
<b>5.MUC</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x		ο	ο	ο
	Σ				ο	
<b>6.MUC</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		ο			
	Σ					
<b>7.MUC</b>	Δ	ο	+	+		
	B	ο	ο	+		
	N	x			ο	
	Σ					
<b>8.MUC</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		ο			
	Σ					
<b>9.MUC</b>	Δ	+	+	+		
	B	ο	ο	+		
	N	x			ο	
	Σ					
<b>10.MUC</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		ο	x		ο
	Σ				ο	
<b>11.MUC</b>	Δ	+	+	+		
	B	+	+	ο		
	N	ο			ο	
	Σ					
<b>12.MUC</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		ο			
	Σ					
<b>13.MUC</b>	Δ	+	+	+		
	B	+	+	+		
	N	ο			ο	
	Σ					
<b>14.MUC</b>	Δ	+	+	+		
	B	ο	+	ο		
	N		+			
	Σ					
<b>15.MUC</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		



	N	o		o	o	o
	Σ				o	

Δ: Δέρμα, Β:Βράγχια, Ν:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα Α 8(15)

**Πίνακας 3.1.13.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το μυτάκι, 2<sup>η</sup> δειγματοληψία.

2 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΜΥΤΑΚΙ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>						
1.M	Δ	o	x	o		
	B	o	x	o		
	N	x		x	x	x
	Σ					
2.M	Δ	o	o	o		
	B	x	x	o		
	N		x			
	Σ					
3.M	Δ	o	o	x		
	B	x	o	o		
	N	x			x	
	Σ					
4.M	Δ	+	o	+		
	B	o	o	+		
	N		o			
	Σ					
5.M	Δ	o	x	x		
	B	x	x	o		
	N	x		x	x	x
	Σ					
6.M	Δ	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N		x			
	Σ					
7.M	Δ	+	o	+		
	B	o	o	o		
	N	x			x	
	Σ					
8.M	Δ	+	x	+		
	B	o	x	o		
	N		x			
	Σ					
9.M	Δ	x	x	x		
	B	x	x	o		
	N	x			x	
	Σ					
10.M	Δ	o	x	x		
	B	o	o	o		
	N		x	x		x
	Σ					
11.M	Δ	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N	x			x	
	Σ					
12.M	Δ	o	x	x		
	B	o	o	o		
	N		x			
	Σ					
13.M	Δ	o	o	+		

	B	○	○	+		
	N	x			x	
	Σ					
14.M	Δ	○	○	x		
	B	x	○	○		
	N		x			
	Σ					
15.M	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα B 4(15)

**Πίνακας 3.1.14.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για τον συκίο, 2<sup>η</sup> δειγματοληψία.

2 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΣΥΚΙΟΣ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
1.SU	Δ	○	○	x		
	B	x	x	x		
	N	x		x	x	x
	Σ					
2.SU	Δ	○	+	+		
	B	○	○	+		
	N		x			
	Σ					
3.SU	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			○	
	Σ					
4.SU	Δ	○	○	x		
	B	x	x	x		
	N		x			
	Σ					
5.SU	Δ	+	+	+		
	B	○	○	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					
6.SU	Δ	○	○	○		
	B	x	x	○		
	N		○			
	Σ					
7.SU	Δ	○	○	○		
	B	x	○	○		
	N	x			○	
	Σ					
8.SU	Δ	+	+	+		
	B	○	○	+		
	N		○			
	Σ					
9.SU	Δ	+	+	+		
	B	○	○	+		
	N	x			○	
	Σ					
10.SU	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x	x		x
	Σ					

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα Α 4(10)

**Πίνακας 3.1.15.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το λαβράκι, 3<sup>η</sup> δειγματοληψία.

3 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΛΑΒΡΑΚΙ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
<b>1.LVa</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	+	+	x		
	N	x		x	x	x
	Σ					
<b>2.LVa</b>	Δ	+	ο	ο		
	B	x	ο	+		
	N		ο			
	Σ					
<b>3.LVa</b>	Δ	+	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N	x			ο	
	Σ					
<b>4.LVa</b>	Δ	+	+	ο		
	B	x	+	ο		
	N		x			
	Σ					
<b>5.LVa</b>	Δ	+	ο	ο		
	B	ο	ο	+		
	N	x		x	x	x
	Σ					
<b>6.LVa</b>	Δ	+	+	+		
	B	+	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
<b>7.LVa</b>	Δ	ο	+	+		
	B	ο	ο	+		
	N	x			x	
	Σ					
<b>8.LVa</b>	Δ	+	+	+		
	B	ο	x	+		
	N		x			
	Σ					
<b>9.LVa</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
<b>10.LVa</b>	Δ	+	+	+		
	B	x	ο	+		
	N		x	x		x
	Σ					
<b>11.LVa</b>	Δ	+	+	+		
	B	x	ο	x		
	N	x			x	
	Σ					
<b>12.LVa</b>	Δ	+	+	+		
	B	ο	+	+		
	N		+			
	Σ					
<b>13.LVa</b>	Δ	+	+	+		
	B	+	+	+		
	N	+			x	
	Σ					

<b>14.LVa</b>	Δ	+	○	○		
	B	x	○	+		
	N		x			
	Σ					
<b>15.LVa</b>	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					
<b>16.LVa</b>	Δ	+	+	○		
	B	+	x	○		
	N		x			
	Σ					
<b>17.LVa</b>	Δ	+	+	○		
	B	x	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
<b>18.LVa</b>	Δ	○	○	○		
	B	x	○	○		
	N		x			
	Σ					
<b>19.LVa</b>	Δ	+	○	+		
	B	x	○	+		
	N	x			x	
	Σ					
<b>20.LVa</b>	Δ	+	+	+		
	B	+	○	+		
	N		x	x		x
	Σ					
<b>21.LVa</b>	Δ	+	○	+		
	B	+	○	+		
	N	x			x	
	Σ					
<b>22.LVa</b>	Δ	+	○	+		
	B	○	○	+		
	N		x			
	Σ					
<b>23.LVa</b>	Δ	○	○	○		
	B	○	○	+		
	N	x			x	
	Σ					
<b>24.LVa</b>	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		○			
	Σ					
<b>25.LVa</b>	Δ	+	○	○		
	B	○	○	+		
	N	x		x	x	x
	Σ					
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>						
<b>Υποστρώματα</b>	<b>όργανα</b>	<b>FMM</b>	<b>MA</b>	<b>AOA</b>	<b>TSA+2%NaCl</b>	<b>TCBS</b>
<b>1.LVb</b>	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					
<b>2.LVb</b>	Δ	+	○	○		
	B	x	○	+		
	N		○			
	Σ					
<b>3.LVb</b>	Δ	+	+	+		
	B	○	○	+		
	N	x			x	
	Σ					
<b>4.LVb</b>	Δ	+	○	○		

	B	○	○	+		
	N		x			
	Σ					
5.LVb	Δ	○	○	○		
	B	x	x	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					
6.LVb	Δ	+	○	○		
	B	x	○	+		
	N		x			
	Σ					
7.LVb	Δ	+	+	+		
	B	○	○	+		
	N	x			x	
	Σ					
8.LVb	Δ	○	○	○		
	B	x	○	○		
	N		x			
	Σ					
9.LVb	Δ	+	○	○		
	B	x	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
10.LVb	Δ	+	+	○		
	B	x	○	○		
	N		x	x		x
	Σ					
11.LVb	Δ	+	+	+		
	B	○	+	+		
	N	x			x	
	Σ					
12.LVb	Δ	+	+	○		
	B	x	+	○		
	N		○			
	Σ					
13.LVb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			○	
	Σ					
14.LVb	Δ	+	+	+		
	B	+	○	○		
	N		x			
	Σ					
15.LVb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					
16.LVb	Δ	+	○	+		
	B	○	○	+		
	N		x			
	Σ					
17.LVb	Δ	+	○	○		
	B	x	○	+		
	N	x			x	
	Σ					
18.LVb	Δ	+	+	+		
	B	x	x	+		
	N		○			
	Σ					
19.LVb	Δ	○	○	○		
	B	x	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
20.LVb	Δ	+	+	+		

	B	○	+	+		
	N		x	+		x
	Σ					
21.LVb	Δ	+	+	○		
	B	+	x	○		
	N	x			○	
	Σ					
22.LVb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
23.LVb	Δ	+	+	+		
	B	+	○	+		
	N	x			x	
	Σ					
24.LVb	Δ	+	+	+		
	B	+	+	+		
	N		x			
	Σ					
25.LVb	Δ	+	○	○		
	B	x	○	+		
	N	x		x	x	x
	Σ					

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα A 21(25) – Μονάδα B 18(25)

**Πίνακας 3.1.16.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για την τσιπούρα, 3<sup>η</sup> δειγματοληψία.

3 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΤΣΙΠΟΥΡΑ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
1.TSa	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					
2.TSa	Δ	○	+	○		
	B	x	+	○		
	N		x			
	Σ					
3.TSa	Δ	○	x	x		
	B	x	○	x		
	N	x			○	
	Σ					
4.TSa	Δ	○	x	○		
	B	○	x	○		
	N		x			
	Σ					
5.TSa	Δ	+	+	○		
	B	x	○	x		
	N	x		x	x	x
	Σ					
6.TSa	Δ	○	○	○		
	B	x	x	x		
	N		○			
	Σ					
7.TSa	Δ	○	○	○		
	B	x	○	○		
	N	x			○	
	Σ					

8.TSa	$\Delta$	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N		o			
	$\Sigma$					
9.TSa	$\Delta$	+	+	o		
	B	o	+	o		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
10.TSa	$\Delta$	o	+	o		
	B	x	o	o		
	N		x	x		x
	$\Sigma$					
11.TSa	$\Delta$	o	x	x		
	B	x	o	x		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
12.TSa	$\Delta$	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N		x			
	$\Sigma$					
13.TSa	$\Delta$	+	+	o		
	B	o	+	o		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
14.TSa	$\Delta$	o	o	o		
	B	x	o	o		
	N		x			
	$\Sigma$					
15.TSa	$\Delta$	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N	x		x	x	x
	$\Sigma$					
16.TSa	$\Delta$	o	o	o		
	B	x	o	o		
	N		x			
	$\Sigma$					
17.TSa	$\Delta$	o	o	o		
	B	x	o	o		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
18.TSa	$\Delta$	+	+	o		
	B	x	o	x		
	N		x			
	$\Sigma$					
19.TSa	$\Delta$	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
20.TSa	$\Delta$	+	+	o		
	B	o	+	o		
	N		x	x		x
	$\Sigma$					
21.TSa	$\Delta$	+	+	o		
	B	+	+	o		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
22.TSa	$\Delta$	+	+	+		
	B	x	o	+		
	N		+			
	$\Sigma$					
23.TSa	$\Delta$	o	o	o		
	B	x	o	o		
	N	x			x	

	Σ					
24.TSa	Δ	ο	x	x		
	B	x	ο	x		
	N		x			
	Σ					
25.TSa	Δ	+	+	ο		
	B	+	+	ο		
	N	x		x	x	x
	Σ					
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>						
<b>Υποστρώματα</b>	<b>όργανα</b>	<b>FMM</b>	<b>MA</b>	<b>AOA</b>	<b>TSA+2%NaCl</b>	<b>TCBS</b>
1.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x		x	x	x
	Σ					
2.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
3.TSb	Δ	+	+	ο		
	B	x	+	+		
	N	x			x	
	Σ					
4.TSb	Δ	ο	+	ο		
	B	x	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
5.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	x		
	N	x		x	x	x
	Σ					
6.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	x	ο		
	N		x			
	Σ					
7.TSb	Δ	+	+	+		
	B	x	ο	+		
	N	x			x	
	Σ					
8.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
9.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
10.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		ο	x		x
	Σ					
11.TSb	Δ	+	+	ο		
	B	x	ο	x		
	N	x			x	
	Σ					
12.TSb	Δ	ο	+	ο		
	B	x	+	ο		
	N		x			
	Σ					
13.TSb	Δ	+	+	ο		
	B	+	+	ο		
	N	x			ο	
	Σ					
14.TSb	Δ	ο	ο	ο		



	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
15.TSb	Δ	○	x	○		
	B	○	x	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					
16.TSb	Δ	○	○	○		
	B	x	x	x		
	N		x			
	Σ					
17.TSb	Δ	○	x	x		
	B	x	○	x		
	N	x			x	
	Σ					
18.TSb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		○			
	Σ					
19.TSb	Δ	○	○	○		
	B	x	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
20.TSb	Δ	○	○	○		
	B	x	○	○		
	N		x	x		x
	Σ					
21.TSb	Δ	+	+	○		
	B	○	+	○		
	N	x			x	
	Σ					
22.TSb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
23.TSb	Δ	○	x	x		
	B	x	x	x		
	N	x			x	
	Σ					
24.TSb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
25.TSb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα A 10(25) – Μονάδα B 7(25)

**Πίνακας 3.1.17.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το λυθρίνι, 3<sup>η</sup> δειγματοληψία.

3 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΛΥΘΡΙΝΙ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
1.La	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					
2.La	Δ	○	+	○		

	B	○	○	+		
	N		x			
	Σ					
3.La	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
4.La	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
5.La	Δ	○	○	○		
	B	○	○	+		
	N	x		x	x	x
	Σ					
6.La	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
7.La	Δ	+	+	○		
	B	○	○	+		
	N	x			x	
	Σ					
8.La	Δ	+	+	○		
	B	○	+	+		
	N		○			
	Σ					
9.La	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
10.La	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x	x		x
	Σ					
11.La	Δ	+	+	○		
	B	+	+	○		
	N	x			x	
	Σ					
12.La	Δ	○	+	○		
	B	○	+	+		
	N		x			
	Σ					
13.La	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
14.La	Δ	+	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
15.La	Δ	○	+	○		
	B	○	○	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					
16.La	Δ	○	+	○		
	B	○	○	+		
	N		x			
	Σ					
17.La	Δ	○	○	x		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
18.La	Δ	+	+	○		

	B	○	○	+		
	N		x			
	Σ					
19.La	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
20.La	Δ	x	x	x		
	B	x	x	x		
	N		x	x		x
	Σ					
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
1.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x		x	x	x
	Σ					
2.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
3.Lb	Δ	+	+	○		
	B	○	○	+		
	N	x			x	
	Σ					
4.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
5.Lb	Δ	+	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x		x	○	x
	Σ					
6.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
7.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
8.Lb	Δ	○	+	○		
	B	○	+	○		
	N		x			
	Σ					
9.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
10.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x	x		x
	Σ					
11.Lb	Δ	○	+	○		
	B	○	○	+		
	N	x			x	
	Σ					
12.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		○			
	Σ					
13.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			○	

	Σ					
14.Lb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
15.Lb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x		x	x	x
	Σ					
16.Lb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		ο			
	Σ					
17.Lb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
18.Lb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
19.Lb	Δ	+	+	ο		
	B	ο	ο	+		
	N	x			ο	
	Σ					
20.Lb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x	x		x
	Σ					

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα A 10(20) – Μονάδα B 5(20)

**Πίνακας 3.1.18.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το φαγκρί, 3<sup>η</sup> δειγματοληψία.

3 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΦΑΓΚΡΙ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
1.Pa	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x		x	x	x
	Σ					
2.Pa	Δ	+	ο	ο		
	B	+	+	ο		
	N		x			
	Σ					
3.Pa	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	+	+		
	N	x			ο	
	Σ					
4.Pa	Δ	+	+	+		
	B	+	+	+		
	N		x			
	Σ					
5.Pa	Δ	ο	+	ο		
	B	ο	+	ο		
	N	x		x	x	x
	Σ					
6.Pa	Δ	+	+	ο		
	B	+	ο	ο		
	N		ο			

	Σ					
<b>7.Pa</b>	Δ	ο	+	+		
	B	+	+	ο		
	N	x			ο	
	Σ					
<b>8.Pa</b>	Δ	ο	+	ο		
	B	+	+	+		
	N		ο			
	Σ					
<b>9.Pa</b>	Δ	ο	+	ο		
	B	+	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
<b>10.Pa</b>	Δ	ο	ο	+		
	B	ο	+	ο		
	N		x	x		x
	Σ					
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>1.Pb</b>	Δ	+	ο	ο		
	B	+	ο	+		
	N	x		x	x	x
	Σ					
<b>2.Pb</b>	Δ	+	+	ο		
	B	+	+	ο		
	N		x			
	Σ					
<b>3.Pb</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
<b>4.Pb</b>	Δ	+	+	ο		
	B	+	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
<b>5.Pb</b>	Δ	+	+	ο		
	B	+	+	ο		
	N	x		x	x	x
	Σ					
<b>6.Pb</b>	Δ	x	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
<b>7.Pb</b>	Δ	ο	+	ο		
	B	+	+	+		
	N	x			x	
	Σ					
<b>8.Pb</b>	Δ	+	+	ο		
	B	+	+	ο		
	N		x			
	Σ					
<b>9.Pb</b>	Δ	ο	+	+		
	B	+	+	+		
	N	x			x	
	Σ					
<b>10.Pb</b>	Δ	+	+	ο		
	B	+	+	ο		
	N		x	x		x
	Σ					

Δ: Δέρμα, Β: Βράγχια, Ν: Νεφρός, Σ: Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα Α 9(10) – Μονάδα Β 8(10)

**Πίνακας 3.1.19.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το μυλοκόπι, 3<sup>η</sup> δειγματοληψία.

<b>3<sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΜΥΛΟΚΟΠΗ</b>						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
<b>1.MUC</b>	Δ	ο	ο	+		
	B	ο	x	+		
	N	x		ο	x	x
	Σ				x	
<b>2.MUC</b>	Δ	+	ο	+		
	B	+	x	x		
	N		ο			
	Σ					
<b>3.MUC</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	ο			ο	
	Σ					
<b>4.MUC</b>	Δ	+	+	+		
	B	+	+	ο		
	N		ο			
	Σ					
<b>5.MUC</b>	Δ	+	+	ο		
	B	+	+	ο		
	N	x		ο	x	x
	Σ				x	
<b>6.MUC</b>	Δ	+	+	+		
	B	+	+	+		
	N		ο			
	Σ					
<b>7.MUC</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
<b>8.MUC</b>	Δ	+	ο	+		
	B	+	x	ο		
	N		ο			
	Σ					
<b>9.MUC</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			ο	
	Σ					
<b>10.MUC</b>	Δ	+	+	ο		
	B	+	+	ο		
	N		ο	x		x
	Σ				x	
<b>11.MUC</b>	Δ	+	+	+		
	B	+	+	+		
	N	x			ο	
	Σ					
<b>12.MUC</b>	Δ	ο	+	ο		
	B	ο	ο	+		
	N		ο			
	Σ					
<b>13.MUC</b>	Δ	+	ο	+		
	B	+	ο	ο		
	N	ο			x	
	Σ					
<b>14.MUC</b>	Δ	+	+	+		
	B	ο	ο	+		
	N		ο			
	Σ					

15.MUC	Δ	+	+	+		
	B	ο	ο	ο		
	N	ο		ο	x	x
	Σ				x	

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα Α 12(15)

**Πίνακας 3.1.20.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το μυτάκι, 3<sup>η</sup> δειγματοληψία.

3 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΜΥΤΑΚΙ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>						
1.M	Δ	ο	x	x		
	B	ο	ο	x		
	N	x		x	x	x
	Σ					
2.M	Δ	ο	ο	x		
	B	x	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
3.M	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
4.M	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	+	ο		
	N		x			
	Σ					
5.M	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	+	+		
	N	x		x	x	x
	Σ					
6.M	Δ	ο	ο	x		
	B	x	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
7.M	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	+		
	N	x			x	
	Σ					
8.M	Δ	x	x	x		
	B	x	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
9.M	Δ	+	ο	ο		
	B	ο	ο	+		
	N	x			x	
	Σ					
10.M	Δ	x	x	x		
	B	x	ο	ο		
	N		x	x		x
	Σ					
11.M	Δ	ο	ο	x		
	B	x	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
12.M	Δ	+	ο	+		
	B	ο	ο	+		
	N		x			

	Σ					
13.M	Δ	ο	x	x		
	B	x	x	ο		
	N	x			x	
	Σ					
14.M	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
15.M	Δ	+	ο	+		
	B	ο	ο	+		
	N	x		x	x	x
	Σ					

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα B 6(15)

**Πίνακας 3.1.21.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για τον συκίο, 3<sup>η</sup> δειγματοληψία.

3 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΣΥΚΙΟΣ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	ΑΟΑ	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
1.SU	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	x	x		
	N	x		x	x	x
	Σ					
2.SU	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
3.SU	Δ	+	+	+		
	B	ο	ο	+		
	N	x			x	
	Σ					
4.SU	Δ	+	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
5.SU	Δ	+	x	x		
	B	ο	+	x		
	N	x		x	x	x
	Σ					
6.SU	Δ	ο	ο	x		
	B	ο	x	x		
	N		x			
	Σ					
7.SU	Δ	+	+	+		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
8.SU	Δ	+	+	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
9.SU	Δ	+	+	+		
	B	ο	ο	+		
	N	x			x	
	Σ					
10.SU	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	x	ο		



	N		x	x		x
	Σ					

Δ: Δέρμα, Β:Βράγχια, Ν:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα Α 6(10)

Στην 4<sup>η</sup> Δειγματοληψία, δεν χρησιμοποιήθηκε το τροποποιημένο ΑΟΑ για δείγματα από νεφρό, καθώς αποδείχτηκε μη αποτελεσματικό για την ανάπτυξη και απομόνωση των Μυξοβακτηριδίων.

**Πίνακας 3.1.22.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το λαβράκι, 4<sup>η</sup> δειγματοληψία.

4 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΛΑΒΡΑΚΙ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	ΑΟΑ	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
<b>1.LVa</b>	Δ	+	ο	ο		
	B	+	ο	+		
	N	x			x	x
	Σ					
<b>2.LVa</b>	Δ	ο	+	ο		
	B	ο	+	ο		
	N		x			
	Σ					
<b>3.LVa</b>	Δ	+	ο	ο		
	B	ο	ο	+		
	N	x			x	
	Σ					
<b>4.LVa</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		ο			
	Σ					
<b>5.LVa</b>	Δ	+	+	ο		
	B	x	+	ο		
	N	x			x	x
	Σ					
<b>6.LVa</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	+		
	N		x			
	Σ					
<b>7.LVa</b>	Δ	+	+	+		
	B	+	ο	+		
	N	x			x	
	Σ					
<b>8.LVa</b>	Δ	+	+	ο		
	B	x	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
<b>9.LVa</b>	Δ	+	ο	+		
	B	x	ο	+		
	N	x			x	
	Σ					
<b>10.LVa</b>	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N		x			x
	Σ					
<b>11.LVa</b>	Δ	+	+	ο		

	B	x	o	x		
	N	x			x	
	Σ					
12.LVa	Δ	+	o	o		
	B	o	o	+		
	N		+			
	Σ					
13.LVa	Δ	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N	x			x	
	Σ					
14.LVa	Δ	+	+	+		
	B	x	o	+		
	N		x			
	Σ					
15.LVa	Δ	o	o	o		
	B	o	o	+		
	N	x			x	x
	Σ					
16.LVa	Δ	o	o	o		
	B	x	o	x		
	N		x			
	Σ					
17.LVa	Δ	+	+	o		
	B	o	o	+		
	N	x			x	
	Σ					
18.LVa	Δ	+	o	+		
	B	o	o	+		
	N		x			
	Σ					
19.LVa	Δ	o	o	o		
	B	x	o	o		
	N	x			x	
	Σ					
20.LVa	Δ	o	+	o		
	B	x	+	o		
	N		x			x
	Σ					
21.LVa	Δ	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N	x			x	
	Σ					
22.LVa	Δ	o	o	x		
	B	x	o	x		
	N		x			
	Σ					
23.LVa	Δ	o	o	x		
	B	x	o	o		
	N	x			x	
	Σ					
24.LVa	Δ	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N		o			
	Σ					
25.LVa	Δ	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N	x			x	x
	Σ					
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
1.LVb	Δ	o	o	o		
	B	o	o	o		

	N	x			x	x
	$\Sigma$					
2.LVb	$\Delta$	o	o	o		
	B	x	o	o		
	N		x			
	$\Sigma$					
3.LVb	$\Delta$	+	o	o		
	B	o	o	+		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
4.LVb	$\Delta$	+	+	+		
	B	x	o	+		
	N		o			
	$\Sigma$					
5.LVb	$\Delta$	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N	x			x	x
	$\Sigma$					
6.LVb	$\Delta$	o	o	x		
	B	x	o	x		
	N		x			
	$\Sigma$					
7.LVb	$\Delta$	+	o	+		
	B	x	o	+		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
8.LVb	$\Delta$	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N		x			
	$\Sigma$					
9.LVb	$\Delta$	o	o	o		
	B	x	o	o		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
10.LVb	$\Delta$	+	+	o		
	B	x	o	+		
	N		x			x
	$\Sigma$					
11.LVb	$\Delta$	o	o	o		
	B	x	o	o		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
12.LVb	$\Delta$	o	o	o		
	B	x	o	o		
	N		x			
	$\Sigma$					
13.LVb	$\Delta$	o	o	x		
	B	x	o	x		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
14.LVb	$\Delta$	+	+	o		
	B	o	o	+		
	N		x			
	$\Sigma$					
15.LVb	$\Delta$	+	o	o		
	B	o	o	+		
	N	x			x	x
	$\Sigma$					
16.LVb	$\Delta$	o	o	o		
	B	o	o	+		
	N		x			
	$\Sigma$					
17.LVb	$\Delta$	o	o	o		
	B	x	o	o		

	N	x			o	
	Σ					
18.LVb	Δ	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N		x			
	Σ					
19.LVb	Δ	o	o	o		
	B	x	o	o		
	N	x			x	
	Σ					
20.LVb	Δ	+	+	o		
	B	x	o	x		
	N		x			x
	Σ					
21.LVb	Δ	+	+	o		
	B	x	+	o		
	N	x			o	
	Σ					
22.LVb	Δ	o	+	o		
	B	o	+	o		
	N		x			
	Σ					
23.LVb	Δ	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N	x			x	
	Σ					
24.LVb	Δ	+	+	+		
	B	+	o	+		
	N		o			
	Σ					
25.LVb	Δ	+	+	o		
	B	+	o	o		
	N	x			x	x
	Σ					

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα A 15(25) – Μονάδα B 12(25)

**Πίνακας 3.1.23.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για την τσιπούρα, 4<sup>η</sup> δειγματοληψία.

4 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΤΣΙΠΟΥΡΑ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
1.TSa	Δ	o	+	o		
	B	x	o	x		
	N	x			x	x
	Σ					
2.TSa	Δ	+	+	+		
	B	x	o	x		
	N		x			
	Σ					
3.TSa	Δ	o	o	o		
	B	x	o	x		
	N	x			x	
	Σ					
4.TSa	Δ	o	o	o		
	B	x	x	x		
	N		x			
	Σ					
5.TSa	Δ	+	+	o		
	B	x	+	x		

	N	x		x	x	x
	$\Sigma$					
<b>6.TSa</b>	$\Delta$	+	+	o		
	B	x	o	x		
	N		x			
	$\Sigma$					
<b>7.TSa</b>	$\Delta$	+	+	o		
	B	o	+	o		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
<b>8.TSa</b>	$\Delta$	+	+	+		
	B	o	+	+		
	N		x			
	$\Sigma$					
9.TSa	$\Delta$	o	o	o		
	B	x	o	x		
	N	x			o	
	$\Sigma$					
<b>10.TSa</b>	$\Delta$	+	+	o		
	B	o	o	o		
	N		x			x
	$\Sigma$					
11.TSa	$\Delta$	o	o	o		
	B	x	o	o		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
12.TSa	$\Delta$	o	o	o		
	B	x	x	x		
	N		x			
	$\Sigma$					
13.TSa	$\Delta$	o	o	o		
	B	o	o	o		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
<b>14.TSa</b>	$\Delta$	+	+	+		
	B	o	+	+		
	N		+			
	$\Sigma$					
15.TSa	$\Delta$	o	o	o		
	B	x	x	x		
	N	x			x	x
	$\Sigma$					
16.TSa	$\Delta$	o	o	x		
	B	x	x	o		
	N		x			
	$\Sigma$					
<b>17.TSa</b>	$\Delta$	+	+	o		
	B	o	+	o		
	N	x			o	
	$\Sigma$					
<b>18.TSa</b>	$\Delta$	o	+	o		
	B	x	o	o		
	N		x			
	$\Sigma$					
19.TSa	$\Delta$	o	x	x		
	B	x	x	x		
	N	x			x	
	$\Sigma$					
20.TSa	$\Delta$	o	o	o		
	B	x	o	x		
	N		o			x
	$\Sigma$					
<b>21.TSa</b>	$\Delta$	o	+	o		
	B	x	o	o		

	N	x			x	
	Σ					
22.TSa	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	x		
	N		x			
	Σ					
23.TSa	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
24.TSa	Δ	+	+	ο		
	B	ο	+	ο		
	N		x			
	Σ					
25.TSa	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N	x			x	x
	Σ					
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>						
<b>Υποστρώματα</b>	<b>όργανα</b>	<b>FMM</b>	<b>MA</b>	<b>AOA</b>	<b>TSA+2%NaCl</b>	<b>TCBS</b>
1.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N	x			x	x
	Σ					
2.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
3.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
4.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
5.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	x
	Σ					
6.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
7.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
8.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	x		
	N		x			
	Σ					
9.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
10.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		ο			x
	Σ					
11.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	x		
	N	x			x	

	Σ					
12.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
13.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			ο	
	Σ					
14.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
15.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	x
	Σ					
16.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
17.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
18.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N		ο			
	Σ					
19.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
20.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N		x			x
	Σ					
21.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
22.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	x		
	N		x			
	Σ					
23.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
24.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
25.TSb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	x
	Σ					

Δ: Δέρμα, Β:Βράγχια, Ν:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα Α 12(25) – Μονάδα Β 0(25)

**Πίνακας 3.1.24.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το λυθρίνι, 4<sup>η</sup> δειγματοληψία.

<b>4<sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΛΥΘΡΙΝΙ</b>						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
1.La	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N	x			x	x
	Σ					
2.La	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
3.La	Δ	ο	+	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
4.La	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
5.La	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	ο	ο		
	N	x			x	x
	Σ					
6.La	Δ	+	+	x		
	B	ο	ο	+		
	N		x			
	Σ					
7.La	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
8.La	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
9.La	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
10.La	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			x
	Σ					
11.La	Δ	+	+	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
12.La	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
13.La	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
14.La	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
15.La	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		



	N	x			x	x
	Σ					
16.La	Δ	+	+	○		
	B	+	○	+		
	N		x			
	Σ					
17.La	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
18.La	Δ	○	○	x		
	B	x	x	x		
	N		x			
	Σ					
19.La	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
20.La	Δ	○	○	x		
	B	x	x	x		
	N		x			x
	Σ					
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>						
<b>Υποστρώματα</b>	<b>όργανα</b>	<b>FMM</b>	<b>MA</b>	<b>AOA</b>	<b>TSA+2%NaCl</b>	<b>TCBS</b>
1.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	x
	Σ					
2.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
3.Lb	Δ	○	○	○		
	B	x	○	○		
	N	x			○	
	Σ					
4.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
5.Lb	Δ	○	○	x		
	B	x	○	x		
	N	x			x	x
	Σ					
6.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
7.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
8.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
9.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
10.Lb	Δ	x	○	x		
	B	x	x	x		
	N		x			x
	Σ					

11.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
12.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		○			
	Σ					
13.Lb	Δ	x	○	x		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
14.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
15.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	x
	Σ					
16.Lb	Δ	○	+	○		
	B	○	○	○		
	N		○			
	Σ					
17.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
18.Lb	Δ	x	○	x		
	B	x	○	○		
	N		x			
	Σ					
19.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
20.Lb	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			x
	Σ					

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα A 4(20) – Μονάδα B 1(20)

**Πίνακας 3.1.25.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το φαγκρί, 4<sup>η</sup> δειγματοληψία.

4 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΦΑΓΚΡΙ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
1.Pa	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	x
	Σ					
2.Pa	Δ	x	○	x		
	B	x	○	○		
	N		x			
	Σ					
3.Pa	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	

	Σ					
4.Pa	Δ	ο	ο	x		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
5.Pa	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	x
	Σ					
6.Pa	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
7.Pa	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
8.Pa	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		ο			
	Σ					
9.Pa	Δ	+	+	ο		
	B	+	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
10.Pa	Δ	ο	ο	x		
	B	x	ο	x		
	N		x			x
	Σ					
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>						
<b>Υποστρώματα</b>	<b>όργανα</b>	<b>FMM</b>	<b>MA</b>	<b>AOA</b>	<b>TSA+2%NaCl</b>	<b>TCBS</b>
1.Pb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	x
	Σ					
2.Pb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	+	ο		
	N		x			
	Σ					
3.Pb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
4.Pb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
5.Pb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	x
	Σ					
6.Pb	Δ	+	ο	ο		
	B	ο	ο	+		
	N		x			
	Σ					
7.Pb	Δ	ο	ο	x		
	B	x	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
8.Pb	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
9.Pb	Δ	ο	ο	ο		

	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
10.Pb	Δ	○	○	x		
	B	x	○	○		
	N		x	x		x
	Σ					

Δ: Δέρμα, Β:Βράγχια, Ν:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα Α 1(10) – Μονάδα Β 2(10)

**Πίνακας 3.1.26.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το μυλοκόπι, 4<sup>η</sup> δειγματοληψία.

4 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΜΥΛΟΚΟΠΗ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	ΜΑ	ΑΟΑ	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
1.MUC	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	x
	Σ					
2.MUC	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
3.MUC	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	○			○	
	Σ					
4.MUC	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
5.MUC	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	x
	Σ					
<b>6.MUC</b>	Δ	○	+	○		
	B	○	+	+		
	N		○			
	Σ					
7.MUC	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			x	
	Σ					
8.MUC	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		x			
	Σ					
9.MUC	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			○	
	Σ					
10.MUC	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N		○			○
	Σ				○	
11.MUC	Δ	○	○	○		
	B	○	○	○		
	N	x			○	
	Σ					

12.MUC	Δ	+	ο	+		
	B	+	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
13.MUC	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
14.MUC	Δ	ο	+	ο		
	B	+	+	ο		
	N		ο			
	Σ					
15.MUC	Δ	+	+	+		
	B	+	+	+		
	N	ο			x	x
	Σ					

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα A 4(15)

**Πίνακας 3.1.27.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για το μυτάκι, 4<sup>η</sup> δειγματοληψία.

4 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΜΥΤΑΚΙ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Β</b>						
1.M	Δ	ο	ο	x		
	B	x	ο	ο		
	N	x			x	x
	Σ					
2.M	Δ	ο	x	x		
	B	x	x	ο		
	N		x			
	Σ					
3.M	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	
	Σ					
4.M	Δ	ο	ο	x		
	B	x	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
5.M	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	x	ο		
	N	x			x	x
	Σ					
6.M	Δ	x	x	x		
	B	x	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
7.M	Δ	+	ο	+		
	B	ο	ο	+		
	N	x			x	
	Σ					
8.M	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
9.M	Δ	ο	ο	x		
	B	x	ο	ο		
	N	x			x	

	Σ					
10.M	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			x
	Σ					
11.M	Δ	+	ο	ο		
	B	ο	ο	+		
	N	x			x	
	Σ					
12.M	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	x	ο		
	N		x			
	Σ					
13.M	Δ	x	x	x		
	B	x	x	ο		
	N	x			x	
	Σ					
14.M	Δ	ο	ο	x		
	B	x	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
15.M	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	x
	Σ					

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα Β 2(15)

**Πίνακας 3.1.28.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για τον συκίο, 4<sup>η</sup> δειγματοληψία.

4 <sup>η</sup> ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ - ΣΥΚΙΟΣ						
Υποστρώματα	όργανα	FMM	MA	AOA	TSA+2%NaCl	TCBS
<b>ΜΟΝΑΔΑ Α</b>						
1.SU	Δ	ο	ο	ο		
	B	ο	ο	ο		
	N	x			x	x
	Σ					
2.SU	Δ	+	+	+		
	B	ο	ο	+		
	N		x			
	Σ					
3.SU	Δ	ο	+	+		
	B	ο	ο	+		
	N	x			ο	
	Σ					
4.SU	Δ	ο	+	+		
	B	ο	ο	+		
	N		x			
	Σ					
5.SU	Δ	+	+	ο		
	B	ο	ο	x		
	N	x			x	x
	Σ					
6.SU	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	x	x		
	N		x			
	Σ					
7.SU	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	x	ο		

	N	x			x	
	Σ					
8.SU	Δ	+	+	+		
	B	ο	ο	ο		
	N		x			
	Σ					
9.SU	Δ	ο	ο	x		
	B	x	x	x		
	N	x			x	
	Σ					
10.SU	Δ	ο	ο	ο		
	B	x	x	x		
	N		x			x
	Σ					

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός, Σ:Σπλήνας

Θετικά στο *Tenacibaculum maritimum*: Μονάδα A 5(10)

### 3.1.3 Στατιστική ανάλυση

Για την σύγκριση ικανότητας απομόνωσης του *T. maritimum* από τα θρεπτικά υποστρώματα (FMM, MA, AOA, TSA+2% NaCl, TCBS) ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή δειγματοληψίας, πραγματοποιήθηκε έλεγχος t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις, για να διαπιστωθεί εάν παρουσιάζεται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο κύριες περιοχές δειγματοληψιών. Πιο συγκεκριμένα ελέγχθηκε εάν η ευαισθησία των υποστρωμάτων τροποποιείται ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή. Η περιοχή Α αντιπροσωπεύει μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Αιγαίου ενώ η περιοχή Β του Ιονίου. Σημειώνεται πως για τα είδη: μυλοκόπι, μυτάκι και συκιός δεν υπάρχουν στοιχεία και από τις δύο μονάδες. Για να εξασφαλιστούν με ασφάλεια τα αποτελέσματα της μηδενικής υπόθεσης, διενεργήθηκαν 2 ξεχωριστοί έλεγχοι, t-test με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις, για την κάθε δειγματοληψία. Στον πρώτο έλεγχο συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα για τα είδη όπου μόνο σε αυτά υπήρχαν δεδομένα και από τις δύο περιοχές, ενώ στον δεύτερο έλεγχο συμπεριελήφθησαν όλα τα είδη.

Μετά τον έλεγχο του t-test με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις για την 1η δειγματοληψία προέκυψε: πως η πιθανότητα είναι μικρότερη των ορίων εμπιστοσύνης ( $P=0,59$  και  $P=0,18$  αντίστοιχα), στοιχεία που υποδεικνύουν πως για την 1η δειγματοληψία η ευαισθησία των υποστρωμάτων είναι ανεξάρτητη της περιοχής δειγματοληψίας.

Μετά τον έλεγχο του t-test με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις για την 2η δειγματοληψία προέκυψε: πως η πιθανότητα είναι μικρότερη των ορίων εμπιστοσύνης ( $P=0,57$  και  $P=0,2$  αντίστοιχα), στοιχεία που υποδεικνύουν πως για την

2η δειγματοληψία η ευαισθησία των υποστρωμάτων είναι ανεξάρτητη της περιοχής δειγματοληψίας.

Μετά τον έλεγχο του t-test με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις για την 3η δειγματοληψία προέκυψε: πως η πιθανότητα είναι μικρότερη των ορίων εμπιστοσύνης ( $P=0,61$  και  $P=0,27$  αντίστοιχα), στοιχεία που υποδεικνύουν πως για την 3η δειγματοληψία η ευαισθησία των υποστρωμάτων είναι ανεξάρτητη της περιοχής δειγματοληψίας.

Τέλος και για την 4η δειγματοληψία προέκυψε: επίσης πως η πιθανότητα είναι μικρότερη των ορίων εμπιστοσύνης ( $P=0,3$  και  $P=0,08$  αντίστοιχα), στοιχεία που υποδεικνύουν πως και για την 4η δειγματοληψία η ευαισθησία των υποστρωμάτων είναι ανεξάρτητη της περιοχής δειγματοληψίας.

Συμπερασματικά, και για τις 4 δειγματοληψίες δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά σε ότι αφορά την ευαισθησία των υποστρωμάτων ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή.

Για την σύγκριση ικανότητας απομόνωσης του *T. maritimum* από τα θεραπευτικά υποστρώματα ανάλογα με το όργανο απομόνωσης (δέρμα, βράγχια, σπλήνας, νεφρός) πραγματοποιήθηκε έλεγχος για το εάν η ικανότητα απομόνωσης του βακτηρίου *T. maritimum* από τα υποστρώματα εξαρτάται από το όργανο όπου έγινε η απομόνωση και ο ενοφθαλμισμός. Εξετάστηκε εάν υπάρχει ειδικότητα οργάνου-υποστρώματος και εάν αυτή η ειδικότητα είναι στατιστικά σημαντική.

Από τα πρώτα κιόλας στοιχεία όπως προκύπτουν από τους πίνακες ευαισθησίας ο σπλήνας και ο νεφρός δεν αποτελούν όργανα όπου το βακτήριο εντοπίζεται. Έτσι, έγινε έλεγχος ειδικότητας μόνο για τα βράγχια και το δέρμα.

Δεδομένου ότι δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις περιοχές Α και Β εφεξής για τον έλεγχο ειδικότητας και τους υπόλοιπους ελέγχους τα δεδομένα των δύο σημείων θα συνυπολογίζονται.

Μετά τον έλεγχο των απόλυτων τιμών των αποτελεσμάτων της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση, για την 1<sup>η</sup> δειγματοληψία και την λήψη δειγμάτων από τα βράγχια, ΔΕΝ προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=0,11$ ). Με άλλα λόγια όταν γίνεται λήψη από τα βράγχια δεν παρατηρείται συγκεκριμένη ειδικότητα ανάμεσα στα υποστρώματα και τα υπό εξέταση είδη. Η ικανότητα απομόνωσης του βακτηρίου για τα 3 υποστρώματα παραμένει ίδια και για τα 7 είδη ιχθύων όταν έγινε λήψη από τα βράγχια.



Ωστόσο, κάποιο ή κάποια από τα υποστρώματα παρουσιάζει ειδίκευση απομόνωσης όταν γίνεται λήψη υλικού από τα βράγχια, ANEΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΕΙΔΟΣ, καθώς παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά ( $P=0,035$ ). Πράγματι με μια πιο προσεκτική ματιά στα περιγραφικά στατιστικά παρατηρείται πως το υπόστρωμα ΑΟΑ παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα απομόνωσης συγκριτικά με τα υπόλοιπα υποστρώματα.

Μετά τον έλεγχο των απόλυτων τιμών των αποτελεσμάτων της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση, για την 1<sup>η</sup> δειγματοληψία και την λήψη δειγμάτων από το δέρμα, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=0,008$ ). Με άλλα λόγια στη 1<sup>η</sup> δειγματοληψία κατά τη λήψη υλικού από το δέρμα παρατηρείται συγκεκριμένη ειδικότητα ανάμεσα στα υποστρώματα και τα υπό εξέταση είδη. Η ικανότητα δηλαδή απομόνωσης του βακτηρίου για τα 3 υποστρώματα ΔΕΝ παραμένει ίδια και για τα 7 είδη ιχθύων όταν γίνει λήψη από το δέρμα. Πράγματι όπως προκύπτει και από τα περιγραφικά στατιστικά φαίνεται πως από τα είδη της οικογένειας Sciaenidae (μυλοκόπι, συκιός) και Moronidae (λαβράκι) είναι ευκολότερο να απομονώσουμε το βακτήριο ANEΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ που θα χρησιμοποιήσουμε. Στον αντίποδα από τα είδη της οικογένειας Sparidae (τσιπούρα, φαγκρί, λυθρίνι και μυτάκι) είναι δυσκολότερο να απομονώσουμε το βακτήριο.

Ωστόσο, κανένα από τα υποστρώματα δεν παρουσιάζει ειδίκευση απομόνωσης όταν γίνεται λήψη υλικού από το δέρμα, καθώς ΔΕΝ παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά ( $P=0,366$ ).

Μετά τον έλεγχο των απόλυτων τιμών των αποτελεσμάτων της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση, για την 2<sup>η</sup> δειγματοληψία και την λήψη δειγμάτων από τα βράγχια, ΔΕΝ προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=0,202$ ). Με άλλα λόγια όταν γίνεται λήψη από τα βράγχια δεν παρατηρείται συγκεκριμένη ειδικότητα ανάμεσα στα υποστρώματα και τα υπό εξέταση είδη. Η ικανότητα απομόνωσης του βακτηρίου για τα 3 υποστρώματα παραμένει ίδια και για τα 7 είδη ιχθύων όταν έγινε λήψη από τα βράγχια.

Ωστόσο, κάποιο ή κάποια από τα υποστρώματα παρουσιάζει ειδίκευση απομόνωσης όταν γίνεται λήψη υλικού από τα βράγχια, ANEΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΕΙΔΟΣ, καθώς παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά ( $P=0,030$ ). Πράγματι με μια πιο προσεκτική ματιά στα περιγραφικά στατιστικά παρατηρείται πως το

υπόστρωμα AOA παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα απομόνωσης συγκριτικά με τα υπόλοιπα υποστρώματα.

Μετά τον έλεγχο των απόλυτων τιμών των αποτελεσμάτων της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση, για την 2<sup>η</sup> δειγματοληψία και την λήψη δειγμάτων από το δέρμα, ΟΡΙΑΚΑ ΔΕΝ προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=0,096$ ). Με άλλα λόγια, Στη 2<sup>η</sup> δειγματοληψία όταν γίνεται λήψη από τα δέρμα δεν παρατηρείται συγκεκριμένη ειδικότητα ανάμεσα στα υποστρώματα και τα υπό εξέταση είδη. Η ικανότητα δηλαδή απομόνωσης του βακτηρίου για τα 3 υποστρώματα παραμένει ίδια και για τα 7 είδη ιχθύων όταν έγινε λήψη από το δέρμα.

Ωστόσο, κανένα από τα υποστρώματα δεν παρουσιάζει ειδικευση απομόνωσης όταν γίνεται λήψη υλικού από το δέρμα, καθώς ΔΕΝ παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά ( $P=0,67$ ).

Μετά τον έλεγχο των απόλυτων τιμών των αποτελεσμάτων της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση, για την 3<sup>η</sup> δειγματοληψία και την λήψη δειγμάτων από τα βράγχια, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=0,028$ ). Με άλλα λόγια στην 3<sup>η</sup> δειγματοληψία κατά τη λήψη υλικού από τα βράγχια παρατηρείται συγκεκριμένη ειδικότητα ανάμεσα στα υποστρώματα και τα υπό εξέταση είδη. Η ικανότητα δηλαδή απομόνωσης του βακτηρίου για τα 3 υποστρώματα ΔΕΝ παραμένει ίδια και για τα 7 είδη ιχθύων όταν γίνει λήψη από τα βράγχια. Πράγματι όπως προκύπτει και από τα περιγραφικά στατιστικά φαίνεται πως κατά την 3η δειγματοληψία το βακτήριο απομονώθηκε ευκολότερα από τα είδη μυλοκόπι, λαβράκι και φαγκρί, ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ που χρησιμοποιήθηκε. Στον αντίποδα από τα είδη τσιπούρα, λυθρίνι και τον συκίο ήταν δυσκολότερο να απομονώσουμε το βακτήριο.

Ωστόσο, κανένα από τα υποστρώματα δεν παρουσιάζει ειδικευση απομόνωσης όταν γίνεται λήψη υλικού από τα βράγχια, καθώς ΔΕΝ παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά ( $P=0,702$ ).

Μετά τον έλεγχο των απόλυτων τιμών των αποτελεσμάτων της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση, για την 3<sup>η</sup> δειγματοληψία και την λήψη δειγμάτων από το δέρμα, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=0,002$ ). Με άλλα λόγια στην 3<sup>η</sup> δειγματοληψία κατά τη λήψη υλικού από το δέρμα παρατηρείται συγκεκριμένη ειδικότητα ανάμεσα στα υποστρώματα και τα υπό εξέταση είδη. Η ικανότητα δηλαδή απομόνωσης του βακτηρίου για τα 3

υποστρώματα ΔΕΝ παραμένει ίδια και για τα 7 είδη ιχθύων όταν γίνει λήψη από το δέρμα. Πράγματι όπως προκύπτει και από τα περιγραφικά στατιστικά φαίνεται πως κατά την 3η δειγματοληψία το βακτήριο απομονώθηκε ξανά ευκολότερα από τα είδη μυλοκόπι, λαβράκι και συκίο, ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ που χρησιμοποιήθηκε. Ενώ το λυθρίνι και το μυτάκι παρουσιάζουν σταθερή δυσκολία στο να απομονωθεί το βακτήριο από το δέρμα τους.

Ωστόσο, κάποιο ή κάποια από τα υποστρώματα παρουσιάζει ειδίκευση απομόνωσης όταν γίνεται λήψη υλικού από το δέρμα, ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΕΙΔΟΣ, καθώς παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά ( $P=0,026$ ). Πράγματι με μια πιο προσεκτική ματιά στα περιγραφικά στατιστικά θα παρατηρήσουμε πως το υπόστρωμα FMM παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα απομόνωσης από το δέρμα συγκριτικά με τα υπόλοιπα υποστρώματα.

Μετά τον έλεγχο των απόλυτων τιμών των αποτελεσμάτων της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση, για την 4<sup>η</sup> δειγματοληψία και την λήψη δειγμάτων από τα βράγχια, ΔΕΝ προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=0,212$ ). Στην 4<sup>η</sup> δειγματοληψία κατά την λήψη υλικού από τα βράγχια δεν παρατηρείται συγκεκριμένη ειδικότητα ανάμεσα στα υποστρώματα και τα υπό εξέταση είδη. Η ικανότητα δηλαδή απομόνωσης του βακτηρίου για τα 3 υποστρώματα παραμένει ίδια και για τα 7 είδη ιχθύων όταν έγινε λήψη από τα βράγχια.

Ωστόσο, κανένα από τα υποστρώματα δεν παρουσιάζει ειδίκευση απομόνωσης όταν γίνεται λήψη υλικού από τα βράγχια, καθώς ΔΕΝ παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά ( $P=0,103$ ).

Μετά τον έλεγχο των απόλυτων τιμών των αποτελεσμάτων της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση, για την 4<sup>η</sup> δειγματοληψία και την λήψη δειγμάτων από το δέρμα, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=0,0006$ ). Με άλλα λόγια στην 4<sup>η</sup> δειγματοληψία κατά τη λήψη υλικού από το δέρμα παρατηρείται συγκεκριμένη ειδικότητα ανάμεσα στα υποστρώματα και τα υπό εξέταση είδη. Η ικανότητα δηλαδή απομόνωσης του βακτηρίου για τα 3 υποστρώματα ΔΕΝ παραμένει ίδια και για τα 7 είδη ιχθύων όταν γίνει λήψη από το δέρμα. Πράγματι όπως προκύπτει και από τα περιγραφικά στατιστικά φαίνεται πως από τον συκίο και το λαβράκι είναι ευκολότερο να απομονώσουμε το βακτήριο

ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ που θα χρησιμοποιήσουμε. Στον αντίποδα από τα είδη της οικογένειας *Sparidae* (τσιπούρα, φαγκρί, λυθρίνι και μυτάκι) ήταν δυσκολότερο να απομονώσουμε το βακτήριο κατά τη 4<sup>η</sup> δειγματοληψία.

Ωστόσο, κανένα από τα υποστρώματα δεν παρουσιάζει ειδικευση απομόνωσης όταν έγινε λήψη υλικού από το δέρμα κατά την 4<sup>η</sup> δειγματοληψία, καθώς ΟΡΙΑΚΑ ΔΕΝ παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά ( $P=0,090$ ).

Για την τελική σύγκριση δειγματοληψιών ανά όργανο, έχοντας αναλύσει όλες τις παραμέτρους για κάθε Δειγματοληψία ξεχωριστά, και αφού επιβεβαιώθηκε πως μεταξύ των 2 περιοχών δεν προκύπτει καμία διαφοροποίηση ως προς την ικανότητα απομόνωσης του *T. maritimum* από τα υποστρώματα, καλούμαστε να δώσουμε μια τελική απάντηση για το εάν τελικά όλες εκείνες οι στατιστικά σημαντικές ή μη παράμετροι που υπολογίσαμε σε κάθε δειγματοληψία ξεχωριστά παρουσιάζουν ένα συνολικό μοτίβο επανάληψης. Με άλλα λόγια, κατά πόσο μια παράμετρος που ήταν στατιστικά σημαντική (π.χ. κατά την δειγματοληψία του Φθινοπώρου), επαναλαμβάνεται λιγότερο ή περισσότερο στις άλλες δειγματοληψίες, και εάν αυτή η τάση στο σύνολο της είναι στατιστικά σημαντική.

Για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα με επαρκή στοιχεία για τα ανωτέρω διενεργήθηκε έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης παραγόντων με αλληλεπίδραση.

Μετά τον έλεγχο των απόλυτων τιμών των αποτελεσμάτων της ανάλυσης διακύμανσης πολλαπλών παραγόντων με αλληλεπίδραση, για την λήψη δειγμάτων από τα βράγχια, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=0,011$ ), για κάθε δειγματοληψία ξεχωριστά που περιέχει δεδομένα για τα βράγχια. Με άλλα λόγια σε κάθε δειγματοληψία μεμονωμένα εντοπίζεται σημαντική διαφορά. Το γεγονός αυτό αποτελεί επί της ουσίας επαλήθευση όλων των προηγούμενων αναλύσεων διακύμανσης που διενεργήθηκαν. Επίσης προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=0,004$ ), όσον αφορά τα υποστρώματα. Επαληθεύονται όλες εκείνες οι διαφορές που εντοπίστηκαν στις αναλύσεις διακύμανσης για κάθε δειγματοληψία ξεχωριστά για τα βράγχια συναρτήσει των υποστρωμάτων. Τελικώς σε ότι αφορά την αλληλεπίδραση, ΔΕΝ παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=0,92$ ). Ως αλληλεπίδραση θεωρείται η συνέργια των μεταβλητών και των δειγματοληψιών μεταξύ τους. Δηλαδή παρά τις τόσες διαφορές που εντοπίστηκαν σε διάφορες μεταβλητές ανά δειγματοληψία, τελικώς δεν αποτελούν τάσεις, δηλαδή στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Μετά τον έλεγχο των απόλυτων τιμών των αποτελεσμάτων της ανάλυσης διακύμανσης πολλαπλών παραγόντων με αλληλεπίδραση για την λήψη δειγμάτων από το δέρμα, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=0,009$ ), για κάθε δειγματοληψία ξεχωριστά που περιέχει δεδομένα για το δέρμα. Με άλλα λόγια σε κάθε δειγματοληψία μεμονωμένα εντοπίζεται σημαντική διαφορά. Το γεγονός αυτό αποτελεί επί της ουσίας επαλήθευση όλων των προηγούμενων αναλύσεων διακύμανσης που διενεργήθηκαν. ΔΕΝ προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=0,064$ ), όσον αφορά τα υποστρώματα. Πράγματι σε όλες τις προηγούμενες αναλύσεις διακυμάνσεων που αφορούσαν το δέρμα, σε καμία στήλη (υποστρώματα) δεν εντοπίστηκε διαφορά. Έτσι προκύπτει διασταυρούμενη επαλήθευση. Τελικώς σε ότι αφορά την αλληλεπίδραση, ΔΕΝ παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=0,947$ ). Ως αλληλεπίδραση θεωρείται η συνέργια των μεταβλητών και των δειγματοληψιών μεταξύ τους. Δηλαδή παρά τις τόσες διαφορές που εντοπίστηκαν σε διάφορες μεταβλητές ανά δειγματοληψία, τελικώς δεν αποτελούν τάσεις, δηλαδή στατιστικά σημαντικές διαφορές.

### **3.1.4 Ποσοστά προσβολής από το *Tenacibaculum maritimum*, ανάλογα με το είδος ψαριού και ανά δειγματοληψία**

Συγκεντρωτικά, όσον αφορά τα αποτελέσματα των τεσσάρων (4) εποχιακών δειγματοληψιών αποδεικνύεται πως πιο ευπαθές από τα θαλασσινά είδη ψαριών είναι το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) με περισσότερες απομονώσεις. Θετικά στο *T. maritimum* επί των συνολικών δειγμάτων βρέθηκαν: 128/200 λαβράκια, 52/200 τσιπούρες, 30/160 λυθρίνια, 38/80 φαγκριά, 31/60 μυλοκόπια, 16/60 μυτάκια και 19/40 συκιοί. Τα λυθρίνια εμφάνισαν το μικρότερο ποσοστό προσβολής. Στον Πίνακα 3.1.29, φαίνεται ο αριθμός δειγμάτων-ψαριών, θετικών στο βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* και το ποσοστό προσβολής από το βακτήριο στις τέσσερες εποχιακές δειγματοληψίες.

Όσον αφορά την παρουσία του βακτηρίου, φαίνεται να σχετίζεται με την άνοδο της θερμοκρασίας του νερού της θάλασσας. Πιο συγκεκριμένα, η θερμοκρασία του νερού της θάλασσας στην 1η δειγματοληψία ήταν 13°C-15°C (62/200 ψάρια), στην 2η δειγματοληψία 16°C-17°C (82/200 ψάρια), στην 3η δειγματοληψία 17°C-19°C (112/200 ψάρια) και στην 4η δειγματοληψία 12°C-14°C (58/200). Από αυτό συνεπάγεται ότι το αυξημένο ποσοστό της παρουσίας του *T. maritimum* σχετίζεται

με την αύξηση της θερμοκρασίας του νερού. Στον Πίνακα 3.1.30, φαίνεται το σύνολο θετικών ψαριών στο *T. maritimum*, ανεξάρτητα από το είδος ψαριών, αλλά στο σύνολο των ψαριών ανά δειγματοληψία και για τις τέσσερες εποχιακές δειγματοληψίες. Στα Γραφήματα 3.1.1-3.1.4, φαίνεται το ποσοστό προσβολής από το *T. maritimum*, ανά είδος ψαριού για τις 4 εποχιακές δειγματοληψίες. Στο Γράφημα 3.1.5, φαίνεται το ποσοστό προσβολής από το *T. maritimum* για τα 7 είδη ψαριών και για τις 4 εποχιακές δειγματοληψίες, συγκριτικά. Πίνακας 3.1.31., φαίνεται ο αριθμός των θετικών ψαριών στο *T. maritimum*, ανάλογα με το είδος ψαριού και ανά δειγματοληψία, για τις τεσσερες εποχιακές δειγματοληψίες.

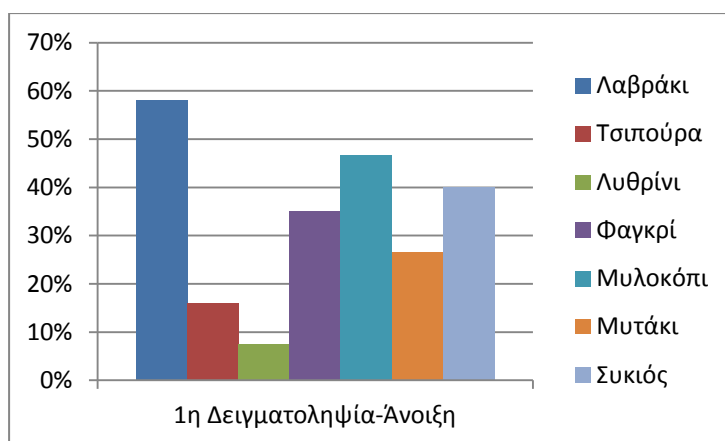
Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, εκτός από τα μυξοβακτηρίδια, στις αλλοιώσεις, συχνά εντοπίστηκαν, σαπροφυτικοί οργανισμοί, όπως βλεφαριδοφόρα παράσιτα και βακτήρια.

Δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα και αλλοιώσεις συστηματικής μόλυνσης, τόσο στα φαινομενικά υγιή ψάρια, όσο και στα ψάρια που έφεραν εμφανείς αλλοιώσεις της νόσου.

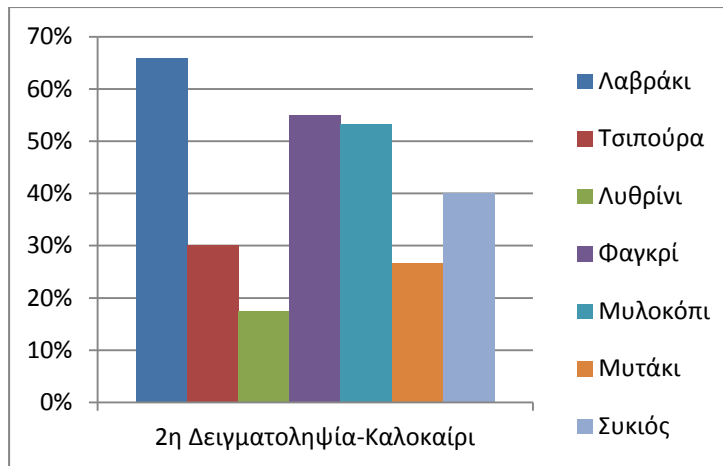
**Πίνακας 3.1.29.** Αριθμός δειγμάτων-ψαριών, θετικών στο βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* και ποσοστό προσβολής από το βακτήριο στις τέσσερες (4) εποχιακές δειγματοληψίες.

<b>ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ</b>	<b>Είδη ψαριών</b>	<b>Θετικά στο <i>Tenacibaculum maritimum</i></b>	<b>Σύνολο ψαριών</b>	<b>Ποσοστό Προσβολής %</b>
<b>1<sup>η</sup> ΑΝΟΙΞΗ</b>	ΛΑΒΡΑΚΙ	29	50	58%
	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	8	50	16%
	ΛΥΘΡΙΝΙ	3	40	7.5%
	ΦΑΓΚΡΙ	7	20	35%
	ΜΥΛΟΚΟΠΙ	7	15	46.6%
	ΜΥΤΑΚΙ	4	15	26.6%
	ΣΥΚΙΟΣ	4	10	40%
<b>2<sup>η</sup> ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ</b>	ΛΑΒΡΑΚΙ	33	50	66%
	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	15	50	30%
	ΛΥΘΡΙΝΙ	7	40	17.5%

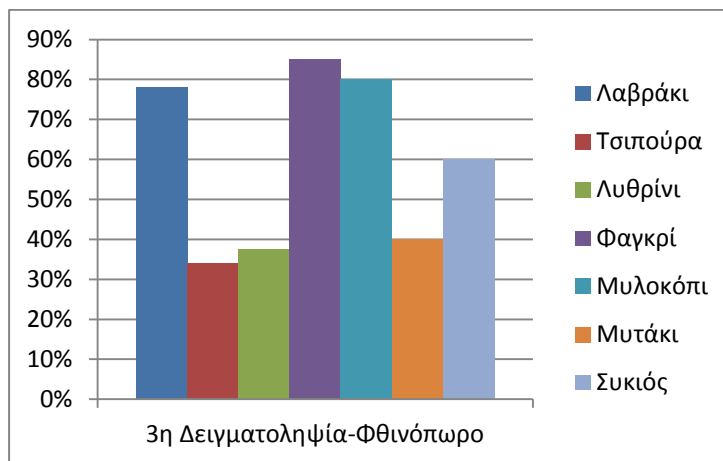
	ΦΑΓΚΡΙ	11	20	55%
	ΜΥΛΟΚΟΠΙ	8	15	53.3%
	ΜΥΤΑΚΙ	4	15	26.6%
	ΣΥΚΙΟΣ	4	10	40%
<b>3<sup>η</sup> ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ</b>	ΛΑΒΡΑΚΙ	39	50	78%
	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	17	50	34%
	ΛΥΘΡΙΝΙ	15	40	37.5%
	ΦΑΓΚΡΙ	17	20	85%
	ΜΥΛΟΚΟΠΙ	12	15	80%
	ΜΥΤΑΚΙ	6	15	40%
	ΣΥΚΙΟΣ	6	10	60%
<b>4<sup>η</sup> ΧΕΙΜΩΝΑΣ</b>	ΛΑΒΡΑΚΙ	27	50	54%
	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	12	50	24%
	ΛΥΘΡΙΝΙ	5	40	12.5%
	ΦΑΓΚΡΙ	3	20	15%
	ΜΥΛΟΚΟΠΙ	4	15	26.6%
	ΜΥΤΑΚΙ	2	15	13.3%
	ΣΥΚΙΟΣ	5	10	50%



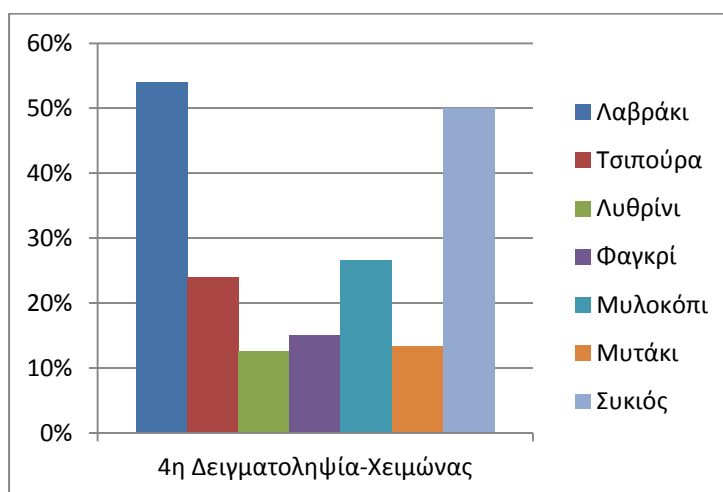
Γράφημα 3.1.1. Ποσοστό προσβολής από το *T. maritimum*, ανά είδος ψαριού για την 1<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Άνοιξη



Γράφημα 3.1.2. Ποσοστό προσβολής από το *T. maritimum*, ανά είδος ψαριού για την 2<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Καλοκαίρι



Γράφημα 3.1.3. Ποσοστό προσβολής από το *T. maritimum*, ανά είδος ψαριού για την 3<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Φθινόπωρο

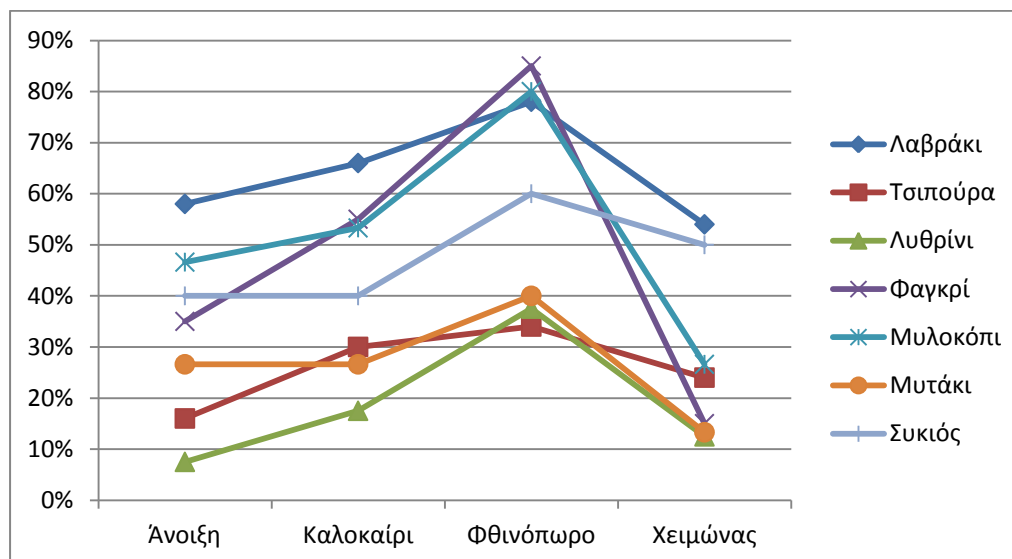




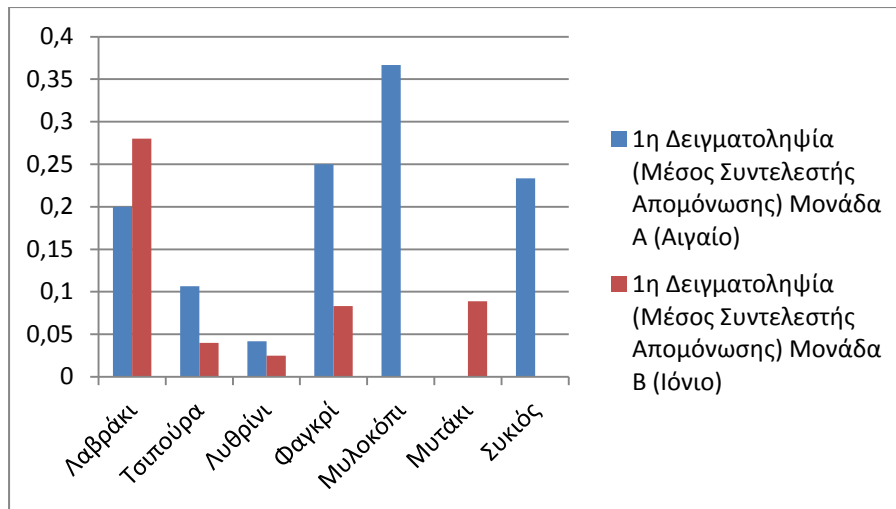
Γράφημα 3.1.4. Ποσοστό προσβολής από το *T. maritimum*, ανά είδος ψαριού για την 4<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Χειμώνας

**Πίνακας 3.1.30.** Σύνολο θετικών ψαριών στο *Tenacibaculum maritimum*, ανεξάρτητα από το είδος ψαριών, αλλά στο σύνολο των ψαριών ανά δειγματοληψία και για τις τέσσερες (4) εποχιακές δειγματοληψίες.

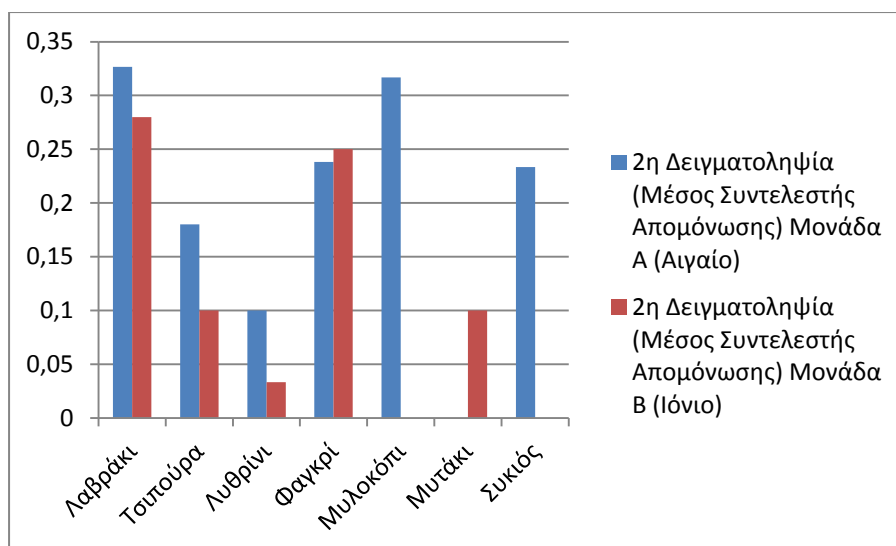
ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ	Σύνολο ψαριών	Θετικά στο <i>Tenacibaculum maritimum</i>	Ποσοστό Προσβολής %
1 <sup>η</sup> Άνοιξη	200	62	31%
2 <sup>η</sup> Καλοκαίρι	200	82	41%
3 <sup>η</sup> Φθινόπωρο	200	112	56%
4 <sup>η</sup> Χειμώνας	200	58	29%
	800	314	39.25%



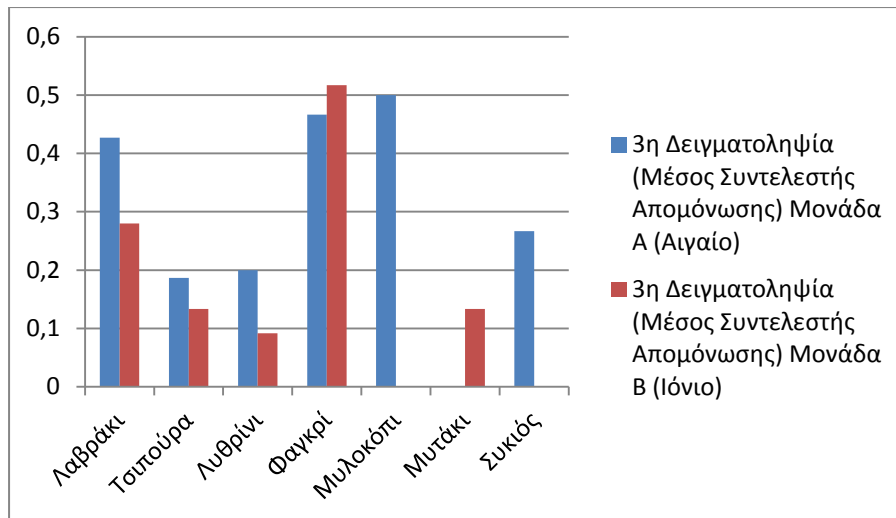
Γράφημα 3.1.5. Ποσοστό προσβολής από το *T. maritimum* για τα 7 είδη ψαριών και για τις 4 εποχιακές δειγματοληψίες, συγκριτικά.



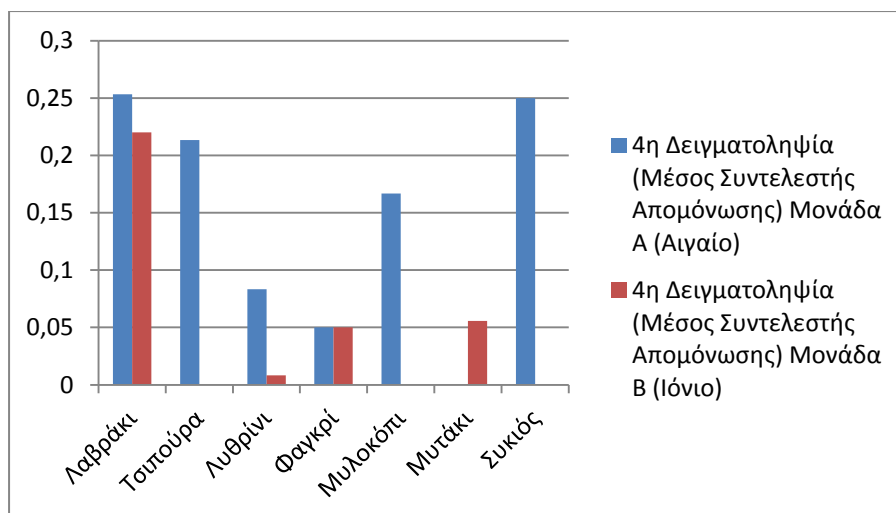
Γράφημα 3.1.6. Μέσος Συντελεστής Απομόνωσης του *T. maritimum*, ανά είδος ψαριού για την 1<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Άνοιξη, για τις Μονάδες A και B



Γράφημα 3.1.7. Μέσος Συντελεστής Απομόνωσης του *T. maritimum*, ανά είδος ψαριού για την 2<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Καλοκαίρι, για τις Μονάδες A και B



Γράφημα 3.1.8. Μέσος Συντελεστής Απομόνωσης του *T. maritimum*, ανά είδος ψαριού για την 3<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Φθινόπωρο, για τις Μονάδες A και B



Γράφημα 3.1.9. Μέσος Συντελεστής Απομόνωσης του *T. maritimum*, ανά είδος ψαριού για την 4<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Χειμώνας, για τις Μονάδες A και B

**Πίνακας 3.1.31.** Αριθμός θετικών ψαριών στο *Tenacibaculum maritimum*, ανάλογα με το είδος ψαριού και ανά δειγματοληψία, για τις τέσσερες (4) εποχιακές δειγματοληψίες.

Είδη ψαριών	1 <sup>η</sup> Δ	2 <sup>η</sup> Δ	3 <sup>η</sup> Δ	4 <sup>η</sup> Δ	Θετικά στο <i>T. maritimum</i> /Σύνολο ψαριών	Ποσοστό Προσβολής %
ΛΑΒΡΑΚΙ	29/50	33/50	39/50	27/50	128/200	64
ΤΣΙΠΟΥΡΑ	8/50	15/50	17/50	12/50	52/200	26
ΛΥΘΡΙΝΙ	3/40	7/40	15/40	5/40	30/160	18.75
ΦΑΓΚΡΙ	7/20	11/20	17/20	3/20	38/80	47.5
ΜΥΛΟΚΟΠΙ	7/15	8/15	12/15	4/15	31/60	51.6
ΜΥΤΑΚΙ	4/15	4/15	6/15	2/15	16/60	26.6
ΣΥΚΙΟΣ	4/10	4/10	6/10	5/10	19/40	47.5
	62/200	82/200	112/200	58/200	314/800	39.25

### 3.1.5 Στατιστική ανάλυση

Για να ελεγχθεί η σύνδεση παρουσίας του βακτηρίου *T. maritimum* ανά εποχική δειγματοληψία και ανά είδος ταυτόχρονα, καθώς και πως μεταβλήθηκαν τα ποσοστά προσβολής χρονικά ανά δειγματοληψία στα ίδια είδη, πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση. Μετά τον έλεγχο των απόλυτων τιμών των αποτελεσμάτων της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση προέκυψε πως ο λόγος  $F/F_{cr}$  είναι  $>1$  και ταυτόχρονα πως η τιμή  $P$  είναι μικρότερη του  $\alpha$  ( $9,16E^{-05}$ ), γεγονός που υποδεικνύει πως μεταξύ των δειγματοληψιών εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά προσβολής και για τα επτά (7) είδη συγκεντρωτικά.

Όσον αφορά το ποσοστό προσβολής μεταξύ των ειδών προκύπτει πως ο λόγος  $F/F_{cr}$  είναι  $>1$  και ταυτόχρονα πως η τιμή  $P$  είναι μικρότερη του  $\alpha$  ( $3,8E^{-05}$ ), γεγονός που υποδεικνύει πως και μεταξύ των ειδών εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό προσβολής.

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος του συντελεστή συσχέτισης εμφάνισης του βακτηρίου *T. maritimum* ανά εποχική δειγματοληψία και ανά είδος ταυτόχρονα. Αποδείχθηκε πως μεγαλύτερη συσχέτιση παρουσιάζουν τα αποτελέσματα μεταξύ του καλοκαιρινής και της φθινοπωρινής δειγματοληψίας καθώς

επίσης και της εαρινής με τη καλοκαιρινή. Μικρότερη συσχέτιση παρουσιάζει η χειμερινή δειγματοληψία με εκείνη της φθινοπωρινής. Το έτος 2011 όπου και διενεργήθηκαν οι δειγματοληψίες (άνοιξη, καλοκαίρι, φθινόπωρο) καταγράφηκαν υψηλές θερμοκρασίες νερού γεγονός που ευνοούσε την ανάπτυξη μικροβιακών πληθυσμών στη στήλη του νερού. Τον χειμώνα του 2012 καταγράφηκαν σημαντικά χαμηλότερες θερμοκρασίες κατά τις δειγματοληψίες. Σημαντικό να αναφερθεί πως δεν προκύπτουν αρνητικοί συντελεστές συσχέτισης μεταξύ των εποχών. Κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο διότι τα δειγματοληπτικά υποκείμενα προέρχονται από μονάδες εκτροφής και όχι από ελεύθερους πληθυσμούς. Η ένταση εκτροφής από μόνη της αποτελεί παράγοντα ανάπτυξης βακτηρίων, και γι αυτό τον λόγο σε όλες τις εποχές εμφανίζεται θετική συσχέτιση.

Όσον αφορά τους συντελεστές συσχέτισης του ποσοστού προσβολής του βακτηρίου ανά είδος ψαριού, προκύπτει: πως υπάρχει ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού προσβολής και της οικογένειας Sparidae. Τα είδη *Sparus aurata* (τσιπούρα), *Pagellus erythrinus* (λυθρίνι), *Puntazzo puntazzo* (μυτάκι) και *Ragrus ragrus* (φαγκρί), ανήκουν στην οικογένεια Sparidae. Αντίθετα μεταξύ των 2 αντιπροσώπων της οικογένειας Sciaenidae προκύπτει ο μικρότερος συντελεστής συσχέτισης. Ωστόσο, δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα ως προς το ποσοστό προσβολής και την συσχέτιση ανά οικογένεια ιχθύων καθώς θα πρέπει να συνυπολογίζονται και άλλοι παράμετροι κυριότερη εκ των οποίων αποτελεί η ιχθυοπυκνότητα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το λαβράκι. Το λαβράκι που ανήκει στην οικογένεια Moronidae παρουσιάζει ισχυρή θετική συσχέτιση προσβολής με είδη όπως το φαγκρί, το λυθρίνι και το μυτάκι που ανήκουν σε άλλη οικογένεια (Sparidae), και το οποίο κατεξοχήν εκτρέφεται σε υψηλές ιχθυοπυκνότητες.

Στον Πίνακα 3.1.32., παρουσιάζονται οι μέσες τιμές ποσοστού προσβολής του βακτηρίου ανάλογα με το είδος και για τις τέσσερες δειγματοληψίες λαμβάνοντας υπόψη την τυπική απόκλιση.

**Πίνακας 3.1.32.** Περιγραφικά στατιστικά στοιχεία ποσοστού εμφάνισης του βακτηρίου *Tenacibaculum maritimum* (Συγκεντρωτικά).

Ποσοστό Προσβολής % (Σύνολο)		
Λαβράκι	64,00%	± 10,58%
Τσιπούρα	26,00%	± 7,83%
Λυθρίνι	18,70%	± 13,14%
Φαγκρί	47,50%	± 29,86%
Μυλοκόπι	51,60%	± 22,05%
Μυτάκι	26,60%	± 10,90%
Συκιός	47,50%	± 9,50%

Πιο συγκεκριμένα, στο λαβράκι τελικώς το βακτήριο εντοπίζεται σε σχετικά μεγάλα ποσοστά και στις τέσσερες εποχές, με μικρές διακυμάνσεις ανά εποχή. Αντίθετα η τσιπούρα παρά τις μεγάλες ιχθυοπυκνότητες που διαχειριστικά υιοθετούνται κατά την εκτροφή της, παρουσιάζει μικρό ποσοστό προσβολής και με μικρή διακύμανση ανά εποχή. Επίσης μικρά ποσοστά προσβολής με μικρή διακύμανση ανά εποχή προκύπτουν και για το λυθρίνι. Τα είδη της οικογένειας Sciaenidae τελικώς παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά προσβολής. Πιο συγκεκριμένα ο συκιός προσβάλλεται σε μεγάλο ποσοστό με μικρή διακύμανση ανά εποχή, ενώ στο μυλοκόπι το ποσοστό προσβολής αυξάνεται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία.

Επίσης μεγαλύτερη συχνότητα και μια πιο σοβαρή μορφή της νόσου εντοπίστηκε στην ομάδα των ψαριών με σωματικό βάρος από 0.5-3gr. Στους Πίνακες 3.1.33-3.1.39, φαίνονται συγκριτικά για τα επτά είδη των ψαριών, τα βάρη τους και για τις τέσσερες εποχιακές δειγματοληψίες.

**Πίνακας 3.1.33.** Λαβράκι. Σύγκριση ανά δειγματοληψία και βάρος ψαριών.

ΛΑΒΡΑΚΙ				
ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ	Βάρη ψαριών	Σύνολο ψαριών	Θετικά στο <i>Tenacibaculum maritimum</i>	Ποσοστό Προσβολής %
1 <sup>η</sup> Άνοιξη	0.5-3gr	40	23	57.5
	50-60gr	10	6	60
2 <sup>η</sup> Καλοκαίρι	0.5-3gr	25	18	72
	6-10gr	25	15	60
3 <sup>η</sup> Φθινόπωρο	0.5-3gr	25	21	84
	30-35gr	25	18	72

4 <sup>η</sup> Χειμώνας	0.5-3gr	25	12	48
	50-80gr	25	15	60

Για την σύγκριση του μεγέθους των ψαριών και του ποσοστού προσβολής για το λαβράκι, πραγματοποιήθηκε έλεγχος τετραγώνου Χ παράγοντα (Chi square-test). Τα δειγματοληπτικά υποκείμενα χωρίστηκαν σε δύο κλάσεις μεγέθους. Η πρώτη κλάση μεγέθους είναι από 0,5-3g και η δεύτερη κλάση μεγέθους πάνω από τα 6g.

Μετά τον έλεγχο τετραγώνου παράγοντα x προέκυψε πως μεταξύ των δύο κλάσεων μεγέθους υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=1,08396E^{-61}$ ), ως προς τα ποσοστά προσβολής για το λαβράκι και πως μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής εμφανίζει η κλάση μεγέθους από 0,5-3g.

**Πίνακας 3.1.34.** Τσιπούρα. Σύγκριση ανά δειγματοληψία και βάρος ψαριών.

ΤΣΙΠΟΥΡΑ				
ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ	Βάρη ψαριών	Σύνολο ψαριών	Θετικά στο <i>Tenacibaculum maritimum</i>	Ποσοστό Προσβολής %
1 <sup>η</sup> Άνοιξη	0.5-5gr	25	5	20
	15-30gr	25	3	12
2 <sup>η</sup> Καλοκαίρι	0.5-5gr	25	9	36
	20-30gr	25	6	24
3 <sup>η</sup> Φθινόπωρο	0.5-5gr	25	10	40
	20-25gr	25	7	28
4 <sup>η</sup> Χειμώνας	0.5-2gr	25	12	48
	40-50gr	25	0	0

Για την σύγκριση του μεγέθους των ψαριών και του ποσοστού προσβολής για την τσιπούρα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος τετραγώνου Χ παράγοντα (Chi square-test). Τα δειγματοληπτικά υποκείμενα χωρίστηκαν σε δύο κλάσεις μεγέθους. Η πρώτη κλάση μεγέθους είναι από 0,5-3g και η δεύτερη κλάση μεγέθους πάνω από τα 15g.

Μετά τον έλεγχο τετραγώνου παράγοντα x προέκυψε πως μεταξύ των δύο κλάσεων μεγέθους υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=3,8203E^{-128}$ ), ως προς τα ποσοστά προσβολής για την τσιπούρα και πως μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής εμφανίζει η κλάση μεγέθους από 0,5-3g.

**Πίνακας 3.1.35.** Λυθρίνι. Σύγκριση ανά δειγματοληψία και βάρος ψαριών.

<b>ΛΥΘΡΙΝΙ</b>				
<b>ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ</b>	<b>Βάρη ψαριών</b>	<b>Σύνολο ψαριών</b>	<b>Θετικά στο <i>Tenacibaculum maritimum</i></b>	<b>Ποσοστό Προσβολής %</b>
1 <sup>η</sup> Άνοιξη	40-50gr	20	2	10
	80-100gr	20	1	5
2 <sup>η</sup> Καλοκαίρι	40-60gr	20	5	25
	80-100gr	20	2	10
3 <sup>η</sup> Φθινόπωρο	30-50gr	20	10	50
	50-60gr	20	5	25
4 <sup>η</sup> Χειμώνας	40-60gr	20	4	20
	80-100gr	20	1	5

Τέλος, για την σύγκριση του μεγέθους των ψαριών και του ποσοστού προσβολής για το λυθρίνι, πραγματοποιήθηκε έλεγχος τετραγώνου Χ παράγοντα (Chi square-test). Τα δειγματοληπτικά υποκείμενα χωρίστηκαν σε δύο κλάσεις μεγέθους. Η πρώτη κλάση μεγέθους είναι από 40-60g και η δεύτερη κλάση μεγέθους πάνω από τα 80g.

Μετά τον έλεγχο τετραγώνου παράγοντα x προέκυψε πως μεταξύ των δύο κλάσεων μεγέθους υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=2,8798E^{-142}$ ), ως προς τα ποσοστά προσβολής για το λυθρίνι και πως μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής εμφανίζει η κλάση μεγέθους από 40-60g.

**Πίνακας 3.1.36.** Φαγκρί. Σύγκριση ανά δειγματοληψία και βάρος ψαριών.

<b>ΦΑΓΚΡΙ</b>				
<b>ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ</b>	<b>Βάρη ψαριών</b>	<b>Σύνολο ψαριών</b>	<b>Θετικά στο <i>Tenacibaculum maritimum</i></b>	<b>Ποσοστό Προσβολής %</b>
1 <sup>η</sup> Άνοιξη	10-15gr	20	2	10
	10-15gr	20	1	5
2 <sup>η</sup> Καλοκαίρι	10-20gr	20	5	25
	10-20gr	20	2	10
3 <sup>η</sup> Φθινόπωρο	10-20gr	20	10	50
	20-25gr	20	5	25
4 <sup>η</sup> Χειμώνας	10-20gr	20	4	20



	10-15gr	20	1	5
--	---------	----	---	---

**Πίνακας 3.1.37.** Μυλοκόπι. Σύγκριση ανά δειγματοληψία και βάρος ψαριών.

<b>ΜΥΛΟΚΟΠΙ</b>				
<b>ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ</b>	<b>Βάρη ψαριών</b>	<b>Σύνολο ψαριών</b>	<b>Θετικά στο <i>Tenacibaculum maritimum</i></b>	<b>Ποσοστό Προσβολής %</b>
1 <sup>η</sup> Άνοιξη	300-350gr	15	7	46.6
2 <sup>η</sup> Καλοκαίρι	300-350gr	15	8	53.3
3 <sup>η</sup> Φθινόπωρο	350-400gr	15	12	80
4 <sup>η</sup> Χειμώνας	350-400gr	15	4	26.6

**Πίνακας 3.1.38.** Μυτάκι. Σύγκριση ανά δειγματοληψία και βάρος ψαριών.

<b>ΜΥΤΑΚΙ</b>				
<b>ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ</b>	<b>Βάρη ψαριών</b>	<b>Σύνολο ψαριών</b>	<b>Θετικά στο <i>Tenacibaculum maritimum</i></b>	<b>Ποσοστό Προσβολής %</b>
1 <sup>η</sup> Άνοιξη	10-15gr	15	4	26.6
2 <sup>η</sup> Καλοκαίρι	10-15gr	15	4	26.6
3 <sup>η</sup> Φθινόπωρο	250-300gr	15	6	40
4 <sup>η</sup> Χειμώνας	250-300gr	15	2	13.3

**Πίνακας 3.1.39.** Συκίος. Σύγκριση ανά δειγματοληψία και βάρος ψαριών.

<b>ΣΥΚΙΟΣ</b>				
<b>ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ</b>	<b>Βάρη ψαριών</b>	<b>Σύνολο ψαριών</b>	<b>Θετικά στο <i>Tenacibaculum maritimum</i></b>	<b>Ποσοστό Προσβολής %</b>
1 <sup>η</sup> Άνοιξη	250-260gr	10	4	40
2 <sup>η</sup> Καλοκαίρι	260-280gr	10	4	40
3 <sup>η</sup> Φθινόπωρο	280-290gr	10	6	60
4 <sup>η</sup> Χειμώνας	280-300gr	10	5	50

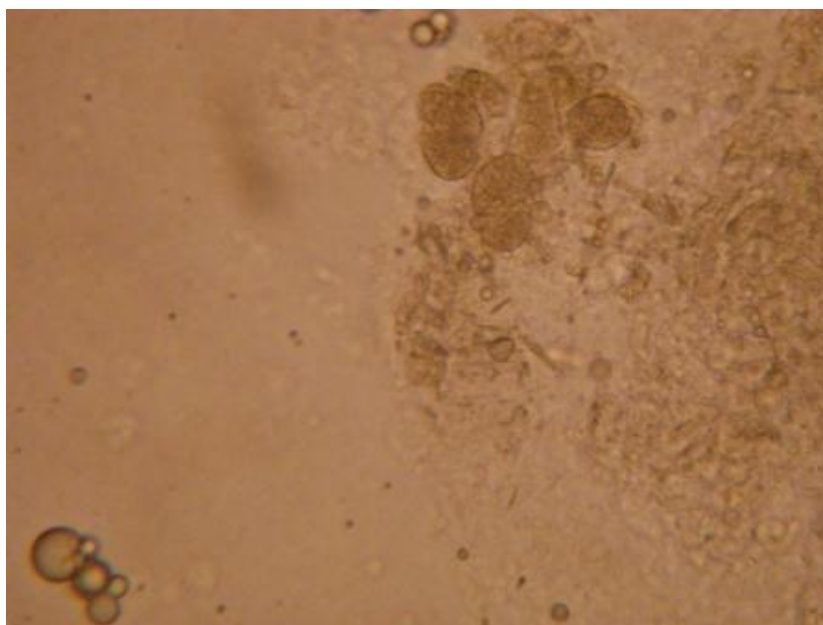
Για τα είδη (φαγκρί, μυλοκόπι, μυτάκι και συκίος) δεν πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία λόγω έλλειψης δεδομένων, καθώς εμφάνισαν την ίδια κλάση μεγέθους και στις τέσσερες εποχιακές δειγματοληψίες.

### 3.1.6 Μικροσκοπική εξέταση νωπών επιχρισμάτων και επιχρισμάτων μετά από χρώση Gram

Η μικροσκοπική παρατήρηση των επιχρισμάτων από τα δείγματα δέρματος, τις δερματικές αλλοιώσεις συμπτωματικών και ασυμπτωματικών ψαριών, καθώς και από τις αποικίες του προς ταυτοποίηση βακτηρίου αποκάλυψαν στην πλειοψηφία των δειγμάτων την παρουσία λεπτών, επιμήκων βακτηρίων με ολισθητική ικανότητα καθώς και άλλα κινητά βακτήρια (Εικόνες 3.1.6.1.-3.1.6.3.).

Από την μικροσκοπική εξέταση επιχρισμάτων από το δέρμα και τα βράγχια, καθώς και από τις αποικίες του βακτηρίου, με Gram χρώση παρατηρήθηκαν: Gram αρνητικοί, λεπτοί, επιμήκεις βάκιλοι, 2-30μm μήκος και 0.5μm διάμετρο, χαρακτηριστικοί του *T. maritimum* (Εικόνες 3.1.6.4.-3.1.6.5.).

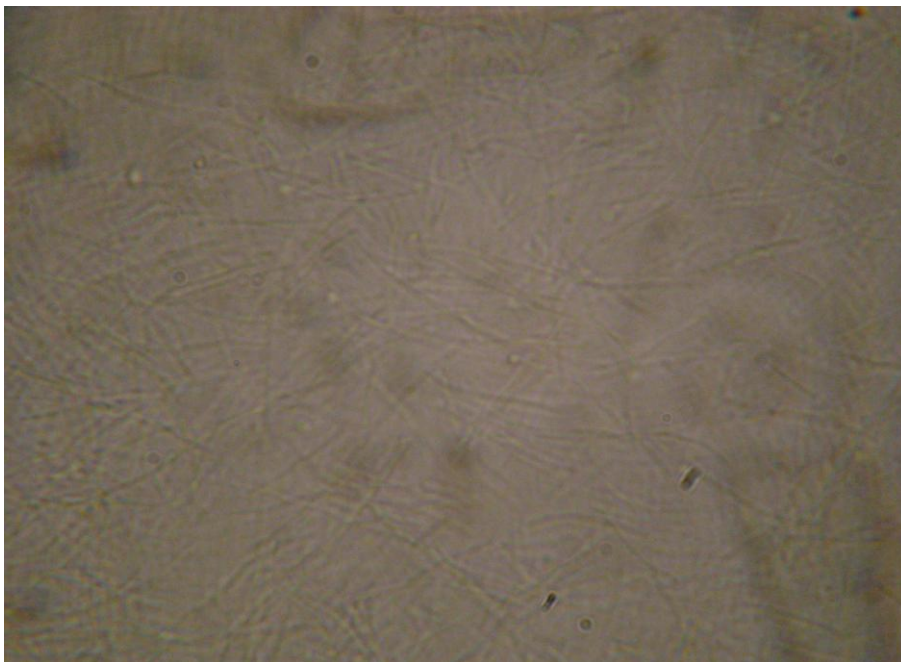
Σε νωπά επιχρίσματα διαπιστώθηκε επίσης ότι οι βάκιλοι ήταν κινητοί (κίνηση ολίσθησης). Μετά την επώαση, ετερότροφα βακτήρια και αποικίες του *T. maritimum* αναπτύχθηκαν και απομονώθηκαν στα θρεπτικά υποστρώματα.



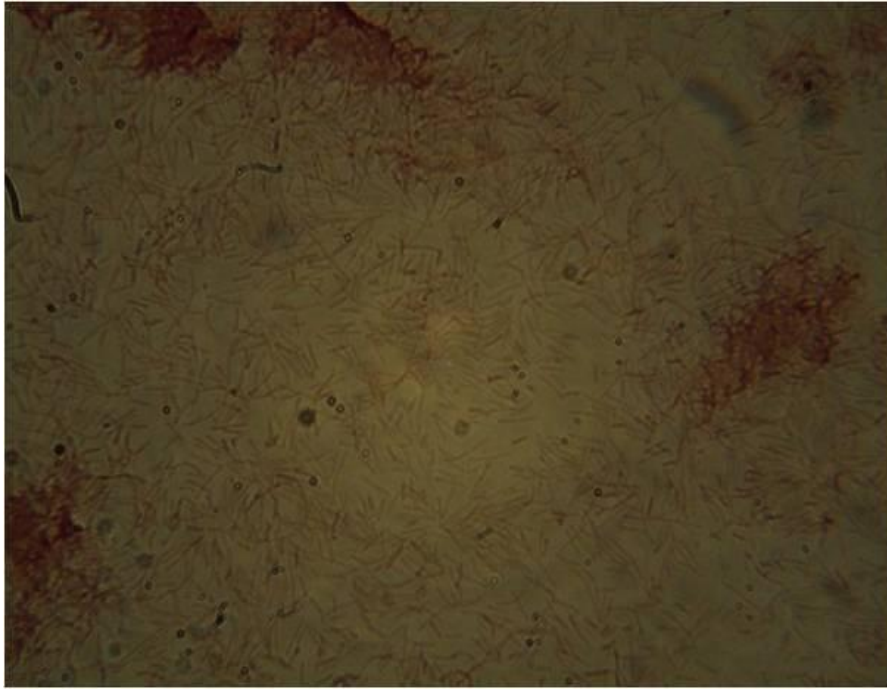
Εικόνα 3.1.6.1. Λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι *Tenacibaculum maritimum* σε νωπό επίχρισμα από δείγμα δέρματος (μεγέθυνση 100x).



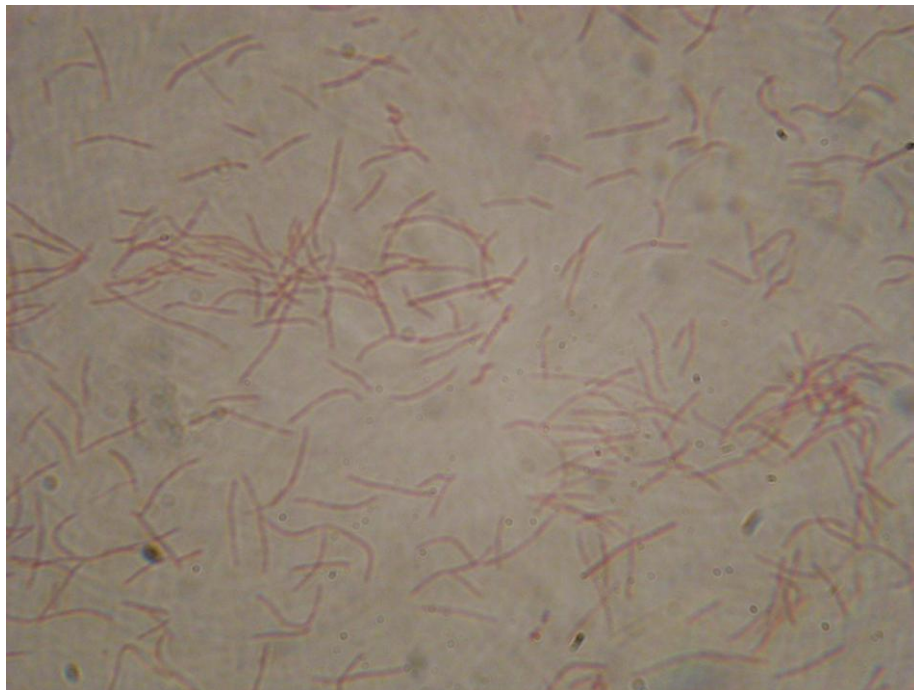
Εικόνα 3.1.6.2. Λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι *Tenacibaculum maritimum* σε νοπό επίχρισμα από αποικία του βακτηρίου (μεγέθυνση 100x).



Εικόνα 3.1.6.3. Λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι *Tenacibaculum maritimum* σε νοπό επίχρισμα από αποικία του βακτηρίου (μεγέθυνση 100x).



Εικόνα 3.1.6.4. Gram αρνητικοί, λεπτοί επιμήκεις βάκλιοι *Tenacibaculum maritimum* σε επίχρισμα, χρώση Gram (μεγέθυνση 100x).



Εικόνα 3.1.6.5. Gram αρνητικοί, λεπτοί επιμήκεις βάκλιοι *Tenacibaculum maritimum* σε επίχρισμα, χρώση Gram (μεγέθυνση 100x).

### 3.1.7 Βιοχημική ταυτοποίηση

Όσον αφορά την βιοχημική ταυτοποίηση των στελεχών και τα αποτελέσματα του API 20E, το κυρίως βιοχημικό προφίλ για τα διακόσια πενήντα δύο (252) από τα τριακόσια δέκα τέσσερα (314) στελέχη *T. maritimum*, ήταν το: **000200410**, όπου η ζελατίνη και το υδρόθειο είναι θετικά (Εικόνα 3.1.7.1.).

Όλα τα στελέχη ήταν θετικά στο τεστ οξειδάσης, καταλάσης, απορρόφηση κόκκινο του Congo και στην μείωση των νιτρικών. Ωστόσο, στην έρευνά μας, ποικίλα αποτελέσματα βρέθηκαν για την ζελατίνη, το τεστ Voges-Proskauer και το υδρόθειο. Στον Πίνακα 3.1.40, φαίνονται τα αποτελέσματα των συμβατικών δοκιμών και των βιοχημικών API 20E (biométrieux) δοκιμών για τα τριακόσια δέκα τέσσερα (314) απομονωμένα στελέχη του *T. maritimum*, από τα θαλάσσια εκτρεφόμενα ψάρια στην Ελλάδα.

Πιο συγκεκριμένα, είκοσι έξι (26) στελέχη που απομονώθηκαν από λαβράκι, από την Μονάδα Εκτροφής 2, στο Ιόνιο πέλαγος, με τον κωδικό (LV2), εμφάνισαν στο API 20E βιοχημικό προφίλ 040100410, όπου το υδρόθειο και το τεστ Voges-Proskauer είναι θετικά. Δέκα (10) στελέχη που απομονώθηκαν από λαβράκι, από την Μονάδα Εκτροφής 1, στο Αιγαίο πέλαγος, με τον κωδικό (LV3), και δέκα έξι (16) στελέχη που απομονώθηκαν από φαγκρί, από την Μονάδα Εκτροφής 2, στο Ιόνιο πέλαγος, με τον κωδικό (P2) εμφάνισαν στο API 20E βιοχημικό προφίλ 000300410 (Εικόνα 3.1.7.2.), όπου η ζελατίνη και το τεστ Voges-Proskauer είναι θετικά. Τέλος, οκτώ (8) στελέχη που απομονώθηκαν από λυθρίνι, από την Μονάδα Εκτροφής 2, στο Ιόνιο πέλαγος, με τον κωδικό (L2), και δύο (2) στελέχη που απομονώθηκαν από συκίο, από την Μονάδα Εκτροφής 2, στο Ιόνιο πέλαγος, με τον κωδικό (SU2) εμφάνισαν στο API 20E βιοχημικό προφίλ 040200410, όπου το υδρόθειο και η ζελατίνη είναι θετικά.

Επίσης τα αποτελέσματα του τεστ API 20E είναι ίδια στις 2 θερμοκρασίες 27°C και 19°C μετά από 48 ώρες επώαση και δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης, NaCl 2% ή NaCl 0.85% ή αποστειρωμένο θαλασσινό νερό 50%.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του συστήματος API ZYM, θετικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στις πρώτες έντεκα (11) αντιδράσεις, εμφανίζοντας ομοιότητα στο βιοχημικό προφίλ των στελεχών (Εικόνες 3.1.7.3.-3.1.7.4.). Στον Πίνακα 3.1.41, φαίνονται τα αποτελέσματα του συστήματος ταυτοποίησης API ZYM (biométrieux) για τα 314 απομονωμένα στελέχη του *T. maritimum*, για τις πρώτες 11

αντιδράσεις, από τα θαλάσσια εκτρεφόμενα ψάρια στην Ελλάδα. Τέλος, όσον αφορά τα αποτελέσματα του API 50 CH, δεν παρατηρήθηκε οξείδωση-αφομοίωση των υδρογονανθράκων.

Σε ότι αφορά τα βιοχημικά συστήματα API, το βιοχημικό προφίλ ήταν παρόμοιο για όλα τα στελέχη ανεξαρτήτως γεωγραφικού σημείου όπου εντοπίστηκαν, και του είδους όπου απομονώθηκαν.

**Πίνακας 3.1.40.** Αποτελέσματα των συμβατικών δοκιμών και των βιοχημικών API 20E (biomérieux) δοκιμών για τα 314 απομονωμένα στελέχη του *Tenacibaculum maritimum*, από τα θαλάσσια εκτρεφόμενα ψάρια στην Ελλάδα.

	LV1	LV2	LV3	TS	L1	L2	P1	P2	MUC	M	SU1	SU2
<b>Δοκιμές-Τεστ</b>												
Gram χρώση	(-) βάκιλοι	(-) βάκιλοι	(-) βάκιλοι	(-) βάκιλοι	(-) βάκιλοι	(-) βάκιλοι	(-) βάκιλοι	(-) βάκιλοι	(-) βάκιλοι	(-) βάκιλοι	(-) βάκιλοι	(-) βάκιλοι
Τεστ κινητικότητας	Κινητοί	Κινητοί	Κινητοί	Κινητοί	Κινητοί	Κινητοί	Κινητοί	Κινητοί	Κινητοί	Κινητοί	Κινητοί	Κινητοί
Τεστ Οξειδάσης	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Τεστ Καταλάσης	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Μείωση νιτρικών	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Απορρόφηση κόκκινου του Congo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>API 20 E</b>												
ONPG (Ορθο Νιτροφενυλ-βD-Γαλακτοπυρανοσιδάση) (Ortho NitroPhenyle Galactopyranosidase)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH (Διυδρολάση της Αργινίνης) (Arginine Dehydrolyase)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC												

(Δεκαρβοξυλάση της Λυσίνης) (Lysine Decarboxylase)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODG (Δεκαρβοξυλάση της Ορνιθίνης) (Ornithine Decarboxylase)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT (χρήση κιτρικού) (Citrate test)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S (παραγωγή ή Υδροθείου) (H <sub>2</sub> S production test)	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
URE (Ουρεάση) (Urease test)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA (Δεαμινάση της Τρυπτοφάνης) (Tryptophan Deaminase)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND (Παραγωγή Ινδόλης) (Indole test)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP (Παραγωγή ή Ακετοΐνης) (Voges-Proskauer)	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
GEL (Ζελατινώση) (Gelatin liquefaction test)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glu, Man, Ino, Sor, Rha, Sac, Mel, Amy,	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ara*												
Αριθμός ψαριών θετικών στο <i>Tenacibaculum maritimum</i>	92	26	10	52	22	8	22	16	31	16	17	2

\*(GLU) Γλυκόζη, (MAN) Μαννιτόλη, (INO) Ινοσιτόλη, (SOR) Σορβιτόλη, (RHA) Ραμνόζη, (SAC) Σουκρόζη, (MEL) D-Μελιβιόζη, (AMY) Αμυγδαλίνη, (ARA) L-Αραβινόζη  
Κυρίως βιοχημικό προφίλ (252 στελέχη): **000200410** GEL(+)  
LV2 (26 στελέχη): 040100410 H<sub>2</sub>S(+) & VP(+)  
LV3 (10 στελέχη) και P2 (16 στελέχη): 000300410 VP(+) & GEL(+)  
L2 (8 στελέχη) και SU2 (2 στελέχη): 040200410 H<sub>2</sub>S(+) & GEL(+)

**Πίνακας 3.1.41.** Αποτελέσματα του συστήματος ταυτοποίησης API ZYM (βιομέτρευσ) για τα 314 απομονωμένα στελέχη του *Tenacibaculum maritimum*, για τις πρώτες 11 αντιδράσεις, από τα θαλάσσια εκτρεφόμενα ψάρια στην Ελλάδα.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
CNTRL	ALK	C <sub>4</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>14</sub>	ARYL	VAL	CYS	TRY	CHR	ACP	NP
-	4-5	2-3	3-4	1-2	5	5	3-4	1	1-2	5	5

ALK: 2-ναφθυλο-φωσφάτη, C<sub>4</sub>: 2-ναφθυλο-βουτυράτη, C<sub>8</sub>: 2-ναφθυλο-καπριλάτη, C<sub>14</sub>: 2-ναφθυλο-μυριστάτη, ARYL: L-λευκιλ-2-ναφθυλαμίδη, VAL: L-βαλιλ-2-ναφθυλαμίδη, CYS: L-κυστιλ-2-ναφθυλαμίδη, TRY: N-βενζο-DL-2-ναφθυλαμίδη, CHR: N-φαινοναλ-2-ναφθυλαμίδη, ACP: 2-ναφθυλοφωσφάτη, NP: Ναφθυλ-AS-BI-φωσφάτη

**Πίνακας 3.1.42.** Ποσοστά διαφοροποίησης Βιοχημικού προφίλ του βακτηρίου στο σύνολο των ιχθύων, ανεξάρτητα από το είδος όπου εντοπίστηκε.

Δείγματα	GEL	VP	H <sub>2</sub> S
92	+	-	-
26	-	+	+
10	+	+	-
52	+	-	-
22	+	-	-
8	+	-	+
22	+	-	-
16	+	+	-
31	+	-	-
16	+	-	-
17	+	-	-
2	+	-	+

(GEL - VP - H <sub>2</sub> S)								
(---)	(+--)	(-+-)	(--+)	(-++)	(++-)	(+-+)	(+++)	Σύνολο
0,00%	80,25%	0,00%	0,00%	8,28%	8,28%	3,18%	0,00%	100,00%



Όσον αφορά τα ποσοστά διαφοροποίησης του βιοχημικού προφίλ του βακτηρίου στο σύνολο των ιχθύων, ανεξάρτητα από το είδος όπου εντοπίστηκε, μετά τον έλεγχο των ποσοστών εμφάνισης για κάθε πιθανή τριάδα αποτελεσμάτων, δεν προέκυψαν αποτελέσματα με επίπεδο εμπιστοσύνης πάνω από το 95%. Έτσι για τα 314 θετικά περιστατικά δεν μπορούμε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για την τριάδα που αντιπροσωπεύει το *T. maritimum*, με την ταυτοποίηση με βιοχημικά μέσα τελικώς να υπολείπεται ως ανιχνευτική μέθοδος ταυτοποίησης του βακτηρίου.



Εικόνα 3.1.7.1. Βιοχημικό προφίλ API 20E του *Tenacibaculum maritimum*: 000200410.



Εικόνα 3.1.7.2. Βιοχημικό προφίλ API 20E του *Tenacibaculum maritimum*: 000300410.



Εικόνες 3.1.7.3. & 3.1.7.4. Βιοχημικό προφίλ API ZYM του *Tenacibaculum maritimum*.

### 3.1.8 Παρασιτολογική εξέταση

Κατά την μικροσκοπική παρατήρηση των νωπών παρασκευασμάτων από ξέσματα βραγχίων (φακό 10X-100X), παρατηρήθηκαν ορισμένα εξωπαράσιτα, κυρίως μετάζωα. Μονογενή παράσιτα, όπως *Furnestinia* sp., *Microcotyle* sp., *Diplectanum* sp. και σε ελάχιστες περιπτώσεις, πρωτόζωα παράσιτα όπως π.χ. *Cryptocaryon irritans* (Εικόνες 3.1.8.1.-3.1.8.3.). Όσον αφορά την προσβολή από τα

μονογενή παράσιτα αποκαλύφθηκε ότι η προσβολή ήταν πιο έντονη, κατά την Φθινοπωρινή περίοδο για όλα τα είδη ψαριών. Το υψηλό ποσοστό προσβολής από τα παράσιτα συμπίπτει και με το υψηλό ποσοστό προσβολής από το *T. maritimum*. Στον Πίνακα 3.1.43, φαίνεται ο αριθμός ψαριών με ταυτόχρονη παρουσία του βακτηρίου *T. maritimum* και παρασίτων στα βράγχια και το ποσοστό προσβολής των ψαριών από το βακτήριο και από παράσιτα στα βράγχια, στις τέσσερες εποχιακές δειγματοληψίες. Στον Πίνακα 3.1.44, φαίνεται ο αριθμός ψαριών θετικών στην παρουσία παρασίτων στα βράγχια και ποσοστό προσβολής των ψαριών από παράσιτα στα βράγχια, στις τέσσερες εποχιακές δειγματοληψίες.

**Πίνακας 3.1.43.** Αριθμός ψαριών με ταυτόχρονη παρουσία του βακτηρίου *Tenacibaculum maritimum* και παρασίτων στα βράγχια και ποσοστό προσβολής των ψαριών από το βακτήριο και από παράσιτα στα βράγχια, στις τέσσερες (4) εποχιακές δειγματοληψίες.

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	Είδη ψαριών	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Ποσοστό Προσβολής % Από βακτήριο	Παράσιτα στα βράγχια	Ποσοστό Προσβολής % Από παράσιτα	Σύνολο ψαριών
<b>1<sup>η</sup> ΑΝΟΙΞΗ</b>	ΛΑΒΡΑΚΙ	29	58%	1	2%	50
	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	8	16%	0	0%	50
	ΛΥΘΡΙΝΙ	3	7.5%	0	0%	40
	ΦΑΓΚΡΙ	7	35%	0	0%	20
	ΜΥΛΟΚΟΠ I	7	46.6%	3	20%	15
	ΜΥΤΑΚΙ	4	26.6%	0	0%	15
	ΣΥΚΙΟΣ	4	40%	1	10%	10
<b>2<sup>η</sup> ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ</b>	ΛΑΒΡΑΚΙ	33	66%	9	18%	50
	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	15	30%	2	4%	50
	ΛΥΘΡΙΝΙ	7	17.5%	0	0%	40
	ΦΑΓΚΡΙ	11	55%	0	0%	20
	ΜΥΛΟΚΟΠ I	8	53.3%	4	26.6%	15
	ΜΥΤΑΚΙ	4	26.6%	0	0%	15
	ΣΥΚΙΟΣ	4	40%	0	0%	10
<b>3<sup>η</sup> ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ</b>	ΛΑΒΡΑΚΙ	39	78%	16	32%	50
	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	17	34%	2	4%	50
	ΛΥΘΡΙΝΙ	15	37.5%	19	47.5%	40

	ΦΑΓΚΡΙ	17	85%	2	10%	20
	ΜΥΛΟΚΟΠ I	12	80%	2	13.3%	15
	ΜΥΤΑΚΙ	6	40%	14	93.3%	15
	ΣΥΚΙΟΣ	6	60%	1	10%	10
<b>4<sup>η</sup> ΧΕΙΜΩΝΑΣ</b>	ΛΑΒΡΑΚΙ	27	54%	9	18%	50
	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	12	24%	14	28%	50
	ΛΥΘΡΙΝΙ	5	12.5%	0	0%	40
	ΦΑΓΚΡΙ	3	15%	0	0%	20
	ΜΥΛΟΚΟΠ I	4	26.6%	0	0%	15
	ΜΥΤΑΚΙ	2	13.3%	0	0%	15
	ΣΥΚΙΟΣ	5	50%	2	20%	10

**Πίνακας 3.1.44.** Αριθμός ψαριών θετικών στην παρουσία παρασίτων στα βράγχια και ποσοστό προσβολής των ψαριών από παράσιτα στα βράγχια, στις τέσσερες (4) εποχιακές δειγματοληψίες.

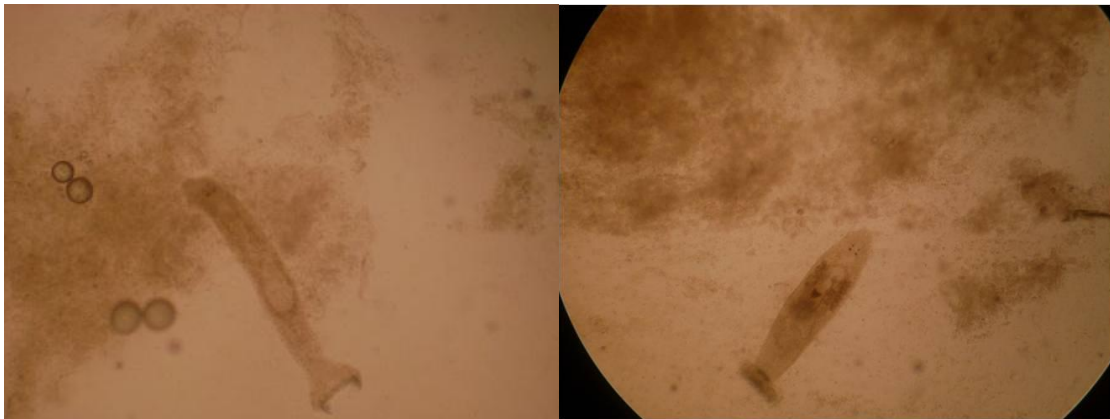
ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ	Σύνολο ψαριών	Θετικά παράσιτα στα βράγχια	Ποσοστό Προσβολής %
1 <sup>η</sup> Άνοιξη	200	5	2.5%
2 <sup>η</sup> Καλοκαίρι	200	15	7.5%
3 <sup>η</sup> Φθινόπωρο	200	56	28%
4 <sup>η</sup> Χειμώνας	200	25	12.5%
	800	101	12.62%

Στον Πίνακα 3.1.45, παρουσιάζονται οι συντελεστές συσχέτισης του ποσοστού προσβολής του βακτηρίου με τη παράλληλη εμφάνιση παρασίτων.

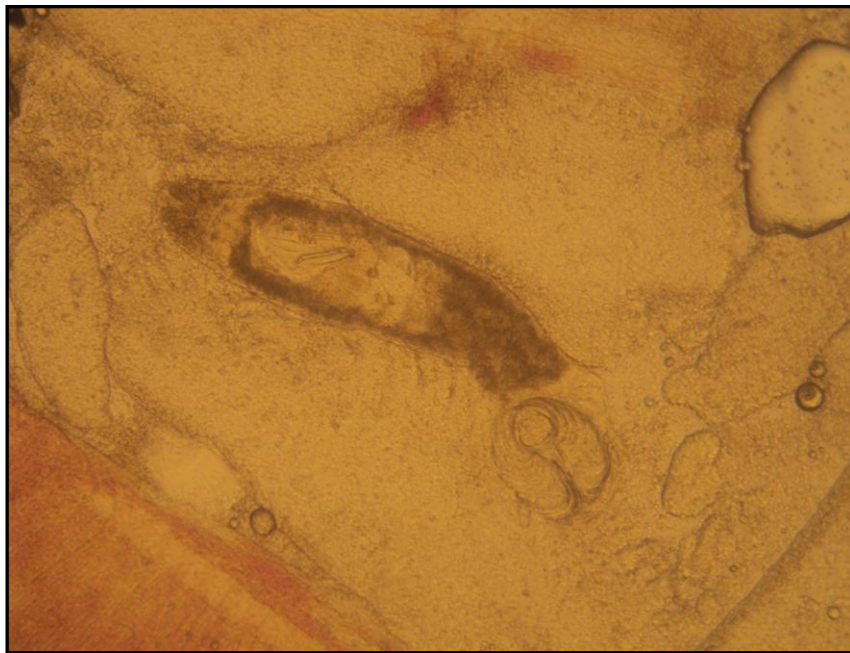
**Πίνακας 3.1.45.** Συντελεστής συσχέτισης εμφάνισης του βακτηρίου *T. maritimum* και παράλληλης εμφάνισης παρασίτων.

	% Προσβολή από βακτήρια	% Προσβολή από παράσιτα
% Προσβολή από βακτήρια	1	
% Προσβολή από παράσιτα	0,267294184	1

Από τα δεδομένα που προκύπτουν φαίνεται πως υπάρχει ασθενώς θετική συσχέτιση (σ.σ.\* τιμή κοντά στο 0) μεταξύ της παρουσίας του *T. maritimum* και παράλληλης παρουσίας εξωπαρασίτων.



Εικόνες 3.1.8.1. & 3.1.8.2. *Diplectanum* sp. σε νοπά παρασκευάσματα βραγχίων (μεγέθυνση 10x).

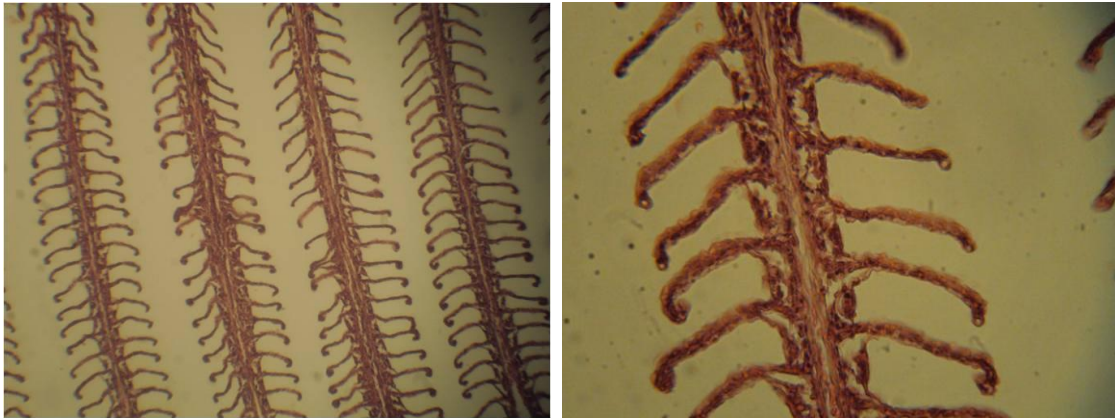


Εικόνα 3.1.8.3. *Furnestinia* sp. σε νοπά παρασκευάσματα βραγχίων (μεγέθυνση 40x).

### 3.1.9 Ιστοπαθολογική εξέταση

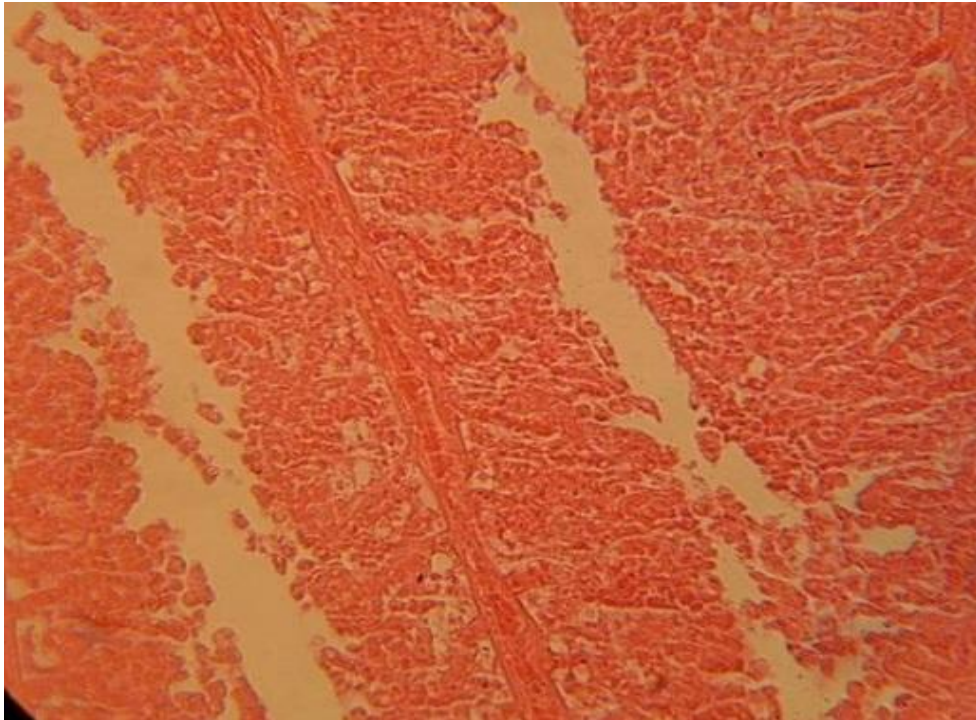
Κατά την ιστολογική εξέταση οι αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν (μεγέθυνση 4X-100X) αφορούσαν κυρίως τα βράγχια και το δέρμα από τα δείγματα των ψαριών που εμφάνισαν εξωτερικές αλλοιώσεις και θνησιμότητα. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν διαταραχή της φυσιολογικής μορφολογίας και ανατομικής δομής των βραγχίων, εστίες φλεγμονής (διήθηση από λεμφοκύτταρα) και εκφύλιση στα βράγχια, συγκόλληση στην βάση των πρωτογενών βραγχιακών νηματίων και

υπερπλασία στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια. Επίσης, συγκόλληση των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων, υπεραιμία των βραγχίων, αιματώματα, τελαγγειεκτασία στα βράγγια ως τυχαίο εύρημα, υπερτροφία και υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων των βραγχίων και άρση του αναπνευστικού επιθηλίου. Απώλεια της φυσιολογικής δομής των βραγχίων, νέκρωση του βραγχιακού επιθηλίου καθώς και μικροαποικίες των βακτηρίων στο επιθήλιο. Πολυεστιακές, βραγχιακές υπερπλαστικές αλλοιώσεις και υπερπλασία-υπερτροφία των βλεννογόνων κυττάρων. Ταυτόχρονα, σε ορισμένα είδη ψαριών, παρατηρήθηκε εισβολή και παρουσία παρασίτων στα βράγγια (Εικόνες 3.1.9.1.-3.1.9.14).

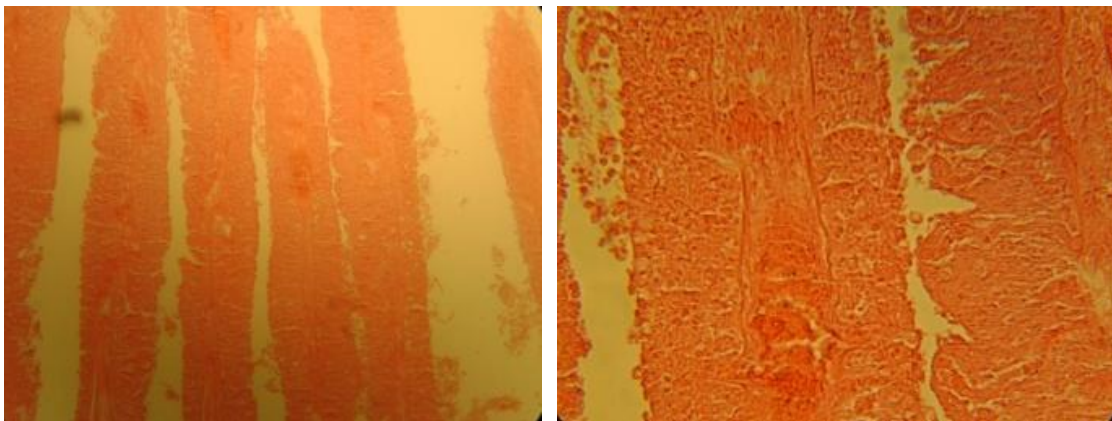


Εικόνα 3.1.9.1. Φυσιολογικά βράγγια, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).  
Εικόνα 3.1.9.2. Φυσιολογικά βράγγια, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).

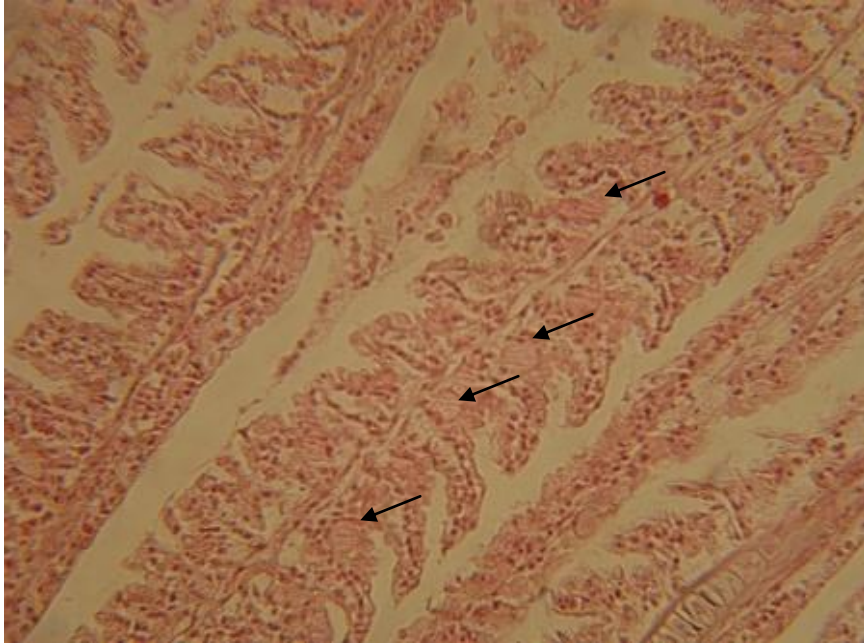




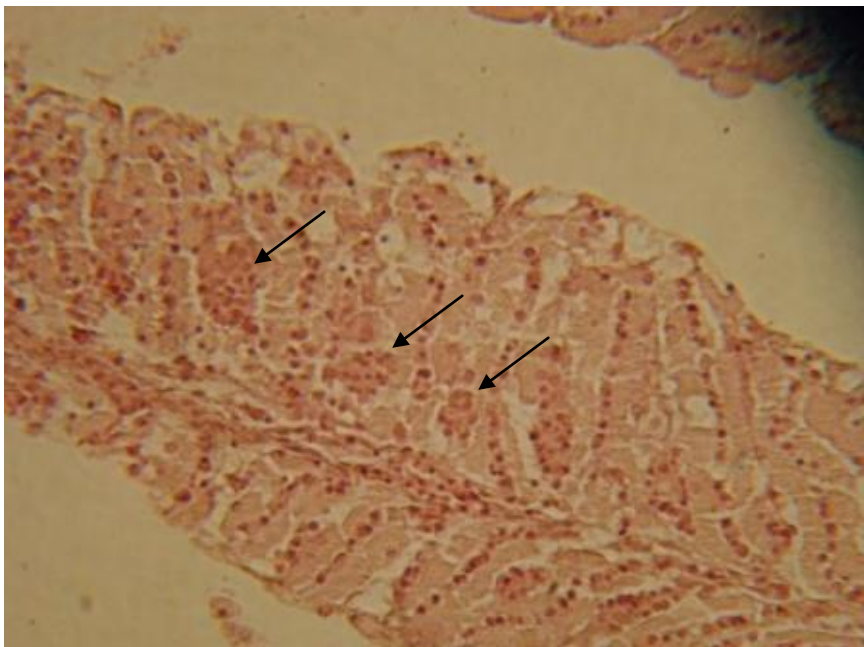
Εικόνα 3.1.9.3. Συγκόλληση στην βάση των πρωτογενών βραγχιακών νηματίων, υπερπλασία στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια, υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων των βραγχίων, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).



Εικόνες 3.1.9.4. & 3.1.9.5. Συγκόλληση των πρωτογενών και δευτερογενών βραγχιακών νηματίων, υπερπλασία στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια, αιματώματα στα πρωτογενή βραγχιακά νημάτια, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 4x & 10x).

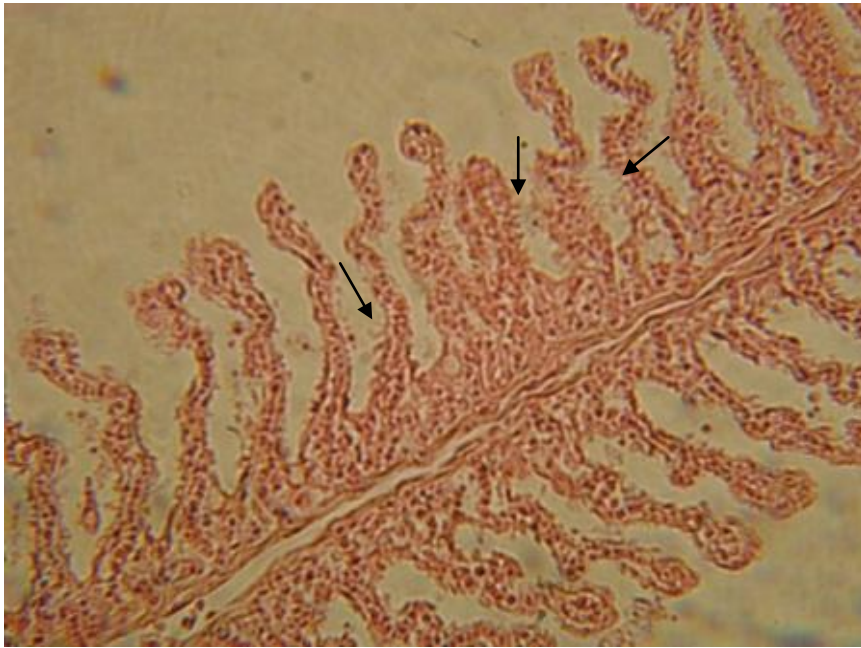


Εικόνα 3.1.9.6. Ιστολογική εικόνα βραγχίων. Απώλεια της φυσιολογικής ανατομικής δομής των βραγχίων, υπερτροφία και υπερπλασία στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια, συγκεντρώσεις βακτηρίων ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα (μαύρα βέλη), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).

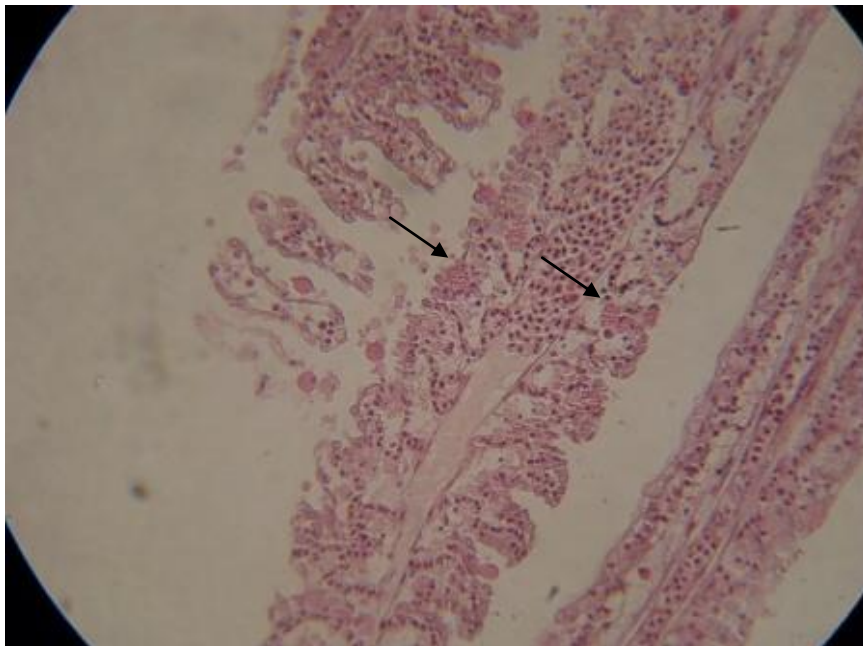


Εικόνα 3.1.9.7. Συγκόλληση των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων, υπερπλασία στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια, νέκρωση του βραγχιακού επιθηλίου, αιματώματα ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα (μαύρα βέλη), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).

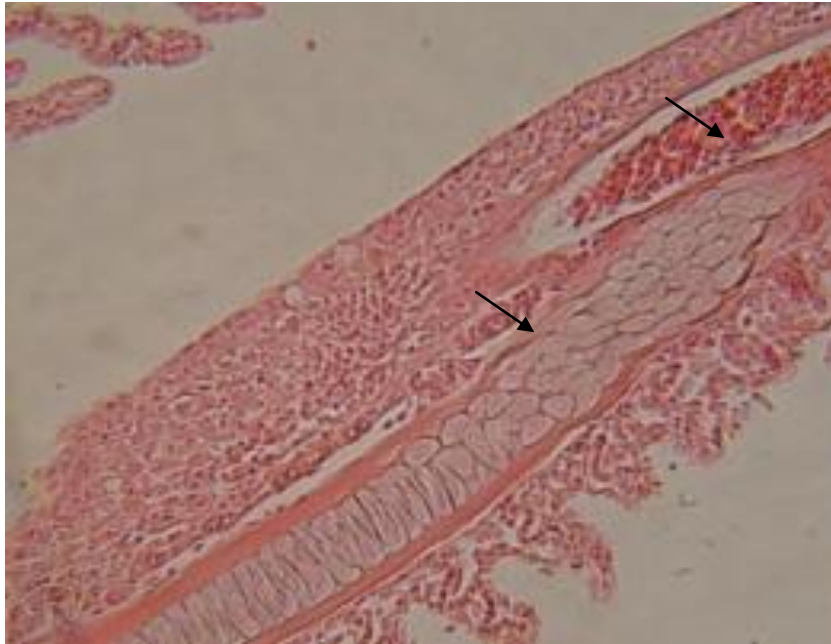




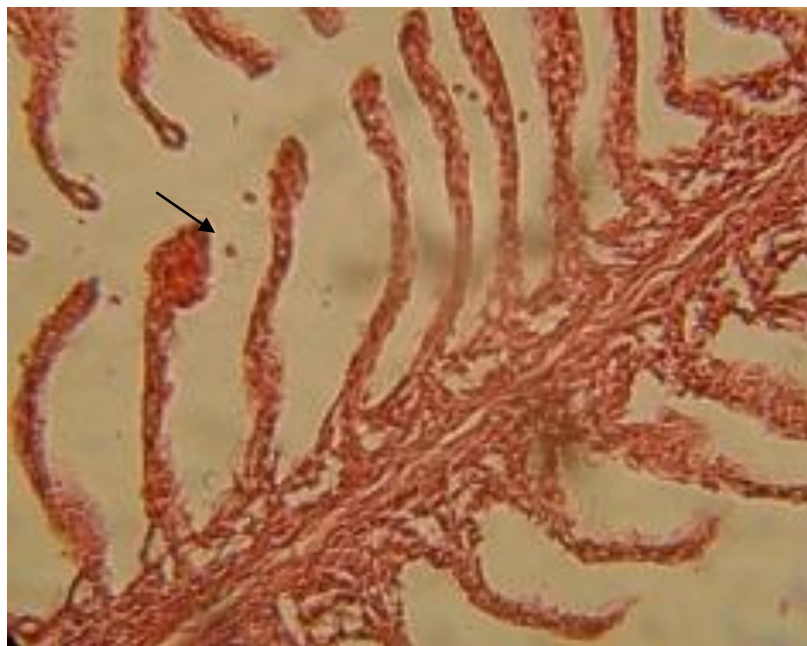
Εικόνα 3.1.9.8. Βάκιλοι προσκολλημένοι στις άκρες των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων (μαύρα βέλη), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).



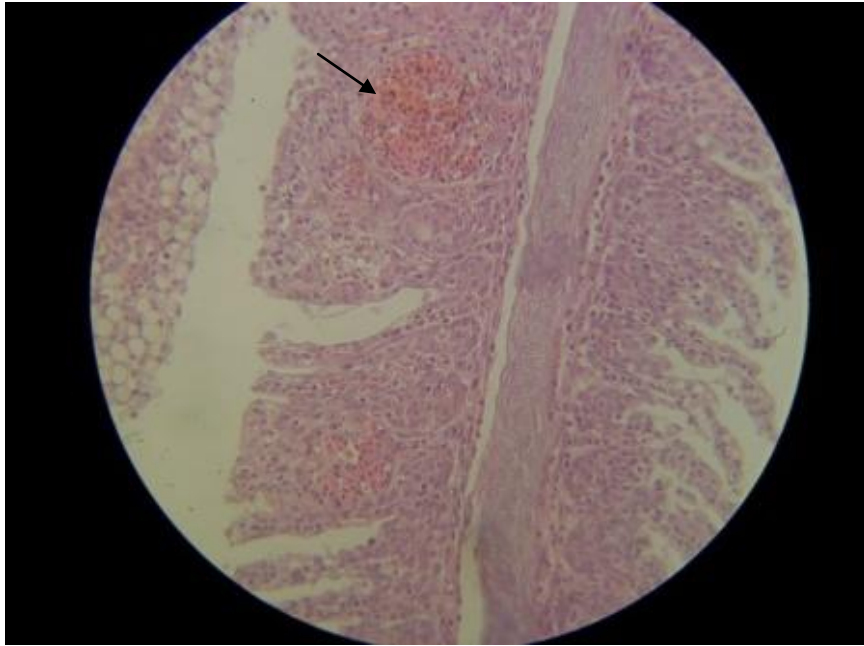
Εικόνα 3.1.9.9. Συγκόλληση των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων, υπερπλασία στα δευτερογενή και πρωτογενή βραγχιακά νημάτια, αποικίες βακτηρίων ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα (μαύρα βέλη), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).



Εικόνα 3.1.9.10. Υπερτροφία και υπερπλασία στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια, συγκόλληση των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων, αιματώματα ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα (μαύρα βέλη), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).



Εικόνα 3.1.9.11. Τελαγγειεκτασία, τυχαίο εύρημα στις άκρες των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων (μαύρο βέλος), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).

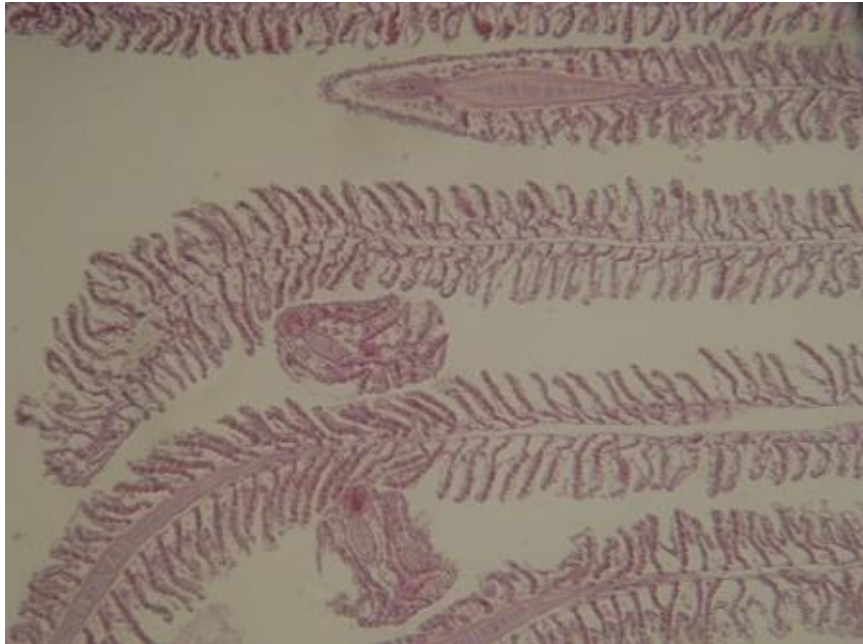


Εικόνα 3.1.9.12. Υπερτροφία και υπερπλασία στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια, συγκόλληση των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων, αιμάτωμα, συγκέντρωση ερυθροκυττάρων ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα (μαύρο βέλος), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).



Εικόνα 3.1.9.13. Μονογενές τρισματώδες παράσιτο ανάμεσα στα πρωτογενή βραγχιακά νημάτια, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).

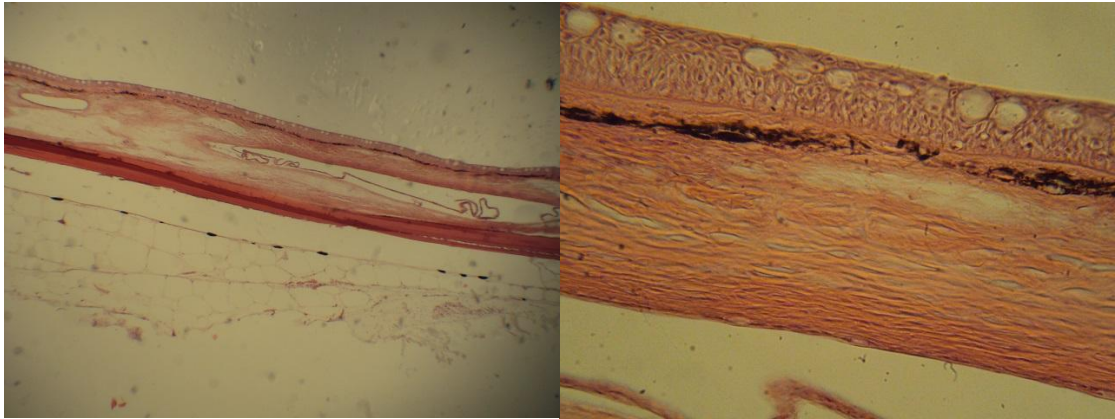




Εικόνα 3.1.9.14. Μονογενές τριηματώδες παράσιτο ανάμεσα στα πρωτογενή βραγχιακά νημάτια, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).

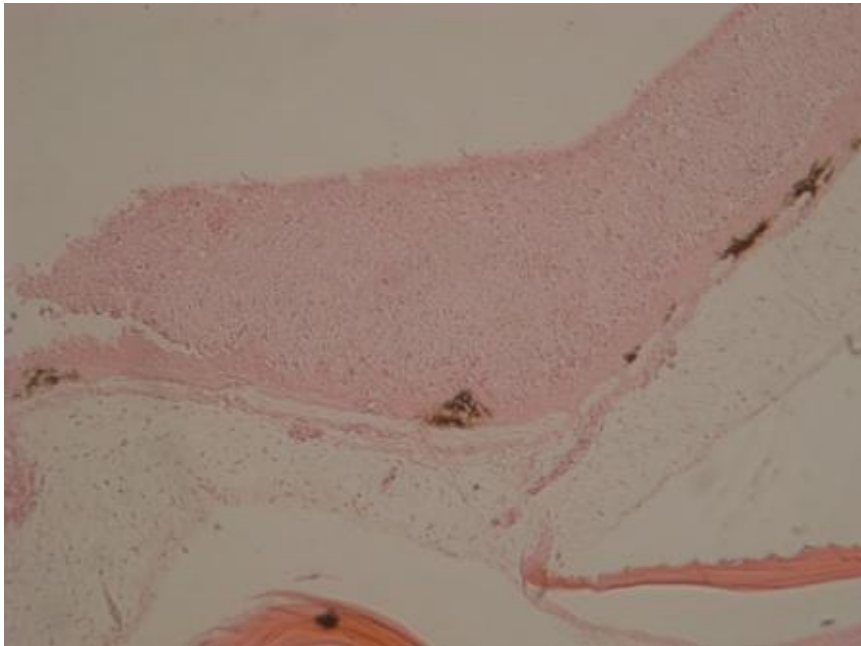
Όσον αφορά τις αλλοιώσεις στο δέρμα, παρατηρήθηκαν πλήρη απώλεια της επιδερμίδας και του χορίου, καθώς και έκθεση και εκτεταμένη νέκρωση του μυϊκού ιστού, σε ορισμένες περιπτώσεις. Μια φλεγμονώδης διήθηση με την παρουσία μακροφάγων παρατηρήθηκε στην επιδερμίδα, στο χόριο και γύρω από εκφυλισμένα μυϊκά κύτταρα. Επιμήκη βακτήρια, βάκιλοι μπορούσαν να εντοπιστούν στο χόριο και στην επιδερμίδα. Παρατηρήθηκαν επίσης, αιμορραγία στην επιδερμίδα και στο χόριο, αλλά χωρίς τα βακτήρια να είναι πάντα ορατά στις ιστολογικές τομές, στο επιθήλιο. Νέκρωση της επιδερμίδας, υπερπλασία των βλενογόνων κυττάρων της επιδερμίδας και σε ορισμένες περιπτώσεις απώλεια μελανοφόρων κυττάρων. Στα περισσότερα δείγματα, παρατηρήθηκε συγκέντρωση και αύξηση του αριθμού των μελανοφόρων κυττάρων στο δέρμα, ενώ στο χόριο μπορούσαν να παρατηρηθούν, λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι μαζί με μελανοφόρα κύτταρα. Τα επιθηλιακά κύτταρα εμφάνισαν διαφορετικού βαθμού σπογγίωση (οίδημα, υπερπλασία, υπερτροφία επιθηλιακών κυττάρων) (Εικόνες 3.1.9.15.-3.1.9.28.).

Απώλεια των λεπιών, οίδημα και φλεγμονή στις θήκες των λεπιών, καθώς και συγκεντρώσεις των βακτηρίων μπορούσαν να παρατηρηθούν πριν την πλήρη διάβρωση του επιθηλίου.

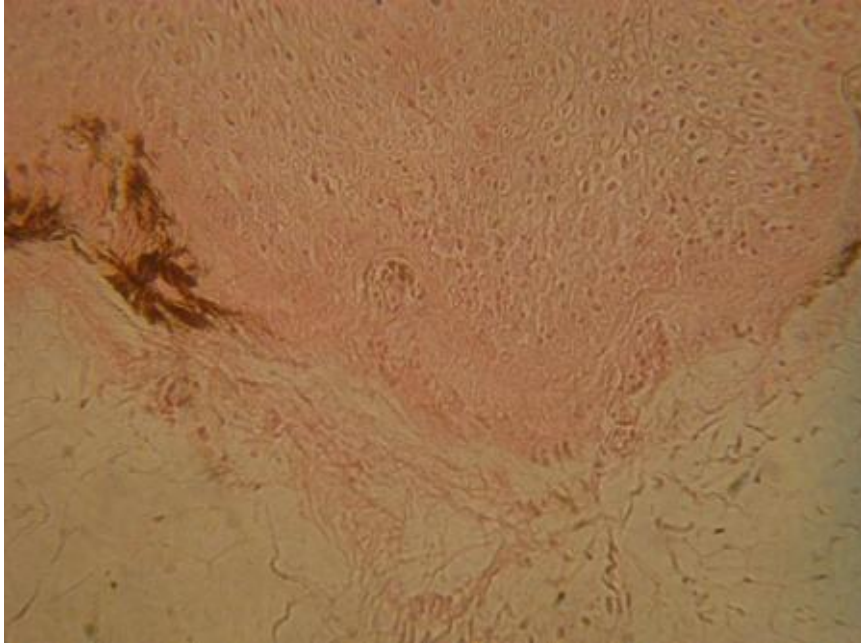


Εικόνα 3.1.9.15. Φυσιολογικό δέρμα, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 4x).

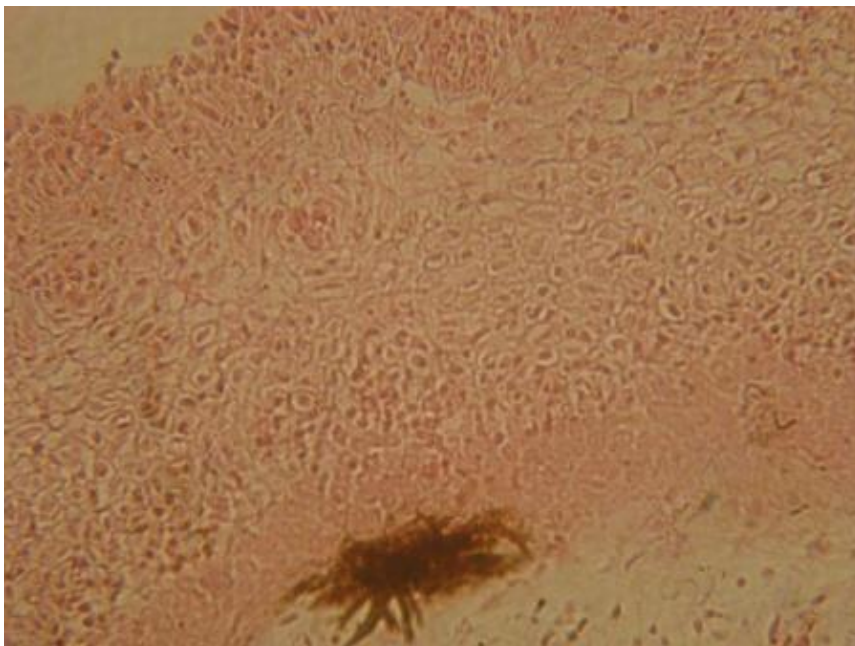
Εικόνα 3.1.9.16. Φυσιολογικό δέρμα, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).



Εικόνα 3.1.9.17. Σπογγίωση στο δέρμα, οίδημα, υπερπλασία, υπερτροφία επιθηλιακών κυττάρων, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).

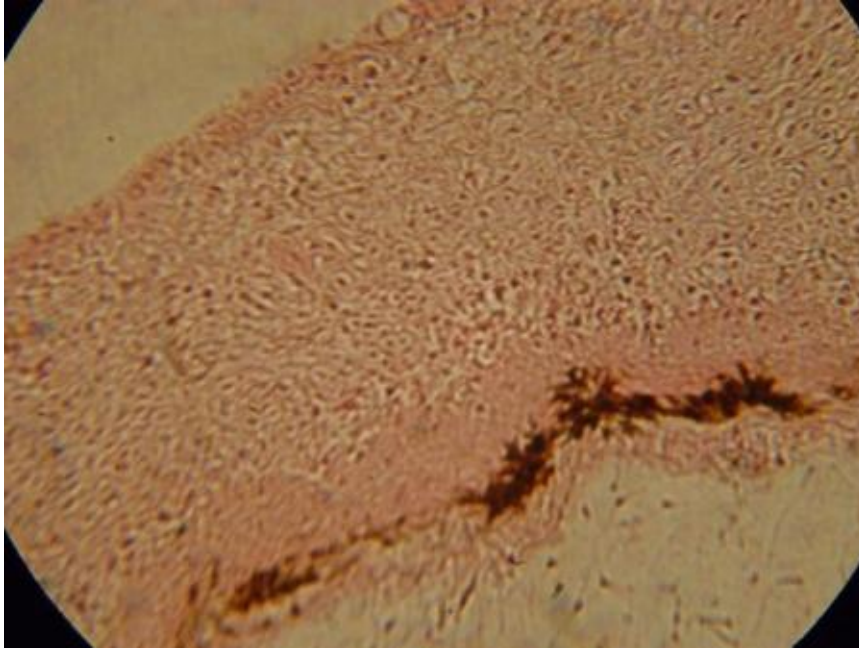


Εικόνα 3.1.9.18. Σπογγίωση στο δέρμα, προηγούμενη εικόνα, μεγαλύτερη μεγέθυνση, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).

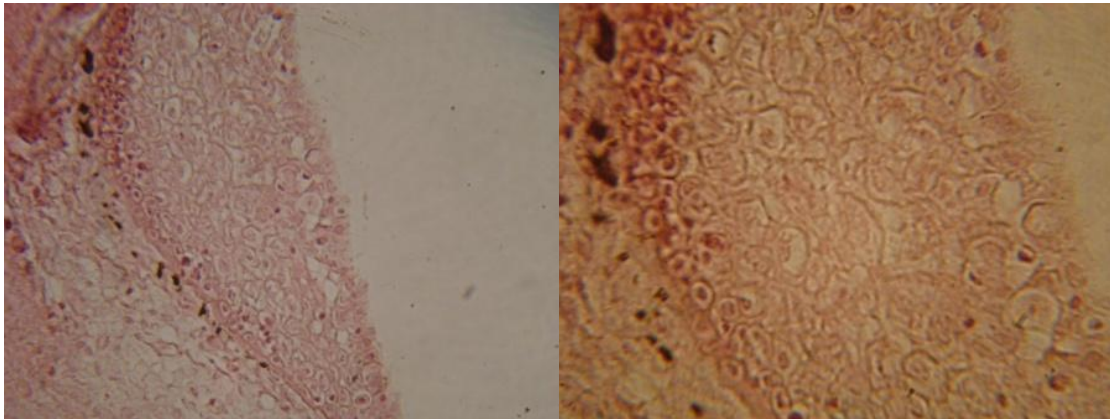


Εικόνα 3.1.9.19. Σπογγίωση στο δέρμα, οίδημα, υπερπλασία, υπερτροφία επιθηλιακών κυττάρων, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 100x).

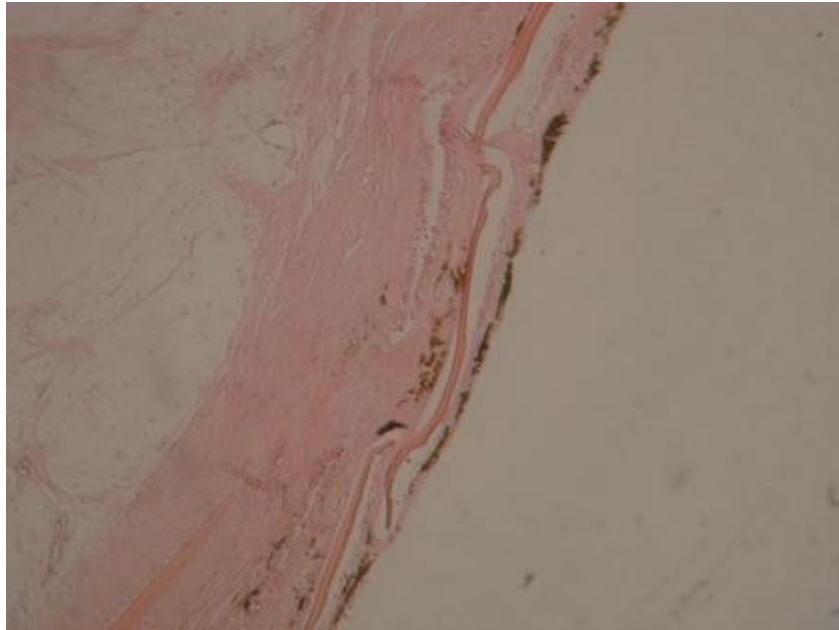




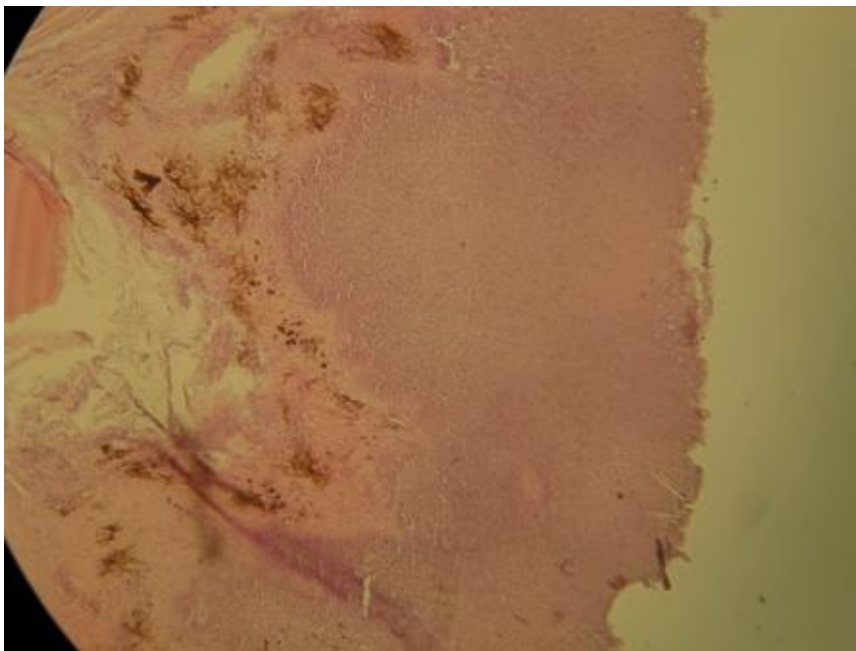
Εικόνα 3.1.9.20. Σπογγίωση στο δέρμα, οίδημα, υπερπλασία, υπερτροφία επιθηλιακών κυττάρων, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).



Εικόνες 3.1.9.21. & 3.1.9.22. Σπογγίωση στο δέρμα, οίδημα, υπερπλασία, υπερτροφία επιθηλιακών κυττάρων & υπερτροφία, υπερπλασία των βλενογόνων κυττάρων χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x & 40x).

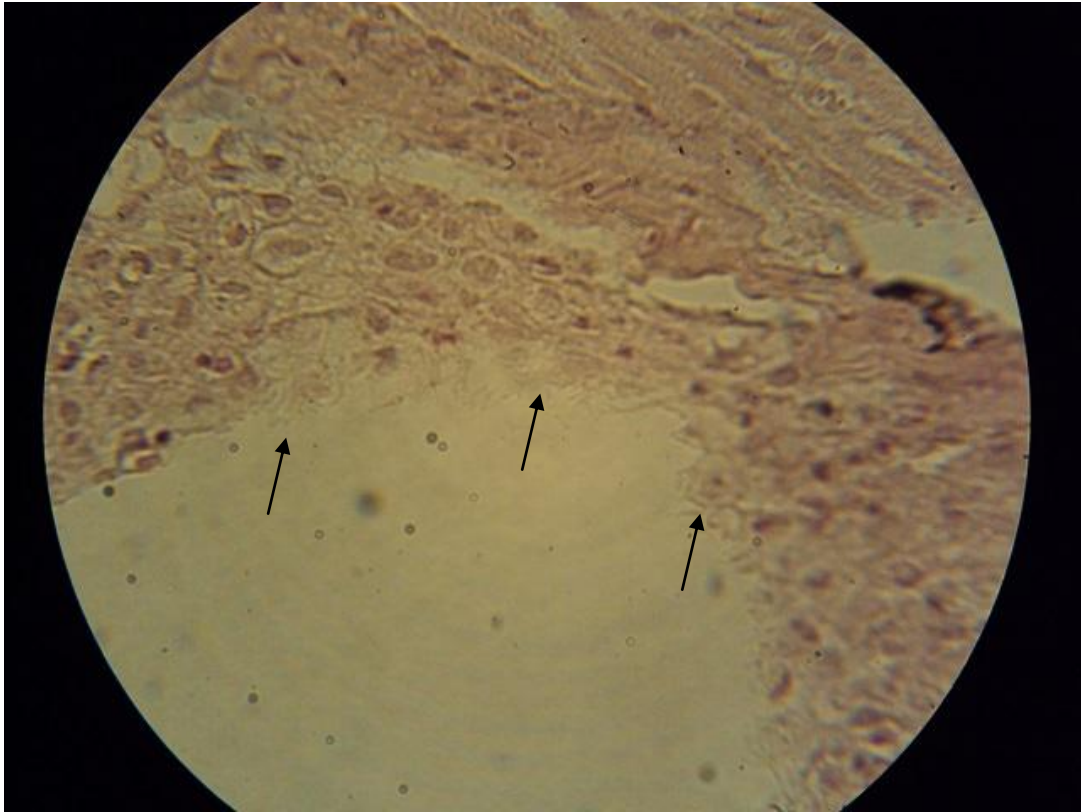


Εικόνες 3.1.9.23. Αύξηση του αριθμού των μελανοφόρων κυττάρων στο δέρμα, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).

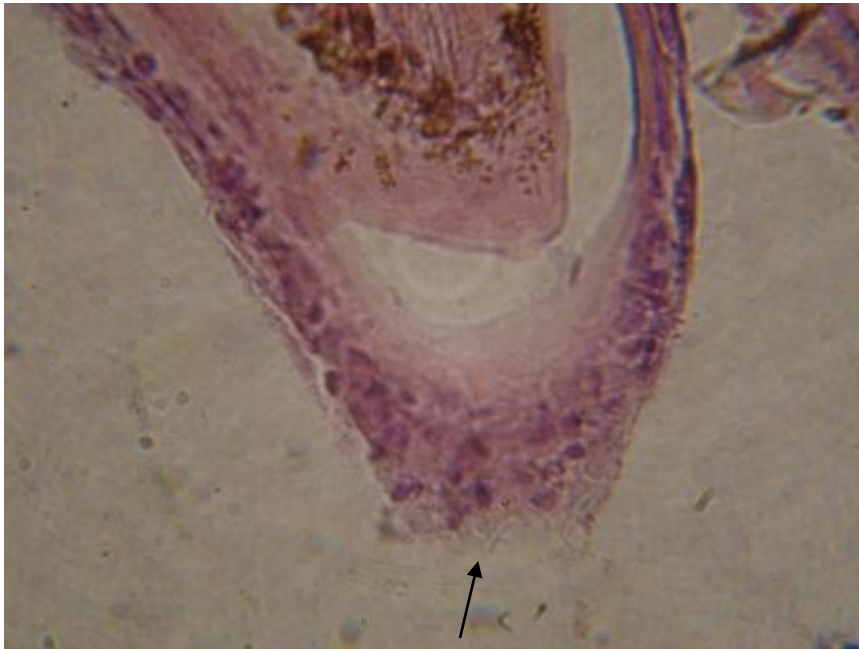


Εικόνα 3.1.9.24. Σπογγίωση στο δέρμα, οίδημα, υπερπλασία, υπερτροφία επιθηλιακών κυττάρων, υπερπλασία επιδερμίδας στο δέρμα-ουράς, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).

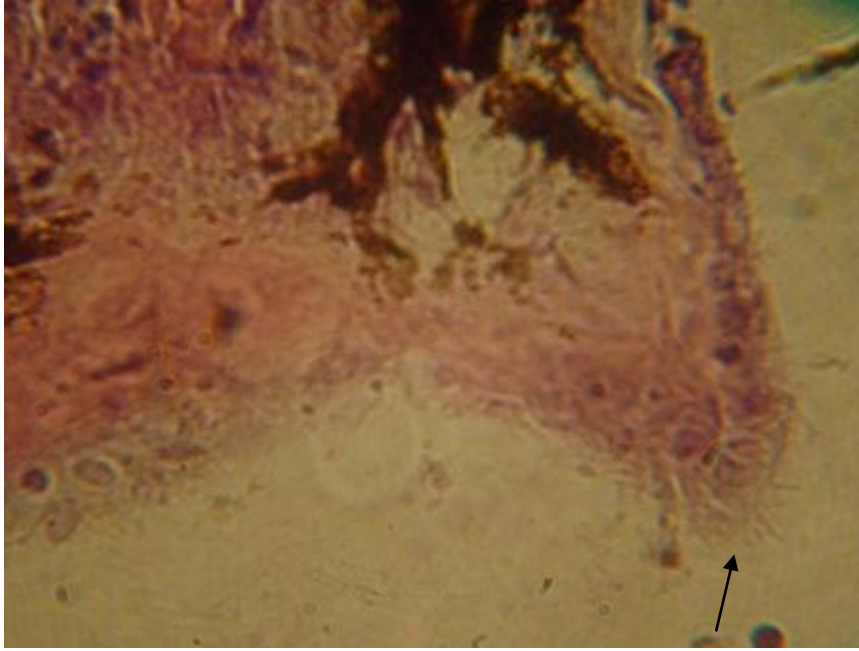




Εικόνα 3.1.9.25. Λεptoί επιμήκεις βάκιλοι, προσκολλημένοι την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων της επιδερμίδας (μαύρα βέλη), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 100x).

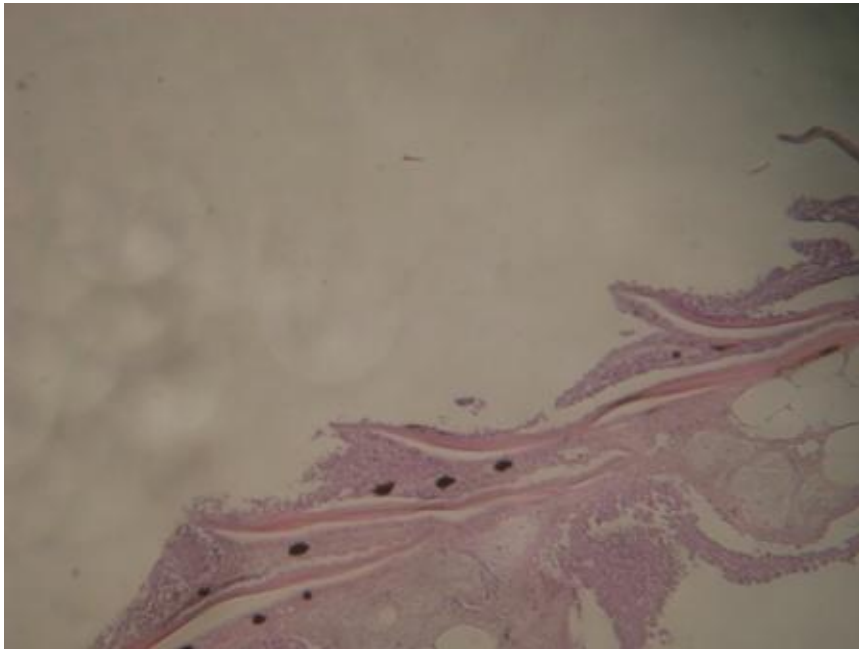


Εικόνα 3.1.9.26. (μεγέθυνση 40x).



Εικόνα 3.1.9.27. (μεγέθυνση 40x).

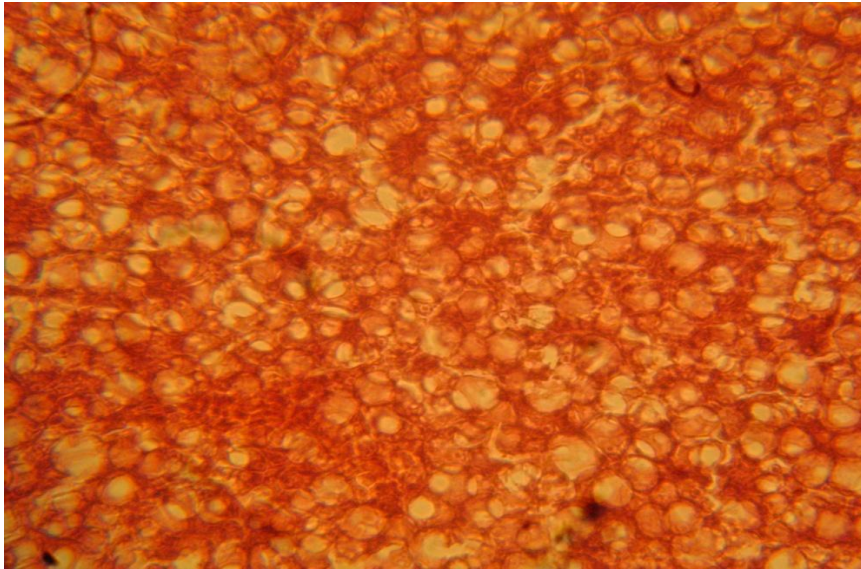
Εικόνες 3.1.9.26. & 3.1.9.27. Ιστολογική τομή δέρματος ουραίου περυγίου. Λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι, προσκολλημένοι την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων της επιδερμίδας (μαύρα βέλη), χρώση αιματοξυλίνη–εωσίνη.



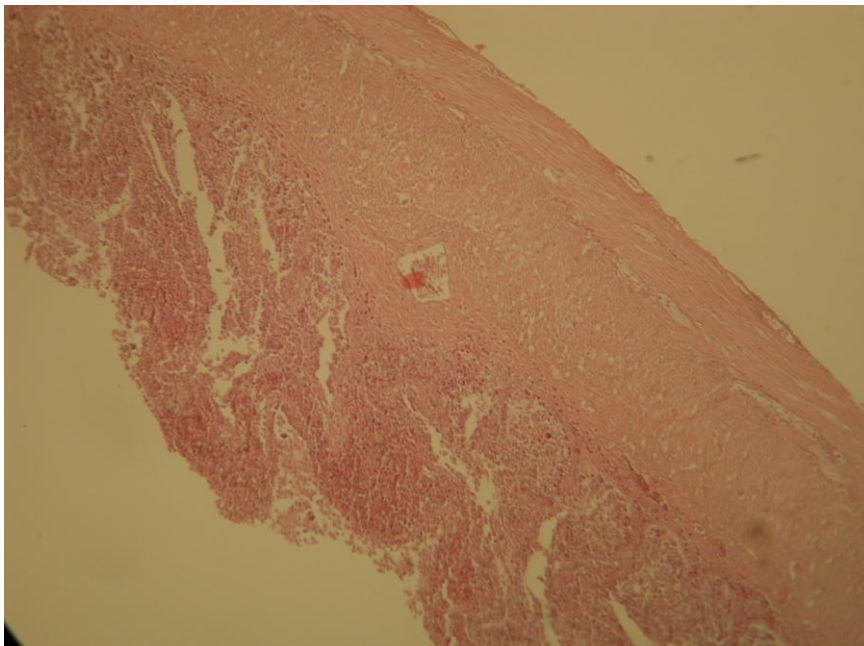
Εικόνα 3.1.9.28. Απώλεια της επιδερμίδας και του χορίου, έκθεση των λεπιών, χρώση αιματοξυλίνη–εωσίνη (μεγέθυνση 10x).

Σε ορισμένα δείγματα από το έντερο διαπιστώθηκε επίσης απόπτωση των εντερικών λαχνών και του βλεννογόνου, συγκόλληση των εντερικών λαχνών,

υπεραιμία του εντέρου και εντερίτιδα, ειδικά στα ψάρια που ανήκαν στο είδος μυλοκόπι. Σε έναν αριθμό ψαριών (n=120), παρατηρήθηκε επίσης λιπώδης εκφύλιση του ήπατος, αποτελώντας τυχαίο εύρημα. Στην πλειοψηφία των ψαριών, δεν διαπιστώθηκαν σοβαρές αλλοιώσεις συστηματικής μόλυνσης και όλη η παθολογία σχετίστηκε με αλλοιώσεις στα εξωτερικά όργανα (Εικόνες 3.1.9.29.-3.1.9.30.).



Εικόνα 3.1.9.29. Λιπώδης εκφύλιση ήπατος, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).



Εικόνα 3.1.9.30. Ιστολογική τομή εντέρου με απόπτωση και συγκόλληση των εντερικών λαχνών και του εντερικού βλεννογόνου, υπεραιμία και φλεγμονή του εντέρου, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).

### 3.1.10 Αντιβιόγραμμα

Τα αντιβιογράμματα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της Εθνικής Επιτροπής για Κλινικά Εργαστηριακά Πρότυπα (NCCLS, 2001) χρησιμοποιώντας στελέχη του *T. maritimum* που απομονώθηκαν.

Οι διαθέσιμες πληροφορίες πάνω στην ευαισθησία στα αντιβιοτικά για ορισμένα παθογόνα βακτήρια των ψαριών, έδειξαν ότι δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με το βασικό θρεπτικό υπόστρωμα που θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την δοκιμή του αντιβιογράμματος (Dalsgaard, 2001). Με την γνώση ότι τα FMM, MA και τροποποιημένο AOA, επέτρεψαν την ανάπτυξη των αποικιών του *T.maritimum* μόνο αυτά τα θρεπτικά υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν για την συγκριτική δοκιμή των επτά (7) διαφορετικών αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται συχνά στις ιχθυοκαλλιέργειες για την θεραπεία της μυξοβακτηριδίασης (Avendaño-Herrera et al., 2005a). Στην πραγματικότητα, αυτά τα 3 θρεπτικά υποστρώματα, χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του *T. maritimum* από εξωτερικά και εσωτερικά όργανα, μολυσμένων ψαριών.

Μετά από 24 ώρες επώαση, αναπτύχθηκαν οι κύκλοι αναστολής γύρω από τα δισκία των αντιβιοτικών. Σε ελάχιστες περιπτώσεις, χρειάστηκαν 48 ώρες επώασης των τριβλίων για να καταστεί δυνατή η μέτρηση της διαμέτρου του κύκλου αναστολής (Εικόνες 3.1.10.1.-3.1.10.3).

Όλα τα στελέχη *T. maritimum* εμφάνισαν γρήγορα, καθαρούς και σαφώς περιγεγραμμένους κύκλους αναστολής στο FMM, στο οποίο έγινε προσθήκη 50% θαλασσινό νερό μετά από 24 ώρες επώασης.

Επιπλέον, αυτοί οι κύκλοι αναστολής παρέμειναν σταθεροί κατά την διάρκεια επώασης. Το τροποποιημένο AOA αποδείχθηκε επίσης αποτελεσματικό για την δοκιμή του αντιβιογράμματος, σχηματίζοντας σαφείς κύκλους αναστολής.

Τα αποτελέσματα του αντιβιογράμματος για τα στελέχη του *T. maritimum* απέδειξαν επίσης ότι και η φύση του θρεπτικού υποστρώματος φαίνεται να επηρεάζει το μέγεθος του κύκλου αναστολής γύρω από τα δισκία αντιβιοτικών. Συγκεκριμένα, στο M.A. δεν σχηματίστηκαν ευκρινείς κύκλοι αναστολής, οδηγώντας σε αβεβαιότητα στην εκτίμηση των κύκλων αναστολής, γι' αυτό και απορρίφθηκε στην πορεία των δοκιμών.

Ανεξάρτητα από τις διαφορές μεταξύ της αποτελεσματικότητας του MA και του FMM και του τροποποιημένου AOA και ανεξάρτητα από το στέλεχος κάθε φορά, όλα τα στελέχη του *T. maritimum* εμφάνισαν παρόμοιο προφίλ ευαισθησίας. Όλα τα

στελέχη εμφάνισαν ευαισθησία στην σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη, οξυτετρακυκλίνη, αμοξυκιλλίνη και φλουμεκίνη. Ενώ, εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο οξολινικό οξύ, στον βιμπριοστατικό παράγοντα 0.129 και στην νεομυκίνη (Πίνακες 3.1.46-3.1.47).

**Πίνακας 3.1.46.** Λαβράκι. Ευαισθησία των απομονωμένων στελεχών του *Tenacibaculum maritimum* στα αντιβιοτικά, για τις τέσσερες (4) δειγματοληψίες.

	1 <sup>η</sup> Δ		2 <sup>η</sup> Δ		3 <sup>η</sup> Δ		4 <sup>η</sup> Δ	
Στέλεχος	1LV .τροποποιη μένο ΑΟΑ- Βράγχια		2LV. FMM- Δέρμα		3LV. FMM- Βράγχια		4LV .τροποποιη μένο ΑΟΑ- Δέρμα	
Αντιβιοτικά	Ζώνη αναστολής, διάμετρος (mm)	Ευαισθησία	Ζώνη αναστολής, διάμετρος (mm)	Ευαισθησία	Ζώνη αναστολής, διάμετρος (mm)	Ευαισθησία	Ζώνη αναστολής, διάμετρος (mm)	Ευαισθησία
<b>SXT</b>	28.3	S	30	S	31.2	S	32.3	S
<b>TE</b>	23.1	S	22.6	S	28	S	33.6	S
<b>AML</b>	22.7	S	26	S	24.5	S	20.8	S
<b>UB</b>	13	S	14	S	12.3	S	21.4	S
<b>OA</b>	-	R	-	R	-	R	-	R
<b>0.129</b>	-	R	-	-	-	-	-	R
<b>N</b>	-	-	-	R	-	R	-	R

**R:**ανθεκτικό, **S:**ευαίσθητο. **SXT**= σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη, 25μg. **TE**= οξυτετρακυκλίνη, 10μg. **AML**= αμοξυκιλλίνη, 10μg. **UB**=φλουμεκίνη, 30μg. **OA**= οξολινικό οξύ, 2μg. **0.129**= βιμπριοστατικός παράγοντας 0.129. **N**= νεομυκίνη, 30μg

**Πίνακας 3.1.47.** Τσιπούρα. Ευαισθησία των απομονωμένων στελεχών του *Tenacibaculum maritimum* στα αντιβιοτικά, για τις τέσσερες (4) δειγματοληψίες.

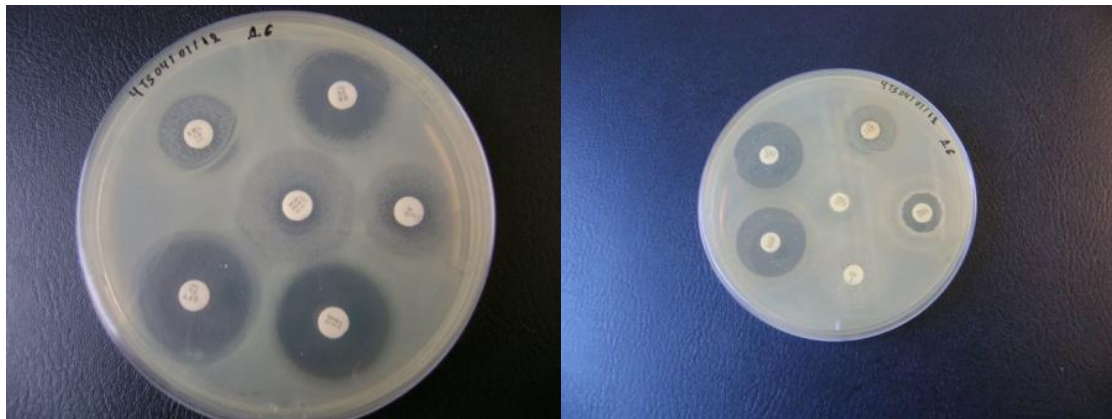
	1 <sup>η</sup> Δ		2 <sup>η</sup> Δ		3 <sup>η</sup> Δ		4 <sup>η</sup> Δ	
Στέλεχος	1TS. FMM- Δέρμα		2TS. τροποποιημ ένο ΑΟΑ- Δέρμα		3TS. FMM- Δέρμα		4TS. ΜΑ- Δέρμα	
Αντιβιοτικά	Ζώνη αναστολής, διάμετρος (mm)	Ευαισθησία	Ζώνη αναστολής, διάμετρος (mm)	Ευαισθησία	Ζώνη αναστολής, διάμετρος (mm)	Ευαισθησία	Ζώνη αναστολής, διάμετρος (mm)	Ευαισθησία
<b>SXT</b>	30	S	32	S	32.2	S	26.1	S
<b>TE</b>	24.7	S	29.2	S	30	S	23.3	S
<b>AML</b>	23.2	S	18.3	S	28.4	S	19.6	S
<b>UB</b>	15.3	S	22.8	S	12.8	S	15.2	S
<b>OA</b>	-	R	-	R	-	R	-	R
<b>0.129</b>	-	R	-	R	-	-	-	-
<b>N</b>	-	R	-	-	-	R	-	R

**R:**ανθεκτικό, **S:**ευαίσθητο. **SXT**= σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη, 25μg. **TE**= οξυτετρακυκλίνη, 10μg. **AML**= αμοξυκιλλίνη, 10μg. **UB**=φλουμεκίνη, 30μg. **OA**= οξολινικό οξύ, 2μg. **0.129**= βιμπριοστατικός παράγοντας 0.129. **N**= νεομυκίνη, 30μg





Εικόνα 3.1.10.1. Αντιβιογράμμα, διακρίνονται οι κύκλοι αναστολής



Εικόνες 3.1.10.2. & 3.1.10.3. Αντιβιογράμμα, διακρίνονται οι κύκλοι αναστολής γύρω από τα δισκία των αντιβιοτικών.

### 3.1.11 Μοριακή ταυτοποίηση-Απομόνωση Γενετικού υλικού PCR,

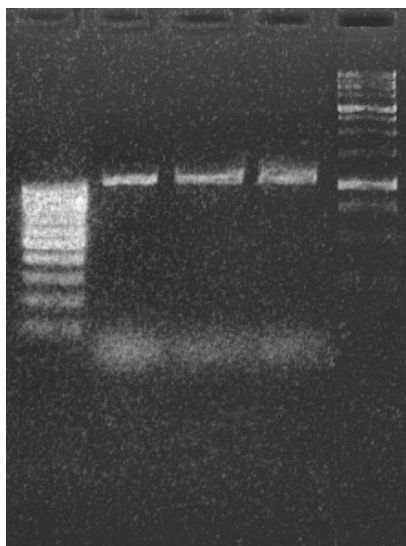
Τα αποτελέσματα της μοριακής ταυτοποίησης και της PCR, επιβεβαίωσαν ότι το υπεύθυνο αίτιο στις περιπτώσεις των ψαριών με τις αλλοιώσεις αλλά και των υγιών ψαριών, ήταν το βακτήριο *T. maritimum*. (Εικόνες 3.1.11.1.-3.1.11.3.).

Η μοριακή ταυτοποίηση επέτρεψε επίσης την ανίχνευση του παθογόνου από μικτές αποικίες ψαριών με αλλοιώσεις της μυξοβακτηριδίασης, κατά τις οποίες η ανάπτυξη εμφανών αποικιών του *T. maritimum* δεν ήταν πάντα δυνατή.

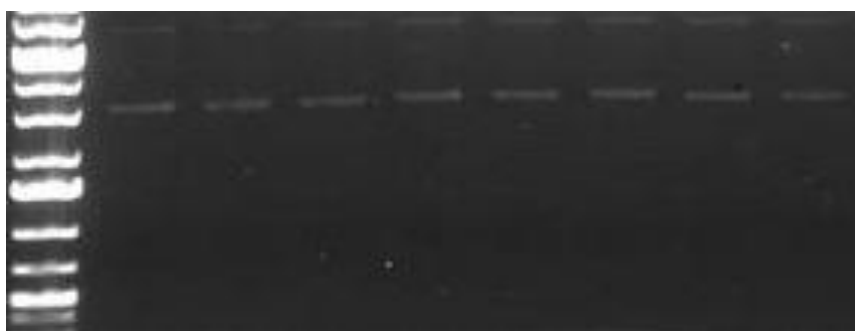
Όλα τα δείγματα που ήταν θετικά με βάση τις μικροσκοπικές και μικροβιολογικές εξετάσεις, ήταν επίσης θετικά με βάση τις μοριακές εξετάσεις.

Επίσης, το πρωτόκολλο PCR που χρησιμοποιήθηκε για αυτή την έρευνα και έχει περιγραφεί προηγουμένως από τον Toyama και συνεργάτες (1996), αποδείχθηκε αποτελεσματικό για την ταυτοποίηση και ανίχνευση των στελεχών που απομονώθηκαν.

Η PCR αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο στην έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση παίρνοντας δείγμα από τις αποικίες του βακτηρίου αλλά και από τους ιστούς των ψαριών απευθείας. Η συνολική διάρκεια για όλη την διαδικασία από την απομόνωση του DNA μέχρι την ηλεκτροφόρηση είναι λιγότερο από 7 ώρες.



Εικόνα 3.1.11.1. Φθορισμός αμπλικονίων, κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Διακρίνονται τα θραύσματα των 1080bp χαρακτηριστικά για *T. maritimum* με χρήση των MAR1-MAR2 εκκινητών.



Εικόνα 3.1.11.2. Ηλεκτροφόρηση. Διακρίνονται τα θραύσματα των 1080bp χαρακτηριστικά για *T. maritimum* με χρήση των MAR1-MAR2 εκκινητών.



Εικόνα 3.1.11.3. Φθορισμός αμπλικονίων, κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Διακρίνονται τα θραύσματα των 1080bp χαρακτηριστικά για *T. maritimum* με χρήση των MAR1-MAR2 εκκινητών.

### 3.1.12 Τράπεζα Αναφοράς Μυξοβακτηριδίων από τις Ελληνικές, Θαλάσσιες Ιχθυοκαλλιέργειες

Σε αυτή την έρευνα, συνολικά, τριακόσια δέκα τέσσερα (314) στελέχη *T. maritimum* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν, με βάση τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά και την μοριακή ταυτοποίηση από όλα τα δείγματα ψαριών (n=800) που συλλέχθηκαν από τις ιχθυοκαλλιέργειες στην Ελλάδα, στην διάρκεια των τεσσάρων (4) δειγματοληψιών. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν από το λαβράκι (n = 128), από την τσιπούρα (n = 52), από το λυθρίνι (n = 30), από το φαγκρί (n = 38), από το μυλοκόπι (n = 31), από το μυτάκι (n = 16) και από τον συκίο (n = 19). Αυτά τα στελέχη απομονώθηκαν κυρίως από το δέρμα, τις δερματικές αλλοιώσεις, τα πτερύγια και τα βράγχια και όχι από εσωτερικά όργανα. Δείγματα τα οποία ελήφθησαν από τον νεφρό και τον σπλήνα, ευνόησαν την ανάπτυξη άλλων ευκαιριακών παθογόνων βακτηρίων, όχι όμως την ανάπτυξη αποικιών του *T. maritimum*.

Όταν ολοκληρώθηκε η ταυτοποίηση, για την απλοποίηση του χειρισμού των δειγμάτων, σε κάθε στέλεχος δόθηκε ένας κωδικός ταυτοποίησης (ξεχωριστός κωδικός αναγνώρισης). Κάθε κωδικός αποτελούνταν από πέντε μέρη: το πρώτο μέρος, ένας αριθμός από το 1-4, ανάλογα με την εποχική δειγματοληψία (1=Άνοιξη, 2=Καλοκαίρι, 3=Φθινόπωρο, 4=Χειμώνας), το δεύτερο μέρος, ανάλογα με το είδος των ψαριών που εξετάστηκαν (LV=λαβράκι, TS=τσιπούρα, L=λυθρίνι, P=φαγκρί, MUS=μυλοκόπι, M=μυτάκι, SU=συκίος), το τρίτο μέρος, ανάλογα με την ακριβή



ημερομηνία συλλογής των δειγμάτων, το τέταρτο μέρος, ανάλογα με την περιοχή συλλογής (Μονάδα 1=a, Μονάδα 2=b) και το πέμπτο μέρος υποδηλώνει τον αύξων αριθμό του κάθε δείγματος. π.χ. Ο κωδικός για το στέλεχος, 1LV16/3/11a.2, σημαίνει: 1<sup>η</sup> δειγματοληψία-την άνοιξη, από λαβράκι, ημερομηνία δειγματοληψίας: 16/3/11, στην μονάδα Α, ο αριθμός του δείγματος είναι 2.

Τα στελέχη των μυξοβακτηρίων, μετά την απομόνωση τους και την ταυτοποίηση τους, διατηρήθηκαν στην κατάψυξη, στους -80°C σε FMM broth με προσθήκη 18% (v/v) γλυκερόλη, σε τροποποιημένο AOA broth με προσθήκη 18% (v/v) γλυκερόλη και σε TSB broth με προσθήκη 18% (v/v) γλυκερόλη. Σκοπός είναι η διατήρηση των απομονωμένων βακτηριδιακών στελεχών για μελλοντικές μελέτες και η δημιουργία τράπεζας μυξοβακτηριδίων από τις Ελληνικές, θαλάσσιες ιχθυοκαλλιέργειες.

Η ίδρυση και λειτουργία αυτής της τράπεζας μυξοβακτηριδίων ακολουθεί τις γενικές αρχές που έχουν καθιερωθεί από την Παγκόσμια Ομοσπονδία και την Συλλογή στελεχών (World Federation for Culture Collections Guidelines, 1999).

Το παρόν έργο αποτελεί την δεύτερη οργανωμένη προσπάθεια διεύρυνσης της πρώτης τράπεζας παθογόνων βακτηρίων των ψαριών, μιας τράπεζας αναφοράς μόνον για μυξοβακτηρίδια, απομονωμένων από τις Ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες.

## **3.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Tenacibaculum maritimum* ΣΕ ΙΧΘΥΔΙΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ**

### **3.2.1 Πειραματική μόλυνση ιχθύων με τα παθογόνα στελέχη *Tenacibaculum maritimum***

Μετά την μόλυνση των ομάδων του πειράματος, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της θερμοκρασίας, του οξυγόνου, του pH και της αμμωνίας και έγινε παρακολούθηση της συμπεριφοράς των ψαριών, της μορφής εξέλιξης της νόσου και της παρατηρούμενης θνησιμότητας. Στον Πίνακα 3.2.1. φαίνονται οι παράμετροι ποιότητας του νερού, κατά την διάρκεια όλων των πειραματικών μολύνσεων.

**Πίνακας 3.2.1.** Ποιότητα νερού κατά την διάρκεια των πειραματικών μολύνσεων

Θερμοκρασία	22±2°C
Αλατότητα	33‰
Οξυγόνο	7.5ppm
pH	7.8
Αμμωνία	0.03 ppm

### 3.2.1.1 1<sup>η</sup> Πειραματική Μόλυνση

Όσον αφορά τα ιχθύδια τσιπούρας, οι δοκιμασίες παθογένειας έδειξαν ότι τα απομονωμένα στελέχη *T. maritimum*, δεν ήταν ικανά να προκαλέσουν αυξημένη θνησιμότητα ή να προκαλέσουν την νόσο όταν τα ψάρια μολύνθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση (Εικόνες 3.2.1.1.1.-3.2.1.1.2.). Συνεπώς, προσπάθεια πειραματικής μόλυνσης με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση βακτηρίων (1<sup>η</sup> Ομάδα, θνησιμότητα μόλις 10%) δεν είχε αποτέλεσμα, γι' αυτό επιλέχθηκε η μόλυνση με εμφύσηση των ψαριών, στις περαιτέρω πειραματικές μολύνσεις. Στον Πίνακα 3.2.2., αναφέρεται η θνησιμότητα πειραματικής μόλυνσης των ιχθυδίων τσιπούρας με το βακτήριο *T. maritimum*.





Εικόνες 3.2.1.1.1. & 3.2.1.1.2. Ενδοπεριτοναϊκή έγχυση στα ιχθύδια κατά την διάρκεια της 1<sup>ης</sup> πειραματικής μόλυνσης.

Αντίθετα, η παρατεταμένη εμβάπτιση των ψαριών για 18 ώρες με διάλυμα βακτηριών του *T. maritimum* αποδείχθηκε αποτελεσματική μέθοδος πρόκλησης της μυξοβακτηριδίασης (2<sup>η</sup> Ομάδα), καθώς προκαλεί παρόμοια κλινικά συμπτώματα με την μυξοβακτηριδίαση, όπως συμβαίνει σε περιστατικά φυσικής μόλυνσης. Παρατηρήθηκαν: αιμορραγίες στο στόμα, διαβρώσεις και νεκρώσεις πτερυγίων και θνησιμότητα 40%, στο τέλος παρακολούθησης της πειραματικής μόλυνσης, 10<sup>η</sup> ημέρα. Στην 3<sup>η</sup> Ομάδα, Μάρτυρας, η θνησιμότητα ήταν 0%.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης, τα μυξοβακτηρίδια, υπάρχουν στο νερό, καθώς απομονώνονται και στα 3 υποστρώματα: τροποποιημένο AOA, FMM, MA. Επιπλέον, στις τσιπούρες οι περισσότερες απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν από MA (Δέρμα - Βράγχια). Στον Πίνακα 3.2.3., διακρίνεται η σύγκριση αποτελεσματικότητας των θεραπευτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για τα ιχθύδια τσιπούρας κατά την 1<sup>η</sup> πειραματική μόλυνση. Η θνησιμότητα στην 2<sup>η</sup> Ομάδα (με εμβάπτιση) άρχισε την 3η ημέρα και μέχρι την 10η ημέρα (4 νεκρές/10 σύνολο).

**Πίνακας 3.2.2.** Θνησιμότητα πειραματικής μόλυνσης ιχθυδίων τσιπούρας με το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum*.

Ημέρες μετά την μόλυνση	1 <sup>η</sup> Ομάδα-Έγχυση	2 <sup>η</sup> Ομάδα-Εμβάπτιση	3 <sup>η</sup> Ομάδα-Μάρτυρας
3 <sup>η</sup>		1	
4 <sup>η</sup>			
5 <sup>η</sup>			
6 <sup>η</sup>			
7 <sup>η</sup>			
8 <sup>η</sup>		2	
9 <sup>η</sup>	1	1	
10 <sup>η</sup>			
Σύνολο νεκρών	1/10	4/10	0/10
Θνησιμότητα	10%	40%	0%

**Πίνακας 3.2.3.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για τα ιχθύδια τσιπούρας κατά την 1<sup>η</sup> πειραματική μόλυνση.

x: Δεν αναπτύχθηκε τίποτα

+: αποικίες *T.maritimum*

ο: Gram (-) βάκιλοι, κόκκοι

Αριθμός νεκρών ψαριών	Ημέρες μετά την μόλυνση	Όργανα απομόνωσης	Έγχυση			Αριθμός νεκρών ψαριών	Ημέρες μετά την μόλυνση	Όργανα απομόνωσης	Εμβάπτιση		
			FMM	MA	AOA				FMM	MA	AOA
1	9 <sup>η</sup>	Δ	ο	+	ο	1	3 <sup>η</sup>	Δ	+	+	ο
		B	ο	ο	ο			B	ο	+	ο
		N	-	ο				N	ο	+	
		Νερό	+	+	+			Νερό	+	+	+
2		Δ				2	8 <sup>η</sup>	Δ	+	+	+
		B						B	+	+	ο
		N						N	ο	+	
		Νερό						Νερό	+	+	+
3		Δ				3	8 <sup>η</sup>	Δ	+	+	ο
		B						B	ο	+	ο
		N						N	-	+	
		Νερό						Νερό	+	+	+
4		Δ				4	9 <sup>η</sup>	Δ	ο	+	ο
		B						B	ο	+	ο
		N						N	-	-	
		Νερό						Νερό	ο	+	+

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός

Όσον αφορά τα ιχθύδια λαβρακιού, όπως παρατηρήθηκε και στα ιχθύδια τσιπούρας, η προσπάθεια πειραματικής μόλυνσης με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση βακτηρίων δεν ήταν ικανή να προκαλέσει θνησιμότητα ή να προκαλέσει την νόσο στα ψάρια. Συνεπώς, προσπάθεια πειραματικής μόλυνσης με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση

βακτηρίων (1<sup>η</sup> Ομάδα, θνησιμότητα 0%) δεν είχε αποτέλεσμα, γι' αυτό επιλέχθηκε η μόλυνση με εμφύπτιση των ψαριών, στις περαιτέρω πειραματικές μολύνσεις. Στον Πίνακα 3.2.4., αναφέρεται η θνησιμότητα πειραματικής μόλυνσης των ιχθυδίων λαβρακιού με το βακτήριο *T. maritimum*.

Η παρατεταμένη εμφύπτιση των ψαριών για 18 ώρες με διάλυμα βακτηριών του *T. maritimum* αποδείχθηκε αποτελεσματική μέθοδος πρόκλησης της μυξοβακτηριδίασης (2<sup>η</sup> Ομάδα). Τα μολυσμένα ιχθύδια εμφάνισαν: αιμορραγίες στο στόμα, διαβρώσεις και νεκρώσεις περυγίων, νέκρωση ουραίου περυγίου και θνησιμότητα 40%, στο τέλος παρακολούθησης της πειραματικής μόλυνσης, 10<sup>η</sup> ημέρα. Από την 3<sup>η</sup> ημέρα παρατηρήθηκε μείωση της διάθεσης για λήψη τροφής, ενώ την 4η και 5η ημέρα εμφανίστηκαν οι πρώτες εξωτερικές, αιμορραγικές δερματικές αλλοιώσεις στα ψάρια. Στην 3<sup>η</sup> Ομάδα, Μάρτυρας, η θνησιμότητα ήταν 0%.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης, τα μυξοβακτηρίδια, υπάρχουν στο νερό, καθώς απομονώνονται και στα 3 υποστρώματα: τροποποιημένο ΑΟΑ, FMM, ΜΑ. Επιπλέον, στα λαβράκια οι περισσότερες απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν από ΑΟΑ (Βράγχια), FMM (Δέρμα), ΜΑ (Δέρμα). Στον Πίνακα 3.2.5., διακρίνεται η σύγκριση αποτελεσματικότητας των θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για τα ιχθύδια λαβρακιού κατά την 1<sup>η</sup> πειραματική μόλυνση. Η θνησιμότητα στην 2<sup>η</sup> Ομάδα (με εμφύπτιση) άρχισε την 4η ημέρα και μέχρι την 10η ημέρα (4 νεκρά/10 σύνολο).

**Πίνακας 3.2.4.** Θνησιμότητα πειραματικής μόλυνσης ιχθυδίων λαβρακιού με το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum*

Ημέρες μετά την μόλυνση	1 <sup>η</sup> Ομάδα-Έγχυση	2 <sup>η</sup> Ομάδα-Εμφύπτιση	3 <sup>η</sup> Ομάδα-Μάρτυρας
3 <sup>η</sup>			
4 <sup>η</sup>		1	
5 <sup>η</sup>			
6 <sup>η</sup>			
7 <sup>η</sup>		1	
8 <sup>η</sup>		2	
9 <sup>η</sup>			
10η			
Σύνολο νεκρών	0/10	4/10	0/10
Θνησιμότητα	0%	40%	0%

**Πίνακας 3.2.5.** Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για τα ιχθύδια λαβρακιού κατά την 1<sup>η</sup> πειραματική μόλυνση.

x: Δεν αναπτύχθηκε τίποτα

+: αποικίες *T.maritimum*

ο: Gram (-) βάκιλοι, κόκκοι

Αριθμός νεκρών ψαριών	Ημέρες μετά την μόλυνση	Όργανα να απομόνωσ ης	Έγχυση			Αριθμός νεκρών ψαριών	Ημέρες μετά την μόλυνση	Όργανα να απομόνωσ ης	Εμβάπτιση		
			FMM	MA	AOA				FMM	MA	AOA
1		Δ				1	4η	Δ	+	+	ο
		B						B	+	+	+
		N						N	ο	+	
		Νερό	-	ο	ο			Νερό	+	+	+
2		Δ				2	7η	Δ	+	+	ο
		B						B	+	ο	+
		N						N	-	ο	
		Νερό						Νερό	+	+	+
3		Δ				3	8η	Δ	+	+	ο
		B						B	ο	ο	+
		N						N	-	+	
		Νερό						Νερό	+	+	+
4		Δ				4	8η	Δ	+	+	+
		B						B	ο	+	+
		N						N	+	+	
		Νερό						Νερό	+	+	+

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός

### 3.2.1.2 2<sup>η</sup> Πειραματική Μόλυνση

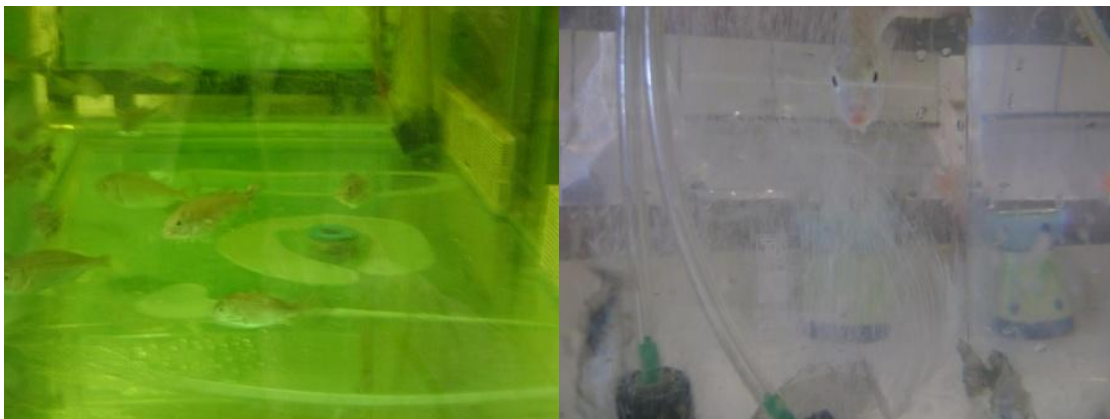
#### 3.2.1.3 Εξέταση των πειραματικά μολυσμένων ιχθύων

Τα πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια λαβρακιού και τσιπούρας με εμβάπτιση, εμφάνισαν παρόμοιες αλλοιώσεις με τα φυσικά μολυσμένα ψάρια, όπως ανορεξία, λήθαργο, εξωτερικές δερματικές αλλοιώσεις και έλκη, αιμορραγίες στις γνάθους, αιμορραγική στοματίτιδα, ωχροκίτρινες νεκρωτικές αλλοιώσεις στο δέρμα, στα πτερύγια και στην ουρά, διάβρωση και νέκρωση των πτερυγίων, ιδιαίτερα του ουραίου πτερυγίου, νέκρωση στα βράγχια και υψηλή θνησιμότητα (λαβράκι 65%, τσιπούρα 35%) (Εικόνες 3.2.1.3.1.-3.2.1.3.27).

Επιπλέον, να σημειωθεί ότι τα ιχθύδια τσιπούρας, λόγω στρες από την πειραματική μόλυνση, προς το τέλος παρακολούθησης του πειράματος, 16<sup>η</sup> ημέρα, εμφάνισαν στο δέρμα, λευκά οζίδια στο δέρμα, λόγω λεμφοκύστης. Κάποια ιχθύδια τσιπούρας, παρουσίασαν επίσης σκοτεινό χρωματισμό στο πίσω μέρος του σώματος τους (Εικόνες 3.2.1.3.4.-3.2.1.3.9).



Εικόνα 3.2.1.3.1. Ιχθύδια τσιπούρας κατά την διάρκεια των πειραματικών μολύνσεων στα ενυδρεία.



Εικόνες 3.2.1.3.2. & 3.2.1.3.3. Ιχθύδια τσιπούρας κατά την διάρκεια των πειραματικών μολύνσεων στα ενυδρεία.



Εικόνα 3.2.1.3.4. Ιχθύδια τσιπούρας, ορισμένα εμφανίζουν σκοτεινό χρωματισμό στο πίσω μέρος του σώματος τους.

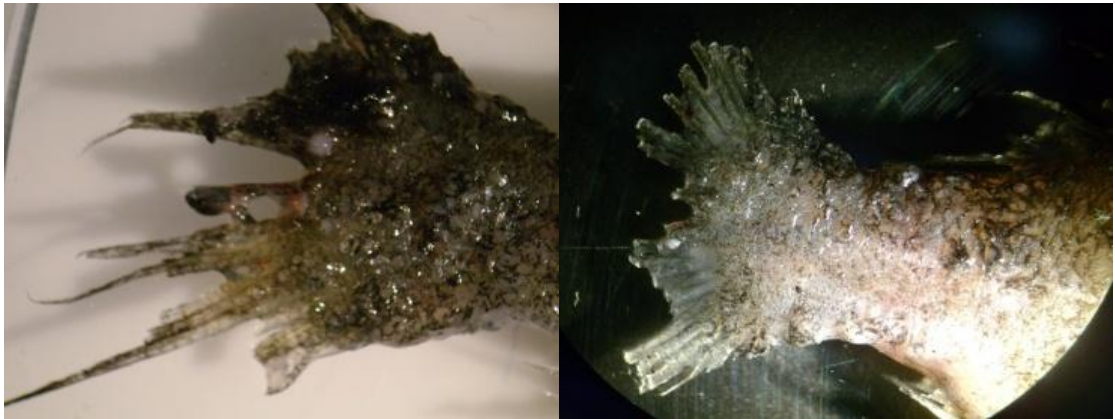


Εικόνα 3.2.1.3.5. Ιχθύδιο τσιπούρας, λευκά οζίδια στο δέρμα, λόγω λεμφοκύστης και νέκρωση, διάβρωση του ουραίου πτερυγίου.





Εικόνες 3.2.1.3.6. & 3.2.1.3.7. Ιχθύδια τσιπούρας λευκά οζίδια στο δέρμα, λόγω λεμφοκύστης και νέκρωση, διάβρωση του ουραίου πτερυγίου.



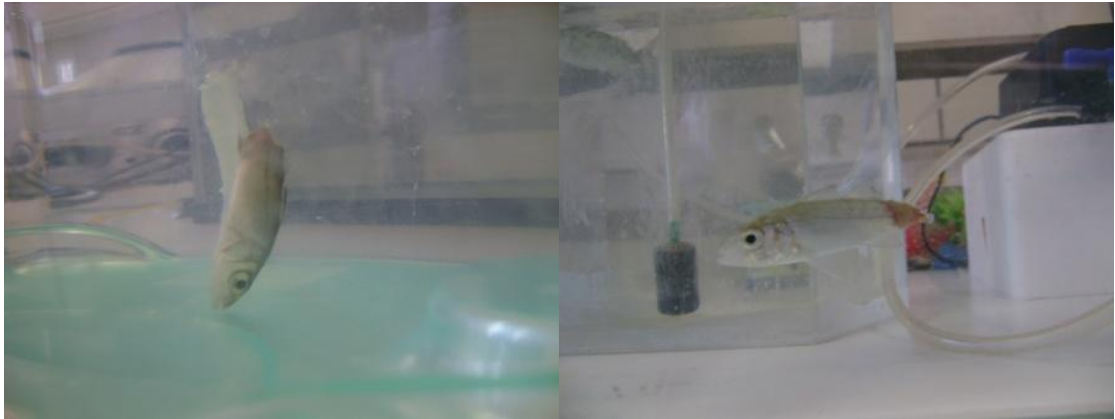
Εικόνες 3.2.1.3.8. & 3.2.1.3.9. Ιχθύδια τσιπούρας λευκά οζίδια στο δέρμα, λόγω λεμφοκύστης και νέκρωση, διάβρωση του ουραίου πτερυγίου.



Εικόνα 3.2.1.3.10. Λαβράκι. Πειραματικά μολυσμένο με μυξοβακτηριδίαση. Ελκωτική, διαβρωτική αλλοίωση και αιμορραγική νέκρωση του ουραίου πτερυγίου.



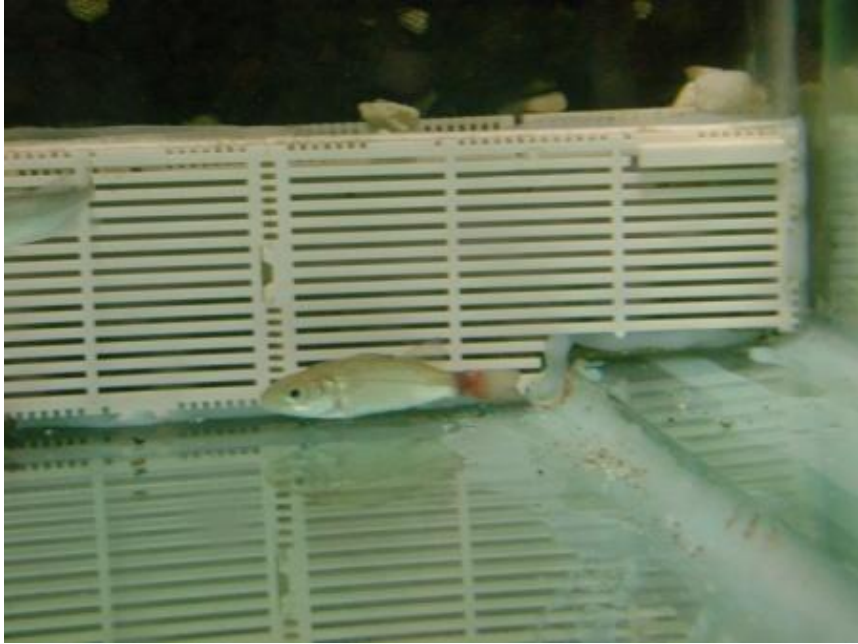
Εικόνα 3.2.1.3.11. Λαβράκι. Πειραματικά μολυσμένο με μυξοβακτηριδίαση. Ελκωτική, διαβρωτική αλλοίωση και αιμορραγική νέκρωση του ουραίου πτερυγίου.



Εικόνες 3.2.1.3.12. & 3.2.1.3.13. Λαβράκια. Πειραματικά μολυσμένα με μυξοβακτηριδίαση. Ελκωτική, διαβρωτική αλλοίωση και αιμορραγική νέκρωση του ουραίου πτερυγίου. Απώλεια του ουραίου πτερυγίου.



Εικόνα 3.2.1.3.14. Λαβράκι. Πειραματικά μολυσμένο με μυξοβακτηριδίαση. Ωχροκίτρινη νέκρωση του ουραίου πτερυγίου.



Εικόνα 3.2.1.3.15. Λαβράκι. Πειραματικά μολυσμένο με μυξοβακτηριδίαση. Ελκωτική νεκρωτική αλλοίωση στην βάση του ουραίου πτερυγίου.



Εικόνα 3.2.1.3.16. Λαβράκι. Πειραματικά μολυσμένο με μυξοβακτηριδίαση. Ωχροκίτρινη, νεκρωτική αλλοίωση στην περιοχή του ουραίου πτερυγίου.



Εικόνα 3.2.1.3.17. Λαβράκι. Πειραματικά μολυσμένα με μυξοβακτηριδίαση. Ελκωτική, διαβρωτική αλλοίωση και νέκρωση του ουραίου πτερυγίου. Πλήρη απώλεια του ουραίου πτερυγίου.



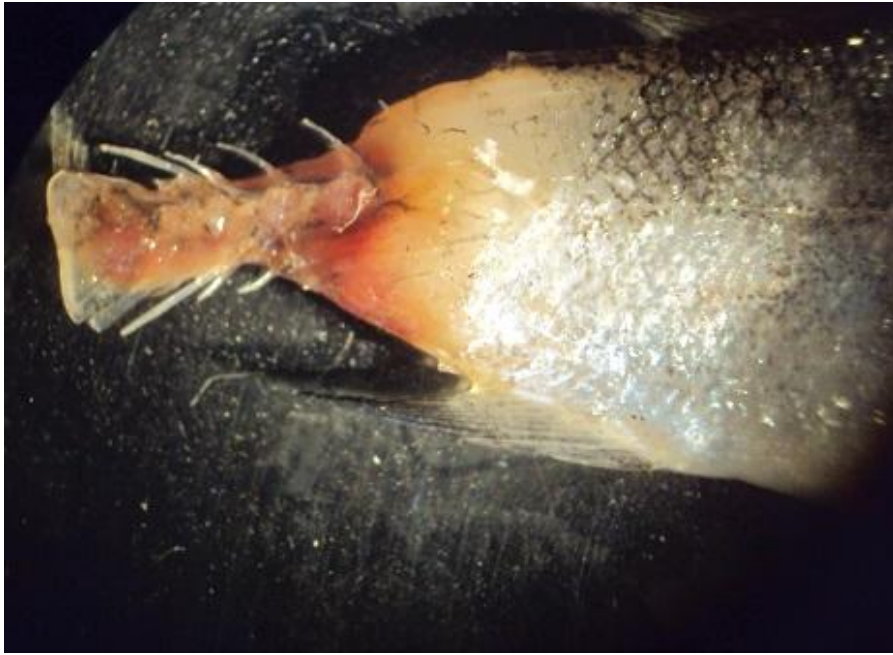
Εικόνα 3.2.1.3.18. Λαβράκι. Πειραματικά μολυσμένο με μυξοβακτηριδίαση. Ωχροκίτρινη, ελκωτική, διαβρωτική αλλοίωση και νέκρωση του ουραίου πτερυγίου. Έκθεση της μυϊκής στιβάδας.



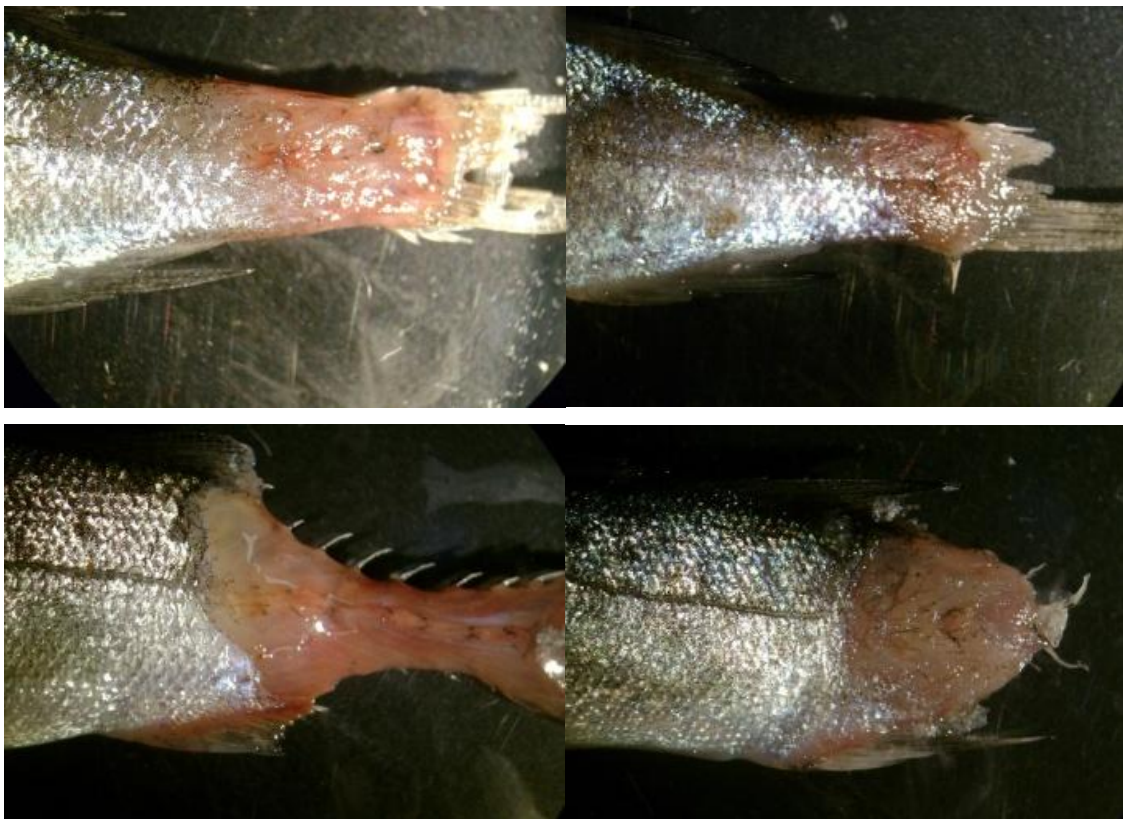


Εικόνα 3.2.1.3.19. Λαβράκι. Πειραματικά μολυσμένο με μυξοβακτηριδίαση. Ελκωτική, διαβρωτική αλλοίωση και νέκρωση του ουραίου πτερυγίου. Απώλεια του ουραίου πτερυγίου και της μυϊκής στιβάδας, έκθεση των σπονδύλων.





Εικόνες 3.2.1.3.20. & 3.2.1.3.21. Λαβράκια. Πειραματικά μολυσμένα με μυξοβακτηριδίαση. Ελκωτική, διαβρωτική αλλοίωση και νέκρωση του ουραίου πετερυγίου. Απώλεια του ουραίου πετερυγίου και της μυϊκής στιβάδας, έκθεση των σπονδύλων.



Εικόνες 3.2.1.3.22. έως 3.2.1.3.25. Λαβράκια. Ουραία πετερύγια. Πειραματικά μολυσμένα με μυξοβακτηριδίαση. Ελκωτική, διαβρωτική αλλοίωση και νέκρωση του

ουραίου περυγίου. Απόλεια του ουραίου περυγίου. Έκθεση της μυϊκής στιβάδας, έκθεση των σπονδύλων.



Εικόνα 3.2.1.3.26. Λαβράκι. Πειραματικά μολυσμένο με μυξοβακτηριδίαση. Φαιές νεκρώσεις των βραγχίων και διάβρωση των βραγχίων.

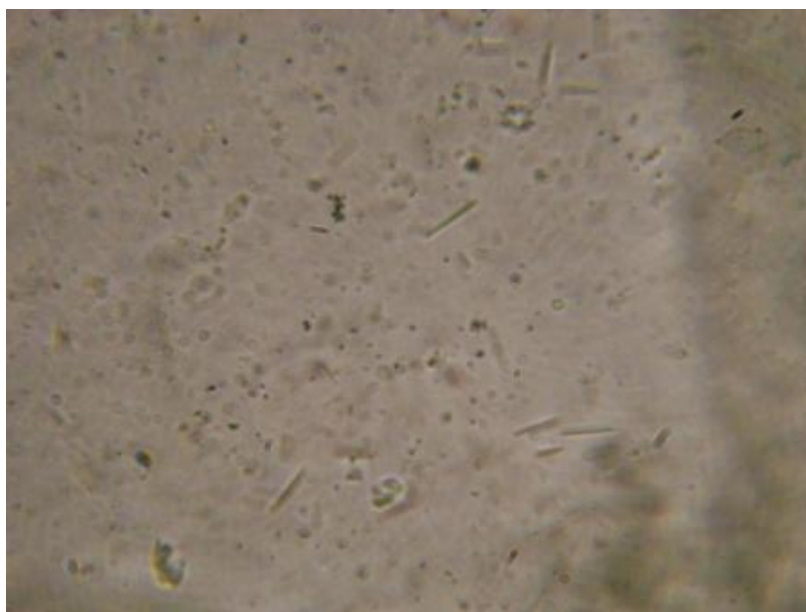


Εικόνα 3.2.1.3.27. Λαβράκι. Πειραματικά μολυσμένο με μυξοβακτηριδίαση. Εστιακή νέκρωση των βραγχίων.

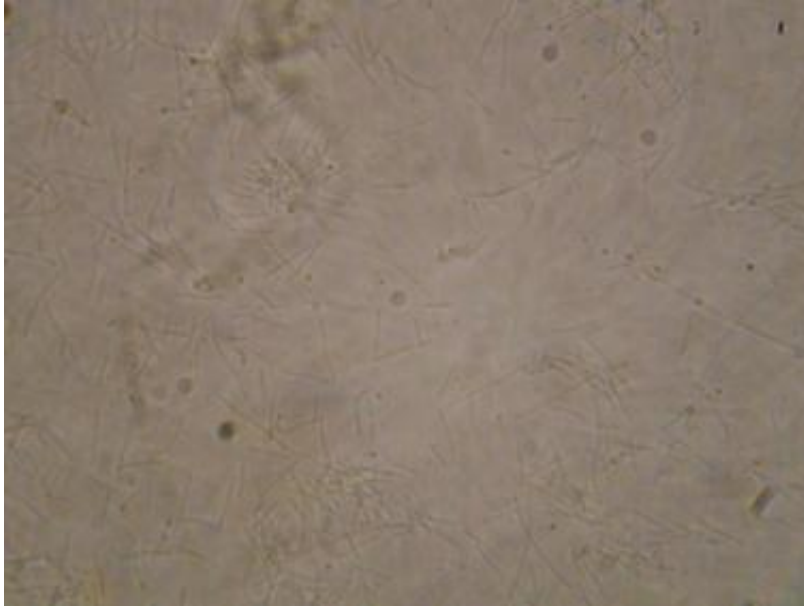


Τα κλινικά συμπτώματα και αλλοιώσεις άρχισαν να εμφανίζονται από την 3<sup>η</sup> ημέρα, μετά την πειραματική μόλυνση. Στις τρεις πρώτες ημέρες, παρατηρήθηκε μείωση της διάθεσης για λήψη τροφής. Την 4η και 5η ημέρα εμφανίστηκαν πιο έντονα, οι πρώτες εξωτερικές, αιμορραγικές δερματικές αλλοιώσεις στα ψάρια. Τις επόμενες ημέρες, μεγαλύτερος αριθμός ψαριών εμφάνισε δερματικές αλλοιώσεις χαρακτηριστικές της νόσου, στην περιοχή της γνάθου, στην βάση των πτερυγίων και στο πίσω μέρος του σώματος, κοντά στο ουραίο πτερύγιο.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης για τα ιχθύδια τσιπούρας, τα μυξοβακτηρίδια, υπάρχουν στο νερό, καθώς απομονώνονται στα 2 υποστρώματα: FMM, MA. Στις τσιπούρες οι περισσότερες απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν από: MA (Δέρμα-Βράγχια), FMM (Δέρμα). Το τροποποιημένο ΑΟΑ δεν αποδείχθηκε αποτελεσματικό για την ανάπτυξη του *T. maritimum*, στην τσιπούρα (3.2.1.3.28.-3.2.1.37.).



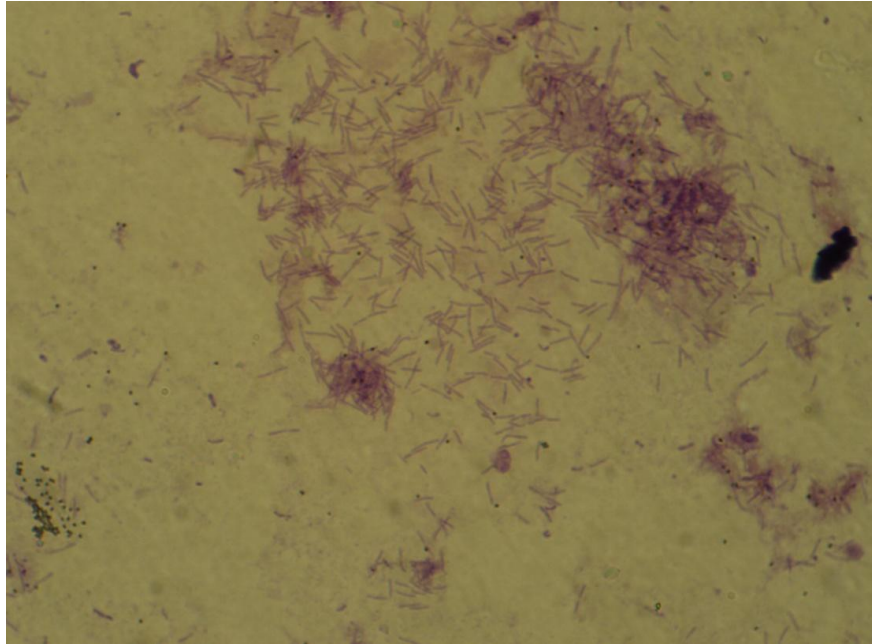
Εικόνα 3.2.1.3.28. Λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι *Tenacibaculum maritimum* σε νοπό επίχρισμα από δείγμα δέρματος (μεγέθυνση 100x).



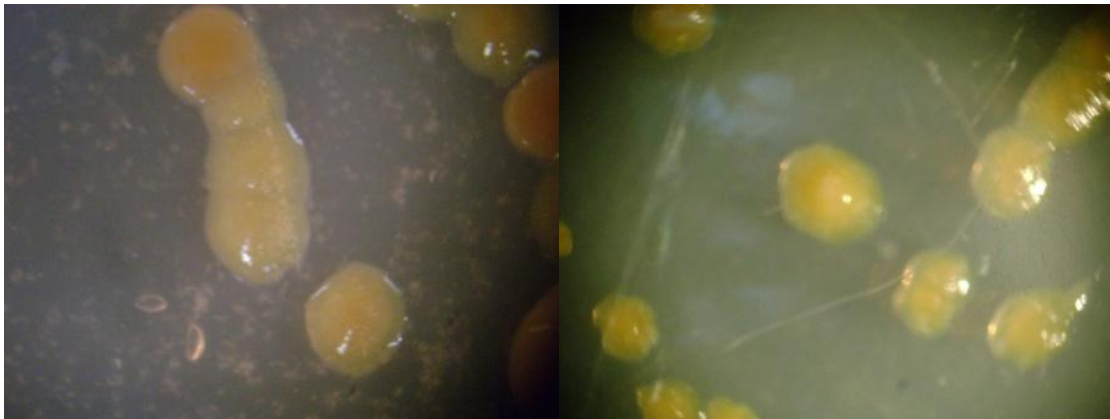
Εικόνα 3.2.1.3.29. Λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι *Tenacibaculum maritimum* σε νοπό επίχρισμα από αποικία του βακτηρίου (μεγέθυνση 100x).



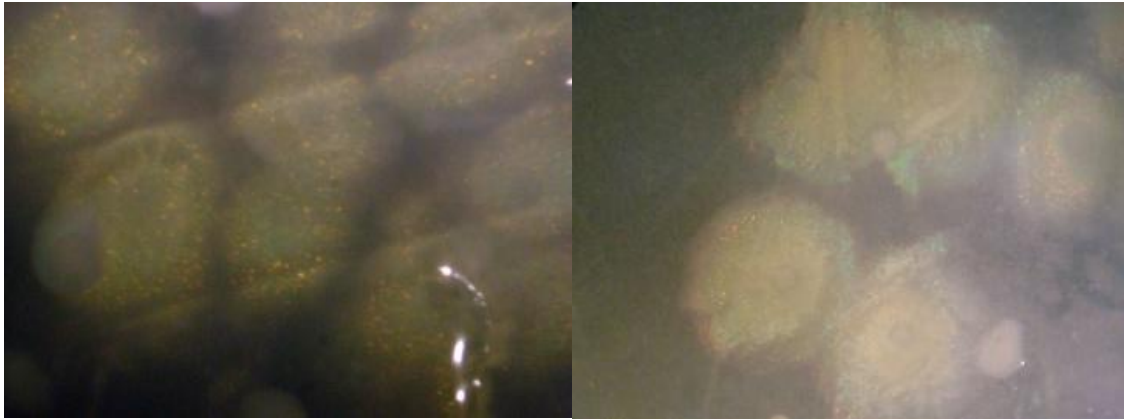
Εικόνα 3.2.1.3.30. Λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι *Tenacibaculum maritimum* σε νοπό επίχρισμα από αποικία του βακτηρίου (μεγέθυνση 100x).



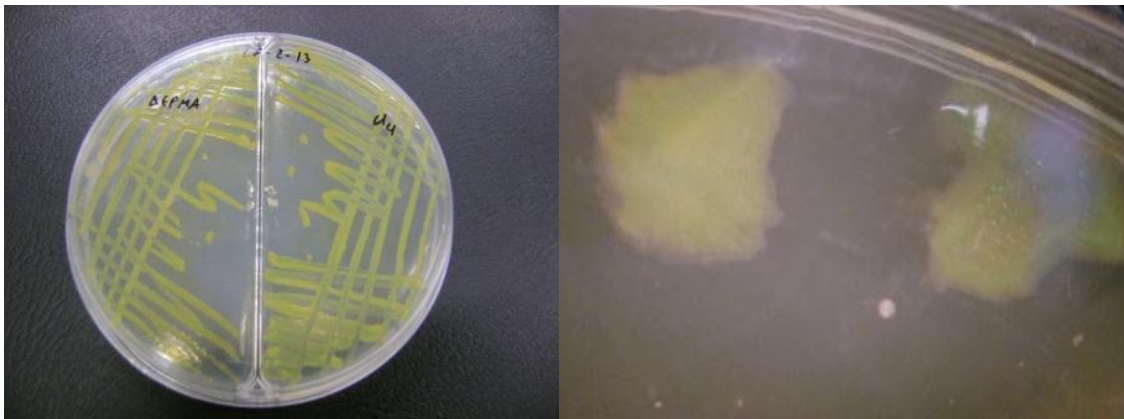
Εικόνα 3.2.1.3.31. Gram αρνητικοί, λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι *Tenacibaculum maritimum* σε επίχρισμα, χρώση Gram (μεγέθυνση 100x).



Εικόνες 3.2.1.3.32. & 3.2.1.3.33. Αποικίες *Tenacibaculum maritimum*, στρογγυλές, κίτρινες και ημιδιαφανείς σε ΜΑ θρεπτικό υπόστρωμα.



Εικόνες 3.2.1.3.34. & 3.2.1.3.35. Αποικίες *Tenacibaculum maritimum*, υποκίτρινες με άνισες προεκτάσεις σε FMM θρεπτικό υπόστρωμα.



Εικόνες 3.2.1.3.36. & 3.2.1.3.37. Ανακαλλιέργεια από αποικίες *Tenacibaculum maritimum*, κίτρινες με άνισες προεκτάσεις σε τροποποιημένο ΑΟΑ θρεπτικό υπόστρωμα.

Η θνησιμότητα άρχισε την 3η ημέρα, μέχρι και την 18η ημέρα (14 νεκρές/40 σύνολο, θνησιμότητα 35%). Από την 2<sup>η</sup> ομάδα των μαρτύρων, προέκυψε μόνο 1 νεκρό ιχθύδιο την 8<sup>η</sup> ημέρα (τυχαίο εύρημα). Στον Πίνακα 3.2.6., διακρίνεται η θνησιμότητα της πειραματικής μόλυνσης των 40 ιχθυδίων τσιπούρας με το βακτήριο *T. maritimum* και σύγκριση της αποτελεσματικότητας των θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης κατά την 2<sup>η</sup> πειραματική μόλυνση. Στο Διάγραμμα 3.2.1., φαίνονται οι ημέρες και παρατηρούμενη, κλιμακούμενη θνησιμότητα για τα πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια τσιπούρας.

Όσον αφορά τα ιχθύδια λαβρακιού, τα μυξοβακτηρίδια, υπάρχουν στο νερό, καθώς απομονώνονται και στα 3 υποστρώματα: FMM, MA, τροποποιημένο ΑΟΑ.

Στα λαβράκια οι περισσότερες απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν από: MA (Δέρμα-Βράγχια), FMM (Δέρμα), AOA (Βράγχια).

Η θνησιμότητα άρχισε την 3η ημέρα, μέχρι και την 19η ημέρα (26 νεκρά/40 σύνολο, θνησιμότητα 65%). Στην 2<sup>η</sup> ομάδα των μαρτύρων, δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα σε όλη την διάρκεια παρακολούθησης των 30 ημερών. Στον Πίνακα 3.2.7., διακρίνεται η θνησιμότητα της πειραματικής μόλυνσης των 40 ιχθυδίων λαβρακιού με το βακτήριο *T. maritimum* και σύγκριση της αποτελεσματικότητας των θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης κατά την 2<sup>η</sup> πειραματική μόλυνση. Στο Διάγραμμα 3.2.2., φαίνονται οι ημέρες και παρατηρούμενη, κλιμακούμενη θνησιμότητα για τα πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια λαβρακιού.

**Πίνακας 3.2.6.** Θνησιμότητα πειραματικής μόλυνσης των 40 ιχθυδίων τσιπούρας με το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* και σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για τα ιχθύδια τσιπούρας κατά την 2<sup>η</sup> πειραματική μόλυνση.

x: Δεν αναπτύχθηκε τίποτα

+: αποικίες *T.maritimum*

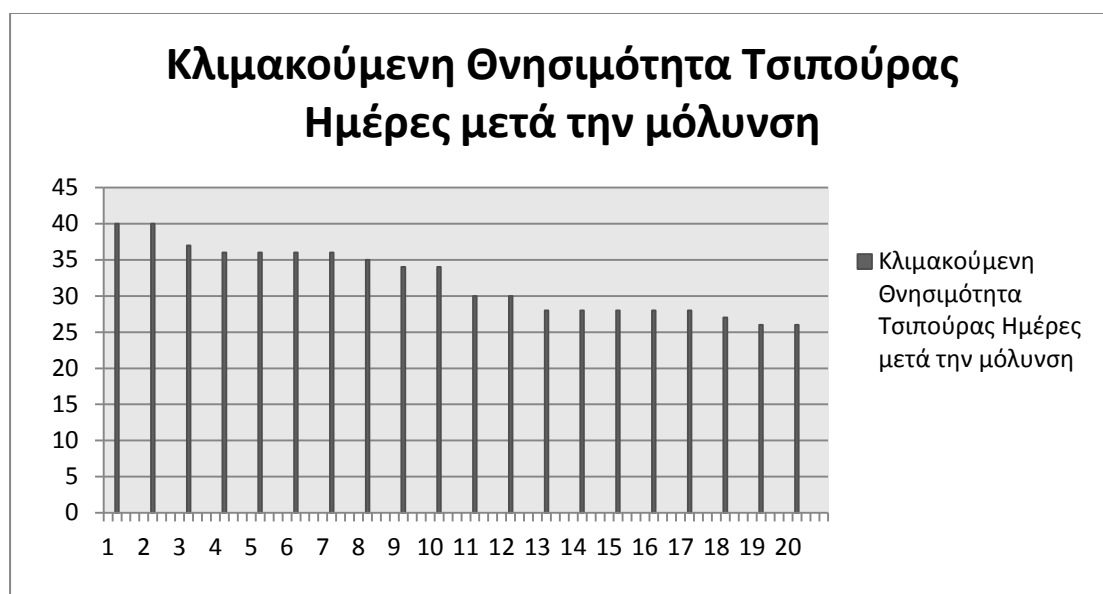
ο: Gram (-) βάκιλοι, κόκκοι

Ημέρες μετά την μόλυνση	Αριθμός νεκρών ψαριών	Όργανα απομόνωσης	Εμβάπτιση		
			FMM	MA	AOA
1		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			
2		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			
3	1	Δ	+	+	+
		B	ο	+	ο
		N			
		Νερό	+	+	ο
	1	Δ	+	+	ο
		B	+	+	ο
		N			
		Νερό	+	+	ο
	1	Δ	+	+	ο
		B	+	+	ο
		N			
		Νερό	+	+	ο
4	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	ο
		N			
		Νερό	+	+	+
5		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			

6		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			
7		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			
8	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	+
		N			
		Νερό	+	+	+
9	1	Δ	+	+	ο
		B	+	+	ο
		N			
		Νερό	+	+	ο
10		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			
11	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	ο
		N			
		Νερό	+	+	ο
	1	Δ	+	+	ο
		B	+	+	ο
		N			
		Νερό	+	+	ο
	1	Δ	+	+	ο
		B	+	+	ο
		N			
		Νερό	+	+	ο
1	Δ	+	+	+	
	B	+	+	ο	
	N				
	Νερό	+	+	ο	
12		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			
13	1	Δ	+	+	ο
		B	+	+	ο
		N			
		Νερό	ο	+	ο
	1	Δ	+	+	ο
		B	ο	+	ο
		N			
		Νερό	ο	+	ο
14		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			
15		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			
16		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			
17		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			

18	1	Δ	+	+	ο
		B	ο	+	ο
		N			
		Νερό	+	+	ο
	1	Δ	+	+	ο
		B	ο	+	ο
		N			
		Νερό	+	+	ο
19					
20					
Σύνολο νεκρών	14/40				
Θνησιμότητα	35%				

Δ: Δέρμα, B:Βράγχια, N:Νεφρός



Διάγραμμα 3.2.1. Ημέρες και παρατηρούμενη, κλιμακούμενη θνησιμότητα για τα πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια τσιπούρας.

**Πίνακας 3.2.7.** Θνησιμότητα πειραματικής μόλυνσης των 40 ιχθυδίων λαβρακιού με το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* και σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για τα ιχθύδια λαβρακιού κατά την 2<sup>η</sup> πειραματική μόλυνση.

x: Δεν αναπτύχθηκε τίποτα

+: αποικίες *T.maritimum*

ο: Gram (-) βάκιλοι, κόκκοι

Ημέρες μετά την μόλυνση	Αριθμός νεκρών ψαριών	Όργανα απομόνωσης	Εμβάπτιση		
			FMM	MA	AOA
1		Δ			

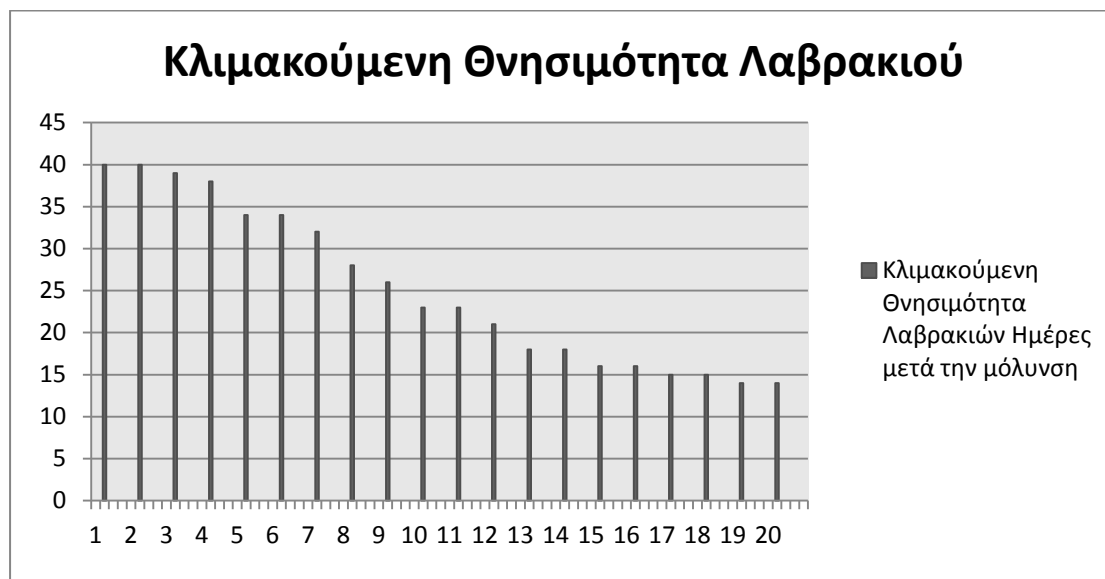
		B			
		N			
		Νερό			
2		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			
3	1	Δ	+	+	ο
		B	ο	+	+
		N			
		Νερό	+	+	+
4	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	+
		N			
		Νερό	+	+	+
5	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	+
		N			
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	ο	+	ο
		B	ο	+	ο
		N			
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	ο
		B	ο	+	ο
		N			
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	+
		N			
		Νερό	+	+	+
6		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			
7	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	+
		N			
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	ο
		B	ο	ο	+
		N			
		Νερό	+	+	+
8	1	Δ	ο	+	ο
		B	ο	ο	+
		N			
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	+
		N			
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	ο
		B	ο	+	+
		N			
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	+
		N			
		Νερό	+	+	+
9	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	+
		N			
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	ο



		B	ο	+	+
		N			
		Νερό	+	+	+
10	1	Δ	+	+	ο
		B	ο	+	+
		N			
	Νερό	+	+	+	
	1	Δ	ο	+	+
		B	+	+	+
		N			
	Νερό	+	+	+	
	1	Δ	+	+	+
B		+	+	+	
N					
Νερό	+	+	+		
11		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			
12	1	Δ	+	+	+
		B	ο	+	+
		N			
	Νερό	+	+	+	
	1	Δ	+	+	ο
		B	+	+	+
		N			
Νερό		+	+	+	
13	1	Δ	+	+	ο
		B	+	+	+
		N			
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	+
		B	ο	ο	+
		N			
	Νερό	+	+	+	
	1	Δ	+	+	+
		B	ο	ο	+
		N			
Νερό		+	+	+	
14		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			
15	1	Δ	+	+	ο
		B	ο	ο	+
		N			
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	ο
		B	+	+	+
		N			
		Νερό	+	+	+
16		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			
17	1	Δ	+	+	ο
		B	ο	ο	+
		N			
		Νερό	+	+	+
18		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			
19	1	Δ	ο	+	ο

		B	○	○	○
		N			
		Νερό	+	+	+
20		Δ			
		B			
		N			
		Νερό			
Σύνολο νεκρών	26/40				
Θνησιμότητα	65%				

Δ: Δέρμα, Β:Βράγχια, Ν:Νεφρός



Διάγραμμα 3.2.2. Ημέρες και παρατηρούμενη, κλιμακούμενη θνησιμότητα για τα πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια λαβρακιού.

Από τα πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια, που εμφάνισαν συμπτώματα και αλλοιώσεις απομονώθηκε εκ νέου ο αντίστοιχος παθογόνος παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε, επιβεβαιώνοντας την παθογονικότητά του.

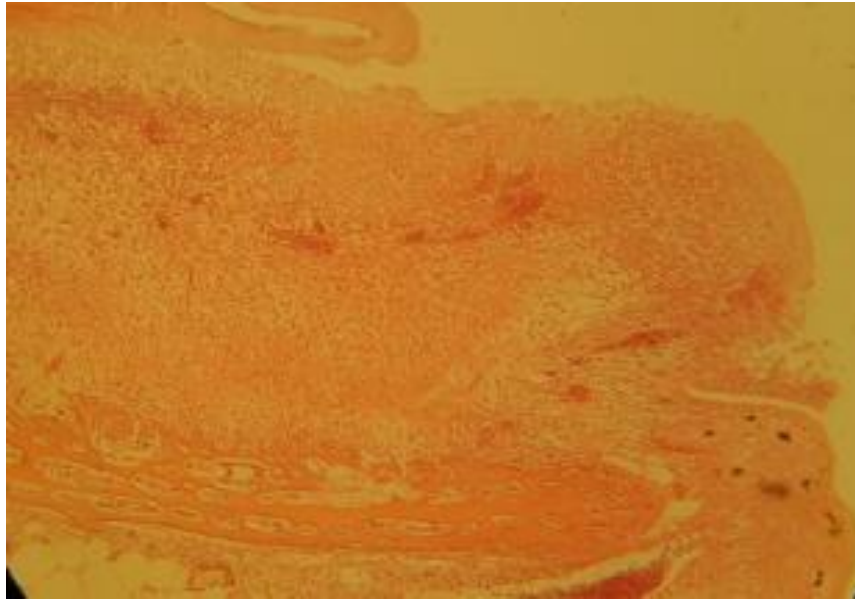
Το *T. maritimum* απομονώθηκε από τα πειραματικά μολυσμένα ψάρια, από τις εξωτερικές δερματικές αλλοιώσεις, στο στόμα και στα πτερύγια, όχι όμως από τον νεφρό. Όταν εφαρμόστηκε η PCR, λαμβάνοντας δείγματα από αποικίες ή ιστούς από τα ψάρια, τότε επιβεβαιώθηκε η παρουσία του *T. maritimum*, αποδίδοντας το αναμενόμενο 1088 bp θραύσμα. Στα ψάρια που επιβίωσαν στην πειραματική μόλυνση, το στέλεχος *T. maritimum* αναπτύχθηκε μόνο σε δείγματα από το δέρμα, που υποδεικνύει ότι υπάρχει ένα στάδιο φορέα του βακτηρίου.

#### 3.2.1.4 Ιστοπαθολογική εξέταση

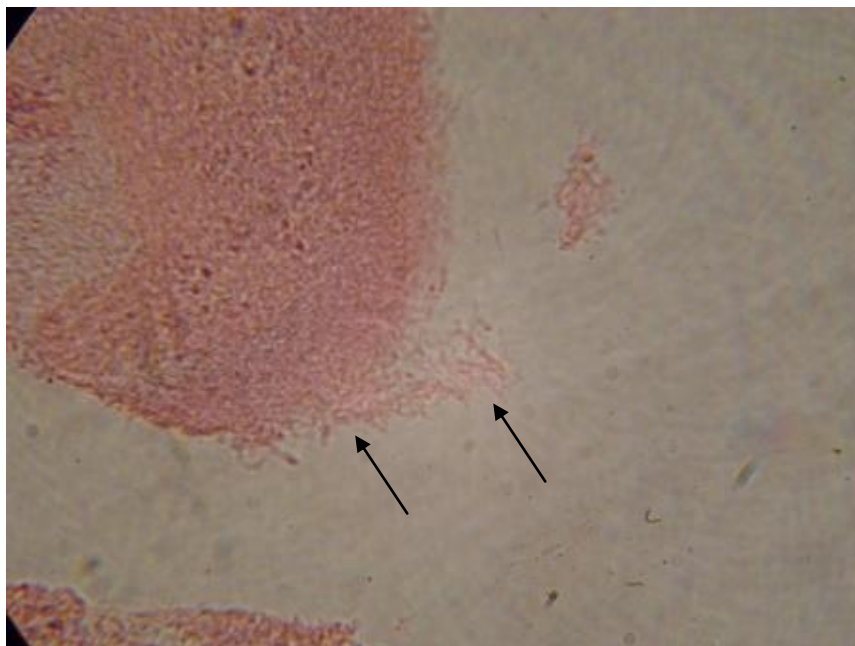
Οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις (μεγέθυνση 4X-100X) εντοπίστηκαν κυρίως στο δέρμα και τα βράγχια, με την εισβολή των βακτηρίων, βακίλων στον συνδετικό ιστό του χορίου και πιο σπάνια στον μυϊκό ιστό. Στις αρχικές αλλοιώσεις περιλαμβάνονταν η απώλεια της επιδερμίδας και του χορίου, η διάβρωση και η εκφύλιση του επιθηλίου με την διήθηση άμορφου πρωτεϊνικού υλικού και την διήθηση από κύτταρα φλεγμονής στην επιδερμίδα και στο χόριο.

Παρατηρήθηκαν συμφόρηση, αιμορραγίες, νέκρωση στην επιδερμίδα, φλεγμονώδης διήθηση στην επιδερμίδα και στο χόριο, αθροίσεις βακτηρίων στο επιθήλιο αλλά χωρίς οι βάκιλοι να είναι πάντα ορατοί στις ιστολογικές τομές. Νεκρώσεις και διαβρώσεις στο δέρμα που οδήγησαν σε έκθεση του μυϊκού ιστού. Τα επιθηλιακά κύτταρα εμφάνισαν σπογγίωση (οίδημα, υπερπλασία, υπερτροφία κυττάρων) και τα βλεννογόνα κύτταρα υπερπλασία. Παρατηρήθηκαν απώλεια των λεπιών και οίδημα με φλεγμονώδη κύτταρα. Συγκέντρωση και αύξηση του αριθμού των μελανοφόρων κυττάρων στο δέρμα. Στο χόριο μπόρεσαν να παρατηρηθούν, λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι μαζί με μελανοφόρα κύτταρα. Η αύξηση των μελανοφόρων κυττάρων του δέρματος και ο χρωματισμός αποδόθηκε στην χρόνια φλεγμονή του δέρματος. Σε ελάχιστες περιπτώσεις παρατηρήθηκε απώλεια μελανοφόρων κυττάρων.

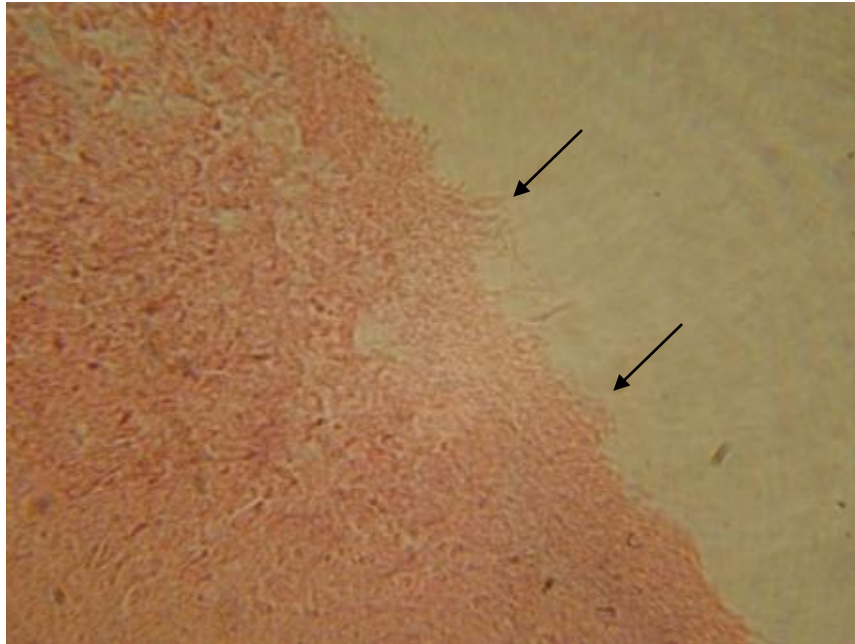
Η νέκρωση του ουραίου πτερυγίου διαπιστώθηκε επίσης σε μεγάλο αριθμό ψαριών, ενώ η νέκρωση των βραγχιών εντοπίστηκε σε λιγότερες περιπτώσεις. Διαπιστώθηκε απώλεια επιδερμίδας και αλλοιώσεις κυρίως γύρω από τα θωρακικά και ουραία πτερύγια. Οστεόλυση του οστού του ουραίου πτερυγίου, σε σπάνιες περιπτώσεις. (Εικόνες 3.2.1.4.1.-3.2.1.4.18.).



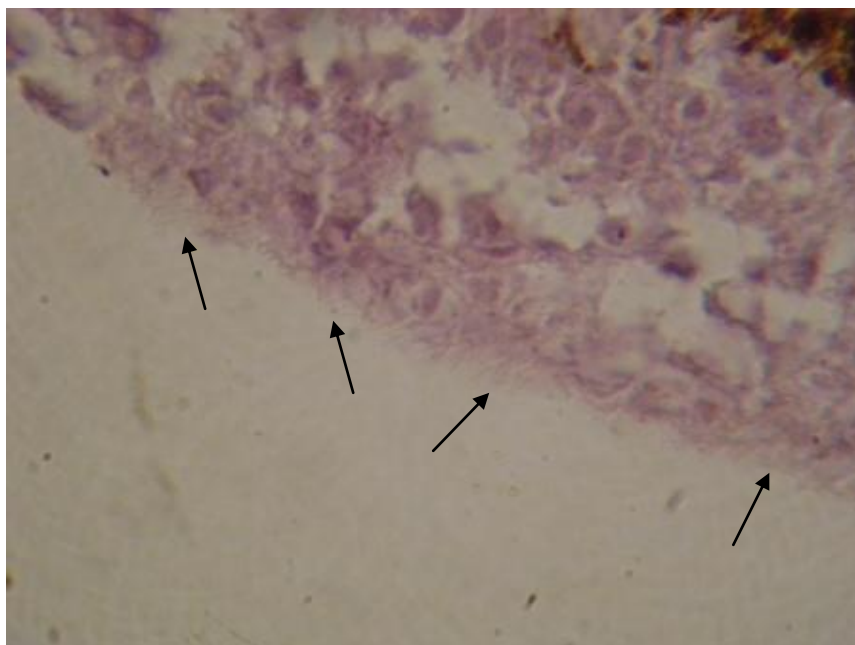
Εικόνα 3.2.1.4.1. Σπογγίωση στο δέρμα γνάθων, οίδημα, υπερπλασία, υπερτροφία επιθηλιακών κυττάρων, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).



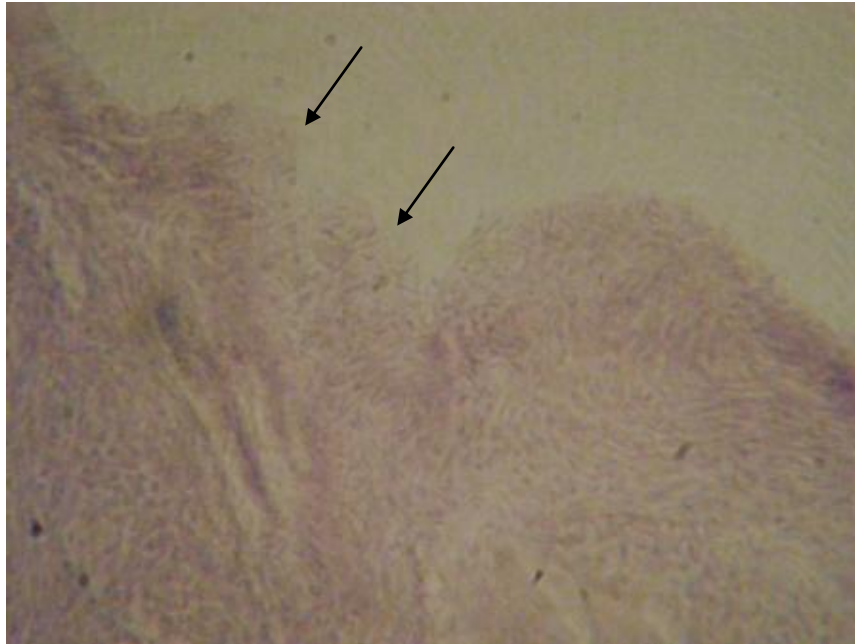
Εικόνα 3.2.1.4.2. Σπογγίωση στο δέρμα γνάθων, προηγούμενη εικόνα, μεγαλύτερη μεγέθυνση. Διακρίνονται λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι, προσκολλημένοι την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων της επιδερμίδας (μαύρα βέλη), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).



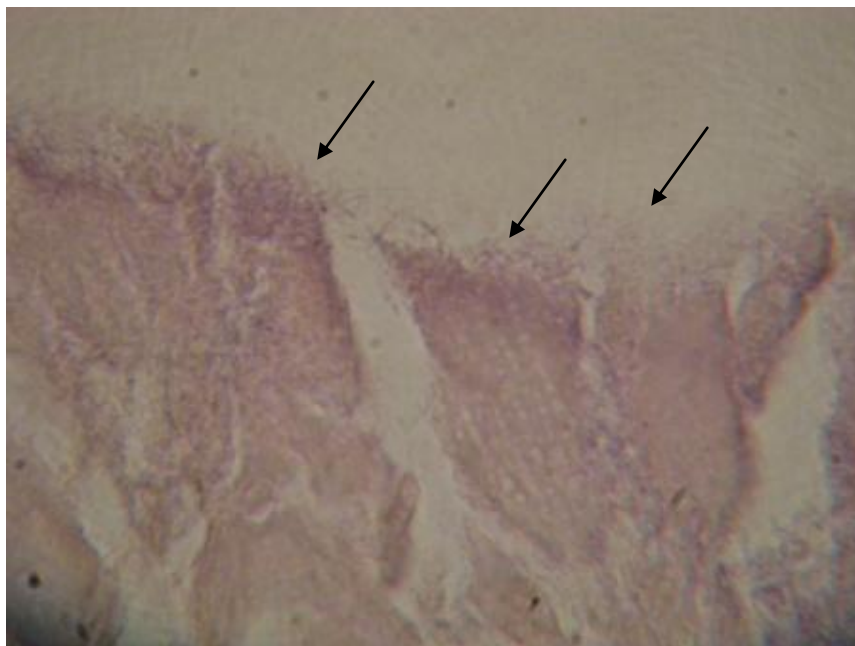
Εικόνα 3.2.1.4.3. Σπογγίωση στο δέρμα γνάθων, προηγούμενη εικόνα, μεγαλύτερη μεγέθυνση. Διακρίνονται λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι, προσκολλημένοι την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων της επιδερμίδας (μαύρα βέλη), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 100x).



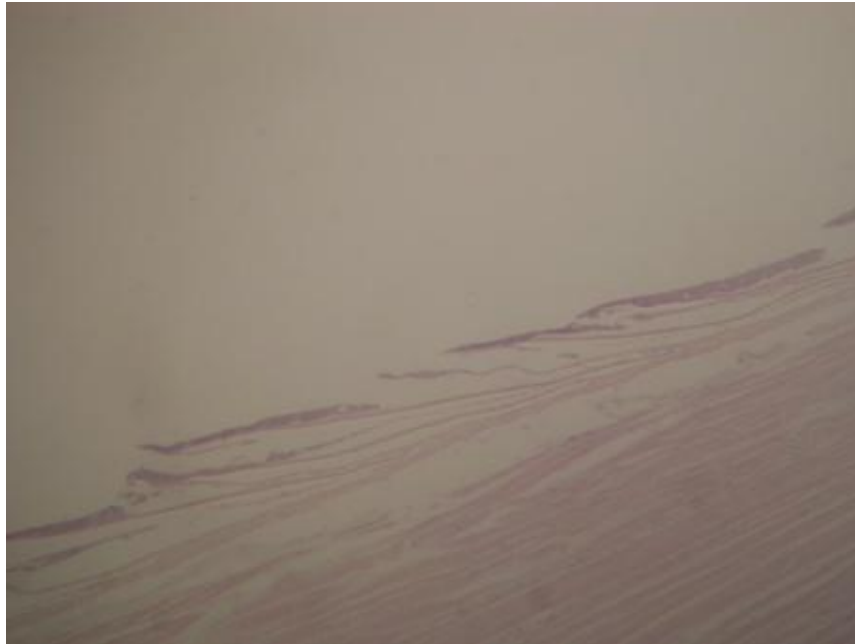
Εικόνα 3.2.1.4.4. Υπερτροφία, υπερπλασία των βλεννογόνων κυττάρων. Διακρίνονται λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι, προσκολλημένοι την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων της επιδερμίδας (μαύρα βέλη), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 100x).



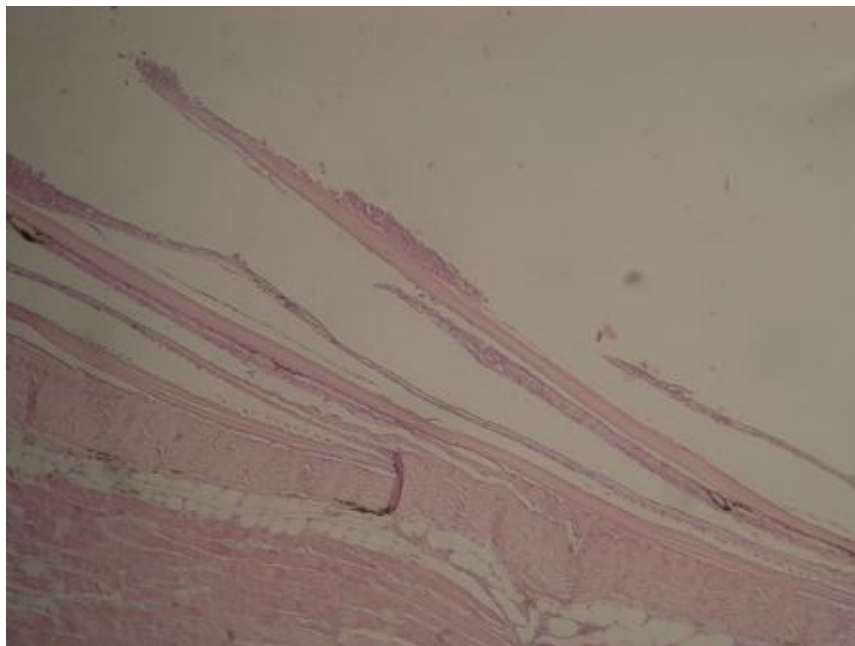
Εικόνα 3.2.1.4.5. Ιστολογική τομή δέρματος ουραίου πτερυγίου. Σπογγώση στο δέρμα. Διακρίνονται λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι, προσκολλημένοι την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων της επιδερμίδας (μαύρα βέλη), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).



Εικόνα 3.2.1.4.6. Ιστολογική τομή δέρματος ουραίου πτερυγίου. Διακρίνονται λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι, προσκολλημένοι την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων της επιδερμίδας (μαύρα βέλη), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).

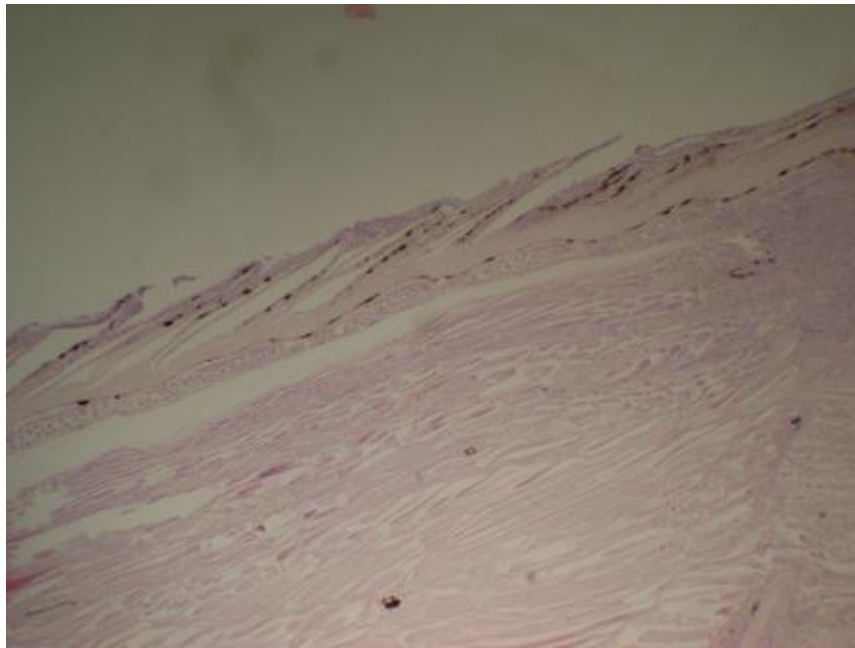


Εικόνα 3.2.1.4.7. Απώλεια της επιδερμίδας, έκθεση του χορίου και των λεπιών, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 4x).

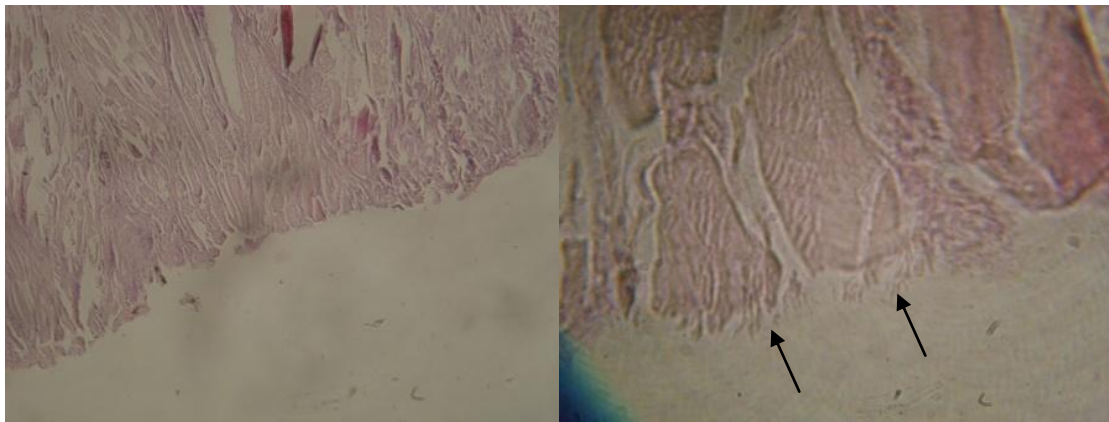


Εικόνα 3.2.1.4.8. Απώλεια της επιδερμίδας, έκθεση του χορίου και των λεπιών, προηγούμενη εικόνα, μεγαλύτερη μεγέθυνση, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).



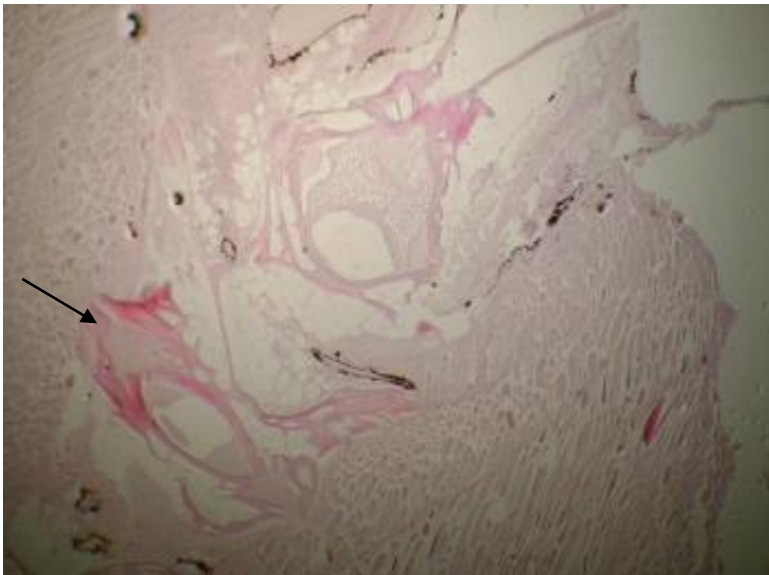
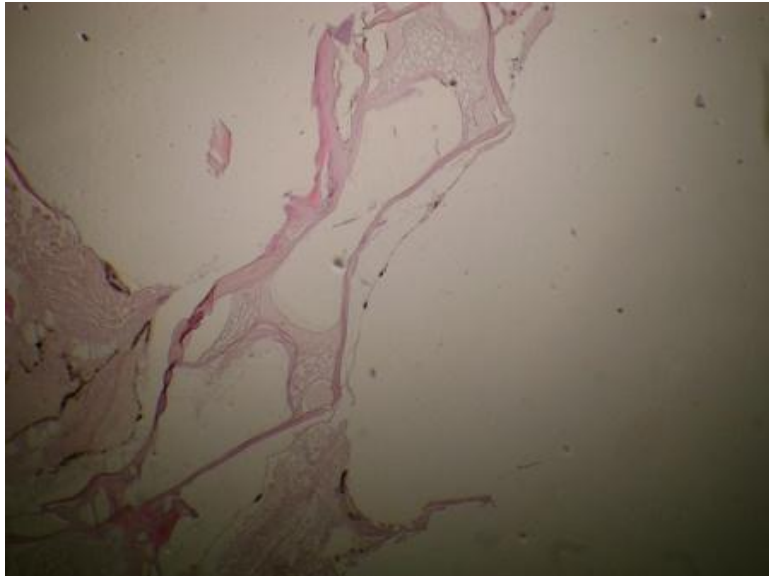


Εικόνα 3.2.1.4.9. Απώλεια της επιδερμίδας, έκθεση του χορίου και των λεπιών, αύξηση του αριθμού των μελανοφόρων κυττάρων στο δέρμα, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 4x).



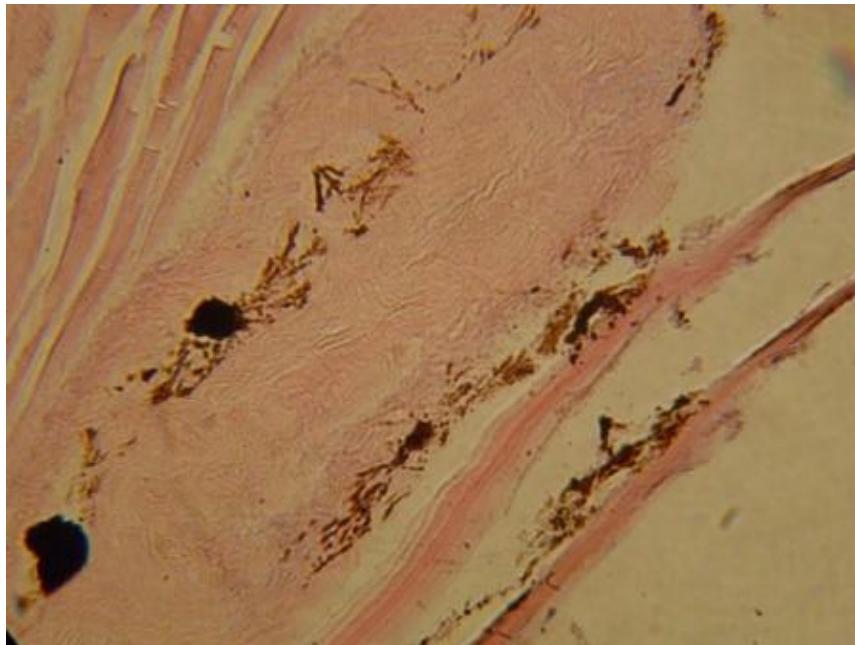
Εικόνες 3.2.1.4.10 & 3.2.1.4.11. Ιστολογική τομή δέρματος ουραίου πτερυγίου. Απώλεια της επιδερμίδας και του χορίου. Έκθεση του μυϊκού ιστού. Λεπτοί επιμήκεις βάκιλοι, προσκολλημένοι την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων της επιδερμίδας (μαύρα βέλη), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x, 100x).



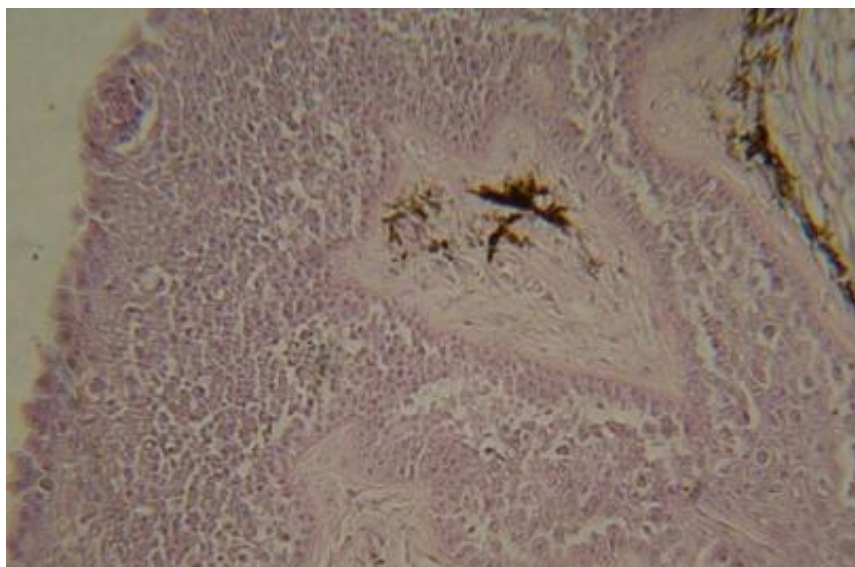


Εικόνες 3.2.1.4.12, 3.2.1.4.13. & 3.2.1.4.14. Ιστολογική τομή δέρματος ουραίου πτερυγίου. Απώλεια της επιδερμίδας, του χορίου και του μυϊκού ιστού. Οστεόλυση

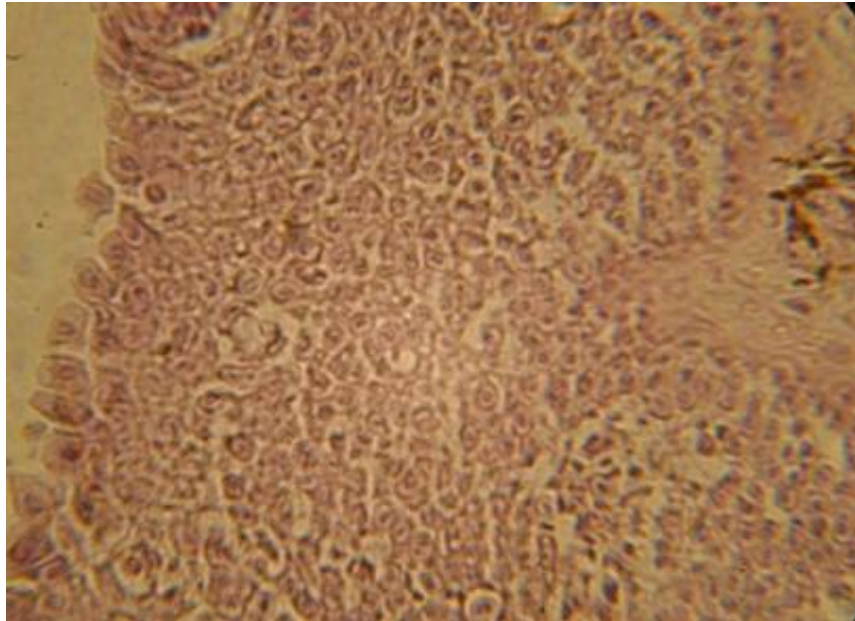
του οστού του ουραίου πτερυγίου (μαύρα βέλη), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x, 40x, 100x).



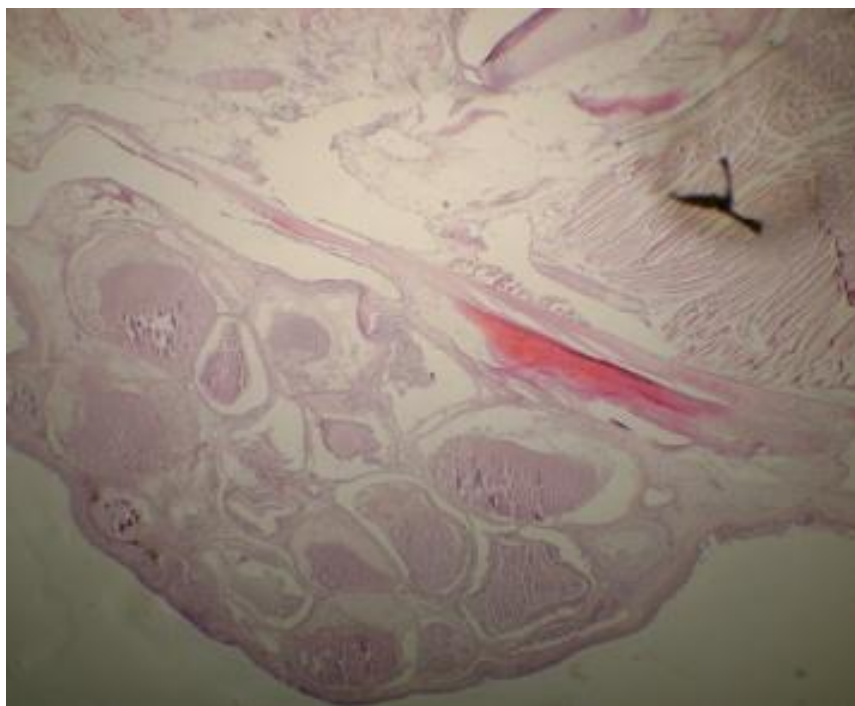
Εικόνα 3.2.1.4.15. Απώλεια της επιδερμίδας, αποκάλυψη του χορίου, αύξηση του αριθμού των μελανοφόρων κυττάρων στο δέρμα, ως τελευταία φάση φλεγμονής, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).



Εικόνα 3.2.1.4.16. Σπογγίωση στο δέρμα, οίδημα, υπερπλασία, υπερτροφία επιθηλιακών κυττάρων, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).



Εικόνα 3.2.1.4.17. Σπογγίωση στο δέρμα, προηγούμενη εικόνα, μεγαλύτερη μεγέθυνση, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 100x).

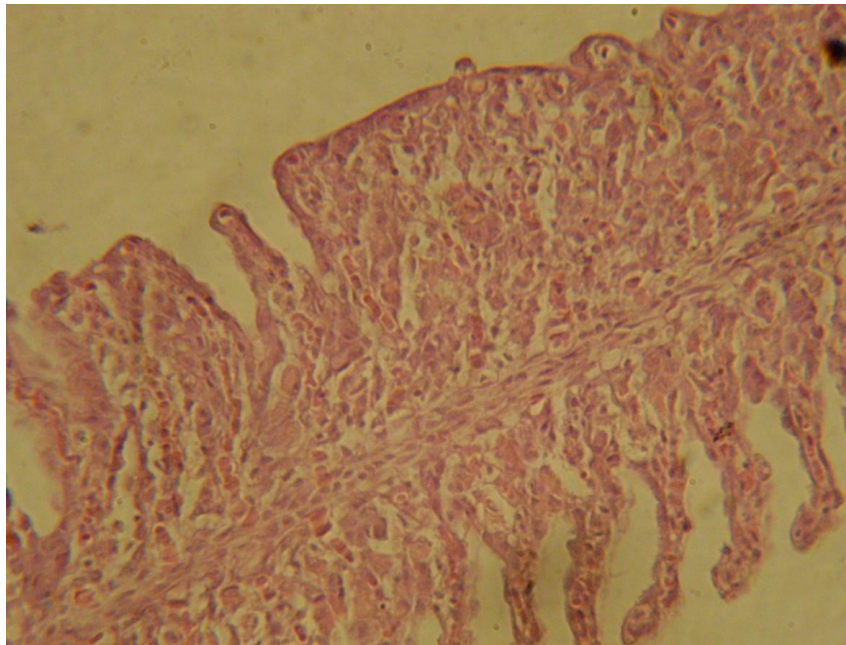


Εικόνα 3.2.1.4.18. Λεμφοκύστη, τυχαίο εύρημα. Διακρίνονται υπερπλαστικοί ινοβλάστες στην επιδερμίδα, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).

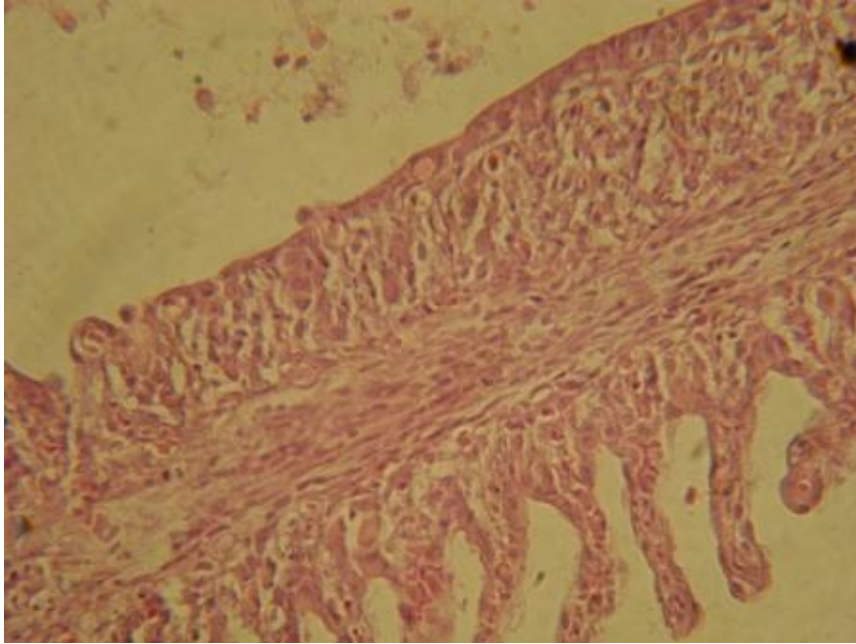


Οι αλλοιώσεις στα βράγχια εμφανίστηκαν με απώλεια της φυσιολογικής δομής των βραγχίων, διάβρωση των πρωτογενών βραγχιακών νηματίων και νεκρώσεις στα βράγχια. Συγκόλληση στην βάση των πρωτογενών βραγχιακών νηματίων και των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων, υπερπλασία και οίδημα στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια. Υπεραιμία των βραγχίων, υπερτροφία και υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων των βραγχίων, και πιο σπάνια, τελαγγειεκτασία, συμφόρηση, εστιακές περιοχές με βακτήρια μέσα στο επιθήλιο.

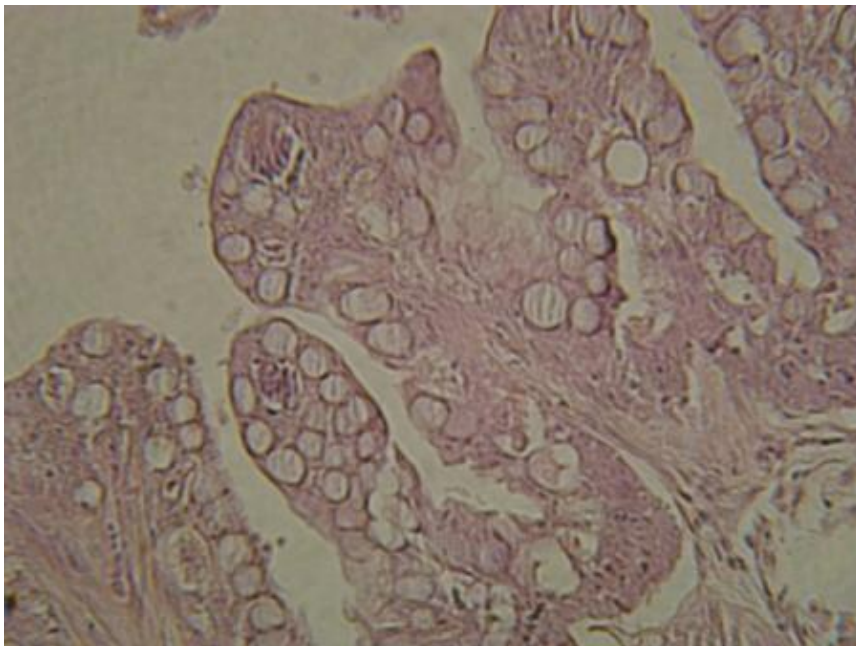
Συγκεντρωτικά, δεν διαπιστώθηκαν αλλοιώσεις συστηματικής μόλυνσης σε εσωτερικά όργανα, όλες οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις εντοπίστηκαν στα εξωτερικά όργανα (βράγχια, δέρμα) (Εικόνες 3.2.1.4.19.-3.2.1.4.27.).



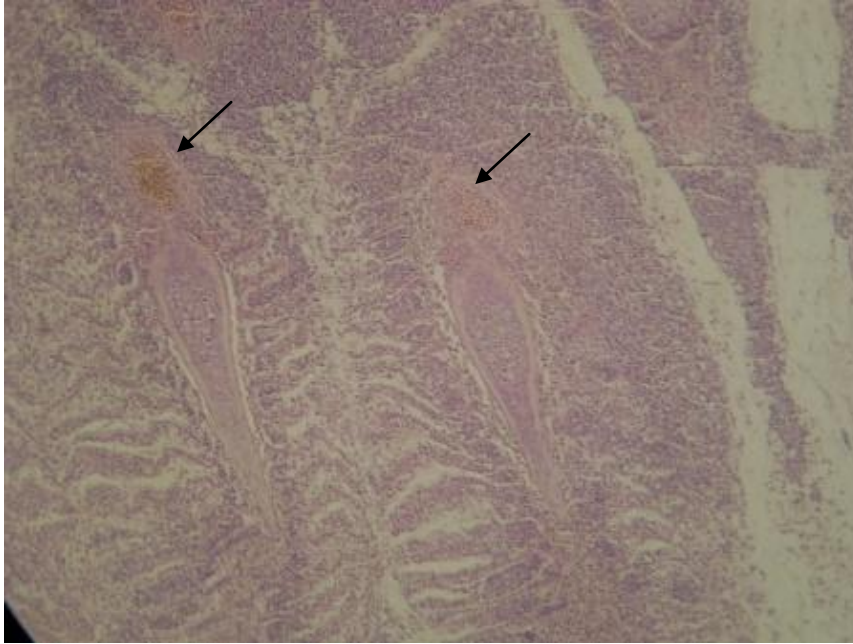
Εικόνα 3.2.1.4.19. Συγκόλληση στην βάση των πρωτογενών βραγχιακών νηματίων, υπερπλασία στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια, υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων των βραγχίων, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).



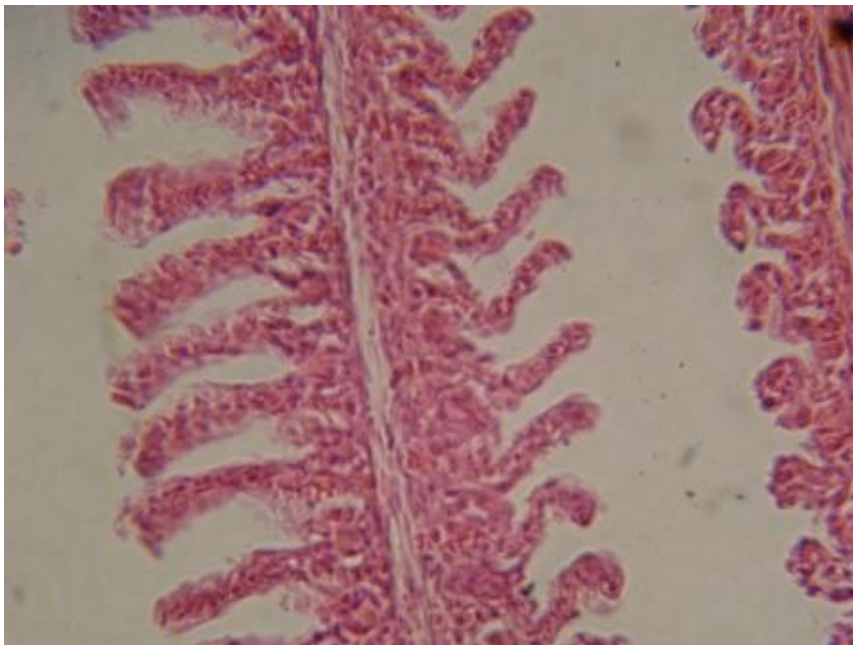
Εικόνα 3.2.1.4.20. Συγκόλληση στην βάση των πρωτογενών βραγχιακών νηματίων, υπερπλασία στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια, υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων των βραγχίων, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).



Εικόνα 3.2.1.4.21. Συγκόλληση στην βάση των πρωτογενών βραγχιακών νηματίων και δευτερογενών βραγχιακών νηματίων, υπερπλασία στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια, υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων των βραγχίων, υπερπλασία & υπερτροφία των βλεννογόνων κυττάρων χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).



Εικόνα 3.2.1.4.22. Συγκόλληση των πρωτογενών και δευτερογενών βραγχιακών νηματίων, υπερπλασία στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια, αιματώματα στα πρωτογενή βραγχιακά νημάτια (μαύρα βέλη), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).

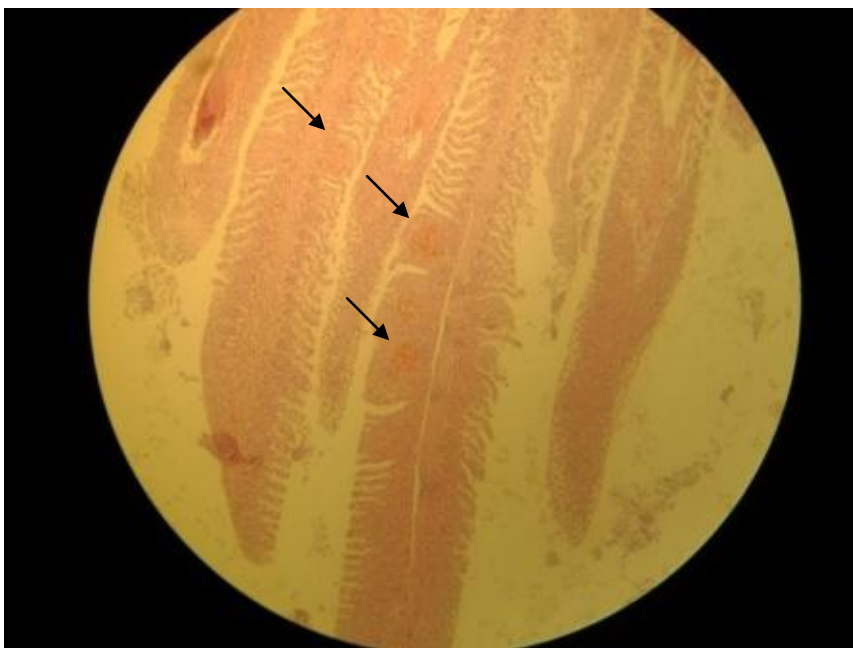


Εικόνα 3.2.1.4.23. Τελαγγειεκτασία στις άκρες των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).





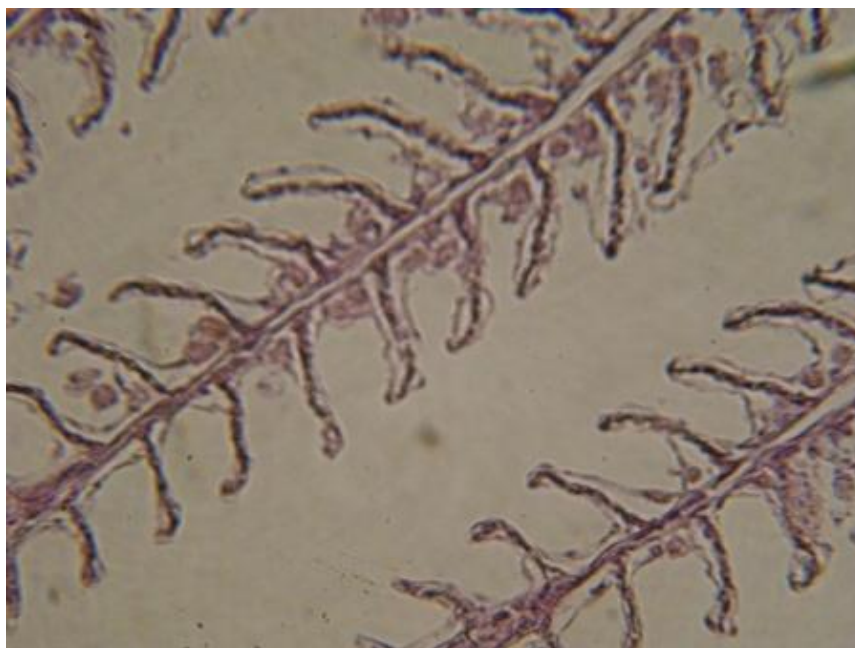
Εικόνες 3.2.1.4.24. Τελαγγειεκτασία στις άκρες των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).



Εικόνα 3.2.1.4.25. Συγκόλληση των πρωτογενών και δευτερογενών βραγχιακών νηματίων, υπερπλασία στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια, αιματώματα στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια (μαύρα βέλη), χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 4x).



Εικόνα 3.2.1.4.26. Οίδημα στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).



Εικόνα 3.2.1.4.27. Οίδημα στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 40x).



### 3.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΙΝΗΣ-Τ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΗΣ ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΣΗΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΣΕ ΤΣΙΠΟΥΡΕΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΑ

Η χρήση των 2 αντισηπτικών διαλυμάτων, υπεροξειδίου του υδρογόνου και χλωραμίνης-Τ, με σκοπό την αντιμετώπιση της νόσου ήταν αποτελεσματική καθώς στα ψάρια στα οποία έγιναν οι εμβαπτίσεις, μειώθηκαν οι εξωτερικές δερματικές αλλοιώσεις και μειώθηκε σημαντικά η θνησιμότητα. Στα λαβράκια, με την χρήση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η θνησιμότητα μειώθηκε από 65% στο 7.5% και με την χρήση της χλωραμίνης-Τ, η θνησιμότητα μειώθηκε από 65% στο 5%. Στις τσιπούρες, με την χρήση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η θνησιμότητα μειώθηκε από 50% στο 40% και την χρήση της χλωραμίνης-Τ, η θνησιμότητα μειώθηκε από 50% στο 30%.

#### 3.3.1 1<sup>η</sup> Πειραματική Μόλυνση

Όσον αφορά τα ιχθύδια τσιπούρας, μετά την προσθήκη των υπεροξειδίου του υδρογόνου & της χλωραμίνης-Τ, μειώθηκαν οι απομονώσεις του *T. maritimum* και αυξήθηκε ο αριθμός των αυτόχθονων, ετερότροφων θαλάσσιων βακτηρίων (μεικτή μόλυνση).

Τα ψάρια - ΑΡΝΗΤΙΚΟΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ: T.NEGATIVE = T.N, υγιή στα οποία έγιναν οι εμβαπτίσεις με τις 2 ουσίες, στις ίδιες συγκεντρώσεις καθώς και οι Μάρτυρες (ΜΑΡΤΥΡΕΣ: T.M)., δηλ. οι ομάδες: 4<sup>η</sup>, 5<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> δεν εμφάνισαν θνησιμότητα.

Στο διάστημα των 10 ημερών, από την 1η εμβάπτιση μέχρι την 2η εμβάπτιση, η θνησιμότητα ήταν:

Για το Υπεροξείδιο: 40%

Για την Χλωραμίνη-Τ: 30%

Για τους Θετικούς Μάρτυρες, με μυξοβακτηρίδια: 50%

επομένως η 2η εμβάπτιση, θα έπρεπε να γίνει νωρίτερα, το αργότερο 3 ημέρες μετά την 1η εμβάπτιση, όταν άρχισαν οι πρώτοι θάνατοι των ψαριών.

### 3.3.1.1 Εξέταση των πειραματικά μολυσμένων ιχθύων, μετά τις εμβαπτίσεις των ουσιών

Από την 4<sup>η</sup>,5<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> ομάδα των μαρτύρων δεν προέκυψαν νεκρά ιχθύδια, σε όλη την διάρκεια της παρακολούθησης του πειράματος. Τα ιχθύδια ανταποκρίθηκαν άμεσα στα λουτρά με υπεροξειδίου του υδρογόνου και χλωραμίνη-T, ήδη από την επόμενη ημέρα τα ιχθύδια των ομάδων εμφάνισαν καλή ανταπόκριση και στην λήψη τροφής, ενώ οι θνησιμότητες μειώθηκαν σταδιακά. Όταν έγινε η 2η εμβάπτιση, ορισμένα ιχθύδια εκδήλωσαν λόγω στρες και αλλοιώσεις από λεμφοκύστη, χωρίς όμως να εμφανίζουν θνησιμότητα.

### 3.3.1.2 Στατιστική ανάλυση

Σύγκριση αποτελεσματικότητας των 2 ουσιών για την 1<sup>η</sup> Πειραματική μόλυνση, Πίνακας 3.3.1.2.1.

**Πίνακας 3.3.1.2.1.** Σύγκριση μεταξύ των θνησιμοτήτων που προέκυψαν από το υπεροξειδίου του υδρογόνου και από τη χλωραμίνη-T, για την τσιπούρα.

Έλεγχος t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις		
	H2O2	Χλωραμίνη-T
Μέσος	7,13333333	7,8
Διακύμανση	2,40952381	1,457142857
Μέγεθος δείγματος	15	15
Διάμεση διακύμανση	1,93333333	
Υποτιθέμενη διαφορά μέσων	0	
βαθμοί ελευθερίας	28	
t	-1,3130643	
P(T<=t) μονόπλευρη	0,09991061	
t κρίσιμο, μονόπλευρο	1,70113091	
P(T<=t) δίπλευρη	0,19982121	
t κρίσιμο, δίπλευρο	2,04840711	

Δεν προκύπτει σημαντικά στατιστική διαφορά μεταξύ των θνησιμοτήτων που προέκυψαν από το υπεροξειδίου του υδρογόνου και από τη χλωραμίνη-T (P=0,19).

**Πίνακας 3.3.1.2.2.** Αποτελεσματικότητα των 2 εμβαπτίσεων με υπεροξειδίου του υδρογόνου και θνησιμότητα των πειραματικά μολυσμένων ιχθυδίων τσιπούρας με το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* και σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για τα ιχθύδια τσιπούρας κατά την 1<sup>η</sup> πειραματική μόλυνση.

x: Δεν αναπτύχθηκε τίποτα

+: αποικίες *T.maritimum*

ο: Gram (-) βάκιλοι, κόκκοι

ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ											
10 ημέρες μεταξύ των 2 Εμβάπτισεων	Αριθμός νεκρών	1 <sup>η</sup> Ομάδα				Ημέρες μετά την μόλυνση	Αριθμός νεκρών	Θετικός Μάρτυρας T.POSITIVE = T.P			
1 <sup>η</sup> Εμβάπτιση			FMM	MA	AOA				FMM	MA	AOA
1		Δ				1		Δ			
		B						B			
		N						N			
2		Δ				2		Δ			
		B						B			
		N						N			
3	1	Δ	+	+	ο	3	1	Δ	+	+	+
		B	ο	+	ο			B	ο	+	ο
		N	ο	+	ο			N	+	+	ο
4	1	Δ	ο	+	ο	4		Δ			
		B	ο	+	ο			B			
		N	ο	+	ο			N			
5		Δ				5	1	Δ	+	+	+
		B						B	+	+	+
		N						N	+	+	+
6		Δ					1	Δ	+	+	ο
		B						B	+	+	ο
		N						N	+	+	+
7	1	Δ	ο	+	ο	6		Δ			
		B	ο	+	ο			B			
		N	ο	+	ο			N			
	1	Δ	+	+	ο	7	1	Δ	+	+	ο
		B	ο	+	ο			B	ο	+	ο
		N	ο	+	ο			N	+	+	ο
8		Δ				8		Δ			
		B						B			
		N						N			
9		Δ				9	1	Δ	+	+	ο
		B						B	+	+	ο
		N						N	+	+	ο
10 2 <sup>η</sup> Εμβάπτιση	Από την 10η ημέρα, κανένα νεκρό ψάρι	Δ				10		Δ			
		B						B			
		N						N			
11		Δ				11		Δ			
		B						B			
		N	ο	ο	ο			N	+	+	ο
12		Δ				12		Δ			
		B						B			
		N						N			
13		Δ				13		Δ			
		B						B			
		N						N			
14		Δ				14		Δ			
		B						B			
		N						N			
15		Δ				15		Δ			
		B						B			
		N	ο	ο	ο			N	+	+	ο
Σύνολο νεκρών	4/10					Σύνολο νεκρών	5/10				
Θνησιμότητα	40%					Θνησιμ	50%				

α						ότητα				
---	--	--	--	--	--	-------	--	--	--	--

Δ: Δέρμα, Β:Βράγχια, Ν:Νερό

**Πίνακας 3.3.1.2.3.** Αποτελεσματικότητα των 2 εμφαπίσεων με χλωραμίνη-Τ και θνησιμότητα των πειραματικά μολυσμένων ιχθυδίων τσιπούρας με το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* και σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για τα ιχθύδια τσιπούρας κατά την 1<sup>η</sup> πειραματική μόλυνση.

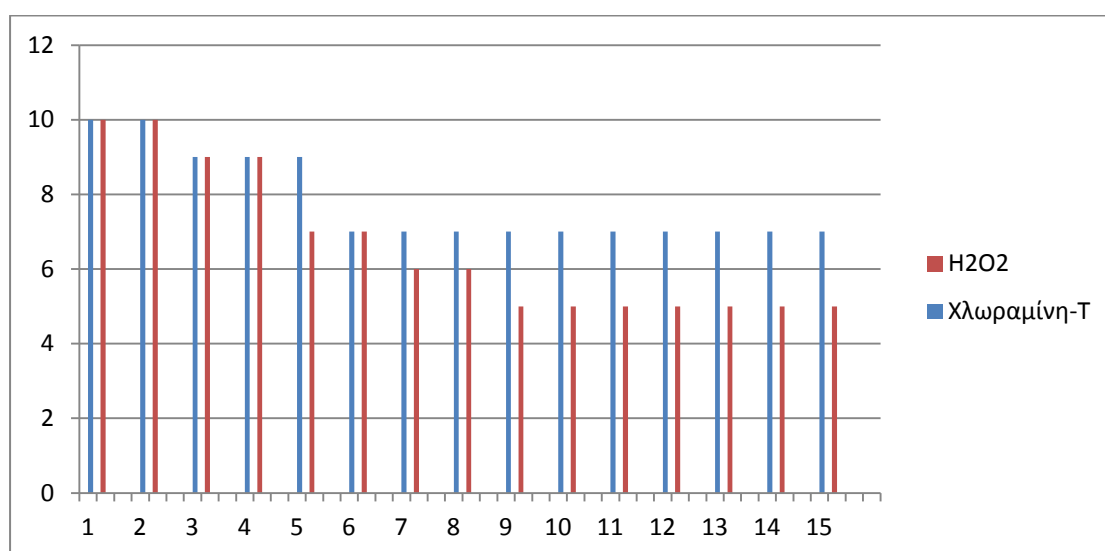
χ: Δεν αναπτύχθηκε τίποτα

+: αποικίες *T.maritimum*

ο: Gram (-) βάκιλοι, κόκκοι

ΧΛΩΡΑΜΙΝΗ-Τ											
10 ημέρες μεταξύ των 2 Εμφαπίσεων	Αριθμός νεκρών	2 <sup>η</sup> Ομάδα				Ημέρες μετά την μόλυνση	Αριθμός νεκρών	Θετικός Μάρτυρας T.POSITIVE = T.P			
1 <sup>η</sup> Εμφάπιση			FMM	MA	AOA				FMM	MA	AOA
1		Δ				1		Δ			
		B						B			
		N						N			
2		Δ				2		Δ			
		B						B			
		N						N			
3	1	Δ	ο	+	ο	3	1	Δ	+	+	+
		B	ο	+	ο			B	ο	+	ο
		N	ο	+	ο			N	+	+	ο
4		Δ				4		Δ			
		B						B			
		N						N			
5		Δ				5	1	Δ	+	+	+
		B						B	+	+	+
		N						N	+	+	+
6	1	Δ	ο	+	ο		1	Δ	+	+	ο
		B	ο	ο	ο			B	+	+	ο
		N	ο	+	ο			N	+	+	+
	1	Δ	ο	+	ο	6		Δ			
		B	ο	ο	ο			B			
		N	ο	+	ο			N			
7		Δ				7	1	Δ	+	+	ο
		B						B	ο	+	ο
		N						N	+	+	ο
8		Δ				8		Δ			
		B						B			
		N						N			
9		Δ				9	1	Δ	+	+	ο
		B						B	+	+	ο
		N						N	+	+	ο
10 2 <sup>η</sup> Εμφάπιση	Από την 10η ημέρα, κανένα νεκρό ψάρι	Δ				10		Δ			
		B						B			
		N						N			
11		Δ				11		Δ			

		B						B			
		N	○	○	○			N	+	+	○
12		Δ				12		Δ			
		B						B			
		N						N			
		Δ						Δ			
13		B				13		B			
		N						N			
		Δ						Δ			
14		B				14		B			
		N						N			
		Δ						Δ			
15		B				15		B			
		N						N			
		Δ						Δ			
Σύνολο νεκρών	3/10					Σύνολο νεκρών	5/10				
Θνησιμότητα	30%					Θνησιμότητα	50%				



Διάγραμμα 3.3.1. Σύγκριση θνησιμότητας μεταξύ της Ομάδας με το Υπεροξειδίου του υδρογόνου και της Ομάδας με την Χλωραμίνη-T, για τα ιχθύδια τσιπούρας

### 3.3.2 2<sup>η</sup> Πειραματική Μόλυνση

Όσον αφορά τα ιχθύδια λαβρακιού, μετά την προσθήκη του υπεροξειδίου του υδρογόνου & της χλωραμίνης-T μειώθηκε ο αριθμός των μυξοβακτηριδίων και απομονώθηκαν κυρίως αυτόχθονα ετερότροφα θαλάσσια βακτήρια (μεικτή μόλυνση). Τα Λαβράκια-Μάρτυρες εμφάνισαν υψηλή θνησιμότητα, από την 3η ημέρα, συνολικά: 26 νεκρά/40, θνησιμότητα 65%. Στα Λαβράκια στα οποία χορηγήθηκε υπεροξείδιο του υδρογόνου, η θνησιμότητα άρχισε την 3η ημέρα (1 νεκρό). Συνολικά στις 30 ημέρες, ήταν: 3 νεκρά/40, θνησιμότητα 7.5%. Στα Λαβράκια στα οποία

χορηγήθηκε χλωραμίνη-Τ, η θνησιμότητα άρχισε την 4η ημέρα (1 νεκρό). Συνολικά στις 30 ημέρες, ήταν: 2 νεκρά/40, θνησιμότητα 5%.

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων: Αποδεικνύεται πειραματικά ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου στην δόση: 200ppm/30min, με εμβάπτιση (3 επαναλήψεις μέρα παρά μέρα), είναι αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση της μυξοβακτηριδίασης και κατάφερε να μειώσει την υψηλή θνησιμότητα από 65% στο 7.5%. Αποδεικνύεται επίσης πειραματικά ότι η χλωραμίνη-Τ στην δόση: 12-15ppm/60min, με εμβάπτιση (3 επαναλήψεις μέρα παρά μέρα), είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση της μυξοβακτηριδίασης και κατάφερε να μειώσει την υψηλή θνησιμότητα από 65% στο 5%.

Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με τα δύο αντισηπτικά διαλύματα, υπολογίστηκε με βάση τον αριθμό των νεκρών ψαριών, συγκριτικά με τους μάρτυρες, όπου ο αριθμός των νεκρών ψαριών ήταν μεγάλος.

### **3.3.2.1 Εξέταση των πειραματικά μολυσμένων ιχθύων, μετά τις εμβαπτίσεις των ουσιών**

Να σημειωθεί ότι οι εμβαπτίσεις πραγματοποιήθηκαν με παροχή οξυγόνου και τα λαβράκια, αμέσως μετά την προσθήκη των 2 ουσιών, εμφάνισαν μια μικρή αντίδραση, στην αρχή κατά την εμβάπτιση (μικρή αύξηση των αναπνοών με γρήγορη κίνηση των βραγχιοκαλυμμάτων και άνοδο στην επιφάνεια του νερού) γρήγορα όμως οι αναπνοές επανήλθαν και τα λαβράκια παρέμειναν στον πυθμένα της δεξαμενής μέχρι το τέλος της εμβάπτισης.

Τα ιχθύδια ανταποκρίθηκαν άμεσα στα λουτρά με υπεροξείδιο του υδρογόνου και Χλωραμίνη-Τ, ήδη από την επόμενη ημέρα τα ιχθύδια των πειραματικών ομάδων εμφάνισαν καλή ανταπόκριση και στην λήψη τροφής, ενώ οι θνησιμότητες μειώθηκαν σταδιακά.

### **3.3.2.2 Στατιστική ανάλυση**

Σύγκριση αποτελεσματικότητας των 2 ουσιών για την 2<sup>η</sup> Πειραματική μόλυνση, Πίνακας 3.3.2.2.1.

**Πίνακας 3.3.2.2.1.** Σύγκριση μεταξύ των θνησιμοτήτων που προέκυψαν από το υπεροξείδιο του υδρογόνου και από τη χλωραμίνη-Τ, για το λαβράκι.

Έλεγχος t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις		
	H2O2	Χλωραμίνη-T
Μέσος	8,133333	8,6
Διακύμανση	1,409524	0,685714286
Μέγεθος δείγματος	15	15
Διάμεση διακύμανση	1,047619	
Υποτιθέμενη διαφορά μέσων	0	
βαθμοί ελευθερίας	28	
t	-1,24864	
P(T<=t) μονόπλευρη	0,111069	
t κρίσιμο, μονόπλευρο	1,701131	
P(T<=t) δίπλευρη	0,222138	
t κρίσιμο, δίπλευρο	2,048407	

Δεν προκύπτει σημαντικά στατιστική διαφορά μεταξύ των θνησιμοτήτων που προέκυψαν από το υπεροξειδίο και από τη χλωραμίνη-T (P=0,22).

**Πίνακας 3.3.2.2.2.** Αποτελεσματικότητα των 3 εμβαπτίσεων με υπεροξειδίο του υδρογόνου και θνησιμότητα των πειραματικά μολυσμένων ιχθυδίων λαβρακιού με το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum*. Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για τα ιχθύδια λαβρακιού κατά την διάρκεια του 2<sup>ου</sup> πειράματος.

x: Δεν αναπτύχθηκε τίποτα

+: αποικίες *T.maritimum*

ο: Gram (-) βάκιλοι, κόκκοι

ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ, 3 Εμβαπτίσεις ανά 2 ημέρες					
2 Ημέρες μεταξύ των 3 Εμβαπτίσεων	Αριθμός νεκρών	1 <sup>η</sup> Ομάδα	FMM	MA	ΑΟΑ
1 1 <sup>η</sup> Εμβάπτιση		Δ			
		B			
		Νερό	ο	+	ο
2		Δ			
		B			
		Νερό			
3 2 <sup>η</sup> Εμβάπτιση	1	Δ	+	+	ο
		B	ο	ο	ο
		Νερό	ο	+	ο
4		Δ			
		B			
		Νερό			
5 3 <sup>η</sup> Εμβάπτιση		Δ			
		B			
		Νερό	ο	ο	ο
6		Δ			
		B			
		Νερό			
7		Δ			
		B			
		Νερό			
8	1	Δ	+	ο	ο
		B	ο	ο	ο
		Νερό	ο	ο	ο
9	1	Δ	+	ο	ο
		B	ο	ο	ο

		Νερό	○	○	○
10	Από την 10η ημέρα, κανένα νεκρό ψάρι	Δ			
		B			
		Νερό			
11		Δ			
		B			
		Νερό	○	○	○
12		Δ			
		B			
		Νερό			
13		Δ			
		B			
		Νερό			
14		Δ			
		B			
		Νερό			
15		Δ			
		B			
		Νερό	○	○	○
Σύνολο νεκρών		3/40			
Θνησιμότητα		7.5%			

**Πίνακας 3.3.2.2.3.** Αποτελεσματικότητα των 3 εμβαπτίσεων με χλωραμίνη-T και θνησιμότητα των πειραματικά μολυσμένων ιχθυδίων λαβρακιού με το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum*. Σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για τα ιχθύδια λαβρακιού κατά την διάρκεια του 2<sup>ου</sup> πειράματος.

x: Δεν αναπτύχθηκε τίποτα

+: αποικίες *T.maritimum*

○: Gram (-) βάκιλοι, κόκκοι

ΧΛΩΡΑΜΙΝΗ-T, 3 Εμβαπτίσεις ανά 2 ημέρες					
2 Ημέρες μεταξύ των 3 Εμβαπτίσεων	Αριθμός νεκρών	2 <sup>η</sup> Ομάδα	FMM	MA	AOA
1 1 <sup>η</sup> Εμβάπτιση		Δ			
		B			
		Νερό	+	○	○
2		Δ			
		B			
		Νερό			
3 2 <sup>η</sup> Εμβάπτιση		Δ			
		B			
		Νερό			
4	1	Δ	+	+	○
		B	○	○	○
		Νερό	○	○	○
5 3 <sup>η</sup> Εμβάπτιση		Δ			
		B			
		Νερό	○	○	○
6		Δ			
		B			
		Νερό			
7	1	Δ	+	○	○
		B	○	○	○
		Νερό	○	○	○
8		Δ			



		B			
		Νερό			
9		Δ			
		B			
		Νερό			
10	Από την 10η ημέρα, κανένα νεκρό ψάρι	Δ			
		B			
		Νερό			
11		Δ			
		B			
		Νερό	ο	ο	ο
12		Δ			
		B			
		Νερό			
13		Δ			
		B			
		Νερό			
14		Δ			
		B			
		Νερό			
15		Δ			
		B			
		Νερό	ο	ο	ο
Σύνολο νεκρών	2/40				
Θνησιμότητα	5%				

**Πίνακας 3.3.2.2.4.** Θνησιμότητα πειραματικής μόλυνσης των 40 ιχθυδίων λαβρακιού με το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum* και σύγκριση αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων, ανά όργανο απομόνωσης για τα ιχθύδια λαβρακιού κατά την διάρκεια του 2<sup>ου</sup> πειράματος.

x: Δεν αναπτύχθηκε τίποτα

+: αποικίες *T.maritimum*

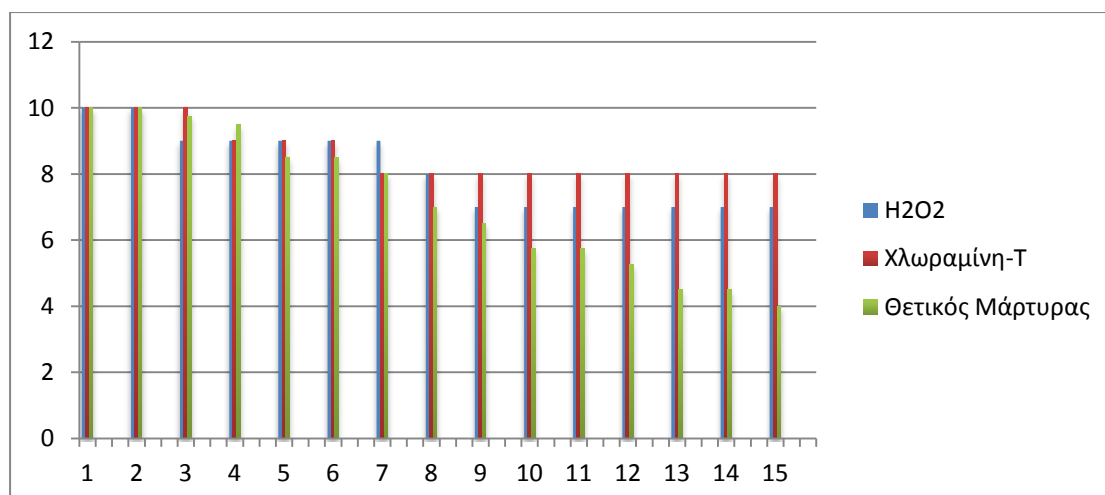
ο: Gram (-) βάκιλοι, κόκκοι

Ημέρες μετά την μόλυνση	Αριθμός νεκρών ψαριών	Όργανα απομόνωσης	Εμβάπτιση		
			FMM	MA	AOA
1		Δ			
		B			
		Νερό			
2		Δ			
		B			
		Νερό			
3	1	Δ	+	+	ο
		B	ο	+	+
		Νερό	+	+	+
4	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	+
		Νερό	+	+	+
5	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	+
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	ο	+	ο
		B	ο	+	ο
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	ο
		B	ο	+	ο

		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	+
		Νερό	+	+	+
6		Δ			
		B			
		Νερό			
7	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	+
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	○
		B	○	○	+
		Νερό	+	+	+
8	1	Δ	○	+	○
		B	○	○	+
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	+
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	○
		B	○	+	+
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	+
		Νερό	+	+	+
9	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	+
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	○
		B	○	+	+
		Νερό	+	+	+
10	1	Δ	+	+	○
		B	○	+	+
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	○	+	+
		B	+	+	+
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	+
		B	+	+	+
		Νερό	+	+	+
11		Δ			
		B			
		Νερό			
12	1	Δ	+	+	+
		B	○	+	+
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	○
		B	+	+	+
		Νερό	+	+	+
13	1	Δ	+	+	○
		B	+	+	+
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	+
		B	○	○	+
		Νερό	+	+	+
	1	Δ	+	+	+
		B	○	○	+
		Νερό	+	+	+
14		Δ			
		B			
		Νερό			
15	1	Δ	+	+	○
		B	○	○	+
		Νερό	+	+	+

	1	Δ	+	+	○
		B	+	+	+
		Νερό	+	+	+
16		Δ			
		B			
		Νερό			
17	1	Δ	+	+	○
		B	○	○	+
		Νερό	+	+	+
18		Δ			
		B			
		Νερό			
19	1	Δ	○	+	○
		B	○	○	○
		Νερό	+	+	+
20		Δ			
		B			
		Νερό			
Σύνολο νεκρών	26/40				
Θνησιμότητα	65%				

Δ: Δέρμα, Β:Βράγχια



Διάγραμμα 3.3.2. Σύγκριση θνησιμότητας μεταξύ της Ομάδας με το Υπεροξείδιο του υδρογόνου, της Ομάδας με την Χλωραμίνη-T, με τον Θετικό Μάρτυρα για τα ιχθύδια λαβρακιού.

### 3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (LC50) ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΙΝΗΣ Τ, ΣΕ ΙΧΘΥΔΙΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ

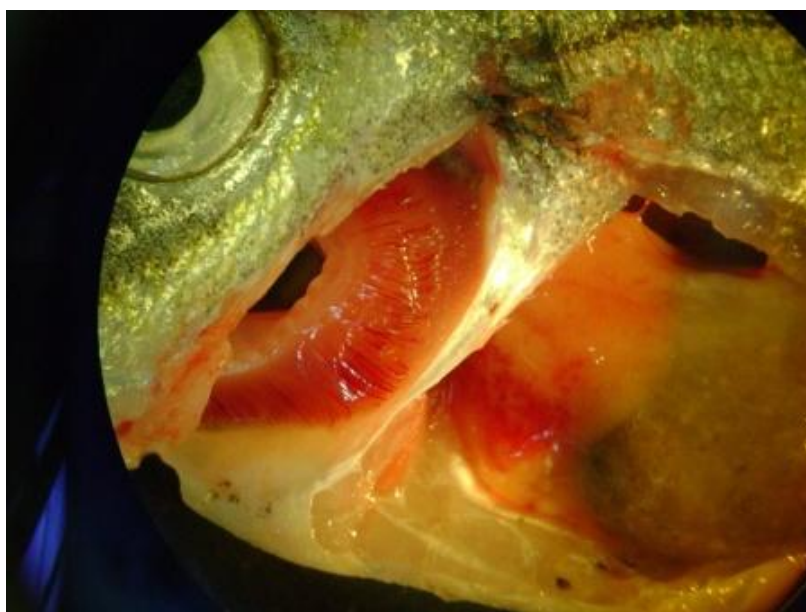
#### 3.4.1 1<sup>η</sup> Πειραματική Εμβάπτιση

Όσον αφορά τα ιχθύδια τσιπούρας, αποδείχθηκε πως, στην 1<sup>η</sup> ομάδα, με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (640ppm/30min) παρατηρήθηκαν 6 νεκρά ψάρια/10 σύνολο στις 48 ώρες, 60% θνησιμότητα. Στην 2<sup>η</sup> ομάδα, με την χλωραμίνη-T

(80rpm/60min) παρατηρήθηκαν 5 νεκρά ψάρια /10 σύνολο στις 48 ώρες, 50% θνησιμότητα. Στην 3<sup>η</sup> ομάδα, θετικός μάρτυρας δεν υπήρξε κανένα νεκρό ιχθύδιο τσιπούρας στην διάρκεια του πειράματος. Πίνακας 3.4.1.

Αποδεικνύεται πως η χλωραμίνη-T προκαλεί μικρότερη θνησιμότητα ακόμη και στην θανατηφόρο συγκέντρωση, ενώ οι τσιπούρες εμφανίζουν μεγαλύτερη ανοχή χλωραμίνη T σε σχέση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Διάγραμμα 3.4.1., Θνησιμότητα για τα ιχθύδια τσιπούρας, από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, 640rpm/30min και την χλωραμίνη-T, 80rpm/60min, συγκριτικά, 72h μετά την εμφάνιση.

Κατά την εμφάνιση, με το υπεροξείδιο του υδρογόνου, οι τσιπούρες: εμφάνισαν ανησυχία, άμεση αντίδραση στην έκθεση στην ουσία, προσπάθεια διαφυγής κοντά στην επιφάνεια του νερού. Ταχύπνοια, γρήγορες κινήσεις βραγχοκαλυμμάτων σκούρο χρωματισμό δέρματος, απώλεια ισορροπίας. Στις νεκρές τσιπούρες διαπιστώθηκε πολύ έντονη υπεραιμία στα βράγχια (σκούρα κόκκινα) (Εικόνες 3.4.1.1.-3.4.1.2.).

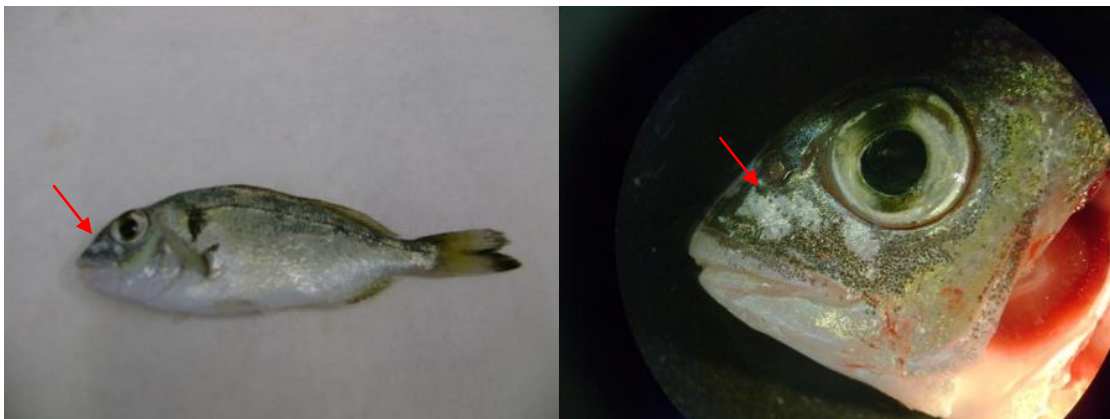


Εικόνα 3.4.1.1. Ιχθύδιο τσιπούρας από την εμφάνιση, με την υψηλή συγκέντρωση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου, υπεραιμία στα βράγχια.



Εικόνα 3.4.1.2. Ιχθύδιο τσιπούρας από την εμβάπτιση, με την υψηλή συγκέντρωση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου, υπεραιμία στα βράγχια.

Κατά την εμβάπτιση, με την χλωραμίνη-Τ, οι τσιπούρες: παρέμειναν στον πυθμένα, σε λήθαργο, ενώ προς το τέλος της εμβάπτισης, εμφάνισαν ανησυχία, ταχύπνοια, γρήγορες κινήσεις βραγχοκαλυμμάτων, σκούρο χρωματισμό δέρματος. Το νερό μύριζε έντονα χλώριο, ενώ στις νεκρές τσιπούρες διαπιστώθηκαν: υπεραιμία στα βράγχια και αποχρωματισμός δέρματος κεφαλής (Εικόνες 3.4.1.3.-3.4.1.4.).

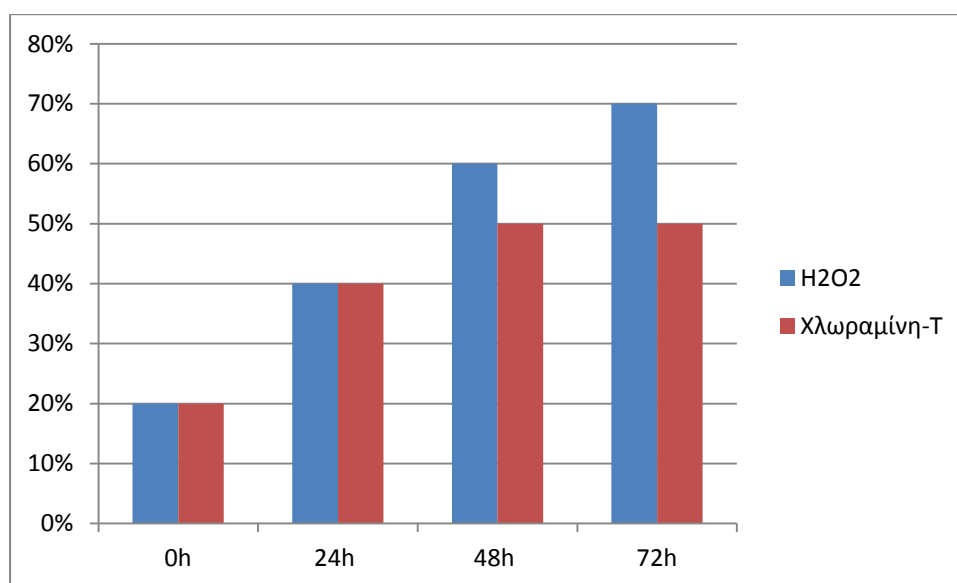


Εικόνες 3.4.1.3. & 3.4.1.4. Ιχθύδιο τσιπούρας από την εμβάπτιση, με την υψηλή συγκέντρωση με την χλωραμίνη-Τ, εστιακός αποχρωματισμός δέρματος κεφαλής (κόκκινα βέλη).

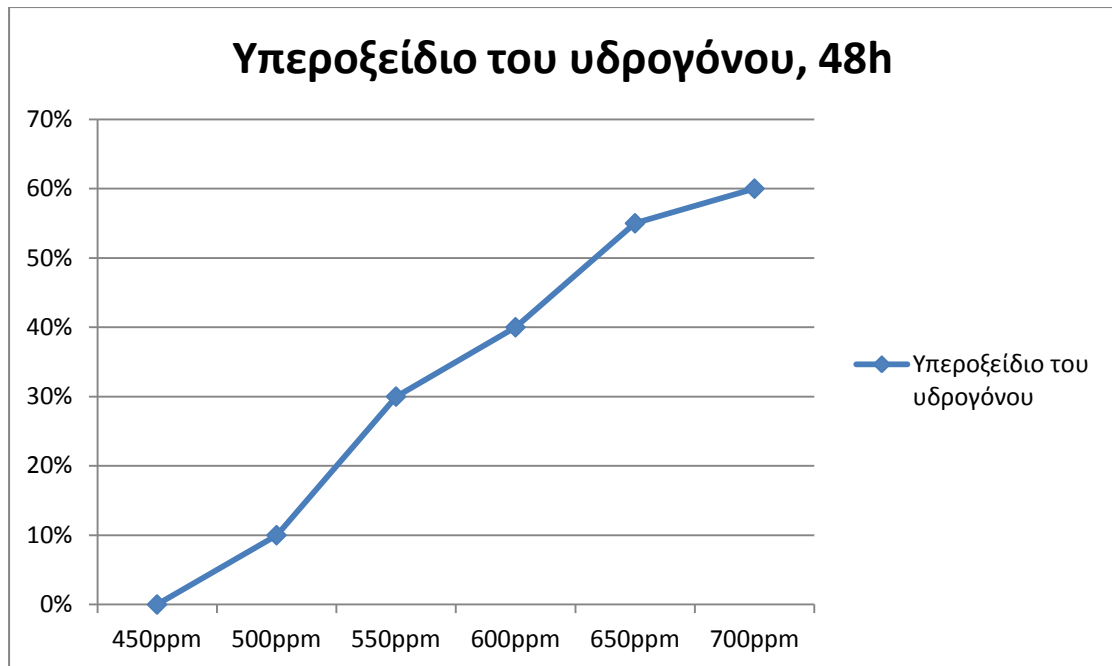
Αποδείχθηκε πως η μεσαία θανατηφόρα συγκέντρωση (Lethal Concentration 50) (LC50), για το υπεροξείδιο του υδρογόνου, στις 48 h, είναι τα 640ppm/30min και για την χλωραμίνη-Τ, είναι η συγκέντρωση 80ppm/60min. Διαγράμματα 3.4.2-3.4.3.

**Πίνακας 3.4.1.** Προσδιορισμός της θανατηφόρου συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-Τ, σε ιχθύδια τσιπούρας.

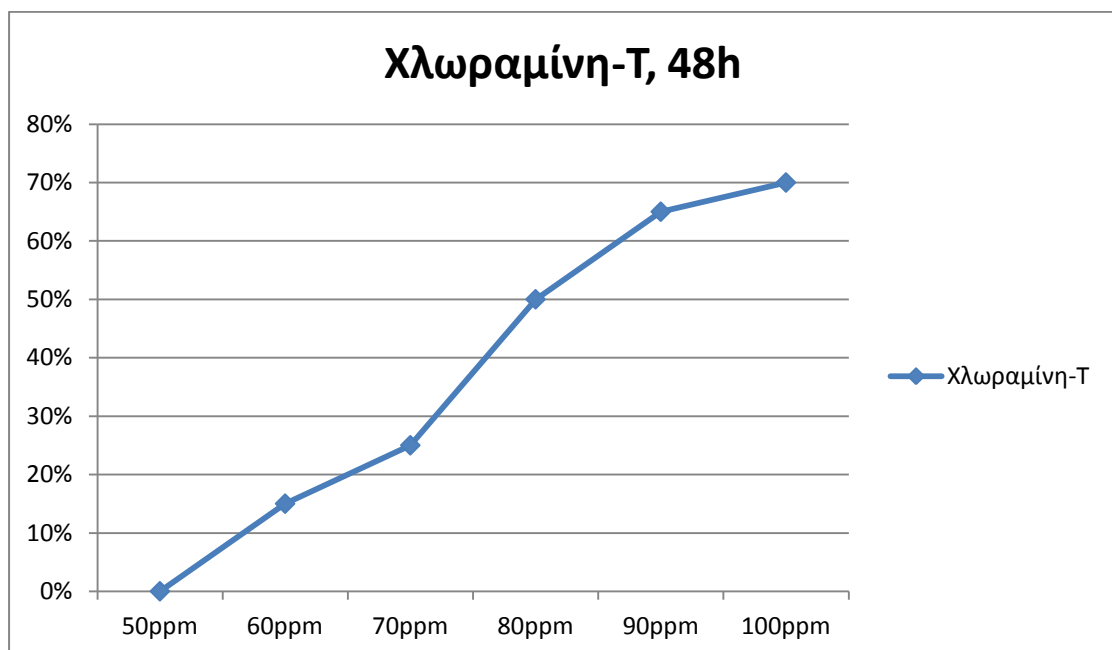
<b>Υπεροξείδιο του υδρογόνου, 640ppm/30min</b>		<b>Χλωραμίνη-Τ, 80ppm/60min</b>	
Χρονικό διάστημα από την εμβάπτιση	Αριθμός νεκρών ψαριών	Χρονικό διάστημα από την εμβάπτιση	Αριθμός νεκρών ψαριών
Κατά την εμβάπτιση	2	Κατά την εμβάπτιση	2
24h μετά την εμβάπτιση	2	24h μετά την εμβάπτιση	2
<b>48h μετά την εμβάπτιση</b>	2	<b>48h μετά την εμβάπτιση</b>	1
72h μετά την εμβάπτιση	1	72h μετά την εμβάπτιση	
Σύνολο νεκρών	7/10	Σύνολο νεκρών	5/10
Θνησιμότητα	70%	Θνησιμότητα	50%



Διάγραμμα 3.4.1. Θνησιμότητα για τα ιχθύδια τσιπούρας, από το Υπεροξείδιο του υδρογόνου, 640ppm/30min και την Χλωραμίνη-Τ, 80ppm/60min, συγκριτικά, 72h μετά την εμβάπτιση.



Διάγραμμα 3.4.2. Ιχθύδια τσιπούρας. Υπεροξειδίο του υδρογόνου, υπολογισμός LC50. Άξονας χ (συγκέντρωση ουσίας) και άξονας ψ (θνησιμότητα) ώστε να φαίνεται σε ποια συγκέντρωση αντιστοιχεί η θνησιμότητα 50% του πληθυσμού των ψαριών



Διάγραμμα 3.4.3. Ιχθύδια τσιπούρας. Χλωραμίνη-Τ, υπολογισμός LC50. Άξονας χ (συγκέντρωση ουσίας) και άξονας ψ (θνησιμότητα) ώστε να φαίνεται σε ποια συγκέντρωση αντιστοιχεί η θνησιμότητα 50% του πληθυσμού των ψαριών

**Πίνακας 3.4.2.** Ο Πίνακας, δείχνει τις LC50 (mg L<sup>-1</sup>) για το Υπεροξειδίο του υδρογόνου και την Χλωραμίνη-T, σε διαφορετικούς χρόνους έκθεσης στις 12, 24 και 48 h, για τα ιχθύδια τσιπούρας.

Υπεροξειδίο του υδρογόνου	Lethal concentration (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Χλωραμίνη-T	Lethal concentration (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
<b>Διάρκεια έκθεσης</b>	<b>LC50</b>	<b>Διάρκεια έκθεσης</b>	<b>LC50</b>
12h	690	12h	106
24h	668	24h	92
<b>48h</b>	<b>640</b>	<b>48h</b>	<b>80</b>

Για το κάθε πείραμα, πραγματοποιούνταν 2 επαναλήψεις.

### 3.4.2 2<sup>η</sup> Πειραματική Εμβάπτιση

Στηριζόμενοι στα αποτελέσματα της 1<sup>ης</sup> πειραματικής εμβάπτισης, στα ιχθύδια τσιπούρας για τις 48 h, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συγκεντρώσεις: για το υπεροξειδίο του υδρογόνου, τα 640ppm/30min και για την χλωραμίνη-T, τα 80ppm/60min. Αποδείχθηκε ότι για το υπεροξειδίο του υδρογόνου, τα 640ppm/30min, στις 24 h και όχι στις 48 h όπως συμβαίνει με τις τσιπούρες, προκάλεσαν τον θάνατο του 50% των ιχθυδίων. Άρα η LC50, για το υπεροξειδίο του υδρογόνου, είναι τα 640ppm/30min, στις 24 h για τα λαβράκια. Ενώ, αποδείχθηκε ότι για την χλωραμίνη-T, τα 80ppm/60min, στις 96 h και όχι στις 48 h όπως συμβαίνει με τις τσιπούρες, προκάλεσαν τον θάνατο του 50% των ιχθυδίων. Άρα η LC50, για την χλωραμίνη-T, είναι τα 80ppm/60min, στις 96 h και όχι στις 48 h όπως συμβαίνει με τις τσιπούρες.

Όσον αφορά τα ιχθύδια λαβρακιού, αποδείχθηκε πως, στην 1<sup>η</sup> ομάδα, με το υπεροξειδίο του υδρογόνου (640ppm/30min) παρατηρήθηκαν 10 νεκρά ψάρια/20 σύνολο στις 24 ώρες και 15 νεκρά ψάρια/20 σύνολο στις 96 ώρες, 75% θνησιμότητα στις 96 ώρες. Στην 2<sup>η</sup> ομάδα, με την χλωραμίνη T παρατηρήθηκαν: 5 νεκρά ψάρια/20 σύνολο στις 24 ώρες και 10 νεκρά ψάρια /20 σύνολο στις 96 ώρες, 50% θνησιμότητα στις 96 ώρες. Στην 3<sup>η</sup> ομάδα, θετικός μάρτυρας δεν υπήρξε κανένα νεκρό ιχθύδιο τσιπούρας στην διάρκεια του πειράματος. Πίνακας 3.4.3.

Αποδεικνύεται πως η χλωραμίνη T προκαλεί μικρότερη θνησιμότητα ακόμη και στην θανατηφόρο συγκέντρωση, ενώ τα λαβράκια εμφανίζουν μεγαλύτερη ανοχή χλωραμίνη T σε σχέση με το υπεροξειδίο του υδρογόνου, όπως και οι τσιπούρες. Διάγραμμα 3.4.4. Θνησιμότητα για τα ιχθύδια λαβρακιού, από το υπεροξειδίο του



υδρογόνου, 640ppm/30min και την χλωραμίνη-T, 80ppm/60min, συγκριτικά, 96h μετά την εμβάπτιση.

Κατά την εμβάπτιση, με το υπεροξειδίο του υδρογόνου, τα λαβράκια: εμφάνισαν έντονη ανησυχία, άμεση αντίδραση στην έκθεση στην ουσία, προσπάθεια διαφυγής κοντά στην επιφάνεια του νερού. Ταχύπνοια, γρήγορες κινήσεις βραγχοκαλυμμάτων σκούρο χρωματισμό δέρματος, απώλεια ισορροπίας, ανώμαλες (ελικοειδείς κινήσεις), προσπάθεια να πηδήξουν από το νερό. Στα νεκρά λαβράκια διαπιστώθηκε έντονη υπεραιμία και νεκρώσεις στα βράγχια (Εικόνα 3.4.2.1.).

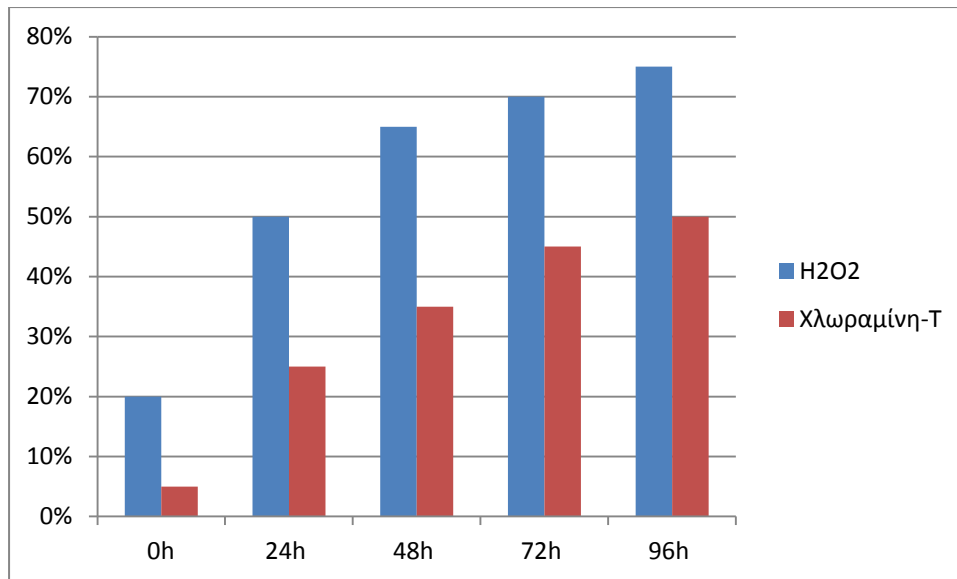
Κατά την εμβάπτιση, με την χλωραμίνη T, τα λαβράκια: παρέμειναν στον πυθμένα, σε λήθαργο, ενώ προς το τέλος της εμβάπτισης, εμφάνισαν ανησυχία, ταχύπνοια, γρήγορες κινήσεις βραγχοκαλυμμάτων, σκούρο χρωματισμό δέρματος. Το νερό μύριζε έντονα χλώριο, ενώ στα νεκρά λαβράκια διαπιστώθηκαν: υπεραιμία στα βράγχια.

Αποδείχθηκε πως η μεσαία θανατηφόρα συγκέντρωση (Lethal Concentration 50) (LC50), για το υπεροξειδίο του υδρογόνου, στις 24 h, είναι τα 640ppm/30min και για την χλωραμίνη-T, στις 96 h, είναι η συγκέντρωση 80ppm/60min. Διαγράμματα 3.4.5-3.4.6.

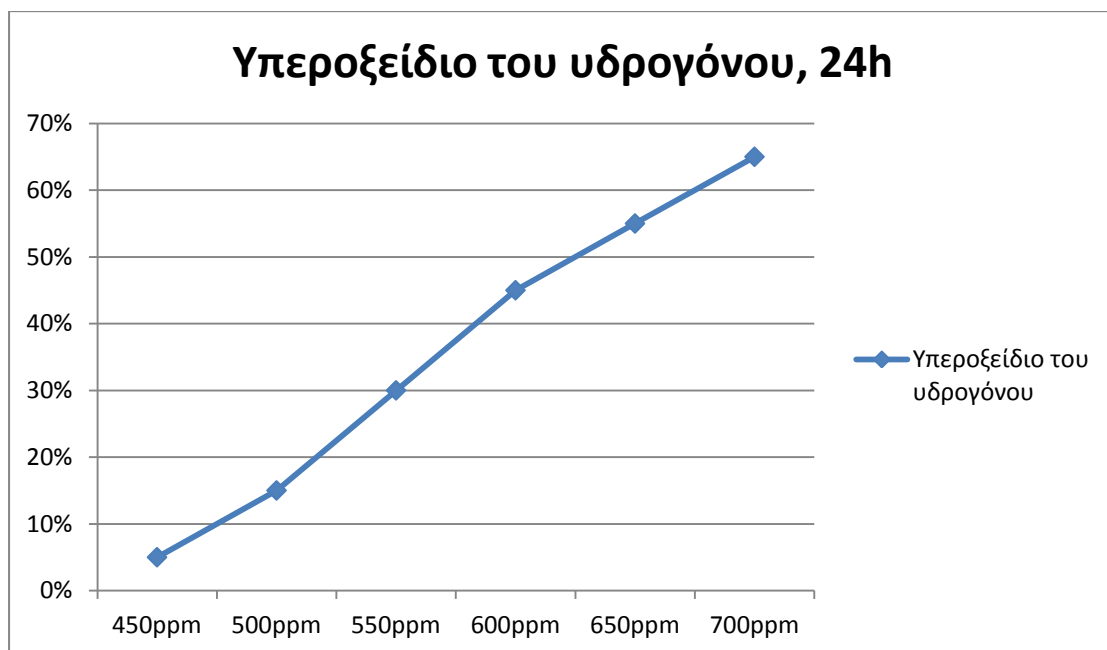
Όλα τα ιχθύδια εμφάνισαν ερεθισμό, προσπάθεια να βγουν από το ενυδρείο, απώλεια ισορροπίας, αύξηση των αναπνευστικών κινήσεων με γρήγορη κίνηση των βραγχοκαλυμμάτων.

**Πίνακας 3.4.3.** Προσδιορισμός της θανατηφόρου συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T, σε ιχθύδια λαβρακιού.

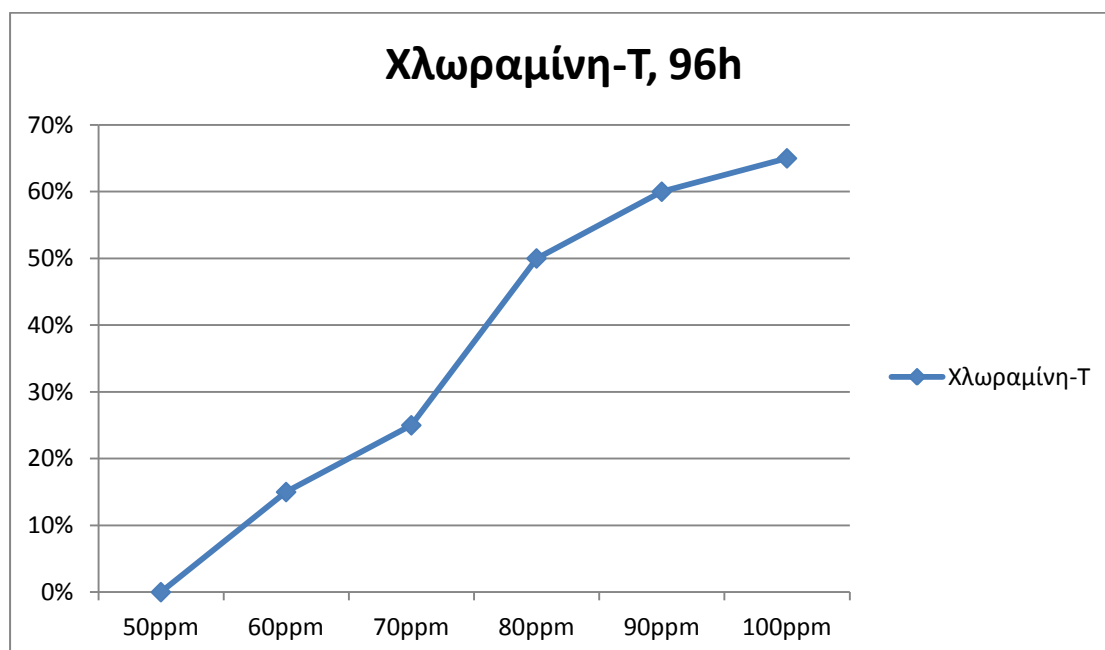
<b>Υπεροξειδίο του υδρογόνου, 640ppm/30min</b>		<b>Χλωραμίνη-T, 80ppm/60min</b>	
Χρονικό διάστημα από την εμβάπτιση	Αριθμός νεκρών ψαριών	Χρονικό διάστημα από την εμβάπτιση	Αριθμός νεκρών ψαριών
Κατά την εμβάπτιση	4	Κατά την εμβάπτιση	1
<b>24h μετά την εμβάπτιση</b>	6	24h μετά την εμβάπτιση	4
48h μετά την εμβάπτιση	3	48h μετά την εμβάπτιση	2
72h μετά την εμβάπτιση	1	72h μετά την εμβάπτιση	2
96h μετά την εμβάπτιση	1	<b>96h μετά την εμβάπτιση</b>	1
Σύνολο νεκρών	15/20	Σύνολο νεκρών	10/20
Θνησιμότητα	75%	Θνησιμότητα	50%



Διάγραμμα 3.4.4. Θνησιμότητα για τα ιχθύδια λαβρακιού, από το Υπεροξείδιο του υδρογόνου, 640ppm/30min και την Χλωραμίνη-T, 80ppm/60min, συγκριτικά, 96h μετά την εμβάπτιση.



Διάγραμμα 3.4.5. Ιχθύδια λαβρακιού. Υπεροξείδιο του υδρογόνου, υπολογισμός LC50. Άξονας χ (συγκέντρωση ουσίας) και άξονας ψ (θνησιμότητα) ώστε να φαίνεται σε ποια συγκέντρωση αντιστοιχεί η θνησιμότητα 50% του πληθυσμού των ψαριών



Διάγραμμα 3.4.6. Ιχθύδια λαβρακιού. Χλωραμίνη-T, υπολογισμός LC50. Άξονας χ (συγκέντρωση ουσίας) και άξονας ψ (θνησιμότητα) ώστε να φαίνεται σε ποια συγκέντρωση αντιστοιχεί η θνησιμότητα 50% του πληθυσμού των ψαριών

**Πίνακας 3.4.4.** Ο Πίνακας, δείχνει τις LC50 ( $\text{mg L}^{-1}$ ) για το Υπεροξείδιο του υδρογόνου και την Χλωραμίνη-T, σε διαφορετικούς χρόνους έκθεσης στις 12, 24 και 48 h, για τα ιχθύδια λαβρακιού.

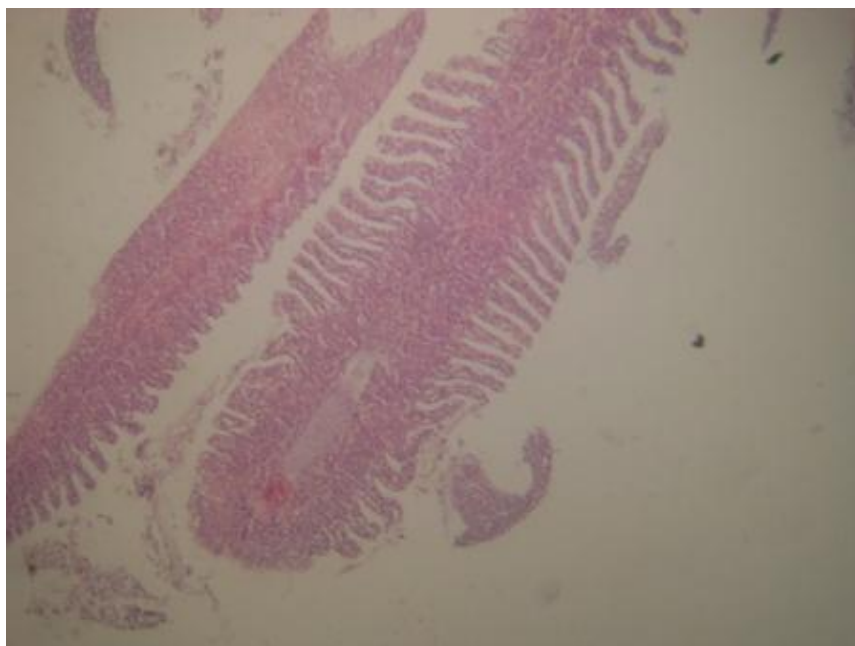
Υπεροξείδιο του υδρογόνου	Lethal concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Χλωραμίνη-T	Lethal concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Διάρκεια έκθεσης	LC50	Διάρκεια έκθεσης	LC50
24h	640	24h	112
48h	618	48h	104
72h	605	72h	92
96h	590	96h	80

Για το κάθε πείραμα, πραγματοποιούνταν 2 επαναλήψεις.

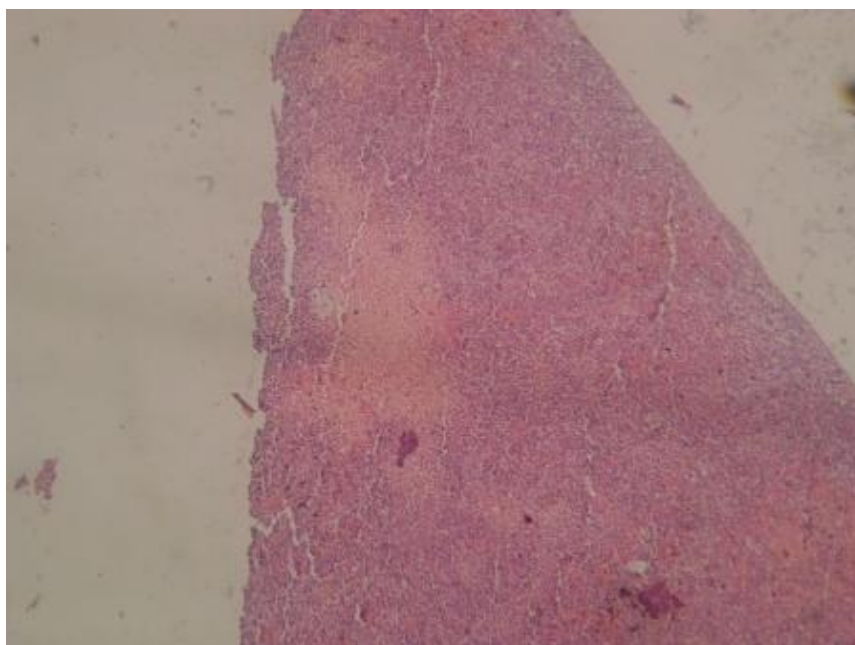
### 3.4.3 Ιστοπαθολογική εξέταση

Η επίδραση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  και της χλωραμίνης-T, προκάλεσε αποδιοργάνωση και νέκρωση του βραγχιακού επιθηλίου. Πράγματι, η μικροσκοπική εξέταση ιστολογικών παρασκευασμάτων από ιστό βραγχίων, ετοιμοθάντων ψαριών στα οποία έγιναν εμφυτεύσεις με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των δύο διαλυμάτων, έδειξαν σημαντική βλάβη και αλλαγές στα βράγχια, κυρίως υπεραιμία και νέκρωση.

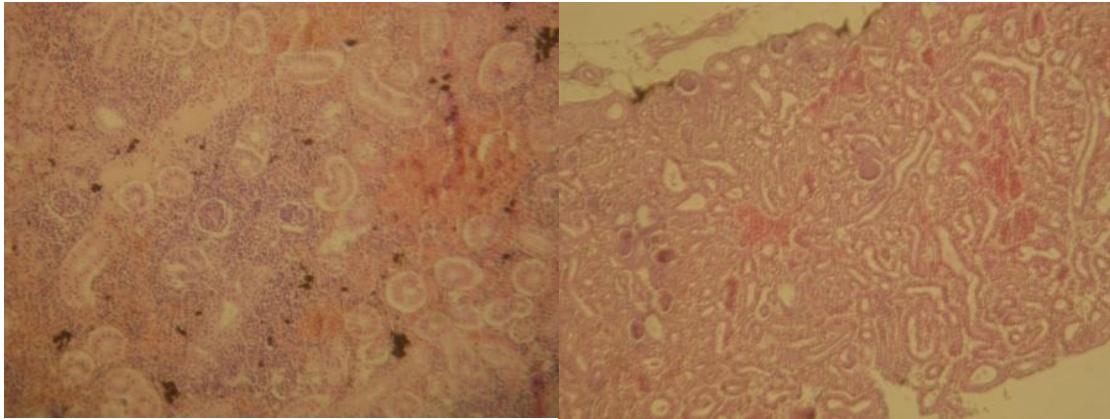
Όσον αφορά, τις εμβαπτίσεις με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις των δύο διαλυμάτων, παρατηρήθηκαν ιστολογικά, νέκρωση και αιμορραγίες στους νεφρούς και στο ήπαρ, σε κάποιες περιπτώσεις (Εικόνες 3.4.3.1.-3.4.3.4.).



Εικόνα 3.4.3.1. Νέκρωση του βραγχιακού επιθηλίου Συγκόλληση στην βάση των πρωτογενών βραγχιακών νηματίων, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).



Εικόνα 3.4.3.2. Εστιακές νεκρώσεις στο ήπαρ, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).



Εικόνες 3.4.3.3. & 3.4.3.4. Αιμορραγίες στο νεφρό, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x).

### 3.5 Εφαρμογή στην πράξη

Μετά την πραγματοποίηση των 2 εμβαπτίσεων με χλωραμίνη-Τ, η θνησιμότητα μειώθηκε στην διάρκεια των επόμενων 5 ημερών. Ελάχιστα νεκρά ιχθύδια (5-10 νεκρά/ημέρα) παρατηρήθηκαν στην διάρκεια των 10 ημερών παρακολούθησης και τα ιχθύδια επανήλθαν πλήρως στην διάρκεια των επόμενων 15 ημερών, δίνοντας ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την χρήση της χλωραμίνης-Τ, στις ιχθυοκαλλιέργειες για την αντιμετώπιση της νόσου της μυξοβακτηριδίασης.

Τα βασικά συμπεράσματα που προκύπτουν από τα ευρήματα της διατριβής αυτής είναι:

- Το μυξοβακτηρίδιο *T. maritimum* εντοπίστηκε και απομονώθηκε από 7 διαφορετικά, εκτρεφόμενα θαλάσσια είδη ψαριών στην Ελλάδα: λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), τσιπούρα (*Sparus aurata*), λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*), φαγκρί (*Pargus pargus*), μυλοκόπι (*Umbrina Cirrosa*), μυτάκι (*Diplodus puntazzo*), και συκίο (*Sciaena umbra*). ενώ για πρώτη φορά διεθνώς, το *T. maritimum*, απομονώθηκε από εκτρεφόμενο συκίο (*Sciaena umbra*).
- Το *T. maritimum*, απομονώνεται από τα ψάρια, σε ποσοστό 39.25% (314/800), ακόμη και αν τα ψάρια είναι φαινομενικά υγιή.
- Η πλειοψηφία των στελεχών του *T. maritimum*, απομονώθηκε κατά την διάρκεια του φθινοπώρου, με ποσοστό προσβολής 56% (112/200).

- Ο μικρότερος αριθμός μυξοβακτηριδίων απομονώθηκε από τα ψάρια, κατά την διάρκεια του χειμώνα με ποσοστό προσβολής 29% (58/200).
- Όσον αφορά τις μέσες τιμές ποσοστού προσβολής του βακτηρίου και το ποσοστό μόλυνσης ανάλογα με το είδος ψαριού: πιο ευπαθές αποδεικνύεται το λαβράκι με περισσότερες απομονώσεις (128/200) και μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής (64%). Αντίθετα η τσιπούρα παρά τις μεγάλες ιχθυοπυκνότητες που διαχειριστικά υιοθετούνται κατά την εκτροφή της, παρουσιάζει μικρό ποσοστό προσβολής και με μικρή διακύμανση ανά εποχή. Τα λυθρίνια επίσης εμφάνισαν το μικρότερο ποσοστό προσβολής, με μικρή διακύμανση ανά εποχή (18.75%).
- Σε σχέση με την εποχικότητα, φαίνεται πως το ποσοστό παρουσίας των μυξοβακτηριδίων, για όλα τα είδη, είναι αυξημένο το φθινόπωρο, (56%), όπου και εντοπίστηκαν οι υψηλότερες θερμοκρασίες στο θαλασσινό νερό. Κατά την θερινή περίοδο διαπιστώθηκε επίσης μια μικρή αύξηση της θνησιμότητας από την άνοιξη, προς την αρχή του καλοκαιριού. Το γεγονός αυτό συνέπεσε με την παράλληλη ανάπτυξη αποικιών από *Listonella anguillarum*, σε μερικά είδη ψαριών, όπως το μυλοκόπι και ο συκίος. Η απομόνωση του *Listonella anguillarum* από το μυλοκόπι, από δείγμα νεφρού έγινε για πρώτη φορά.
- Η παθολογία, φαίνεται να σχετίζεται με την άνοδο της θερμοκρασίας του νερού της θάλασσας. Από αυτό συνεπάγεται ότι το αυξημένο ποσοστό παρουσίας των μυξοβακτηριδίων σχετίζεται και με την αύξηση της θερμοκρασίας του νερού, 17°C-19°C (112/200 ψάρια), η οποία θεωρείται κρίσιμος παράγοντας στην εξέλιξη της παθογένειας του βακτηρίου.
- Εκτός από το γεγονός του μεγάλου ποσοστού προσβολής των ψαριών, η μεγαλύτερη θνησιμότητα και οι πιο έντονες αλλοιώσεις της νόσου εντοπίστηκαν στην ομάδα των ψαριών με μικρό σωματικό βάρος από 0.5-3gr.
- Κατά την μακροσκοπική και νεκροτομική εξέταση, τα ασθενή ιχθύδια εμφάνισαν κοινή συμπτωματολογία, χαρακτηριστική της νόσου της μυξοβακτηριδίασης, όπως ανορεξία, καχεξία, λήθαργος, αιμορραγίες στις γνάθους, αιμορραγική στοματίτιδα, αποχρωματισμό δέρματος, ωχροκίτρινες νεκρωτικές αλλοιώσεις στο δέρμα, στα πτερύγια και στην ουρά, υπεραιμία στα πτερύγια, διάβρωση της ουράς και των πτερυγίων. Σε όλα τα δείγματα,

δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα και αλλοιώσεις συστηματικής μόλυνσης και αλλοιώσεις σε εσωτερικά όργανα.

- Από τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών εξετάσεων για τα δείγματα από το δέρμα και βράγχια, πιο αποτελεσματικά θρεπτικά υποστρώματα αποδείχθηκαν από δείγματα δέρματος, το FMM θρεπτικό υπόστρωμα (n=108) και από δείγματα βραγχίων το τροποποιημένο AOA (n=76). Το FMM επίσης αποδείχθηκε το πιο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για την αρχική ανάπτυξη του *T. maritimum* από τα δείγματα ψαριών. Προσπάθειες να αναπτυχθούν μυξοβακτηρίδια σε TSA+2%NaCl, TCBS, τροποποιημένο AOA, FMM και MA, παίρνοντας δείγμα από νεφρό και σπλήνα δεν είχαν αποτέλεσμα. Το TSA+2% NaCl επίσης δεν είναι αποτελεσματικό για τα μυξοβακτηρίδια, ενώ οι ανακαλλιέργειες αναπτύσσονται πιο εύκολα σε FMM. Η παρασκευή των υποστρωμάτων FMM & AOA πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 50% θαλασσινό νερό.
- Δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά σε ότι αφορά την ευαισθησία των υποστρωμάτων ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή.
- Η προσθήκη των αντιβιοτικών φλουμεκίνη και νεομυκίνη (με σκοπό την εκλεκτική ανάπτυξη των μυξοβακτηριδίων) στα υποστρώματα δεν ευνόησε την ανάπτυξη των μυξοβακτηριδίων.
- Η καλλιέργεια των μυξοβακτηριδίων αποδείχθηκε δύσκολη μιας και ο αργός ρυθμός ανάπτυξης που τα χαρακτηρίζει, δίνει την ευκαιρία σε λοιπά ευκαιριακά βακτήρια να υποστείλουν την ανάπτυξη τους
- Η πραγματική βέλτιστη θερμοκρασία επώασης για τα μυξοβακτηρίδια, καθορίστηκε στους 19 με 21°C.
- Τα αποτελέσματα του τεστ API 20E, έδειξαν ότι το κυρίως βιοχημικό προφίλ για τα 252 από τα 314 στελέχη *T. maritimum*, ήταν το: 000200410, όπου η ζελατίνη και το υδρόθειο είναι θετικά. Ωστόσο, στην έρευνά μας, ποικίλα αποτελέσματα βρέθηκαν για την ζελατίνη, το τεστ Voges-Proskauer και το υδρόθειο σε εξήντα δύο στελέχη.
- Επίσης τα αποτελέσματα του τεστ API 20E ήταν ίδια στις 2 θερμοκρασίες 27°C και 19°C μετά από 48 ώρες επώαση και δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης, NaCl 2% ή NaCl 0.85% ή αποστειρωμένο θαλασσινό νερό 50%.

- Σε ότι αφορά τα βιοχημικά συστήματα API, το βιοχημικό προφίλ ήταν παρόμοιο για όλα τα στελέχη ανεξαρτήτως γεωγραφικού σημείου όπου εντοπίστηκαν, και του είδους όπου απομονώθηκαν, εντός των ελληνικών συνόρων. Στοιχεία που υποδηλώνουν πως παρατηρείται μια ομοιογένεια στον Ελλαδικό χώρο σε ότι αφορά τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του *T. maritimum*.
- Τα αποτελέσματα της μοριακής ταυτοποίησης και της PCR, επιβεβαίωσαν ότι το υπεύθυνο αίτιο στις περιπτώσεις των ψαριών με τις αλλοιώσεις αλλά και των υγιών ψαριών, ήταν το βακτήριο *T. maritimum*. Το πρωτόκολλο PCR που χρησιμοποιήθηκε για αυτή την έρευνα και έχει περιγραφεί προηγουμένως από τον Toyama και συνεργάτες (1996), αποδείχθηκε αποτελεσματικό για την ταυτοποίηση και ανίχνευση των στελεχών που απομονώθηκαν.
- Η απομόνωση του γενετικού υλικού και ταυτοποίηση μέσω PCR κρίνεται καταλληλότερη σε σύγκριση με τα API καθώς ο χρόνος ο οποίος απαιτείται μέχρι την ταυτοποίηση είναι μικρότερος. Επιπλέον, η ταυτοποίηση μέσω μοριακών τεχνικών, δεν απαιτεί απαραίτητα την καλλιέργεια του παθογόνου σε θρεπτικά υποστρώματα αλλά γίνεται απευθείας λήψη μολυσμένου ιστού από τον φορέα.
- Σχετικά με την ταυτόχρονη προσβολή από τα μονογενή παράσιτα, αποδείχθηκε πως το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής από τα παράσιτα, και για τα 7 είδη ψαριών, εντοπίστηκε, το φθινόπωρο (28%), που συμπίπτει με το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής από το *T. maritimum* (56%).
- Οι κύριες ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις των ψαριών, εντοπίστηκαν στο βραγχιακό επιθήλιο και στο δέρμα. Παρατηρήθηκαν υπεραιμία των βραγχίων, αιματώματα, τελαγγιεκτασία στα βράγχια, υπερτροφία και υπερπλασία του επιθηλίου, συγκόλληση των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων, άρση του αναπνευστικού επιθηλίου, υπερπλασία και υπερτροφία βλεννογόνων κυττάρων, μικροαποικίες των βακτηρίων στο επιθήλιο. Στο δέρμα, παρατηρήθηκαν πλήρη απώλεια της επιδερμίδας και του χορίου. Παρατηρήθηκε επίσης συγκέντρωση και αύξηση του αριθμού των μελανοφόρων κυττάρων στο δέρμα, παρουσία βακτηρίων στο χόριο και στην επιδερμίδα, σπογγίωση, νέκρωση και φλεγμονώδης διήθηση.
- Τα αποτελέσματα του αντιβιογράμματος για τα στελέχη του *T. maritimum* απέδειξαν ότι η φύση του θρεπτικού υποστρώματος επηρεάζει το μέγεθος του



κύκλου αναστολής γύρω από τα δισκία αντιβιοτικών. Συγκεκριμένα, στο Μ.Α. δεν σχηματίστηκαν ευκρινείς κύκλοι αναστολής. Το FMM και το τροποποιημένο ΑΟΑ αποδείχθηκαν αποτελεσματικότερα για την δοκιμή του αντιβιογράμματος, σχηματίζοντας σαφείς κύκλους αναστολής.

- Όλα τα στελέχη του *T. maritimum* εμφάνισαν παρόμοιο προφίλ ευαισθησίας, καθώς εμφάνισαν ευαισθησία στην σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη, οξυτετρακυκλίνη, αμοξυκιλίνη και φλουμεκίνη και ανθεκτικότητα στο οξολινικό οξύ, στον βιμπριοστατικό παράγοντα 0.129 και στην νεομυκίνη.
- Συνολικά, 314 στελέχη *T. maritimum* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν, με βάση τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά και την μοριακή ταυτοποίηση από όλα τα δείγματα ψαριών (n=800) που συλλέχθηκαν. Σε κάθε στέλεχος δόθηκε ένας συγκεκριμένος κωδικός ταυτοποίησης. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν από το λαβράκι (n = 128), από την τσιπούρα (n = 52), από το λυθρίνι (n = 30), από το φαγκρί (n = 38), από το μυλοκόπι (n = 31), από το μυτάκι (n = 16) και από τον συκίο (n = 19). Αυτά τα στελέχη απομονώθηκαν κυρίως από το δέρμα, τις δερματικές αλλοιώσεις, τα πτερύγια και τα βράγχια και όχι από εσωτερικά όργανα.
- Τα στελέχη, μετά την απομόνωση τους και την ταυτοποίησή τους, διατηρήθηκαν στην κατάψυξη, στους -80°C, με σκοπό την ίδρυση και λειτουργία μιας τράπεζας μυξοβακτηριδίων, μιας τράπεζας αναφοράς μόνον για μυξοβακτηρίδια, απομονωμένων από τις Ελληνικές Ιχθυοκαλλιέργειες, για οποιαδήποτε επιστημονική μελέτη μπορεί να γίνει, είτε για επιδημιολογικούς λόγους, είτε για το σχεδιασμό αντιμετώπισης κάποιων σημαντικών ασθενειών.
- Από τις πειραματικές μολύνσεις που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τον έλεγχο της παθογόνου δράσης των απομονωμένων βακτηριδιακών στελεχών του *T. maritimum* σε ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού, η προσπάθεια πειραματικής μόλυνσης με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση βακτηρίων δεν ήταν ικανή να προκαλέσει θνησιμότητα ή να προκαλέσει την νόσο στα ψάρια. Η παρατεταμένη εμφάνιση των ψαριών για 18 ώρες με διάλυμα βακτηριών του *T. maritimum* αποδείχθηκε αποτελεσματικότερη μέθοδος πρόκλησης της μυξοβακτηριδίασης.
- Το μοντέλο πειραματικής μόλυνσης των ψαριών, με εμφάνιση, σε συγκέντρωση βακτηρίων από  $1.0 \times 10^6$  cells/ml έως  $1.5 \times 10^6$  cells/ml που

περιγράφηκε σε αυτή την έρευνα, αποδείχθηκε αποτελεσματικό και μπορεί να αποτελέσει την βάση για μελλοντικές επιδημιολογικές μελέτες, με σκοπό την πρόληψη και έλεγχο της μυξοβακτηριδίασης.

- Τα πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια λαβρακιού και τσιπούρας με εμφύσηση, εμφάνισαν παρόμοιες αλλοιώσεις με τα φυσικά μολυσμένα ψάρια, όπως ανορεξία, λήθαργο, εξωτερικές δερματικές αλλοιώσεις και έλκη, αιμορραγίες στις γνάθους, αιμορραγική στοματίτιδα, ωχροκίτρινες νεκρωτικές αλλοιώσεις στο δέρμα, στα πτερύγια και στην ουρά, διάβρωση και νέκρωση των πτερυγίων, ιδιαίτερα του ουραίου πτερυγίου και υψηλή θνησιμότητα (λαβράκι 65%, τσιπούρα 35%).
- Αποδείχθηκε η παθογένεια των απομονωμένων στελεχών καθώς και η αποτελεσματικότητα της πειραματικής εμφύσησης στην εκδήλωση της νόσου στα πειραματικά μολυσμένα ψάρια. Η θνησιμότητα για τα ιχθύδια τσιπούρας άρχισε την 3η ημέρα, μέχρι και την 18η ημέρα (14 νεκρές/40 σύνολο), θνησιμότητα 35%, στο τέλος των πειραμάτων. Η θνησιμότητα για τα ιχθύδια λαβρακιού άρχισε την 3η ημέρα, μέχρι και την 19η ημέρα (26 νεκρά/40 σύνολο), θνησιμότητα 65%.
- Οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στα πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια εντοπίστηκαν κυρίως στο δέρμα και τα βράγχια και ήταν παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στα φυσικά μολυσμένα ψάρια.
- Από τις εμφύσεις των πειραματικά μολυσμένων ιχθυδίων τσιπούρας (2 επαναλήψεις) και λαβρακιών (3 επαναλήψεις) με: υπεροξειδίου του υδρογόνου (διάλυμα 35%), στην δόση: 200ppm/30min και χλωραμίνη-T στην δόση: 12-15ppm/60min, αποδείχθηκε πως το υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και η χλωραμίνη-T, μπορούν να θεωρηθούν αποτελεσματικοί τρόποι αντιμετώπισης της μυξοβακτηριδίασης
- Μετά την ολοκλήρωση των πειραματικών μολύνσεων και εμφύσεων με τα δύο διαλύματα, στα ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού, τα ιχθύδια ανταποκρίθηκαν στην θεραπεία, εμφανίζοντας μείωση της θνησιμότητας. Στα λαβράκια, με την χρήση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η θνησιμότητα μειώθηκε από 65% στο 7.5% και με την χρήση της χλωραμίνης-T, η θνησιμότητα μειώθηκε από 65% στο 5%. Στις τσιπούρες, με την χρήση του

υπεροξειδίου του υδρογόνου, η θνησιμότητα μειώθηκε από 50% στο 40% και την χρήση της χλωραμίνης-T, η θνησιμότητα μειώθηκε από 50% στο 30%.

- Συγκρίνοντας την αποτελεσματικότητα των 2 ουσιών, για τα ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού, δεν προέκυψε σημαντικά στατιστική διαφορά μεταξύ των θνησιμοτήτων που προκλήθηκαν από το υπεροξείδιο του υδρογόνου και από τη χλωραμίνη-T.
- Μέσω των πειραματικών μολύνσεων, αποδείχθηκε πως η χρήση της χλωραμίνης-T και του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι πολύ αποτελεσματική και πολλά υποσχόμενη στην αντιμετώπιση της μυξοβακτηριδίασης στα θαλασσινά εκτρεφόμενα μεσογειακά είδη ιχθύων, που μπορεί να περιορίσει τόσο το ποσοστό προσβολής και την ένταση της μυξοβακτηριδίασης όσο και τις θνησιμότητες.
- Όσον αφορά τα ιχθύδια τσιπούρας, αποδείχθηκε πως η μεσαία θανατηφόρα συγκέντρωση (Lethal Concentration 50) (LC50), για το υπεροξείδιο του υδρογόνου, στις 48 h, είναι τα 640ppm/30min και για την χλωραμίνη-T, στις 48 h, είναι η συγκέντρωση 80ppm/60min.
- Όσον αφορά τα ιχθύδια λαβρακιού, αποδείχθηκε πως η μεσαία θανατηφόρα συγκέντρωση (Lethal Concentration 50) (LC50), για το υπεροξείδιο του υδρογόνου, στις 24 h, είναι τα 640ppm/30min και για την χλωραμίνη-T, στις 96 h, είναι η συγκέντρωση 80ppm/60min.
- Τέλος, όσον αφορά την εφαρμογή στην πράξη, αποδείχθηκε πως η χρήση της χλωραμίνης-T, με 2 εμβαπτίσεις στην συγκέντρωση των 12ppm/60min στην θεραπευτική αντιμετώπιση μολυσμένων με μυξοβακτηρίδια ιχθυδίων τσιπούρας, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική.
- Στο μέλλον, περισσότερη έρευνα πρέπει να γίνει για τον καθορισμό των πηγών μόλυνσης, των μηχανισμών μετάδοσης και λοιμογόνου δύναμης, της κλινικής σημασίας, της αντίστασης στα αντιβιοτικά, των νέων επιλογών θεραπείας (υπεροξείδιο του υδρογόνου, χλωραμίνη-T) και την ανάπτυξη εμβολιακών σκευασμάτων έναντι των μολύνσεων με μυξοβακτηρίδια.
- Απαραίτητη επίσης κρίνεται μελλοντικά, η διεξοδική έρευνα σχετικά με την παθολογία των νέων ειδών που μπαίνουν στις μονάδες εκτροφής, όπως το μυλοκόπι και ο συκιάς. Με αυτό τον τρόπο θα προσδιοριστούν οι παθογόνοι

παράγοντες του κάθε είδους, διευκολύνοντας κάθε προσπάθεια εκτροφής τους.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>**

### **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Οι ιχθυοκαλλιέργειες στην Ελλάδα αποτελούν έναν από τους πιο σημαντικούς τομείς της ζωικής παραγωγής με σημαντικό ποσοστό εξαγωγών της παραγόμενης ποσότητας. Ωστόσο, τα νοσήματα και η παθολογία των εκτρεφόμενων ψαριών, αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που αντιμετωπίζουν σήμερα οι ιχθυοκαλλιέργειες σε παγκόσμιο επίπεδο καθώς επηρεάζουν την ανάπτυξη των ψαριών, προκαλούν μείωση της παραγωγής, αύξηση του κόστους και προβλήματα στην ευζωία των ψαριών.

Συγκεκριμένα, η μυξοβακτηριδίαση που αποτελεί το αντικείμενο έρευνας της διδακτορικής διατριβής, αποτελεί περιοριστικό παράγοντα εκτροφής πολλών θαλασσινών ψαριών σε περιοχές της Ευρώπης, της Αμερικής και της Ιαπωνίας. Στα θαλασσινά είδη ψαριών, το κύριο αίτιο της νόσου είναι το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum*.

Η νόσος έχει αναφερθεί σε πολλά είδη εκτρεφόμενων ψαριών, τόσο στην Ελλάδα όσο και παγκοσμίως αλλά δεν υπάρχουν εκτεταμένες μελέτες για την ασθένεια αυτή ιδίως σε μεσογειακά είδη. Επιπλέον η απομόνωση των βακτηρίων αυτών θεωρείται δύσκολη και απαιτεί εξειδικευμένη γνώση και εκλεκτικά υποστρώματα. Σε περιπτώσεις εμφάνισης της νόσου στα ψάρια, θεραπεύονται συνήθως χωρίς αντιβιογράμματα, με αποτέλεσμα να γίνονται άσκοπες, πολλές φορές, θεραπείες που επιβαρύνουν το περιβάλλον και το τελικό προϊόν και έχουν επίπτωση στην ανθεκτικότητα των μικροβίων στα αντιβιοτικά. Η καλλιέργεια και ταυτοποίηση των πιο παθογόνων ειδών θα μπορέσει να βοηθήσει στη εξεύρεση πιο ειδικών και γρήγορων τεχνικών για την άμεση αντιμετώπισή τους και την σωστή θεραπεία (McVicar & White, 1979,1982; Wakabayashi et al., 1986; Bernardet & Grimont, 1989; Devesa et al., 1989; Pazos et al., 1993, 1996; Chen et al., 1995; Handler et al., 1997; Ostland et al., 1999; Santos et al., 1999; Suzuki et al., 2001; Avendaño-Herrera et al., 2004a, 2004b,2005; Salati et al., 2005; Toranzo et al., 2005; Vatsos, 2007; Piñeiro-Vidal et al., 2008a,b; Lee et al., 2009; Oh et al., 2012; Piñeiro-Vidal et al., 2012; Failde et al., 2013).

#### **4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΟΧΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΟ *Tenacibaculum maritimum* ΣΕ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ**

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η παρουσία του βακτηρίου *T. maritimum* σε εκτρεφόμενα είδη θαλάσσιων ψαριών σε διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας κατά

την διάρκεια τεσσάρων (4) εποχικών δειγματοληψιών. Για πρώτη φορά στην Ελλάδα, στελέχη του βακτηρίου *T. maritimum* από θαλασσινά είδη ψαριών, συλλέχθηκαν απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν βιοχημικά και μοριακά, ελέγχθηκε η λοιμογόνος δύναμή τους και στη συνέχεια κωδικοποιήθηκαν και αποθηκεύτηκαν.

Στην παρούσα έρευνα παρατηρήθηκε πως το βακτηρίδιο *T. maritimum*, απομονώνεται από τα θαλασσινά εκτρεφόμενα ψάρια, σε ποσοστό 39.25% (314/800) παρόλο που κατά την διάρκεια των δειγματοληψιών, πολλά ψάρια δεν εμφάνιζαν κανένα από τα χαρακτηριστικά συμπτώματα και αλλοιώσεις της νόσου. Αυτή η έρευνα, απέδειξε την παρουσία του βακτηριδίου *T. maritimum* σε επτά (7) διαφορετικά, εκτρεφόμενα θαλάσσια είδη ψαριών στην Ελλάδα, ενώ για πρώτη φορά διεθνώς, το *T. maritimum*, απομονώθηκε από εκτρεφόμενο συκίο (*Sciaena umbra*).

Αποδείχθηκε πως η πλειοψηφία των στελεχών του *T. maritimum*, απομονώθηκε κατά την διάρκεια του φθινοπώρου, με ποσοστό προσβολής 56% (112/200). Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί με προηγούμενη έρευνα που αφορούσε περισσότερα είδη βακτηρίων και πραγματοποιήθηκε από τις Yiagnisis & Athanassopoulou (2011) στην Ελλάδα, σε τσιπούρα και λαβράκι όπου επίσης η πλειοψηφία των βακτηριακών στελεχών απομονώθηκε το φθινόπωρο.

Ο μικρότερος αριθμός μυξοβακτηριδίων απομονώθηκε από τα ψάρια, κατά την διάρκεια του χειμώνα, με ποσοστό προσβολής 29% (58/200). Αυτά τα αποτελέσματα, συμφωνούν με τα αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από τους Yiagnisis & Athanassopoulou (2011) και Company et al. (1999) όπου βακτηριολογικές και παρασιτολογικές μελέτες σε ψάρια στην περιοχή της Μεσογείου, απέδειξαν μια στενή συσχέτιση μεταξύ της υψηλής θνησιμότητας και της υψηλής θερμοκρασίας νερού.

Σε σχέση με την εποχικότητα, φαίνεται πως το ποσοστό παρουσίας των μυξοβακτηριδίων, για όλα τα είδη: λαβράκι, τσιπούρα, λυθρίνι, φαγκρί, μυλοκόπι, μυτάκι και συκίο είναι αυξημένο το φθινόπωρο (56%), όπου και εντοπίστηκαν οι υψηλότερες θερμοκρασίες στο θαλασσινό νερό. Κατά την θερινή περίοδο διαπιστώθηκε επίσης μια μικρή αύξηση της θνησιμότητας από την άνοιξη, προς την αρχή του καλοκαιριού. Το γεγονός αυτό συνέπεσε με την παράλληλη ανάπτυξη αποικιών από *Listonella anguillarum*, σε μερικά είδη ψαριών, όπως το μυλοκόπι και ο συκίος. Η απομόνωση του *Listonella anguillarum* από το μυλοκόπι, από δείγμα νεφρού έγινε για πρώτη φορά στην Ελλάδα.

Τα ευρήματα, φαίνεται να σχετίζονται με την άνοδο της θερμοκρασίας του νερού της θάλασσας, αφού τα ποσοστά παρουσίας των μυξοβακτηριδίων αυξήθηκαν με την αύξηση της θερμοκρασίας του νερού, 17°C-19°C (112/200 ψάρια), η οποία θεωρείται κρίσιμος παράγοντας στην εξέλιξη της παθογένειας του βακτηρίου. Γεγονός που ταυτίζεται και βιβλιογραφικά, καθώς παρατηρείται συχνότερη παρουσία του βακτηρίου σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 15°C, ενώ αυξάνεται παράλληλα και η ένταση της νόσου, σύμφωνα με τους Pazos et al. (1996), Handlinger et al. (1997), Santos et al. (1999) και Avendaño-Herrera et al. (2006). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί πιο σπάνια περιστατικά της μυξοβακτηριδίασης κατά την διάρκεια του χειμώνα, από τους Wakabayashi et al. (1984), Bernardet et al. (1994) και Soltani et al. (1996). Πιθανά, στην παρούσα μελέτη το ποσοστό εμφάνισης και η σοβαρότητα της μυξοβακτηριδίασης να αυξήθηκε, σε θερμοκρασίες νερού άνω των 15°C και με την ταυτόχρονη παρουσία διαφόρων παραγόντων καταπόνησης. Συγκεκριμένα, κατά την διάρκεια των δειγματοληψιών από τις μονάδες παρατηρήθηκαν σε ορισμένες περιπτώσεις υψηλή ιχθυοπυκνότητα και προηγήθηκαν χειρισμοί μεταφοράς των ψαριών, ενώ διαπιστώθηκε και η ταυτόχρονη παρουσία παρασίτων στα βράγχια, ειδικά το φθινόπωρο. Επιπλέον το έτος 2011 όπου και διενεργήθηκαν οι δειγματοληψίες (άνοιξη, καλοκαίρι, φθινόπωρο) καταγράφηκαν υψηλές θερμοκρασίες νερού γεγονός που ευνοούσε την ανάπτυξη μικροβιακών πληθυσμών στη στήλη του νερού. Τον χειμώνα του 2012 καταγράφηκαν σημαντικά χαμηλότερες θερμοκρασίες κατά τις δειγματοληψίες.

Ασφαλή συμπεράσματα ως προς το ποσοστό προσβολής και την συσχέτιση ανά οικογένεια ιχθύων δεν μπορούν να εξαχθούν, καθώς θα πρέπει να συνυπολογίζονται και άλλοι παράμετροι κυριότερη εκ των οποίων αποτελεί η ιχθυοπυκνότητα. Η ένταση εκτροφής από μόνη της και η υψηλή ιχθυοπυκνότητα αποτελεί παράγοντα ανάπτυξης βακτηρίων, καθώς προκαλεί καταπόνηση στα ψάρια και ευνοεί την μετάδοση των παθογόνων παραγόντων ανάμεσα στα εκτρεφόμενα ψάρια σύμφωνα και με τους Chen et al. (1995), Magariños et al. (1995), Handlinger et al. (1997), Noga (2000) και Roberts (2001).

Εκτός από την θερμοκρασία του νερού, η καταπόνηση στα ψάρια μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την εκδήλωση της ασθένειας. Νερά με υψηλό οργανικό φορτίο, κανιβαλισμός, ανεπαρκής διατροφή, μεγάλες αλλαγές στην θερμοκρασία, υψηλή ιχθυοπυκνότητα, μεταφορές και χειρισμοί αποτελούν φυσικοχημικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι ενισχύουν την εκδήλωση της ασθένειας.



Τέτοιοι παράγοντες καταπόνησης είναι συνήθεις στα συστήματα υδατοκαλλιεργειών και έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες έρευνες από τους McVicar & White (1979, 1982), Wakabayashi et al. (1984), Chen et al. (1995), Magariños et al. (1995), Handler et al. (1997), Roberts (2001) και Toranzo et al. (2005), όπου περιστατικά έξαρσης της νόσου εμφανίστηκαν μετά από την μεταφορά των ιχθυδίων στους κλωβούς στην θάλασσα.

Όσον αφορά το ποσοστό προσβολής ανάλογα με το είδος ψαριού, πιο ευπαθές από τα θαλασσινά είδη ψαριών αποδεικνύεται το λαβράκι με περισσότερες απομονώσεις (128/200) και μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής (64%) και στις τέσσερες εποχές, με μικρές διακυμάνσεις ανά εποχή. Σε προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκαν από τις Yiagnisis & Athanassopoulou (2011), σχετικά με τα είδη βακτηρίων που απομονώνονται από εκτρεφόμενα και άγρια θαλασσινά ψάρια στην Ελλάδα, στο λαβράκι επίσης απομονώθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό παθογόνων βακτηρίων, σε σχέση με τα άλλα είδη. Αντίθετα η τσιπούρα παρά τις μεγάλες ιχθυοπυκνότητες που διαχειριστικά υιοθετούνται κατά την εκτροφή της, παρουσιάζει μικρό ποσοστό προσβολής και με μικρή διακύμανση ανά εποχή. Επίσης μικρά ποσοστά προσβολής με μικρή διακύμανση ανά εποχή προκύπτουν και για το λυθρίνι. Τα λυθρίνια εμφάνισαν το μικρότερο ποσοστό προσβολής και στις τέσσερες δειγματοληψίες (18.75%). Αντίθετα, τα είδη της οικογένειας Sciaenidae παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά προσβολής. Πιο συγκεκριμένα ο συκίος προσβάλλεται σε μεγάλο ποσοστό με μικρή διακύμανση ανά εποχή, ενώ στο μυλοκόπι το ποσοστό προσβολής αυξάνεται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία. Στην παρούσα έρευνα για πρώτη φορά διεθνώς, πραγματοποιείται μια σύγκριση του ποσοστού προσβολής από το μυξοβακτηρίδιο *T. maritimum*, ανάλογα με το είδος ψαριών, ανάμεσα σε επτά (7) διαφορετικά εκτρεφόμενα είδη.

Εκτός από το γεγονός του μεγάλου ποσοστού προσβολής των ψαριών, η μεγαλύτερη θνησιμότητα και οι πιο έντονες αλλοιώσεις της νόσου εντοπίστηκαν στην ομάδα των ψαριών με σωματικό βάρος από 0.5-3gr. Αυτό σχετίζεται με την προφανή μεγαλύτερη ευαισθησία αυτής της ομάδας των ψαριών στο *T. maritimum*. Το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενες έρευνες κατά τις οποίες η ευαισθησία των ψαριών στην νόσο εξαρτάται από την ηλικία και το μέγεθος των ψαριών. Οι ίδιοι ερευνητές απέδειξαν ότι η νόσος εμφανίζεται πιο συχνά σε ψάρια με βάρος από 1-80gr ενώ ψάρια άνω των 100gr εμφανίζονται πιο ανθεκτικά στην νόσο (McVicar & White, 1979; Wakabayashi et al., 1984; Bernardet et al., 1994; Handler et al.,

1997; Avendaño-Herrera et al., 2005). Αυτό το συμπέρασμα οφείλεται προφανώς στην μεγαλύτερη ευαισθησία των μικρότερων σε ηλικία και μέγεθος ψαριών, όπου οι σοβαρές αλλοιώσεις των προσβεβλημένων ιστών μπορούν να εξελιχθούν σε προχωρημένες ελκωτικές αλλοιώσεις και να προκαλέσουν τον θάνατο, μέσα σε λίγες μέρες, σύμφωνα με τους Bernardet et al. (1994). Επιπλέον, σε αυτή την ηλικία τα ιχθύδια δεν έχουν αναπτύξει ακόμη πλήρως το ανοσοποιητικό τους σύστημα, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην προσβολή από *T. maritimum*.

#### 4.1.1 Μακροσκοπική και Νεκροτομική εξέταση

Κατά την μακροσκοπική και νεκροτομική εξέταση, τα ασθενή ιχθύδια εμφάνισαν κοινή συμπτωματολογία με κλινική εικόνα που χαρακτηριζόταν από: ανορεξία, καχεξία, λήθαργος, αιμορραγίες στις γνάθους, αιμορραγική στοματίτιδα, αποχρωματισμό δέρματος, ωχροκίτρινες νεκρωτικές αλλοιώσεις στο δέρμα, στα πτερύγια και στην ουρά, υπεραιμία στα πτερύγια, διάβρωση της ουράς και των πτερυγίων, παρόμοια συμπτώματα με αυτά που έχουν ήδη αναφερθεί βιβλιογραφικά από προηγούμενους ερευνητές, Pazos et al. (1993), Chen et al. (1995), Handler et al. (1997), Ostland et al. (1999), Santos et al. (1999), Avendaño-Herrera et al. (2004a), Salati et al. (2005) και Toranzo et al. (2005) για την νόσο της μυξοβακτηριδίασης στα ψάρια.

Σε όλα τα δείγματα, δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα και αλλοιώσεις συστηματικής μόλυνσης και αλλοιώσεις σε εσωτερικά όργανα, τόσο στα φαινομενικά υγιή ψάρια, όσο και στα ψάρια που έφεραν εμφανείς αλλοιώσεις της νόσου, και όλη η παθολογία σχετιζόταν με τις αλλοιώσεις στα εξωτερικά όργανα. Αυτό το συμπέρασμα έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες έρευνες σε πειραματικά και φυσικά μολυσμένα ψάρια, με το στέλεχος *T. maritimum* 89/4762 που απομονώθηκε από την Τασμανία (1989) σε σολομούς του Ατλαντικού, από τους Handler et al. (1997) και με τα στελέχη *T. maritimum* PC503.1, ACC6.1, PC424.1, σε πειραματικά μολυσμένα καλκάνια, από τους Avendaño-Herrera et al. (2006). Με εξαίρεση τα δείγματα από το μυλοκόπι. Στο μυλοκόπι, το έντερο εμφάνισε εικόνα εντερίτιδας με ορώδες κίτρινο περιεχόμενο, σε ένα μεγάλο αριθμό ιχθύων (36/60) από κάθε δειγματοληψία, πιθανά τυχαίο εύρημα, λόγω της ταυτόχρονης προσβολής των ψαριών από το βακτήριο *Listonella anguillarum* το οποίο θα μπορούσε να

αποικήσει το βλεννογόνο του εντέρου και να προκαλέσει εντερίτιδα. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και περιστατικά μυξοβακτηριδίασης σε ψάρια, στα οποία παρατηρήθηκε συστηματική μόλυνση και αλλοιώσεις σε εσωτερικά όργανα, όπως στον νεφρό και σπλήνα εξαιτίας της νόσου, σε προηγούμενες έρευνες από τους Alsina & Blanch (1993), Cepeda & Santos (2002), Avendaño-Herrera et al., (2004b), υποδεικνύοντας ότι το *T. maritimum* διαθέτει ισχυρούς μηχανισμούς λοιμογόνου δύναμης.

Η θνησιμότητα, στις περιπτώσεις εμφάνισης της νόσου κυμαίνονταν 5-10%, φτάνοντας το 20-30%. Προηγούμενες μελέτες, από τους Handlinger et al. (1997) απέδειξαν ότι η καταπόνηση αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για την παθογένεια του *T. maritimum*. Η μεγάλη ιχθυοπυκνότητα, οι χειρισμοί, η υψηλή θερμοκρασία νερού και άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, μπορούν να επιδράσουν στο ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών, καταστρέφοντας το, προκαλώντας αύξηση της κορτιζόλης στο αίμα τους και μειώνοντας την αντίστασή τους στην εκδήλωση νοσημάτων, σύμφωνα και με τους Barcellos et al. (1999), Yiagnisis (2011) και Kunttu et al. (2012)

#### 4.1.2 Βακτηριολογική εξέταση

Όσον αφορά τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών εξετάσεων, στο FMM και M.A θρεπτικό υπόστρωμα αναπτύχθηκαν αποικίες τυπικές του *T. maritimum*. Πρόκειται για αποικίες μυξοβακτηριδίων με μορφολογία παρόμοια με αυτή που περιγράφεται βιβλιογραφικά από τους Pazos et al. (1996), Avendaño-Herrera et al. (2006) και οι οποίες αντιστοιχούσαν στο βακτήριο *T. maritimum*, υπεύθυνο μικροβιακό παράγοντα πρόκλησης της μυξοβακτηριδίασης. Επίσης, οι αποικίες στο τροποποιημένο με 50% θαλασσινό νερό AOA, μορφολογικά αντιστοιχούσαν στο βακτήριο *T. maritimum*, σύμφωνα και με τους Wakabayashi et al. (1986), Pazos et al. (1996) και Avendaño-Herrera et al. (2006).

Στην παρούσα έρευνα αποδείχθηκε για πρώτη φορά ότι η χρήση των τροποποιημένων με προσθήκη 50% θαλασσινό νερό υποστρωμάτων AOA και FMM, είναι αποτελεσματική για την ανάπτυξη του *T. maritimum*, ενώ οι Pazos και συνεργάτες (1996) αναφέρουν μόνο την προσθήκη 100% ή 70% θαλασσινό νερό, ως διαλύτη. Να σημειωθεί ότι το τροποποιημένο AOA, με την προσθήκη διαλύτη 50% θαλασσινό νερό αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματικό και δεν υπάρχει έτοιμο εμπορικό σκεύασμα. Στην έρευνα μας, τα τροποποιημένα υποστρώματα AOA και FMM,

χρησιμοποιώντας ως διαλύτη 50% θαλασσινό νερό εμφάνισαν σαφώς βελτιωμένα αποτελέσματα από τις πρώτες 48 ώρες, καθώς παρατηρήθηκαν αρκετές αποικίες μυξοβακτηριδίων με μορφολογία παρόμοια με αυτή που περιγράφεται βιβλιογραφικά από τους Pazos et al. (1996).

Για τα δείγματα νεφρού και σπλήνα, μετά την επώαση στα θρεπτικά υποστρώματα TSA+2%NaCl και TCBS διαπιστώθηκε η ανάπτυξη πλήθους κινητών και ακίνητων βακτηρίων με σχήμα κόκκων-κοκκοβάκιλων, όπως η ανάπτυξη αποικιών του *Listonella (Vibrio) anguillarum*. Στην παρούσα έρευνα, προσπάθειες να αναπτυχθούν μυξοβακτηρίδια σε τροποποιημένο ΑΟΑ, FMM, Μ.Α λαμβάνοντας δείγματα από νεφρό ή σπλήνα δεν είχαν αποτέλεσμα, εξαιτίας πιθανόν της μη εντόπισης του βακτηρίου στα εσωτερικά όργανα. Το TSA+2% NaCl αποδείχθηκε επίσης μη αποτελεσματικό, ενώ οι ανακαλλιέργειες αναπτύχθηκαν πιο εύκολα σε FMM. Επίσης, οι αποικίες αναπτύχθηκαν πιο γρήγορα σε δείγματα που ελήφθησαν από το δέρμα σε σχέση με τα βράγχια (FMM, ΜΑ, ΑΟΑ). Αυτό το συμπέρασμα πιθανά να οφείλεται στο γεγονός ότι οι αρχικές εστίες μόλυνσης με το *T. maritimum*, είναι οι επιφάνειες του σώματος και το δέρμα. Το *T. maritimum* προσκολλάται ισχυρά στο δέρμα και στην βλέννα των ψαριών (Magariños et al., 1995). Η εντόπιση του βακτηρίου μέσα στο στρώμα της βλέννας, υποδεικνύει πως το *T. maritimum* μπορεί να αποτελεί μέρος του αυτόχθονου πληθυσμού του δέρματος του ψαριού, και επομένως το βακτήριο μπορεί να παραμείνει στο υδάτινο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα, χρησιμοποιώντας το δέρμα σαν δεξαμενή (Avendaño-Herrera, 2005b).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε σολομοειδή, οι Powell και συνεργάτες (2004) εμβολίασαν μια μεγάλη συγκέντρωση βακτηρίων ( $4 \times 10^{11}$  με  $10^{12}$  κύτταρα ανά ψάρι) σε βράγχια σολομού, προκαλώντας ποικίλες θνησιμότητες στα ψάρια, παρατήρησαν ωστόσο πως η αναπνευστική διαταραχή ήταν αποτέλεσμα της τριβής των βραγχιών, παρά της μόλυνσης με το βακτήριο. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν πως τα βράγχια δεν αποτελούν μια σημαντική οδό μόλυνσης με το *T. maritimum*, γι' αυτό και το *T. maritimum* αναπτύσσεται δυσκολότερα σε δείγματα από βράγχια, σύμφωνα και με την παρούσα έρευνα.

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, εκτός από τα μυξοβακτηρίδια, στις αλλοιώσεις, συχνά εντοπίστηκαν, σαπροφυτικοί οργανισμοί, όπως βλεφαριδοφόρα παράσιτα και βακτήρια. Αυτά τα αποτελέσματα, έρχονται σε συμφωνία βιβλιογραφικά με τα ευρήματα από προηγούμενες μελέτες των McVicar & White

(1979), Devesa et al. (1989), Chen et al. (1995), Handler et al. (1997), Avendaño-Herrera et al. (2006) και Mitchell & Rodger (2011).

Στα περισσότερα από τα εξωτερικά δείγματα, και άλλα είδη βακτηρίων αναπτύχθηκαν στα υποστρώματα FMM και MA, εξαιτίας της χαρακτηριστικής αργής ανάπτυξης του *T. maritimum* και της υπερανάπτυξης των άλλων βακτηρίων που συνυπάρχουν στα εξωτερικά δείγματα και υπερκαλύπτουν την ανάπτυξή του, αναστέλλοντας το, αποτελέσματα που συμφωνούν και με έρευνες από τους Pazos et al. (1996), Hikida et al. (1979), Handler et al. (1997) και Avendaño-Herrera et al. (2004c). Τα περισσότερα βακτήρια που απομονώθηκαν, αναγνωρίστηκαν ως είδη που ανήκουν στο γένος *Vibrio*, καθώς επίσης και βακτήρια που ανήκουν στα είδη, *L. anguillarum*, *A. salmonicida* και κινητά είδη *Aeromonas* περιστασιακά απομονώθηκαν. Αυτά τα ετερότροφα, αλλόφιλα βακτήρια (*Vibrio*, *Pseudomonas* και *Alteromonas* spp.) αναπτύσσονται γρήγορα σε δείγματα από δέρμα, και καταφέρνουν να αναστείλουν την ανάπτυξη του *T. maritimum*. Συμπερασματικά η καλλιέργεια των μυξοβακτηριδίων είναι αρκετά δύσκολη μιας και ο αργός ρυθμός ανάπτυξης που τα χαρακτηρίζει, δίνει την ευκαιρία σε λοιπά ευκαιριακά βακτήρια να υποστεύουν την ανάπτυξη τους, σύμφωνα και με έρευνες των McVicar & White (1979), Devesa et al. (1989), Chen et al. (1995), Handler et al. (1997), Avendaño-Herrera et al. (2006) και Mitchell & Rodger (2011).

Η δυσκολία εντοπίζεται στο να αναγνωριστούν οι αποικίες του *T. maritimum*, μεταξύ των μικτών αποικιών που αναπτύσσονται, καθώς και άλλα επιμήκη βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Flexibacter*, *Cytophaga* ή *Flavobacterium* μπορούν να αναγνωριστούν λάθος ως *T. maritimum*.

Η προσθήκη των αντιβιοτικών φλουμεκίνη, σε συγκέντρωση 2ppm (2mg/l) και νεομυκίνη, σε συγκέντρωση 4ppm (4mg/l) τόσο στο M.A όσο και στο F.M.M., μετά από επώαση στους 19<sup>0</sup>C, δεν ευνόησαν την ανάπτυξη των μυξοβακτηριδίων. Συμπερασματικά η προσθήκη των αντιβιοτικών φλουμεκίνη και νεομυκίνη στα υποστρώματα δεν ευνοεί την ανάπτυξη των μυξοβακτηριδίων. Σύμφωνα μάλιστα με τον Avendaño-Herrera και συνεργάτες (2008), το θρεπτικό υπόστρωμα, FMM και φλουμεκίνη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο του για την αρχική ανάπτυξη του *T. maritimum*, καθώς μπορεί να αποκλείσει ευαίσθητα στελέχη, όπως παρατηρήθηκε στην δική μας έρευνα.

Αποδείχθηκε επίσης πως η ιδανική και βέλτιστη θερμοκρασία επώασης καθορίστηκε στους 19 με 21<sup>0</sup>C, αντί για 25<sup>0</sup>C όπως προτείνεται από τους Pazos et al.

(1996), καθώς αυτή η θερμοκρασία ευνόησε την ανάπτυξη των μυξοβακτηριδίων και ανέστειλε την ανάπτυξη των ετερότροφων, θαλάσσιων βακτηρίων. Αποδείχθηκε ότι το FMM θρεπτικό υπόστρωμα και το τροποποιημένο AOA ήταν τα πιο αποτελεσματικά θρεπτικά υποστρώματα για την ανάπτυξη του *T. maritimum* από τα δείγματα του δέρματος και των βραγχίων αντίστοιχα. Επιπλέον, το FMM εμφάνισε την μεγαλύτερη ανασταλτική ικανότητα ανάπτυξης των ετερότροφων, θαλάσσιων βακτηρίων και καλύτερη ικανότητα ανάπτυξης του *T. maritimum*. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες των Pazos et al. (1996) και Avendaño-Herrera et al. (2008). Σε προηγούμενη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα, σε μικρότερο όμως αριθμό ψαριών από τους Kolygas et al. (2012), το FMM επίσης αποδείχθηκε το πιο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για την αρχική ανάπτυξη του *T. maritimum* από τα δείγματα ψαριών.

Ο μεγαλύτερος αριθμός στελεχών του *T. maritimum* απομονώθηκε από δείγματα δέρματος σε FMM θρεπτικό υπόστρωμα (n=108) και από δείγματα βραγχίων σε τροποποιημένο AOA (n=76). Το MA αποδείχθηκε αποτελεσματικό για την ανάπτυξη του *T. maritimum*, ιδιαίτερα στην περίπτωση των δειγμάτων από την τσιπούρα. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η αρχική αποτυχία να αναπτυχθεί το *T. maritimum* από τα δείγματα των ψαριών, χρησιμοποιώντας το MA και TSA+2%NaCl μπορεί να είναι αποτέλεσμα της ικανότητας αυτών των υποστρωμάτων να ευνοούν την ανάπτυξη ετερότροφων, αλλόφιλων βακτηρίων, αναστέλλοντας το *T. maritimum*, σύμφωνα και με τους Pazos et al. (1996).

#### 4.1.3 Στατιστική ανάλυση

Στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα, ότι η ευαισθησία των υποστρωμάτων (FMM, MA, AOA και TSA), όσον αφορά την ικανότητα απομόνωσης του *T. maritimum* είναι ανεξάρτητη από την γεωγραφική περιοχή δειγματοληψίας (Αιγαίο-Ιόνιο) και για τις τέσσερες δειγματοληψίες. Στοιχεία που υποδηλώνουν ίσως μια ομοιογένεια των στελεχών του *T. maritimum* στον Ελλαδικό χώρο σε ότι αφορά τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του και την ικανότητα απομόνωσης του.

Όσον αφορά την ικανότητα απομόνωσης του *T. maritimum* από τα θρεπτικά υποστρώματα ανάλογα με το όργανο απομόνωσης (δέρμα, βράγχια, σπλήνας, νεφρός) αποδείχθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα, πως ο σπλήνας και ο νεφρός δεν

αποτελούν όργανα όπου το βακτήριο εντοπίζεται. Πιθανά αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι το *T. maritimum* προσκολλάται ισχυρά στο δέρμα και στην βλέννα των ψαριών (Magariños et al., 1995) και εκεί προκαλεί τις κυριότερες αλλοιώσεις, σύμφωνα και με τους Pazos et al. (1993), Chen et al. (1995), Handler et al. (1997), Ostland et al. (1999), Santos et al. (1999), Avendaño-Herrera et al. (2004a), Salati et al. (2005) και Toranzo et al. (2005).

Στην παρούσα έρευνα αποδείχθηκε επίσης για πρώτη φορά στην Ελλάδα, με βάση τα αποτελέσματα από τις τέσσερες (4) εποχικές δειγματοληψίες, πως το θρεπτικό υπόστρωμα τροποποιημένο ΑΟΑ παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα απομόνωσης συγκριτικά με τα υπόλοιπα υποστρώματα. όταν γίνεται λήψη υλικού από τα βράγγια, ανεξάρτητα από το είδος ψαριού και πως το υπόστρωμα FMM παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα απομόνωσης από το δέρμα συγκριτικά με τα υπόλοιπα υποστρώματα. Είναι η πρώτη έρευνα που πραγματοποιείται, συγκρίνοντας την ικανότητα απομόνωσης του *T. maritimum* από τα θρεπτικά υποστρώματα ανάλογα με το όργανο απομόνωσης, σε θαλασσινά εκτρεφόμενα ψάρια.

Επιπλέον η ικανότητα απομόνωσης του βακτηρίου δεν παραμένει ίδια και για τα επτά (7) είδη ιχθύων όταν γίνει λήψη υλικού από το δέρμα. Πράγματι όπως προκύπτει και από τα περιγραφικά στατιστικά φαίνεται πως από τα είδη της οικογένειας Sciaenidae (μυλοκόπι, συκίος) και Moronidae (λαβράκι) είναι ευκολότερο να απομονωθεί το βακτήριο ανεξάρτητα από το υπόστρωμα που θα χρησιμοποιηθεί. Στον αντίποδα από τα είδη της οικογένειας Sparidae (τσιπούρα, φαγκρί, λυθρίνι και μυτάκι) που είναι δυσκολότερο να απομονωθεί το βακτήριο. Σε προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκαν από τις Yiagnisis & Athanassopoulou (2011), στην Ελλάδα, στο λαβράκι επίσης απομονώθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό παθογόνων βακτηρίων, σε σχέση με τα άλλα είδη. Όσον αφορά το μυλοκόπι και τον συκίο αποτελούν νέα εκτρεφόμενα μεσογειακά είδη ιχθύων και γίνονται προσπάθειες για την αποτελεσματική εντατική εκτροφή τους (Chao & Trewavas, 1990; Ballarin et al., 2004). Ωστόσο, ο αριθμός των μελετών σχετικά με την παθολογία τους είναι πολύ περιορισμένος (Dalla Valle et al., 2000; Noga, 2000; Vatsos et al., 2006; Ternengo et al., 2010; Katharios & Tsigenopoulos, 2010). Απαραίτητη επομένως κρίνεται η διεξοδική έρευνα σχετικά με την διερεύνηση της παθολογίας των νέων ειδών που μπαίνουν στις μονάδες εκτροφής για να προσδιοριστούν οι παθογόνοι παράγοντες του κάθε είδους.

#### 4.1.4 Μικροσκοπική εξέταση νωπών επιχρισμάτων και επιχρισμάτων μετά από χρώση Gram

Από την μικροσκοπική εξέταση επιχρισμάτων από το δέρμα και τα βράγχια, με Gram χρώση παρατηρήθηκαν: Gram αρνητικοί, λεπτοί, επιμήκεις βάκιλοι, 2-30μm μήκος και 0.5μm διάμετρο, χαρακτηριστικοί του *T. maritimum*. Σε νωπά επιχρίσματα διαπιστώθηκε επίσης ότι οι βάκιλοι ήταν κινητοί (κίνηση ολίσθησης), σύμφωνα και με τους Pazos et al. (1996) και Santos et al. (1999).

Όταν οι βάκιλοι, παρέμειναν για μεγαλύτερο χρόνο επώασης, πάνω από 3 ημέρες εμφάνισαν τάση να γίνουν μικρότεροι σε μέγεθος και να γίνουν σφαιρικοί, ένα χαρακτηριστικό που επίσης αναφέρεται από τους Wakabayashi et al. (1986), Chen & Henry-Ford, (1995) και Avendaño-Herrera et al. (2006).

#### 4.1.5 Βιοχημική ταυτοποίηση

Όσον αφορά την βιοχημική ταυτοποίηση των στελεχών και τα αποτελέσματα του API 20E, το κυρίως βιοχημικό προφίλ για τα διακόσια πενήντα δύο (252) από τα τριακόσια δέκα τέσσερα (314) στελέχη *T. maritimum*, ήταν το: 000200410, όπου η ζελατίνη και το υδρόθειο είναι θετικά.

Όλα τα στελέχη ήταν θετικά στο τεστ οξειδάσης, καταλάσης, απορρόφηση κόκκινο του Congo και στην μείωση των νιτρικών. Αυτά τα αποτελέσματα των βιοχημικών συστημάτων API είναι παρόμοια με προηγούμενα που έχουν αναφερθεί σε μελέτες και βιβλιογραφικές πηγές από τους Wakabayashi et al. (1986), Bernardet et al. (1990), Pazos et al. (1990, 1996), Ostland et al. (1999), Suzuki et al. (2001), Buller (2004), Avendaño-Herrera et al. (2004a, 2008, 2009) και Mourinho et al. (2008). Ωστόσο, στην έρευνά μας, ποικίλα αποτελέσματα βρέθηκαν για την ζελατίνη, το τεστ Voges-Proskauer και το υδρόθειο, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες από τους Chen et al. (1995), Avendaño-Herrera et al. (2004a) και Kolygas et al. (2012).

Πιο συγκεκριμένα, είκοσι έξι (26) στελέχη που απομονώθηκαν από λαβράκι, με τον κωδικό (LV2), εμφάνισαν στο API 20E βιοχημικό προφίλ 040100410, όπου το υδρόθειο και το τεστ Voges-Proskauer είναι θετικά. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με το βιοχημικό προφίλ του βακτηρίου που είχε βρεθεί σε προηγούμενη μελέτη από τους Kolygas et al. (2012) για τα στελέχη του *T. maritimum* σε λαβράκι και τσιπούρα, στην Ελλάδα. Δέκα (10) στελέχη που απομονώθηκαν από λαβράκι, με



τον κωδικό (LV3), και δέκα έξι (16) στελέχη που απομονώθηκαν από φαγκρί, με τον κωδικό (P2) εμφάνισαν στο API 20E βιοχημικό προφίλ 000300410, όπου η ζελατίνη και το τεστ Voges- Proskauer είναι θετικά. Τέλος, οκτώ (8) στελέχη που απομονώθηκαν από λυθρίνι, με τον κωδικό (L2), και δύο (2) στελέχη που απομονώθηκαν από συκίο, με τον κωδικό (SU2) εμφάνισαν στο API 20E βιοχημικό προφίλ 040200410, όπου το υδρόθειο και η ζελατίνη είναι θετικά.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του συστήματος βιοχημικής ταυτοποίησης API 20E, διακόσια πενήντα δύο (252) στελέχη, μειώνουν τα νιτρικά, είναι θετικά στην ζελατίνη και δεν παράγουν υδρόθειο (H<sub>2</sub>S), αποτελέσματα που συμφωνούν και με την προϋπάρχουσα βιβλιογραφία, από τους Wakayabashi et al. (1986), Bernardet et al. (1990), Hansen et al. (1992) και Ostland et al. (1999). Ωστόσο σε τριάντα έξι (36) στελέχη του *T. maritimum* δεν παρατηρείται μείωση στα νιτρικά και είναι θετικά σε υδρόθειο, αποτελέσματα σύμφωνα με τους Chen et al. (1995) και Avendaño-Herrera et al. (2004a). Συνεπώς υπάρχει μια διαφωνία ως προς το H<sub>2</sub>S με αρκετές δημοσιεύσεις των Bernardet et al. (1990), Hansen et al. (1992), Chen et al. (1995) και Avendaño-Herrera et al. (2004). Επίσης στην παρούσα έρευνα παρατηρήθηκε πως τα αποτελέσματα του τεστ API 20E είναι ίδια στις 2 θερμοκρασίες 27°C και 19°C μετά από 48 ώρες επώαση και δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης, NaCl 2% ή NaCl 0.85% ή αποστειρωμένο θαλασσινό νερό 50%.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του συστήματος API ZYM, θετικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στις πρώτες έντεκα (11) αντιδράσεις, σε όλα τα στελέχη που συμφωνούν με τα ευρήματα άλλων ερευνών από τους Bernardet et al. (1990) και Ostland et al. (1999).

Το βιοχημικό προφίλ των στελεχών, εμφάνισε ομοιότητα όταν το σύστημα API ZYM, χρησιμοποιήθηκε. Αυτό το προφίλ των βακτηρίων, είναι παρόμοιο με προφίλ που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες μελέτες από τον Buller (2004), επιβεβαιώνοντας την βιοχημική ομοιογένεια του είδους. Τέλος, όσον αφορά τα αποτελέσματα του API 50 CH, δεν παρατηρήθηκε οξειδωση-αφομοίωση των υδρογονανθράκων.

Σε ότι αφορά τα βιοχημικά συστήματα API, το βιοχημικό προφίλ ήταν παρόμοιο για όλα τα στελέχη ανεξαρτήτως γεωγραφικού σημείου όπου εντοπίστηκαν, και του είδους όπου απομονώθηκαν, εντός των ελληνικών συνόρων. Στοιχεία που υποδηλώνουν μια ομοιογένεια στον Ελλαδικό χώρο σε ότι αφορά τα βιοχημικά

χαρακτηριστικά του *T. maritimum*, σύμφωνα και με προηγούμενη έρευνα από τους Kolygas et al. (2012).

Στις περισσότερες βιβλιογραφικές παραπομπές το βιοχημικό προφίλ των μυξοβακτηρίων δεν είναι ικανό να αποτελέσει μέσο διαφορικής διάγνωσης σε επίπεδο είδους. Στην παρούσα μελέτη εξετάζονται συνολικά 90 βιοχημικές συνιστώσες και γίνεται προσπάθεια αφενός για διαφορική διάγνωση σε επίπεδο είδους, και αφετέρου για να προκύψει ένας πίνακας βιοχημικής αναφοράς για αυτό το βακτήριο.

#### **4.1.6 Μοριακή ταυτοποίηση-Απομόνωση Γενετικού υλικού PCR**

Τα αποτελέσματα της μοριακής ταυτοποίησης και της PCR, επιβεβαίωσαν ότι το υπεύθυνο αίτιο στις περιπτώσεις των ψαριών με τις αλλοιώσεις αλλά και των υγιών ψαριών, ήταν το βακτήριο *T. maritimum*. Η μοριακή ταυτοποίηση επέτρεψε επίσης την ανίχνευση του παθογόνου από μικτές αποικίες ψαριών με αλλοιώσεις της μυξοβακτηριδίασης, κατά τις οποίες η ανάπτυξη εμφανών αποικιών του *T. maritimum* δεν ήταν πάντα δυνατή.

Όλα τα δείγματα που ήταν θετικά με βάση τις μικροσκοπικές και μικροβιολογικές εξετάσεις, ήταν επίσης θετικά με βάση τις μοριακές εξετάσεις. Η PCR χρησιμοποιείται πλέον με επιτυχία για την διάγνωση της μυξοβακτηριδίασης από το *T. maritimum*, χρησιμοποιώντας δείγματα από δέρμα, βλέννα, μολυσμένους ιστούς καθώς και από μικτές ή καθαρές αποικίες του βακτηρίου, σύμφωνα και με τους Toyama et al. (1996), Bader & Shotts (1998), Cepeda et al. (2003) και Avendaño-Herrera et al. (2004a).

Η αποτελεσματικότητα της χρήσης απευθείας ιστών από το δέρμα των ψαριών για την έγκαιρη διάγνωση της νόσου με την PCR, μπορεί να εξηγηθεί εξαιτίας του αρχικού στόχου μόλυνσης του παθογόνου, που είναι η επιφάνεια του σώματος των ψαριών, σύμφωνα και με τους Magariños et al. (1995) και Handler et al. (1997).

Το πρωτόκολλο PCR που χρησιμοποιήθηκε για αυτή την έρευνα και έχει περιγραφεί προηγουμένως από τον Toyama και συνεργάτες (1996), αποδείχθηκε αποτελεσματικό για την ταυτοποίηση και ανίχνευση των στελεχών που απομονώθηκαν. Περαιτέρω μελέτη χρειάζεται να πραγματοποιηθεί με τα

απομονωμένα στελέχη, που θα δώσει επιπλέον πληροφορίες για την γενετική ποικιλία του *T. maritimum* στην Ελλάδα, στο μέλλον.

Η PCR αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο στην έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση της μυξοβακτηριδίασης στα εκτρεφόμενα, θαλάσσια ψάρια, παίρνοντας δείγμα από τις αποικίες του βακτηρίου αλλά και από τους ιστούς των ψαριών απευθείας. Δεν απαιτείται καλλιέργεια του παθογόνου και αποτελεί έγκαιρη και ευαίσθητη μέθοδο ανίχνευσης του βακτηρίου από δείγματα ψαριών απευθείας.

Η απομόνωση του γενετικού υλικού και η ταυτοποίηση μέσω της PCR κρίνεται καταλληλότερη σε σύγκριση με τα συστήματα ταυτοποίησης API καθώς ο χρόνος ο οποίος απαιτείται μέχρι την ταυτοποίηση είναι μικρότερος. Τα βιοχημικά αντιδραστήρια API παρόλο που επέδειξαν ομοιογένεια αποτελεσμάτων για τα στελέχη *T. maritimum*, απαιτούν πολύ χρόνο (4-5 μέρες) μέχρι να προκύψουν τα αποτελέσματα του βιοχημικού προφίλ. Στον αντίποδα η ταυτοποίηση μέσω μοριακών τεχνικών PCR δεν απαιτεί απαραίτητα την καλλιέργεια του παθογόνου σε θρεπτικά υποστρώματα αλλά γίνεται απευθείας λήψη μολυσμένου ιστού από τον φορέα. Σε καμία όμως περίπτωση, η μοριακή ταυτοποίηση δεν μπορεί να αντικαταστήσει την σημασία και πρακτική αξία εκτέλεσης ενός αντιβιογράμματος, με σκοπό την επιλογή της κατάλληλης αντιβιοτικής θεραπείας για την αντιμετώπιση της μόλυνσης από την μυξοβακτηριδίαση στα ψάρια.

#### **4.1.7 Παρασιτολογική εξέταση**

Σχετικά με την προσβολή από τα μονογενή παράσιτα, αποδείχθηκε πως το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής από τα παράσιτα, και για τα επτά (7) είδη ψαριών, εντοπίστηκε το φθινόπωρο (28%), που συμπίπτει με το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής από το *T. maritimum* (56%). Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η παρουσία των παρασίτων αποτελεί παράγοντα προδιάθεσης για την παρουσία του *T. maritimum* στα ψάρια ή το αντίστροφο.

#### **4.1.8 Ιστοπαθολογική εξέταση**

Οι ιστοπαθολογικές αλλαγές στους ιστούς των ψαριών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλείο διάγνωσης για την επίδραση των βακτηρίων στα όργανα των ψαριών και έχουν μεγάλη διαγνωστική αξία.

Οι αλλοιώσεις εντοπίστηκαν κυρίως στο βραγχιακό επιθήλιο και στο δέρμα. Αποδείχθηκε πως περιοχές του σώματος των ψαριών, όπου υπάρχει συνεχής ερεθισμός, όπως τα θωρακικά και ουραίο πτερύγιο, ευνοούν την ανάπτυξη των αλλοιώσεων.

Η συγκόλληση των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων, αποτέλεσε την συχνότερη ιστοπαθολογική αλλοίωση στην παρούσα μελέτη και ίσως είναι η πιο συχνή αντίδραση των βραγχίων καθώς μειώνει την επιφάνεια ανταλλαγής των αερίων. Παρατηρήθηκαν υπεραιμία των βραγχίων, αιματώματα, τελαγγειεκτασία στα βράγχια, υπερτροφία και υπερπλασία του επιθηλίου, άρση του αναπνευστικού επιθηλίου, μικροαποικίες των βακτηρίων στο επιθήλιο. Απώλεια της φυσιολογικής δομής των βραγχίων και νέκρωση του βραγχιακού επιθηλίου έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες και από τους Handlinger et al. (1997), van Gelderen et al. (2009), Vilar et al. (2012). Η υπερπλασία των βλεννογόνων κυττάρων αυξάνει την απόσταση μεταξύ της ανταλλαγής αερίων στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια, μειώνοντας την ικανότητα ανταλλαγής αερίων και προκαλώντας υποξία. Αυτή η υπερπλασία περιγράφεται σε πολλά ψάρια ως αντίδραση του οργανισμού στην επίδραση παθογόνων παραγόντων και τοξικών ουσιών, ως αρχική γραμμή άμυνας των ψαριών, σύμφωνα με τους van Gelderen et al. (2009).

Τελαγγειεκτασία, συμφόρηση και εστιακές περιοχές με βακτήρια μέσα στο επιθήλιο, έχουν επίσης παρατηρηθεί και από τον Powell et al. (2004, 2005). Είναι γνωστό ότι τα βράγχια των ψαριών είναι από τα πιο ευαίσθητα όργανα, που αντιδρούν πρώτα στις αλλαγές του περιβάλλοντος, καθώς η αναπνοή, η ωσμωρύθμιση και η απέκκριση πραγματοποιούνται μέσω των βραγχίων. Ωστόσο, με την θερμοκρασία του νερού της θάλασσας να συνεχίζει να αυξάνεται, η συχνότητα εμφάνισης του *T. maritimum* μπορεί να αυξηθεί από ελάχιστες εξάρσεις σε χρόνια και συχνό πρόβλημα (Handlinger et al., 1997; van Gelderen et al., 2009).

Η βλάβη στο δέρμα αποτελεί παράγοντα προδιάθεσης για την εισβολή του *T. maritimum*, σύμφωνα και με τους Handlinger et al. (1997). Δεν παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις συστηματικής μόλυνσης στα μολυσμένα ψάρια και όλη η παθολογία συνδέθηκε με τα εξωτερικά όργανα (δέρμα, βράγχια). Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες έρευνες σε πειραματικά και φυσικά μολυσμένα ψάρια, σολομοί του Ατλαντικού, που πραγματοποιήθηκαν από τους Soltani (1995) και Handlinger et al. (1997).

Αποδείχθηκε από τις εποχικές δειγματοληψίες πως η βλάβη στην επιφάνεια του δέρματος, ειδικά σε μέρη του σώματος όπου η τριβή μπορεί να γίνει εύκολα σε συνθήκες αιχμαλωσίας, σε συνδυασμό με ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη των βακτηρίων, μπορούν να διευκολύνουν τον αποικισμό του επιθηλίου από το *T. maritimum* και την εισβολή του στους ιστούς κάτω από το επιθήλιο.

Οι διαφορές που μπορεί να εντοπιστούν στις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις, μπορεί να είναι αποτέλεσμα της διαφορετικής ανοσολογικής ανταπόκρισης μεταξύ των ειδών των ψαριών ή εξαιτίας του διαφορετικού σταδίου ανάπτυξης των αλλοιώσεων.

Οι κύριες αλλοιώσεις στο δέρμα, χαρακτηρίζονται από την πλήρη απώλεια της επιδερμίδας και του χορίου, καθώς και εκτεταμένη νέκρωση του μυϊκού ιστού. Μια φλεγμονώδης διήθηση με την παρουσία μακροφάγων παρατηρήθηκε γύρω από εκφυλισμένα μυϊκά κύτταρα. Gram αρνητικά, επιμήκη βακτήρια μπορούσαν να εντοπιστούν στο χόριο. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι μόλις τα βακτήρια φτάσουν στο χόριο, πιθανόν μέσω της διαβρωμένης επιδερμίδας, είναι ικανά να πολλαπλασιαστούν και να παράγουν ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την βλάβη των υποκείμενων ιστών. Παρόμοιες μορφοπαθολογικές αλλαγές και αλλοιώσεις σε ψάρια με μυξοβακτηριδίαση, που μολύνθηκαν με το *T. maritimum* έχουν περιγραφεί σε προηγούμενες έρευνες από τους Vilar et al. (2012).

Η βλάβη αυτή στην επιδερμίδα, όχι μόνο διευκολύνει την είσοδο παθογόνων παραγόντων, αλλά προκαλεί επίσης οσμωτικό στρες το οποίο μπορεί να απειλήσει την ζωή των ψαριών. Αυτή η στενή συσχέτιση μεταξύ της βλάβης του δέρματος και της αποίκησης από βακτήρια συχνά, δυσκολεύει την αναγνώριση του αρχικού αιτίου, σύμφωνα και με τον Noga (2000).

Στην γλώσσα (*Solea senegalensis*) έχουν αναφερθεί σοβαρά έλκη που μπορούν να οδηγήσουν σε μια πλήρη απώλεια της επιδερμίδας, του χορίου και της υποδερμίδας, αφήνοντας εκτεθειμένο τον μυϊκό ιστό. Η νέκρωση μπορεί να επεκταθεί και στον μυϊκό ιστό. Παρόμοιες αλλοιώσεις, έχουν αναφερθεί στον σολομό του Ατλαντικού από τους van Gelderen et al. (2011). Στην περιφέρεια των ελκών, μπορεί να παρατηρηθεί απώλεια των λεπιών και οίδημα με φλεγμονώδη κύτταρα. Παρατηρήθηκε επίσης συγκέντρωση και αύξηση του αριθμού των μελανοφόρων κυττάρων στο δέρμα. Αυτή η συγκέντρωση των μελανοφόρων κυττάρων μπορεί να προκαλέσει ένα τοπικό αποχρωματισμό, εξηγώντας την φαιό χρωματισμό των

αλλοιώσεων στο δέρμα που παρατηρείται στα ψάρια που νοσούν από μυξοβακτηριδίαση.

Η παρουσία των βακτηρίων στο χόριο και στην επιδερμίδα, η σπογγίωση, νέκρωση και φλεγμονώδης διήθηση έχουν επίσης αναφερθεί από τους Ferguson et al. (2010) και Vilar et al. (2012).

Συχνά οι βάκιλοι δεν μπορούν να παρατηρηθούν μέσα στο επιθήλιο της επιδερμίδας. Η αδυναμία εύρεσης ορατών βακίλων, στις ιστολογικές τομές του δέρματος, μπορεί να σημαίνει την αδυναμία των βακτηρίων να επιβιώσουν σε ένα περιβάλλον με έντονη δράση της κολλαγενάσης, καθώς το φυσιολογικό επιθήλιο αποτελεί μια αποτελεσματικό φραγμό πρώτης άμυνας, σύμφωνα με τους Handlinger et al. (1997).

Μια σοβαρή φλεγμονώδη διήθηση και αιμορραγία στην επιδερμίδα και στο χόριο, σημαίνει πως αν τα βακτήρια περάσουν την επιδερμίδα, τότε εισέρχονται στους υποκείμενους ιστούς, παράγοντας εξωκυτταρικά ένζυμα. Προηγούμενες μελέτες από τους Pazos (1997) και van Gelderen et al. (2009) έχουν δείξει ότι εξωκυτταρικά προϊόντα (ECP) που παράγονται από το *T. maritimum* μπορούν να προκαλέσουν νέκρωση και είναι ισχυρά τοξικά. Η υπερπλασία των επιθηλιακών και βλεννογόνων κυττάρων είναι αλλοιώσεις που σχετίζονται με την φυσιολογική φλεγμονώδη αντίδραση και αυξάνουν την προστασία της επιδερμίδας ή εμπλέκονται στην αποκατάσταση της φυσιολογικής δομής του δέρματος, σύμφωνα με τον Shephard (1994).

Η ανεύρεση των μονογενών παρασίτων *Diplectanum* sp., *Furnestinia* sp. και *Microcotyle* sp., θα μπορούσε να συνδυαστεί επίσης και με την υπερπλασία των βραγχίων η οποία εντοπίστηκε με την ιστοπαθολογική εξέταση. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε σολομοειδή από τους Handlinger et al. (1997), van Gelderen et al. (2009) και Mitchell & Rodger (2011). Σε ορισμένα δείγματα από το έντερο διαπιστώθηκε επίσης απόπτωση των εντερικών λαχνών και του βλεννογόνου, συγκόλληση των εντερικών λαχνών, υπεραϊμία του εντέρου και εντερίτιδα. Η ύπαρξη του *Listonella anguillarum* το οποίο θα μπορούσε να αποικήσει το βλεννογόνο του εντέρου και να προκαλέσει την εκδήλωση φλεγμονής, σύμφωνα με τους Frans et al (2011) θα μπορούσε επίσης να συνδέεται με την καταρροϊκή εντερίτιδα η οποία αποκαλύφθηκε με τις μακροσκοπικές και ιστοπαθολογικές εξετάσεις του εντέρου, κυρίως στο μυλοκόπι.

#### 4.1.9 Αντιβιόγραμμα

Η πραγματοποίηση του αντιβιογράμματος, είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη διαγνωστική μέθοδος, εμφανίζει υψηλό βαθμό αξιοπιστίας σχετικά με την συγκέντρωση των αντιβιοτικών ενώ ένας μεγάλος αριθμός αντιβιοτικών μπορεί να εξεταστεί από ένα και μόνο απομονωμένο στέλεχος (Alderman & Smith, 2001; Smith, 2001).

Στην παρούσα έρευνα, όλα τα στελέχη *T. maritimum* εμφάνισαν γρήγορα, καθαρούς και σαφώς περιγεγραμμένους κύκλους αναστολής στο FMM, στο οποίο έγινε προσθήκη 50% θαλασσινό νερό μετά από 24 ώρες επώασης. Σύμφωνα με τον Avendaño-Herrera et al. (2005a), το FMM το οποίο παρασκευάζεται με εμπορικά θαλάσσια άλατα, αντί για θαλασσινό νερό είναι επίσης κατάλληλο για την απομόνωση του βακτηρίου και την δοκιμή αντιβιογράμματος.

Επιπλέον, αυτοί οι κύκλοι αναστολής παρέμειναν σταθεροί κατά την διάρκεια επώασης. Αυτά τα πλεονεκτήματα των αντιβιογραμμάτων, προσφέρουν μια άμεση λύση για την επιλογή της κατάλληλης αντιβιοτικής θεραπείας, σε επίπεδο ρουτίνας, στις ιχθυοκαλλιέργειες, σύμφωνα με τον Avendaño-Herrera et al. (2005a). Το τροποποιημένο ΑΟΑ αποδείχθηκε επίσης αποτελεσματικό για την δοκιμή του αντιβιογράμματος, σχηματίζοντας σαφείς κύκλους αναστολής.

Τα αποτελέσματα του αντιβιογράμματος για τα στελέχη του *T. maritimum* απέδειξαν επίσης ότι και η φύση του θρεπτικού υποστρώματος φαίνεται να επηρεάζει το μέγεθος του κύκλου αναστολής γύρω από τα δισκία αντιβιοτικών. Συγκεκριμένα, στο Μ.Α. δεν σχηματίστηκαν ευκρινείς κύκλοι αναστολής. Αυτά τα αποτελέσματα για το Μ.Α. μπορούν να δικαιολογηθούν εξαιτίας των ποιοτικών και ποσοτικών διαφορών στην σύσταση του Μ.Α. σε σύγκριση με τα άλλα ολιγοτροφικά υποστρώματα, κυρίως στις πηγές άνθρακα και αζώτου, και στην παρουσία υπερβολικών ποσοτήτων δισθενών κατιόντων, τα οποία είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τα αποτελέσματα δοκιμής ευαισθησίας των αντιβιοτικών. Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκε πως το FMM, είναι πιο αποτελεσματικό για την δοκιμή αντιβιογράμματος για τα στελέχη του *T. maritimum*.

Ανεξάρτητα από τις διαφορές μεταξύ της αποτελεσματικότητας του ΜΑ, του FMM και του τροποποιημένου ΑΟΑ και ανεξάρτητα από το στέλεχος κάθε φορά, όλα τα στελέχη του *T. maritimum* εμφάνισαν παρόμοιο προφίλ ευαισθησίας. Όλα τα στελέχη εμφάνισαν ευαισθησία στην σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη, οξυτετρακυκλίνη, αμοξυκιλίνη και φλουμεκίνη, Ενώ, εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο

οξολινικό οξύ, στον βιμπριοστατικό παράγοντα 0.129 και στην νεομυκίνη, αποτελέσματα που συμφωνούν και βιβλιογραφικά με τους Alsina & Blanch (1993), Bernardet et al. (1994) και Avendaño-Herrera et al. (2004a, 2005a, 2008).

#### **4.1.10 Τράπεζα Αναφοράς Μυξοβακτηριδίων από τις Ελληνικές, Θαλάσσιες Ιχθυοκαλλιέργειες**

Παρότι η Ελλάδα είναι πρωτοπόρος στην ιχθυοκαλλιέργεια, ωστόσο δεν υπήρχε μια οργανωμένη καταγραφή και αποθήκευση των παθογόνων βακτηρίων που συναντώνται στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες. Μέχρι σήμερα, επίσης μελέτες πάνω στα παθογόνα βακτήρια που προκαλούν προβλήματα στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες, χρησιμοποιούσαν στελέχη από συλλογές βακτηρίων άλλων χωρών, όπως η Ιταλία ή η Γαλλία. Σε πολλές περιπτώσεις τα στελέχη αυτών των χωρών, διαφέρουν αρκετά από τα Ελληνικά στελέχη. Επιπλέον, υπήρχαν πρακτικές δυσκολίες, στην απόκτηση αυτών των βακτηριακών στελεχών από τις τράπεζες του εξωτερικού. Είναι φανερό λοιπόν ότι υπήρχε μία επιτακτική ανάγκη να προχωρήσουμε σε μία καταγραφή και ακριβή ταυτοποίηση των παθογόνων βακτηρίων στην Ελλάδα.

Αυτό το κενό, της ύπαρξης μια τράπεζας παθογόνων βακτηρίων από τις Ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες ήρθε να καλύψει η πρώτη τράπεζα που δημιουργήθηκε. Η πρώτη προσπάθεια αφορούσε το πρωτοποριακό πρόγραμμα «Ίδρυση Τράπεζας Παθογόνων Μικροβίων από τις Ελληνικές Υδατοκαλλιέργειες» στο Μέτρο 4.6 του ΕΠ ΑΛΕΙΑ 2000-2006, το οποίο υλοποιήθηκε από το Εργαστήριο Ιχθυολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Παν/μίου Θεσσαλονίκης και τους συνεργαζόμενους φορείς, το Εργαστήριο Ιχθυολογίας και Ιχθυοπαθολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και το Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών Αθηνών. Η τράπεζα που δημιουργήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος αυτού περιλαμβάνει βακτήρια εκτός των μυξοβακτηριδίων (Angelidis et al., 2008).

Διάφορες τράπεζες μικροβίων, ιδιωτικές και κρατικές, υπάρχουν σήμερα σε πολλές χώρες και περιλαμβάνουν απομονωμένα και ταυτοποιημένα μικρόβια (βακτήρια, ιούς κλπ.). Πληροφορίες για την απομόνωση τους (όπως ιστορικό, προέλευση, είδος ξενιστή, λοιμογόνος δύναμη κλπ.) συνοδεύουν το κάθε στέλεχος.



Αυτές οι πληροφορίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες μελέτες, όπως στην έρευνα της διασποράς των παθογόνων μικροβίων σε μια συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή, εδραιώνοντας ένα σύστημα ελέγχου των μικροβίων και βοηθώντας στην ανάπτυξη εμβολίων (World Federation for Culture Collections Guidelines, 1999).

Αυτή η συλλογή βακτηρίων, μπορεί να αποτελέσει σημαντικό «εργαλείο» πληροφοριών, για τους ανθρώπους που εργάζονται στον τομέα των ιχθυοκαλλιέργειών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση για την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών μέτρων ελέγχου των νοσημάτων των ψαριών, στην Ελλάδα καθώς και στις Μεσογειακές και Ευρωπαϊκές χώρες.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την δεύτερη οργανωμένη προσπάθεια διεύρυνσης της πρώτης τράπεζας, μιας τράπεζας αναφοράς μόνο για μυξοβακτηρίδια, απομονωμένων από τις Ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες.

Τα παθογόνα μυξοβακτηρίδια που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από την μελέτη αυτή αντικατοπτρίζουν τα παθογόνα που κατά κύριο λόγο απομονώνονται στις Ελληνικές και Μεσογειακές ιχθυοκαλλιέργειες τόσα χρόνια, αλλά ως τώρα δεν είχαν ταυτοποιηθεί και αποθηκευτεί για περαιτέρω μελέτη. Από όσο γνωρίζουμε δεν πραγματοποιείται παρόμοια μελέτη στην Ελλάδα ή σε διεθνές επίπεδο, ενώ η συλλογή των βακτηριδίων που δημιουργήθηκε θα φυλάσσεται στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Ιχθυολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής του Π.Θ. Πιστεύεται ότι η συνέχιση της λειτουργίας της τράπεζας και μετά το τέλος της έρευνας αυτής, θα βοηθήσει στην καλύτερη αντιμετώπιση των παθολογικών προβλημάτων που οφείλονται σε αυτά τα είδη, τα οποία είναι και τα πιο συχνά που εμφανίζονται στις υδατοκαλλιέργειες και προκαλούν μεγάλες απώλειες.

Η σημασία της ίδρυσης μιας τράπεζας μικροβίων φαίνεται από τον μεγάλο αριθμό τέτοιων τραπεζών που υπάρχουν διεθνώς. Η λειτουργία τους είναι η βάση για οποιαδήποτε επιστημονική μελέτη μπορεί να γίνει, είτε για επιδημιολογικούς λόγους, είτε για το σχεδιασμό αντιμετώπισης κάποιων σημαντικών ασθενειών.

Η κύρια όμως, απαίτηση της ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας και κυρίως της θαλάσσιας είναι εκτός από την διάγνωση, ταυτοποίηση και θεραπεία των κύριων παθογόνων μυξοβακτηριδίων, είναι η δημιουργία εμβολίων και αυτεμβολίων από στελέχη που κυριαρχούν τώρα στον ελληνικό χώρο, κάτι που αυτή η Τράπεζα μπορεί να δώσει στο άμεσο μέλλον. Μέχρις στιγμής, σήμερα, κυκλοφορεί μόνο ένα εμπορικό εμβολιακό σκεύασμα (FM-95) ως πατέντα του πανεπιστημίου Santiago de

Compostela της Ισπανίας για την αποτελεσματική πρόληψη της μυξοβακτηρίασης στο καλκάνι, *Scophthalmus maximus* (Santos et al., 1999).

Σε αυτή την έρευνα, συνολικά, τριακόσια δέκα τέσσερα (314) στελέχη *T. maritimum* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν, με βάση τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά και την μοριακή ταυτοποίηση από όλα τα δείγματα ψαριών (n=800). Σε κάθε στέλεχος δόθηκε ένας συγκεκριμένος κωδικός ταυτοποίησης. Τα στελέχη απομονώθηκαν κυρίως από το δέρμα, τις δερματικές αλλοιώσεις, τα πτερύγια και τα βράγχια και όχι από εσωτερικά όργανα. Η πιο πιθανή εξήγηση είναι ότι τα μυξοβακτηρίδια υπάρχουν και εντοπίζονται στα εξωτερικά όργανα των ψαριών προκαλώντας τοπικά αλλοιώσεις, ενώ σε πολύ προχωρημένες περιπτώσεις έξαρσης της νόσου, προκαλούν σηψαιμία και εμφανίζουν εντόπιση σε εσωτερικά όργανα, όπως ο νεφρός και ο σπλήνας (Pazos et al., 1993; Chen et al., 1995; Handler et al., 1997; Ostland et al., 1999; Santos et al., 1999; Avendaño-Herrera et al., 2004a; Salati et al., 2005; Toranzo et al., 2005).

Τα στελέχη, μετά την απομόνωση τους και την ταυτοποίησή τους, διατηρήθηκαν στην κατάψυξη, στους -80°C σε FMM broth με προσθήκη 18% (v/v) γλυκερόλη, σε τροποποιημένο AOA broth με προσθήκη 18% (v/v) γλυκερόλη και σε TSB broth με προσθήκη 18% (v/v) γλυκερόλη. Πιο αποτελεσματικό, αποδείχθηκε το FMM broth με προσθήκη 18% (v/v) γλυκερόλη. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες των Pazos et al. (1996) και Avendaño-Herrera et al. (2008).

#### **4.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΜΕ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Tenacibaculum maritimum* ΣΕ ΙΧΘΥΔΙΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ**

Όσον αφορά τις πειραματικές μολύνσεις για τα ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού, η προσπάθεια πειραματικής μόλυνσης με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση στελεχών του *T. maritimum* δεν ήταν ικανή να προκαλέσει θνησιμότητα ή να προκαλέσει την νόσο στα ψάρια. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενα αποτελέσματα από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν από τους Wakabayashi et al. (1984), Alsina & Blanch (1993) και Avendaño-Herrera et al. (2006a), όπου η ενδομυϊκή και ενδοπεριτοναϊκή έγχυση δεν ήταν αποτελεσματικές να προκαλέσουν την νόσο σε πειραματικά μολυσμένα καλκάνια και λαβράκια.

Η παρατεταμένη εμβάπτιση των ψαριών για 18 ώρες με διάλυμα βακτηριών του *T. maritimum* αποδείχθηκε αποτελεσματική μέθοδος πρόκλησης της μυξοβακτηριδίασης καθώς προκαλεί παρόμοια κλινικά συμπτώματα με την μυξοβακτηριδίαση και θνησιμότητα, όπως συμβαίνει σε περιστατικά φυσικής μόλυνσης.

Τα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης έδειξαν ότι, τα μυξοβακτηρίδια, υπάρχουν στο νερό, καθώς απομονώνονται και στα 3 υποστρώματα: τροποποιημένο AOA, FMM, MA. Επιπλέον, στις τσιπούρες οι περισσότερες απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν από MA (Δέρμα - Βράγχια) και στα λαβράκια οι περισσότερες απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν από AOA (Βράγχια), FMM (Δέρμα), MA (Δέρμα).

Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες αναφορές για το ίδιο παθογόνο, που πραγματοποιήθηκαν από τους Wakabayashi et al. (1984), Alsina & Blanch (1993) και Avendaño-Herrera et al. (2006a). Στην πραγματικότητα, η πλειοψηφία των κυττάρων του *T. maritimum* που ενοφθαλμίζεται στα ψάρια, απελευθερώνεται στο νερό, μέσα στις πρώτες 6 ώρες, μετά την έγχυση. Αυτός φαίνεται να είναι ο λόγος που η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση σαν μέθοδος μόλυνσης, δεν είναι αποτελεσματική στην πρόκληση της μυξοβακτηριδίασης.

Παρόλο που κάποιοι συγγραφείς, όπως οι Wakabayashi et al. (1984) και Baxa et al. (1987), προτείνουν ότι η μόλυνση με εμβάπτιση δεν είναι αποτελεσματική μέθοδος πειραματικής μόλυνσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η νόσος μπορεί να εκδηλωθεί εύκολα στα ψάρια με παρατεταμένη εμβάπτιση και χωρίς να απαιτείται προηγουμένως, τριβή του δέρματος των ψαριών, όπως έχει περιγραφεί σε πειράματα στο λαβράκι από τους Bernardet et al. (1994). Είναι επίσης γνωστό, ότι η αρχική οδός μόλυνσης από το *T. maritimum* είναι η επιφάνεια του δέρματος, καθώς το βακτήριο προσκολλάται ισχυρά στην εξωτερική επιφάνεια και στην βλέννα (Magariños et al., 1995). Συνεπώς το *T. maritimum* μπορεί να επιβιώσει μέσα στο υδάτινο περιβάλλον, χρησιμοποιώντας την βλέννα σαν δεξαμενή.

Συμπερασματικά, το μοντέλο πειραματικής μόλυνσης των ψαριών, με εμβάπτιση, σε συγκέντρωση βακτηρίων από  $1.0 \times 10^6$  cells/ml έως  $1.5 \times 10^6$  cells/ml που περιγράφηκε σε αυτή την έρευνα για πρώτη φορά στην Ελλάδα σε τσιπούρες και λαβράκια, αποδείχθηκε αποτελεσματικό και μπορεί να αποτελέσει την βάση για μελλοντικές επιδημιολογικές μελέτες, με σκοπό την πρόληψη και έλεγχο της μυξοβακτηριδίασης.

Στην συνέχεια των πειραμάτων, τα πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια λαβρακιού και τσιπούρας με εμβάπτιση, εμφάνισαν παρόμοιες αλλοιώσεις με τα φυσικά μολυσμένα ψάρια και υψηλή θνησιμότητα (λαβράκι 65%, τσιπούρα 35%). Επιπλέον, τα ιχθύδια τσιπούρας, λόγω καταπόνησης από την πειραματική μόλυνση, προς το τέλος παρακολούθησης του πειράματος, εμφάνισαν στο δέρμα, λευκά οζίδια στο δέρμα, λόγω λεμφοκύστης, που θεωρήθηκε τυχαίο εύρημα.

Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν καθαρά την παθογένεια των απομονωμένων στελεχών καθώς και την αποτελεσματικότητα της πειραματικής εμβάπτισης στην εκδήλωση της νόσου στα πειραματικά μολυσμένα ψάρια, τα οποία εμφάνισαν συμπτώματα και αλλοιώσεις. Η θνησιμότητα για τα ιχθύδια τσιπούρας άρχισε την 3η ημέρα, μέχρι και την 18η ημέρα (14 νεκρές/40 σύνολο), θνησιμότητα 35%, στο τέλος των πειραμάτων. Η θνησιμότητα για τα ιχθύδια λαβρακιού άρχισε την 3η ημέρα, μέχρι και την 19η ημέρα (26 νεκρά/40 σύνολο), θνησιμότητα 65%. Σε προηγούμενη έρευνα πειραματικής μόλυνσης με εμβάπτιση, από τους Avendaño-Herrera et al. (2006a, 2006b), που πραγματοποιήθηκε σε καλκάνια (*Scophthalmus maximus*), η θνησιμότητα άρχισε την 7<sup>η</sup> ημέρα και έφτασε το 66.6% στο τέλος των πειραμάτων. Σε έρευνα επίσης που πραγματοποιήθηκε από τους Mohamed et al. (2012), σε ψάρια του είδους (*Thalassoma Purpureum*), η θνησιμότητα έφτασε το 60% στο τέλος των πειραμάτων (14<sup>η</sup> ημέρα).

Στα ψάρια που επιβίωσαν στην πειραματική μόλυνση, το στέλεχος *T. maritimum* αναπτύχθηκε μόνο σε δείγματα από το δέρμα, που υποδεικνύει ότι υπάρχει ένα στάδιο φορέα του βακτηρίου. Τα αποτελέσματα μας επίσης, δείχνουν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του βαθμού της λοιμογόνου δύναμης και της προέλευσης του στελέχους του *T. maritimum*. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί από τους Handlinger et al. (1997), που μόλυναν πειραματικά διάφορα είδη ψαριών με εμβάπτιση, χρησιμοποιώντας ένα στέλεχος που απομονώθηκε από ένα περιστατικό φυσικής μόλυνσης σε σολομοειδή. Ωστόσο, περισσότερες μελέτες χρησιμοποιώντας διαφορετικά είδη ψαριών και περισσότερα στελέχη θα πρέπει να γίνουν, για να καθορίσουν το εύρος ευαισθησίας των ψαριών-ξενιστών για αυτό το παθογόνο.

Τα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης για τα ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού έδειξαν ότι, τα μυξοβακτηρίδια, υπάρχουν στο νερό, καθώς απομονώνονται στα θρεπτικά υποστρώματα: FMM, MA και τροποποιημένο ΑΟΑ. Το γεγονός ότι τα μυξοβακτηρίδια, εντοπίζονται στο νερό των πειραματικά μολυσμένων

ψαριών, φαίνεται να συνδέεται με το γεγονός ότι οι μολυσμένοι πληθυσμοί μεταφέρονται σε ενυδρεία με ανακυκλωμένο σύστημα νερού, το οποίο ανατροφοδοτεί συνέχεια το νερό με το αυξημένο μικροβιακό φορτίο που παράγεται από τα ψάρια στα οποία η νόσος έχει ήδη εκδηλωθεί.

#### **4.2.1. Ιστοπαθολογική εξέταση**

Οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις εντοπίστηκαν κυρίως στο δέρμα και τα βράγχια. Παρατηρήθηκαν συμφόρηση, αιμορραγίες, νέκρωση στην επιδερμίδα, φλεγμονώδης διήθηση στην επιδερμίδα, αθροίσεις βακτηρίων στο επιθήλιο αλλά χωρίς οι βάκιλοι να είναι πάντα ορατοί στις ιστολογικές τομές. Νεκρώσεις και διαβρώσεις στο δέρμα, ιδιαίτερα του ουραίου πτερυγίου. Η αύξηση των μελανοφόρων κυττάρων του δέρματος και ο χρωματισμός που παρατηρήθηκε αποδόθηκε στην χρόνια φλεγμονή του δέρματος.

Οι αλλοιώσεις στα βράγχια εμφανίστηκαν με απώλεια της φυσιολογικής δομής των βραγχίων, διάβρωση των πρωτογενών βραγχιακών νηματίων και νεκρώσεις στα βράγχια. Συγκόλληση στην βάση των πρωτογενών βραγχιακών νηματίων και των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων και υπερπλασία στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια, αλλοιώσεις παρόμοιες με αυτές που έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες έρευνες από τους Handlinger et al. (1997), Powell et al. (2004, 2005), van Gelderen et al. (2009), Vilar et al. (2012) και Failde et al. (2013).

Στην παρούσα μελέτη, δεν διαπιστώθηκαν αλλοιώσεις συστηματικής μόλυνσης σε εσωτερικά όργανα, όλες οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις εντοπίστηκαν στα εξωτερικά όργανα (βράγχια, δέρμα), όπως παρατηρήθηκε και στις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις των ψαριών από τις εποχικές δειγματοληψίες.

### **4.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΙΝΗΣ-Τ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΗΣ ΜΥΞΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΣΗΣ, ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΣΕ ΤΣΙΠΟΥΡΕΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΑ**

Για τις εμβαπτίσεις χρησιμοποιήθηκαν τσιπούρες και λαβράκια, δύο είδη τα οποία καλλιεργούνται σε ευρεία κλίμακα στις θαλάσσιες ιχθυοκαλλιέργειες, στην Ελλάδα.

Στις ιχθυοκαλλιέργειες, τα δύο διαλύματα, χρησιμοποιούνται στις θεραπείες εμβάπτισης (λουτρά) κυρίως σε ψάρια γλυκού νερού και σολομοειδή έναντι διάφορων νοσημάτων που προκαλούνται από οργανισμούς, όπως εξωτερικά παράσιτα, θαλάσσια ψείρα (*Lepeophtherius salmonis*) βακτήρια, και μύκητες σε διάφορα είδη και στάδια ανάπτυξης των ψαριών. Με βάση την βιβλιογραφία από προηγούμενες μελέτες των Rach et al. (1997), Mitchell (1998), Speare et al. (1999), Bowker et al. (2000), Toovey & Lyndon (2000), Montgomery-Brock et al. (2001), Thomas-Jinu & Goodwin (2004), Mansell et al. (2005), Avendaño-Herrera et al. (2006a), Russo et al. (2007), Leef et al. (2007), Yanong (2011) και Cruz-Lacierda et al. (2012), σχετικά με την χρήση και τις δοσολογίες του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T για την αντιμετώπιση νοσημάτων στα ψάρια, πραγματοποιήθηκαν εμβαπτίσεις πειραματικά μολυσμένων ιχθυδίων τσιπούρας (2 επαναλήψεις) και λαβρακιών (3 επαναλήψεις) με: υπεροξείδιο του υδρογόνου (διάλυμα 35%), στην δόση 200ppm/30min και χλωραμίνη-T στην δόση 12-15ppm/60min.

Μετά την ολοκλήρωση των πειραματικών μολύνσεων και εμβαπτίσεων με τα δύο διαλύματα, στα ιχθύδια τσιπούρας και λαβρακιού, τα ιχθύδια ανταποκρίθηκαν αμέσως στην θεραπεία, εμφανίζοντας μείωση της θνησιμότητας. Στα λαβράκια, με την χρήση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η θνησιμότητα μειώθηκε από 65% στο 7.5% και με την χρήση της χλωραμίνης-T, η θνησιμότητα μειώθηκε από 65% στο 5%. Στις τσιπούρες, με την χρήση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η θνησιμότητα μειώθηκε από 50% στο 40% και την χρήση της χλωραμίνης-T, η θνησιμότητα μειώθηκε από 50% στο 30%.

Η χλωραμίνη-T, χρησιμοποιείται ήδη ευρέως στην θεραπεία της νόσου των βραγχίων των ψαριών (σολομοειδή κυρίως), στις ιχθυοκαλλιέργειες **γλυκού νερού** (Thorburn & Moccia, 1993) καθώς επίσης και στην αντιμετώπιση της προσβολής των βραγχίων από αμοιβάδες (Powell & Clark, 2003). Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar* L.), απέδειξαν πως η χλωραμίνη-T στο θαλασσινό νερό μπορεί να είναι το ίδιο αποτελεσματική όσο και στο γλυκό νερό (Harris et al. 2004, 2005). Η χρήση της χλωραμίνης-T, σε συγκέντρωση 10 mg/L για 60 min, αποδείχθηκε αποτελεσματική στην προσβολή των βραγχίων από αμοιβάδες σε σολομοειδή (Leef et al., 2007). Επίσης, η χλωραμίνη-T έχει χρησιμοποιηθεί, σε συγκέντρωση 12 mg/L για 60 min με εμβάπτιση ανά 2 ημέρες για την αντιμετώπιση της βακτηριακής νόσου των βραγχίων (BGD), που προκαλείται από το

βακτήριο *Flavobacterium branchiophilum*, στα σολομοειδή, σύμφωνα με έρευνα από τους Bowker et al. (2008). Έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Gaikowski et al., (2008) απέδειξε επίσης ότι η εμβάπτιση με χλωραμίνη-T (20 mg/L) για 60 min ανά δύο ημέρες είναι πολύ αποτελεσματική νοσημάτων των ψαριών του γλυκού νερού.

Έρευνες επίσης που πραγματοποιήθηκαν από τους Altinok (2004) και Boran & Altinok (2013) για την χρήση της χλωραμίνης-T, σε συγκέντρωση 10-20 mg/L σε πέστροφες και χρυσόψαρα απέδειξαν ότι η χλωραμίνη-T, είναι πολύ αποτελεσματική στην αντιμετώπιση εξωτερικών παρασιτώσεων και βακτηριακών μολύνσεων σε αυτά τα είδη ψαριών γλυκού νερού. Αποτελέσματα που συμφωνούν και με προηγούμενες έρευνες σε πέστροφες που πραγματοποιήθηκαν από τους Powell & Perry (1997). Πρόσφατες έρευνες σε πέστροφες, επίσης απέδειξαν ότι η χρήση της χλωραμίνης-T, σε συγκέντρωση 10-20 mg/L, είναι πολύ αποτελεσματική στην πρόληψη ή θεραπεία εξωτερικών παρασίτων και βακτηριακών μολύνσεων (Boran & Altinok, 2013).

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) αρχικά, χρησιμοποιήθηκε σαν χαμηλής προτεραιότητας αντισηπτικό και μυκητοκτόνο, ειδικά σε μύκητες των αυγών των ψαριών (Bowker et al., 2008; Mitchell & Rodger, 2011). Εμβαπτίσεις σε συγκέντρωση 50-250 ppm έως 60 min, αποδείχθηκαν αποτελεσματικές έναντι των μυκήτων των αυγών των ψαριών. Αποδείχθηκε επίσης αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση της νόσου των βραγχιών των σολομοειδών (BGD), σε συγκέντρωση 50-100 ppm από 30 έως 60 min, σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη από τους Mitchell & Rodger (2011). Έχει χρησιμοποιηθεί επίσης για τον έλεγχο πολλών εξωτερικών παθογόνων των ψαριών, ειδικά αυτών που ανήκουν στα γένη *Flavobacterium* και *Cytophaga* (Thomassen, 1993; Arndt & Wagner, 1997; Rach et al., 1997; Lumsden et al., 1998; Derksen et al., 1999; Thomas-Jinu & Goodwin, 2004).

Ιδιαίτερα σημαντική και αποτελεσματική είναι η χρήση του  $H_2O_2$  στην αντιμετώπιση της προσβολής του σολομού του Ατλαντικού (*Salmo salar* L.), από την θαλάσσια ψείρα (*Lepeophtheirus salmonis*), σύμφωνα με έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί από τους Bruno & Raynard (1994), Treasurer & Grant (1997), Toovey & Lyndon (2000). Η χρήση του  $H_2O_2$ , για την αντιμετώπιση της θαλάσσιας ψείρας του σολομού, προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Johnson et al. (1993), με την μορφή εμβαπτίσεων σε συγκέντρωση 1500–2000 mg/L για 20 min. Σε έρευνες που ακολούθησαν από τους Kierner & Black (1997), Arndt & Wagner (1997), Rach et al. (1997), Speare & Arsenault (1997), Treasurer & Grant (1997), McAndrew et al. (1998) και Treasurer et al. (2000) αποδείχθηκε πως μικρότερες συγκεντρώσεις (200–

300 mg/L) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι εξίσου αποτελεσματικές και ασφαλείς για τα περισσότερα ψάρια. Σε έρευνα από τους Speare & Arsenault (1997), η χρήση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε ιχθύδια πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) σε συγκέντρωση 200 mg/L για 60 min αποδείχθηκε επίσης αποτελεσματική στην αντιμετώπιση της βακτηριακής νόσου των βραγχίων.

Ωστόσο, εκτεταμένες έρευνες όσον αφορά την χρήση και την αποτελεσματικότητα της χλωραμίνης-T και του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε θαλασσινά εκτρεφόμενα είδη ψαριών δεν έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα. Στην παρούσα μελέτη γίνεται για πρώτη φορά, μια προσπάθεια σύγκρισης της αποτελεσματικότητας των δύο ουσιών στην αντιμετώπιση της νόσου της μυξοβακτηριδίασης, σε θαλασσινά είδη ψαριών (τσιπούρα, λαβράκι).

Στην παρούσα έρευνα, συγκρίνοντας την αποτελεσματικότητα των δύο ουσιών, για τα ιχθύδια τσιπούρας και για τα ιχθύδια λαβρακιού, δεν προέκυψε σημαντικά στατιστική διαφορά μεταξύ των θνησιμοτήτων που προκλήθηκαν από το υπεροξείδιο του υδρογόνου και από τη χλωραμίνη-T. Σε παρόμοια έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Bowker et al. (2013), συγκρίνοντας την αποτελεσματικότητα των δύο ουσιών στην αντιμετώπιση της βακτηριακής νόσου που προκαλείται από το *Flavobacterium columnare*, αποδείχθηκε επίσης πως δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των θνησιμοτήτων μεταξύ των δύο ουσιών και πως και οι δύο ουσίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μείωση της θνησιμότητας στα ψάρια (*Micropterus salmoides floridanus*) και (*Lepomis macrochirus*).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Thomas-Jinu & Goodwin (2004), οι εμβάψεις με χλωραμίνη-T για την αντιμετώπιση της νόσου Columnaris από το *Flavobacterium columnare* σε γατόψαρα (*Ictalurus punctatus*) μείωσαν σημαντικά την θνησιμότητα. Το ίδιο αποτέλεσμα διαπιστώθηκε από τον Riley (2000), σε γατόψαρα, με εμβάπτιση με χλωραμίνη-T (15 mg/L), όπου η θνησιμότητα μειώθηκε από 84–100% σε 6–14%.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου στην δόση: 200ppm/30min, με εμβάπτιση (3 επαναλήψεις μέρα παρά μέρα), και η χλωραμίνη-T, στην δόση: 12-15ppm/60min, με εμβάπτιση (3 επαναλήψεις μέρα παρά μέρα), θεωρούνται κατάλληλα αντισηπτικά διαλύματα για την θεραπεία της νόσου. Επιπλέον, επειδή η μυξοβακτηριδίαση εμφανίζεται συχνότερα σε ιχθύδια μικρού μεγέθους, σε αυτά τα στάδια ανάπτυξης είναι δύσκολη η θεραπεία με την χορήγηση φαρμάκων από το στόμα ή με έγχυση. Γι' αυτό οι ιχθυοκαλλιέργειες απαιτούν



φάρμακα με αντιβακτηριδιακές ιδιότητες, τα οποία μπορούν να χορηγηθούν στα ιχθύδια με εμφύσηση για την θεραπεία, όπως τα δύο διαλύματα. Η προσθήκη των δύο διαλυμάτων στο θαλασσινό νερό, με την μορφή εμφύσεων, στις παραπάνω συγκεντρώσεις, κατάφερε να μειώσει την παρουσία του *T. maritimum* σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Η θεραπεία που επιχειρείται μέχρι σήμερα από τις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειών, στις περιπτώσεις εμφάνισης της νόσου είναι συνήθως εμπειρική, ενώ υπάρχει το πρόβλημα της απόκτησης αντίστασης στα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά λόγω της αλόγιστης χρήσης τους. Μέσω των πειραματικών εμφύσεων αποδείχθηκε πως η χρήση της χλωραμίνης-T και του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι αποτελεσματική και πολλά υποσχόμενη στην αντιμετώπιση της μυξοβακτηριδίασης στα θαλασσινά εκτρεφόμενα μεσογειακά είδη ιχθύων. Συγκρίνοντας το κόστος των δύο ουσιών για μια δεξαμενή 100m<sup>3</sup>, και συγκέντρωση για το υπεροξείδιο του υδρογόνου 200ppm, και για την χλωραμίνη-T 15ppm, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει πολύ μικρή διαφορά στην τιμή.

Επιπλέον, το υπεροξείδιο του υδρογόνου εμφανίζει ένα πλεονέκτημα ως προς το περιβάλλον, καθώς διασπάται σε νερό και οξυγόνο (Treasurer & Grant 1997), συνεπώς η χρήση του στις ιχθυοκαλλιέργειες μπορεί να επεκταθεί σε πολλές περιπτώσεις (Rach et al 1997).

Το *T. maritimum* είναι ένας καταλάση θετικός μικροοργανισμός (Suzuki et al., 2001), και θα μπορούσε να αποσυνθέτει ρίζες υπεροξειδίου, αυξάνοντας την επιβίωση βακτηρίων, στην παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης του υπεροξειδίου, όπως έχει αναφερθεί για άλλα παθογόνα βακτήρια, όπως: *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio harveyi* και *Photobacterium damsela subsp. piscicida* από τους Díaz-Rosales et al. (2003). Πρόσθετες μελέτες για τον ρόλο της καταλάσης στην προστασία αυτού του παθογόνου έναντι του υπεροξειδίου θα πρέπει να διεξαχθούν. Προφανώς, η δόση και ο χρόνος έκθεσης στο υπεροξείδιο του υδρογόνου, θα καθορίσει το βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατικό του αποτέλεσμα, σύμφωνα με τους Hyslop et al. (1995).

Από την άλλη μεριά, αυτόχθονοι πληθυσμοί ετερότροφων θαλάσσιων βακτηρίων από την βλέννα και το δέρμα, επιβίωσαν στην έκθεση στο υπεροξείδιο του υδρογόνου και στην χλωραμίνη-T, αν και στην αρχή εμφάνισαν μια μικρή πτώση στον πληθυσμό τους. Είναι γνωστό ότι η αρχική μόλυνση από το *T. maritimum* συμβαίνει στην επιφάνεια του σώματος, καθώς το παθογόνο προσκολλάται ισχυρά στο δέρμα και στην βλέννα, τα οποία δεν περιέχουν συστατικά που αναστέλλουν την

ανάπτυξη αυτού του βακτηρίου, σύμφωνα με τους Magariños et al. (1995). Έτσι, το *T. maritimum* μπορεί να επιβιώσει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μέσα στο υδρόβιο περιβάλλον, χρησιμοποιώντας την βλέννα σαν δεξαμενή.

Οι Avendaño-Herrera και συνεργάτες, (2006) πραγματοποιώντας πειραματικές μολύνσεις σε καλκάνια (*Scophthalmus maximus*), σε συγκεντρώσεις 30 και 240 ppm με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, διαπίστωσαν επίσης διαφορές στην θνησιμότητα, ανάλογα με το αν πραγματοποιήθηκε η εμφάνιση στα ψάρια ή όχι. Διαπίστωσαν ότι μια πιο σοβαρή μορφή της νόσου, βρέθηκε στην ομάδα των ψαριών που εκτέθηκαν στα 240 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, την 3<sup>η</sup> μέρα, μετά από την έκθεση. Τα ψάρια στα οποία μολύνθηκαν με το *T. maritimum*, και δεν πραγματοποιήθηκε εμφάνιση η θνησιμότητα έφτασε στο 66.6% στο τέλος του πειράματος (10<sup>η</sup> ημέρα). Παρόμοια αποτελέσματα σχετικά με την θνησιμότητα, έχουν αναφερθεί και σε πειραματικά μολυσμένα γατόψαρα (*Ictalurus punctatus*), με το *Flavobacterium columnare* από τους Thomas-Jinu & Goodwin, (2004). Είναι πιθανόν, σε αυτές τις μελέτες, οι εμφάνισεις με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, να προκάλεσαν αύξηση του στρες στα ψάρια, επιταχύνοντας την εξέλιξη της μυξοβακτηριδίασης, γι' αυτό και παρατηρήθηκαν θάνατοι στην ομάδα των ψαριών, στα οποία έγινε εμφάνιση με 240 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Όπως αναμένονταν δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα στους αρνητικούς μάρτυρες.

Στην παρούσα μελέτη για πρώτη φορά διεθνώς, εξετάστηκε η επίδραση της χλωραμίνης-T και του υπεροξειδίου του υδρογόνου στην αντιμετώπιση της νόσου της μυξοβακτηριδίασης σε θαλασσινά είδη ψαριών, όπως η τσιπούρα και το λαβράκι και αποδείχθηκε ότι και οι δύο ουσίες είναι αποτελεσματικές στην μείωση της θνησιμότητας των ψαριών. Περαιτέρω μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό ψαριών και σε περισσότερα είδη θαλασσινών ψαριών, κρίνονται απαραίτητες στο μέλλον για την επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T.

#### **4.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (LC50) ΤΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΛΩΡΑΜΙΝΗΣ T, ΣΕ ΙΧΘΥΔΙΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ**

Προσδιορίστηκε η μεσαία θανατηφόρα συγκέντρωση (Lethal Concentration 50) (LC50), των δύο αντισηπτικών διαλυμάτων, του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T, δηλ. η συγκέντρωση των δύο διαλυμάτων στην οποία πεθαίνει το 50% ενός πληθυσμού ιχθυδίων δοκιμής κατά την διάρκεια ενός συγκεκριμένου

χρονικού διαστήματος. Η μεσαία θανατηφόρα συγκέντρωση (LC50) σε διαφορετικές περιόδους έκθεσης και συγκεντρώσεις, υπολογίστηκε με βάση την μέθοδο Reed & Muench (1938). Στην παρούσα έρευνα για πρώτη φορά στην Ελλάδα, γίνεται μια προσπάθεια προσδιορισμού της μεσαίας θανατηφόρας συγκέντρωσης για τις δύο ουσίες, σε θαλασσινά είδη ψαριών.

Όσον αφορά τα ιχθύδια τσιπούρας, αποδείχθηκε πως η μεσαία θανατηφόρα συγκέντρωση (Lethal Concentration 50) (LC50), για το υπεροξειδίο του υδρογόνου, στις 48 h, είναι τα 640ppm/30min και για την χλωραμίνη-T, στις 48 h, είναι η συγκέντρωση 80ppm/60min.

Στηριζόμενοι στα αποτελέσματα για τα ιχθύδια τσιπούρας για τις 48 h, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συγκεντρώσεις: για το υπεροξειδίο του υδρογόνου, τα 640ppm/30min και για την χλωραμίνη-T, τα 80ppm/60min και για τα λαβράκια.

Όσον αφορά τα λαβράκια, αποδείχθηκε πως η μεσαία θανατηφόρα συγκέντρωση (Lethal Concentration 50) (LC50), για το υπεροξειδίο του υδρογόνου, στις 24 h, είναι τα 640ppm/30min και για την χλωραμίνη-T, είναι η συγκέντρωση 80ppm/60min, στις 96 h και όχι στις 48 h όπως συμβαίνει με τις τσιπούρες.

Αποδείχθηκε επίσης πως η χλωραμίνη-T προκαλεί μικρότερη θνησιμότητα ακόμη και στην θανατηφόρο συγκέντρωση, ενώ οι τσιπούρες και τα λαβράκια εμφανίζουν μεγαλύτερη ανοχή στην χλωραμίνη-T σε σχέση με το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Παρόμοιες έρευνες για τον προσδιορισμό της μεσαίας θανατηφόρας συγκέντρωσης για τις δύο ουσίες, σε θαλασσινά εκτρεφόμενα είδη ψαριών, όπως είναι η τσιπούρα και το λαβράκι δεν έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα.

Σε προηγούμενη έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τον Altinok (2004), σε χρυσόψαρα (*Carassius auratus*) η LC50 για την χλωραμίνη-T, στις 24 h βρέθηκε 24.3mg/L, ενώ σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε γατόψαρα (*Ictalurus punctatus*), από τους Gaikowski et al. (2008), η LC50 για την χλωραμίνη-T, στις 24 h βρέθηκε 60mg/L. Όσον αφορά το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, εμφανίστηκε 50% θνησιμότητα, μετά από 3 h σε γατόψαρα καναλιών που εκτέθηκαν σε 238 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και σε ψάρια bluegill που εκτέθηκαν σε 460 mg/L, σύμφωνα με τους Rach et al. (1997) και Speare et al. (1999).

Διαφορές στα είδη ψαριών (καθώς κάποια είδη, όπως τα γατόψαρα είναι πιο ευαίσθητα), διαφορές στο μέγεθος, στην ηλικία των ψαριών καθώς και στις παραμέτρους του νερού μπορούν να επηρεάσουν την δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χλωραμίνης-T και την τοξικότητα τους στα ψάρια και πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη, σύμφωνα και με τους Rach et al. (1997).

Σχετικά με την τοξική επίδραση των δύο διαλυμάτων, απευθείας στα ψάρια, κατά τα πρώτα λεπτά που ακολούθησαν μετά την προσθήκη τους, τα ψάρια εμφάνισαν συμπτώματα αναπνευστικής δυσχέρειας στην εμβάπτιση. Αυτά τα συμπτώματα περιελάμβαναν προσπάθεια να πηδήξουν τα ψάρια έξω από τα ενυδρεία, υποτονική αντίδραση φόβου, αύξηση των αναπνευστικών κινήσεων με γρήγορη κίνηση των βραγχιοκαλυμμάτων και αθροίσεις των ψαριών κοντά στην επιφάνεια του νερού. Ωστόσο, όλα τα ψάρια επανέκτησαν τον φυσιολογικό αναπνευστικό ρυθμό και συμπεριφορά, σύντομα μετά την έκθεση, οπότε δεν παρατηρήθηκαν θνησιμότητες.

Αντίθετα, ψάρια τα οποία εκτέθηκαν στην μεγαλύτερη συγκέντρωση των 2 απολυμαντικών διαλυμάτων, 640 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και 80 ppm χλωραμίνη-T εκτός από τα παρόμοια συμπτώματα που εκδήλωσαν, εμφάνισαν επίσης ανικανότητα σταθεροποίησης και ελέγχου της θέσης του σώματος τους στο νερό, παραμονή στον πυθμένα, ενώ η θνησιμότητα εμφανίστηκε κατά την διάρκεια εμβάπτισης αλλά και μέσα στις επόμενες 24-48 ώρες, μετά την έκθεση.

Γενικά, οι περισσότερες μελέτες τοξικότητας των δύο διαλυμάτων έχουν αναφερθεί σε διάφορα είδη σολομού και ψαριών γλυκού νερού, από τους Rach et al. (1997), Lumsden et al. (1998), Gaikowski et al. (1999), Derksen et al. (1999), King & Farrell (2002) και Thomas-Jinu & Goodwin (2004). Αυτοί οι συγγραφείς σημείωσαν ότι η τοξικότητα εξαρτάται επίσης από την θερμοκρασία νερού, τον αριθμό και την διάρκεια έκθεσης των εμβαπτίσεων, την ηλικία ή το στάδιο ανάπτυξης των ψαριών και τις συνθήκες του νερού, όπως η οργανική ύλη και η λάσπη.

Στηριζόμενοι στα πειραματικά μας αποτελέσματα, θεωρείται σημαντική η δυνατότητα επέκτασης των ερευνών σε επίπεδο πραγματικής εκτροφής για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των δύο ουσιών. Η παραγωγή αξιοποιώντας την έρευνα και ανταλλάσσοντας απόψεις, για την εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα, μπορεί να αξιολογήσει και να επανασχεδιάσει τα μέσα που θα χρησιμοποιεί στις εκτροφές, επενδύοντας στην νέα τεχνολογία. Η ανάπτυξη νέων μεθόδων αντιμετώπισης των παθολογικών προβλημάτων θα πρέπει να ξεφύγει από τα όρια της Πανεπιστημιακής κοινότητας και να αντιμετωπιστεί από την Πολιτεία ως μείζον προτεραιότητα χρηματοδότησης των ερευνών σε αυτή την κατεύθυνση, με σκοπό την παραγωγή ποιοτικών προϊόντων για τον καταναλωτή.

Τέλος, όσον αφορά την εφαρμογή στην πράξη, αποδείχθηκε πως η χρήση της χλωραμίνης-T, με δύο εμβαπτίσεις στην συγκέντρωση των 12ppm/60min στην θεραπευτική αντιμετώπιση μολυσμένων με μυξοβακτηρίδια ιχθυδίων τσιπούρας,

είναι αποτελεσματική. Ωστόσο, θα πρέπει μελλοντικά να γίνει εφαρμογή της χρήσης της σε μεγαλύτερο αριθμό ψαριών, ώστε να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητά της.

Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας είναι πρωτότυπα καθώς δεν υπάρχει πληροφόρηση για τις μολύνσεις από τα μυξοβακτηρίδια, στα θαλασσινά μεσογειακά είδη στην Ελλάδα και η θεραπεία που επιχειρείται σήμερα στις περιπτώσεις αυτές είναι συνήθως εμπειρική.

Επιπλέον δε, υπάρχει το πρόβλημα της απόκτησης, σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα, αντίστασης στα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, που έχει σαν αποτέλεσμα την χρήση υπερβολικών ποσοτήτων φαρμάκων για μεγάλο χρονικό διάστημα ή και πολλές επαναλήψεις θεραπειών. Εξάλλου, όλη η νομοθεσία που αφορά τα εγκεκριμένα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται σήμερα στην Ελλάδα έχει βασιστεί σε στοιχεία ψαριών ψυχρών νερών (και ειδικότερα στον σολομό) και δεν είναι γνωστός ο τρόπος μεταβολισμού τους σε είδη θερμών υποτροπικών περιοχών και πολύ περισσότερο σε «νέα» είδη. Το πρόβλημα, επομένως, των καταλοίπων στους ιστούς αποκτά ιδιαίτερη σημασία και μπορεί να μειωθεί σημαντικά με την σωστή και έγκαιρη διάγνωση και εξειδικευμένη γνώση. Έτσι, η επιτυχής υλοποίηση των στόχων αυτής της έρευνας καθίσταται πρωταρχικής σημασίας και θα συμβάλει σημαντικά στην βελτίωση της θεραπείας, της έγκαιρης και ακριβούς διάγνωσης και επομένως στην αύξηση της παραγωγικότητας και ποιότητας των εκτρεφόμενων αυτών ειδών.

Τα αναμενόμενα οφέλη από την διδακτορική διατριβή, είναι επίσης και οικονομικά, αφού η υδατοκαλλιέργεια είναι ένας πολύ σημαντικός τομέας της εθνικής οικονομίας μας και η Ελλάδα κατέχει την 1η θέση σε παραγωγή ευρύαλων ειδών σε παγκόσμιο επίπεδο. Η μείωση των θνησιμοτήτων στον κλάδο έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας από τους βασικότερους παράγοντες μείωσης του κόστους παραγωγής και ως εκ τούτου θα έχει θετική επίπτωση στην τοπική οικονομία και απασχόληση. Πέραν αυτού όμως, τα αποτελέσματα και η τράπεζα μυξοβακτηριδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ευρύτερα από τους ενδιαφερόμενους φορείς σε όλη την Ελλάδα και διεθνώς.

#### **4.5 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ - ΣΥΝΕΧΙΣΗ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ**

Για την βιώσιμη ανάπτυξη των ιχθυοκαλλιεργειών είναι απαραίτητη η καλύτερη διαθέσιμη τεχνογνωσία ως προς την βιολογία, την τεχνολογία, τις περιβαλλοντικές παραμέτρους και την διαχείριση καθώς και η μετατροπή αυτής της

γνώσης σε υλικό, εργαλεία και ικανότητα για την επίτευξη των καλύτερων αποδόσεων. Οι ιχθυοκαλλιέργειες μπορούν να αναπτυχθούν και να συνεισφέρουν στην παγκόσμια οικονομία εάν υπάρξει ένα βοηθητικό πλαίσιο για τη δραστηριότητα αυτή, το οποίο θα περιλαμβάνει κανονισμούς, διεθνοποίηση, ενημέρωση των καταναλωτών και που θα ασχολείται με όλες τις πλευρές της τροφικής αλυσίδας της ιχθυοκαλλιέργειας, τις δομές, την συνέχιση της έρευνας και την εξέλιξη της τεχνολογίας.

Όσον αφορά τις μολύνσεις με τα μυξοβακτηρίδια στα μεσογειακά, θαλάσσια είδη ψαριών, παρά τις μελέτες που έχουν γίνει μέχρι τώρα, υπάρχουν ελλείψεις στις γνώσεις μας όσον αφορά τους παράγοντες μη ειδικής άμυνας, τους λοιμογόνους παράγοντες, την επιβίωση του παθογόνου στο περιβάλλον και την μετάδοσή τους. Τα μυξοβακτηρίδια, γίνονται όλο και πιο σημαντικά αυξάνοντας την απαίτηση για έγκυρη ταυτοποίηση αυτών των παθογόνων, καθώς και για αποτελεσματικούς τρόπους προφύλαξης και ελέγχου.

Ο έλεγχος της υγείας των ψαριών βοηθά στην αύξηση της ασφάλειας των προϊόντων, μειώνοντας τις συνέπειες των νοσημάτων στα εκτρεφόμενα ψάρια και ελαχιστοποιώντας την χρήση χημικών φαρμάκων και αντιβιοτικών.

Στο μέλλον, περισσότερη έρευνα πρέπει να γίνει για τον καθορισμό των πηγών μόλυνσης, των μηχανισμών μετάδοσης και λοιμογόνου δύναμης, της κλινικής σημασίας, της αντίστασης στα αντιβιοτικά, των νέων επιλογών θεραπείας (υπεροξειδίου του υδρογόνου, χλωραμίνη-T) και την ανάπτυξη εμβολιακών σκευασμάτων έναντι των μολύνσεων με μυξοβακτηρίδια.

Απαραίτητη επίσης κρίνεται μελλοντικά, η διεξοδική έρευνα σχετικά με την παθολογία των νέων ειδών που μπαίνουν στις μονάδες εκτροφής, όπως το μυλοκόπι και ο συκίος. Με αυτό τον τρόπο θα προσδιοριστούν οι παθογόνοι παράγοντες του κάθε είδους, διευκολύνοντας κάθε προσπάθεια εκτροφής τους.

## Greek Aquaculture Myxobacteria (GAM)

Τράπεζα Αναφοράς Μυξοβακτηριδίων από τις Ελληνικές, θαλάσσιες



### Ιχθυοκαλλιέργειες

Πίνακας απομονωμένων στελεχών του βακτηριδίου *T. maritimum* από εκτρεφόμενα θαλασσινά είδη ψαριών:

Α.Α.	Κωδικοποιημένο στέλεχος	Είδος ψαριού	Όργανο απομόνωσης	Θρεπτικό υπόστρωμα
1	1LV16/3/11a.2	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
2	1LV16/3/11a.4	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
3	1LV16/3/11a.5	Λαβράκι	Βράγχια	Μ.Α.
4	1LV16/3/11a.8	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
5	1LV16/3/11a.10	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
6	1LV16/3/11a.12	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
7	1LV16/3/11a.13	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
8	1LV16/3/11b.1	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
9	1LV16/3/11b.2	Λαβράκι	Δέρμα	Μ.Α.
10	1LV16/3/11b.4	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
11	1LV16/3/11b.7	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
12	1LV16/3/11b.9	Λαβράκι	βράγχια	ΑΟΑ
13	1LV16/3/11b.10	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
14	1LV24/4/11.1	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
15	1LV24/4/11.3	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
16	1LV24/4/11.4	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
17	1LV24/4/11.5	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
18	1LV24/4/11.7	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
19	1LV24/4/11.8	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
20	1LV24/4/11.10	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
21	1LV24/4/11.12	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
22	1LV24/4/11.13	Λαβράκι	Δέρμα	Μ.Α.
23	1LV24/4/11.14	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
24	1LV24/4/11.17	Λαβράκι	Δέρμα	ΑΟΑ
25	1LV24/4/11.19	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
26	1LV24/4/11.20	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
27	1LV24/4/11.21	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
28	1LV24/4/11.22	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
29	1LV24/4/11.24	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
30	1TS16/3/11a.1	Τσιπούρα	Δέρμα	FMM
31	1TS16/3/11a.5	Τσιπούρα	Δέρμα	Μ.Α.
32	1TS16/3/11a.8	Τσιπούρα	Δέρμα	Μ.Α.
33	1TS16/3/11a.10	Τσιπούρα	Δέρμα	FMM
34	1TS16/3/11a.18	Τσιπούρα	Δέρμα	Μ.Α.
35	1TS24/4/11b.5	Τσιπούρα	Δέρμα	Μ.Α.
36	1TS24/4/11b.12	Τσιπούρα	Δέρμα	Μ.Α.
37	1TS24/4/11b.22	Τσιπούρα	Δέρμα	Μ.Α.
38	1L16/3/11a.10	Λυθρίνι	Βράγχια	ΑΟΑ

39	1L16/3/11a.18	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
40	1L24/4/11b.8	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
41	1P16/3/11a.4	Φαγκρί	Δέρμα	FMM
42	1P16/3/11a.5	Φαγκρί	Βράγχια	M.A.
43	1P16/3/11a.7	Φαγκρί	Δέρμα	M.A.
44	1P16/3/11a.9	Φαγκρί	Δέρμα	FMM
45	1P16/3/11a.10	Φαγκρί	Δέρμα	FMM
46	1P24/4/11b.8	Φαγκρί	Δέρμα	FMM
47	1P24/4/11b.10	Φαγκρί	Δέρμα	M.A.
48	1MUC16/3/11.2	Μυλοκόπι	Δέρμα	M.A.
49	1MUC16/3/11.4	Μυλοκόπι	Βράγχια	ΑΟΑ
50	1MUC16/3/11.7	Μυλοκόπι	Δέρμα	FMM
51	1MUC16/3/11.9	Μυλοκόπι	Δέρμα	ΑΟΑ
52	1MUC16/3/11.12	Μυλοκόπι	Δέρμα	FMM
53	1MUC16/3/11.13	Μυλοκόπι	Βράγχια	ΑΟΑ
54	1MUC16/3/11.14	Μυλοκόπι	Δέρμα	M.A.
55	1M24/4/11.5	Μυτάκι	Δέρμα	FMM
56	1M24/4/11.6	Μυτάκι	Βράγχια	ΑΟΑ
57	1M24/4/11.7	Μυτάκι	Δέρμα	ΑΟΑ
58	1M24/4/11.14	Μυτάκι	Δέρμα	FMM
59	1SU16/3/11.3	Συκίος	Βράγχια	ΑΟΑ
60	1SU16/3/11.4	Συκίος	Δέρμα	ΑΟΑ
61	1SU16/3/11.5	Συκίος	Δέρμα	M.A.
62	1SU16/3/11.9	Συκίος	Δέρμα	FMM
63	2LV06/06/11a.1	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
64	2LV06/06/11a.2	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
65	2LV06/06/11a.3	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
66	2LV06/06/11a.4	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
67	2LV06/06/11a.6	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
68	2LV06/06/11a.7	Λαβράκι	Δέρμα	ΑΟΑ
69	2LV06/06/11a.8	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
70	2LV06/06/11a.10	Λαβράκι	Δέρμα	M.A.
71	2LV06/06/11a.12	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
72	2LV06/06/11a.13	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
73	2LV06/06/11a.14	Λαβράκι	Δέρμα	M.A.
74	2LV06/06/11a.16	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
75	2LV06/06/11a.17	Λαβράκι	Δέρμα	M.A.
76	2LV06/06/11a.18	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
77	2LV06/06/11a.19	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
78	2LV06/06/11a.23	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
79	2LV06/06/11a.24	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
80	2LV06/06/11a.25	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
81	2LV06/07/11b.1	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
82	2LV06/07/11b.2	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
83	2LV06/07/11b.3	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
84	2LV06/07/11b.5	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
85	2LV06/07/11b.6	Λαβράκι	Δέρμα	M.A.
86	2LV06/07/11b.7	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
87	2LV06/07/11b.8	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
88	2LV06/07/11b.10	Λαβράκι	Δέρμα	M.A.
89	2LV06/07/11b.12	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
90	2LV06/07/11b.13	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
91	2LV06/07/11b.16	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
92	2LV06/07/11b.17	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
93	2LV06/07/11b.18	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
94	2LV06/07/11b.22	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
95	2LV06/07/11b.23	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ



96	2TS06/06/11a.1	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
97	2TS06/06/11a.4	Τσιπούρα	Δέρμα	FMM
98	2TS06/06/11a.9	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
99	2TS06/06/11a.10	Τσιπούρα	Δέρμα	FMM
100	2TS06/06/11a.13	Τσιπούρα	Δέρμα	FMM
101	2TS06/06/11a.17	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
102	2TS06/06/11a.22	Τσιπούρα	Βράγχια	M.A.
103	2TS06/06/11a.23	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
104	2TS06/06/11a.25	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
105	2TS06/07/11b.3	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
106	2TS06/07/11b.5	Τσιπούρα	Δέρμα	FMM
107	2TS06/07/11b.8	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
108	2TS06/07/11b.10	Τσιπούρα	Δέρμα	FMM
109	2TS06/07/11b.19	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
110	2TS06/07/11b.21	Τσιπούρα	Βράγχια	M.A.
111	2L06/06/11a.7	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
112	2L06/06/11a.11	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
113	2L06/06/11a.12	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
114	2L06/06/11a.17	Λυθρίνι	Δέρμα	FMM
115	2L06/06/11a.20	Λυθρίνι	Βράγχια	AOA
116	2L06/07/11b.12	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
117	2L06/07/11b.19	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
118	2P06/06/11a.4	Φαγκρί	Βράγχια	AOA
119	2P06/06/11a.5	Φαγκρί	Δέρμα	M.A.
120	2P06/06/11a.7	Φαγκρί	Δέρμα	FMM
121	2P06/06/11a.8	Φαγκρί	Δέρμα	M.A.
122	2P06/06/11a.9	Φαγκρί	Δέρμα	M.A.
123	2P06/06/11a.10	Φαγκρί	Βράγχια	M.A.
124	2P06/07/11b.1	Φαγκρί	Δέρμα	M.A.
125	2P06/07/11b.2	Φαγκρί	Δέρμα	M.A.
126	2P06/07/11b.7	Φαγκρί	Δέρμα	FMM
127	2P06/07/11b.9	Φαγκρί	Βράγχια	M.A.
128	2P06/07/11b.10	Φαγκρί	Βράγχια	AOA
129	2MUC06/06/11.1	Μυλοκόπι	Βράγχια	AOA
130	2MUC06/06/11.3	Μυλοκόπι	Δέρμα	FMM
131	2MUC06/06/11.4	Μυλοκόπι	Δέρμα	M.A.
132	2MUC06/06/11.7	Μυλοκόπι	Δέρμα	AOA
133	2MUC06/06/11.9	Μυλοκόπι	Βράγχια	AOA
134	2MUC06/06/11.11	Μυλοκόπι	Δέρμα	FMM
135	2MUC06/06/11.13	Μυλοκόπι	Βράγχια	AOA
136	2MUC06/06/11.14	Μυλοκόπι	Δέρμα	M.A.
137	2M06/07/11.4	Μυτάκι	Δέρμα	AOA
138	2M06/07/11.7	Μυτάκι	Δέρμα	FMM
139	2M06/07/11.8	Μυτάκι	Δέρμα	FMM
140	2M06/07/11.13	Μυτάκι	Βράγχια	AOA
141	2SU06/06/11.2	Συκιός	Βράγχια	AOA
142	2SU06/06/11.5	Συκιός	Δέρμα	M.A.
143	2SU06/06/11.8	Συκιός	Δέρμα	FMM
144	2SU06/06/11.9	Συκιός	Δέρμα	AOA
145	3LV06/09/11a.1	Λαβράκι	Βράγχια	M.A.
146	3LV06/09/11a.2	Λαβράκι	Βράγχια	AOA
147	3LV06/09/11a.3	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
148	3LV06/09/11a.4	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
149	3LV06/09/11a.5	Λαβράκι	Βράγχια	AOA
150	3LV06/09/11a.6	Λαβράκι	Βράγχια	FMM
151	3LV06/09/11a.7	Λαβράκι	Βράγχια	AOA
152	3LV06/09/11a.8	Λαβράκι	Δέρμα	FMM

153	3LV06/09/11a.10	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
154	3LV06/09/11a.11	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
155	3LV06/09/11a.12	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
156	3LV06/09/11a.13	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
157	3LV06/09/11a.14	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
158	3LV06/09/11a.16	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
159	3LV06/09/11a.17	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
160	3LV06/09/11a.19	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
161	3LV06/09/11a.20	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
162	3LV06/09/11a.21	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
163	3LV06/09/11a.22	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
164	3LV06/09/11a.23	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
165	3LV06/09/11a.25	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
166	3LV18/10/11b.2	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
167	3LV18/10/11b.3	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
168	3LV18/10/11b.4	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
169	3LV18/10/11b.6	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
170	3LV18/10/11b.7	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
171	3LV18/10/11b.9	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
172	3LV18/10/11b.10	Λαβράκι	Δέρμα	M.A.
173	3LV18/10/11b.11	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
174	3LV18/10/11b.12	Λαβράκι	Δέρμα	M.A.
175	3LV18/10/11b.14	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
176	3LV18/10/11b.16	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
177	3LV18/10/11b.17	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
178	3LV18/10/11b.18	Λαβράκι	Δέρμα	M.A.
179	3LV18/10/11b.20	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
180	3LV18/10/11b.21	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
181	3LV18/10/11b.23	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
182	3LV18/10/11b.24	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
183	3LV18/10/11b.25	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
184	3TS06/09/11a.2	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
185	3TS06/09/11a.5	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
186	3TS06/09/11a.9	Τσιπούρα	Δέρμα	FMM
187	3TS06/09/11a.10	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
188	3TS06/09/11a.13	Τσιπούρα	Δέρμα	FMM
189	3TS06/09/11a.18	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
190	3TS06/09/11a.20	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
191	3TS06/09/11a.21	Τσιπούρα	Δέρμα	FMM
192	3TS06/09/11a.22	Τσιπούρα	Δέρμα	FMM
193	3TS06/09/11a.25	Τσιπούρα	Βράγχια	M.A.
194	3TS02/11/11.3	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
195	3TS02/11/11.4	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
196	3TS02/11/11.7	Τσιπούρα	Δέρμα	FMM
197	3TS02/11/11.11	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
198	3TS02/11/11.12	Τσιπούρα	Βράγχια	M.A.
199	3TS02/11/11.13	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
200	3TS02/11/11.21	Τσιπούρα	Δέρμα	FMM
201	3L01/09/11a.2	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
202	3L01/09/11a.5	Λυθρίνι	Βράγχια	ΑΟΑ
203	3L01/09/11a.7	Λυθρίνι	Δέρμα	FMM
204	3L01/09/11a.8	Λυθρίνι	Δέρμα	FMM
205	3L01/09/11a.11	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
206	3L01/09/11a.12	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
207	3L01/09/11a.14	Λυθρίνι	Δέρμα	FMM
208	3L01/09/11a.15	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
209	3L01/09/11a.16	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
210	3L01/09/11a.18	Λυθρίνι	Δέρμα	FMM

211	3L18/10/11b.3	Λυθρίνι	Βράγχια	ΑΟΑ
212	3L18/10/11b.5	Λυθρίνι	Δέρμα	FMM
213	3L18/10/11b.9	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
214	3L18/10/11b.12	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
215	3L18/10/11b.19	Λυθρίνι	Δέρμα	FMM
216	3P06/09/11a.2	Φαγκρί	Βράγχια	M.A.
217	3P06/09/11a.3	Φαγκρί	Δέρμα	M.A.
218	3P06/09/11a.4	Φαγκρί	Δέρμα	M.A.
219	3P06/09/11a.5	Φαγκρί	Δέρμα	M.A.
220	3P06/09/11a.6	Φαγκρί	Δέρμα	FMM
221	3P06/09/11a.7	Φαγκρί	Βράγχια	FMM
222	3P06/09/11a.8	Φαγκρί	Βράγχια	M.A.
223	3P06/09/11a.9	Φαγκρί	Βράγχια	FMM
224	3P06/09/11a.10	Φαγκρί	Δέρμα	ΑΟΑ
225	3P18/10/11b.1	Φαγκρί	Δέρμα	FMM
226	3P18/10/11b.2	Φαγκρί	Βράγχια	M.A.
227	3P18/10/11b.4	Φαγκρί	Δέρμα	FMM
228	3P18/10/11b.5	Φαγκρί	Βράγχια	M.A.
229	3P18/10/11b.7	Φαγκρί	Δέρμα	M.A.
230	3P18/10/11b.8	Φαγκρί	Βράγχια	M.A.
231	3P18/10/11b.9	Φαγκρί	Δέρμα	M.A.
232	3P18/10/11b.10	Φαγκρί	Δέρμα	FMM
233	3MUC06/09/11.1	Μυλοκόπι	Βράγχια	ΑΟΑ
234	3MUC06/09/11.2	Μυλοκόπι	Δέρμα	ΑΟΑ
235	3MUC06/09/11.4	Μυλοκόπι	Δέρμα	ΑΟΑ
236	3MUC06/09/11.5	Μυλοκόπι	Δέρμα	M.A.
237	3MUC06/09/11.6	Μυλοκόπι	Δέρμα	M.A.
238	3MUC06/09/11.8	Μυλοκόπι	Δέρμα	FMM
239	3MUC06/09/11.10	Μυλοκόπι	Δέρμα	FMM
240	3MUC06/09/11.11	Μυλοκόπι	Δέρμα	M.A.
241	3MUC06/09/11.12	Μυλοκόπι	Βράγχια	ΑΟΑ
242	3MUC06/09/11.13	Μυλοκόπι	Δέρμα	ΑΟΑ
243	3MUC06/09/11.14	Μυλοκόπι	Δέρμα	M.A.
244	3MUC06/09/11.15	Μυλοκόπι	Δέρμα	FMM
245	3M18/10/11.4	Μυτάκι	Βράγχια	M.A.
246	3M18/10/11.5	Μυτάκι	Βράγχια	M.A.
247	3M18/10/11.7	Μυτάκι	Βράγχια	ΑΟΑ
248	3M18/10/11.9	Μυτάκι	Δέρμα	FMM
249	3M18/10/11.12	Μυτάκι	Βράγχια	ΑΟΑ
250	3M18/10/11.15	Μυτάκι	Δέρμα	FMM
251	3SU06/09/11.3	Συκιός	Δέρμα	M.A.
252	3SU06/09/11.4	Συκιός	Δέρμα	FMM
253	3SU06/09/11.5	Συκιός	Δέρμα	FMM
254	3SU06/09/11.7	Συκιός	Δέρμα	M.A.
255	3SU06/09/11.8	Συκιός	Δέρμα	FMM
256	3SU06/09/11.9	Συκιός	Δέρμα	M.A.
257	4LV16/01/12a.1	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
258	4LV16/01/12a.2	Λαβράκι	Δέρμα	M.A.
259	4LV16/01/12a.3	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
260	4LV16/01/12a.5	Λαβράκι	Βράγχια	M.A.
261	4LV16/01/12a.6	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
262	4LV16/01/12a.7	Λαβράκι	Βράγχια	FMM
263	4LV16/01/12a.8	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
264	4LV16/01/12a.9	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
265	4LV16/01/12a.11	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
266	4LV16/01/12a.12	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
267	4LV16/01/12a.14	Λαβράκι	Δέρμα	FMM

268	4LV16/01/12a.15	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
269	4LV16/01/12a.17	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
270	4LV16/01/12a.18	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
271	4LV16/01/12a.20	Λαβράκι	Δέρμα	M.A.
272	4LV20/02/12b.3	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
273	4LV20/02/12b.4	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
274	4LV20/02/12b.7	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
275	4LV20/02/12b.10	Λαβράκι	Δέρμα	M.A.
276	4LV20/02/12b.14	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
277	4LV20/02/12b.15	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
278	4LV20/02/12b.16	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
279	4LV20/02/12b.20	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
280	4LV20/02/12b.21	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
281	4LV20/02/12b.22	Λαβράκι	Δέρμα	M.A.
282	4LV20/02/12b.24	Λαβράκι	Βράγχια	ΑΟΑ
283	4LV20/02/12b.25	Λαβράκι	Δέρμα	FMM
284	4TS16/01/12a.1	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
285	4TS16/01/12a.2	Τσιπούρα	Δέρμα	FMM
286	4TS16/01/12a.5	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
287	4TS16/01/12a.6	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
288	4TS16/01/12a.7	Τσιπούρα	Βράγχια	M.A.
289	4TS16/01/12a.8	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
290	4TS16/01/12a.10	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
291	4TS16/01/12a.14	Τσιπούρα	Δέρμα	FMM
292	4TS16/01/12a.17	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
293	4TS16/01/12a.18	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
294	4TS16/01/12a.21	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
295	4TS16/01/12a.24	Τσιπούρα	Δέρμα	M.A.
296	4L16/01/12a.3	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
297	4L16/01/12a.6	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
298	4L16/01/12a.11	Λυθρίνι	Δέρμα	FMM
299	4L16/01/12a.16	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
300	4L20/02/12b.16	Λυθρίνι	Δέρμα	M.A.
301	4P16/01/12a.9	Φαγκρί	Δέρμα	M.A.
302	4P20/02/12.2	Φαγκρί	Βράγχια	M.A.
303	4P20/02/12.6	Φαγκρί	Βράγχια	ΑΟΑ
304	4MUC16/01/12.6	Μυλοκόπι	Βράγχια	M.A.
305	4MUC16/01/12.12	Μυλοκόπι	Δέρμα	FMM
306	4MUC16/01/12.14	Μυλοκόπι	Βράγχια	M.A.
307	4MUC16/01/12.15	Μυλοκόπι	Δέρμα	M.A.
308	4M20/02/12.7	Μυτάκι	Βράγχια	ΑΟΑ
309	4M20/02/12.11	Μυτάκι	Δέρμα	FMM
310	4SU16/01/12.2	Συκιός	Δέρμα	FMM
311	4SU16/01/12.3	Συκιός	Δέρμα	M.A.
312	4SU16/01/12.4	Συκιός	Δέρμα	ΑΟΑ
313	4SU16/01/12.5	Συκιός	Δέρμα	M.A.
314	4SU16/01/12.8	Συκιός	Δέρμα	FMM

## Πλοήγηση

- Greek Aquaculture Myxobacteria
- Ιστορικό
- Λίστα απομονωμένων μικροβίων
- Εργαστήριο Ιχθυολογίας και Ιχθυοπαθολογίας

Εργαστήριο Ιχθυολογίας - Ιχθυοπαθολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή  
Επιστημών Υγείας, Καρδίτσα, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Greek Aquaculture Myxobacteria (GAM)**

**Τράπεζα Αναφοράς Μυξοβακτηριδίων από τις Ελληνικές, θαλάσσιες  
Ιχθυοκαλλιέργειες**

**Ιστορικό:**

Από τον Μάρτιο του 2013, στο Εργαστήριο Ιχθυολογίας - Ιχθυοπαθολογίας, στο Τμήμα Κτηνιατρικής του Π.Θ. λειτουργεί Τράπεζα Αναφοράς Μυξοβακτηριδίων από θαλάσσια εκτρεφόμενα ψάρια της Ελλάδας. Για την υλοποίηση του προγράμματος συνεργάστηκαν: Το εργαστήριο Ιχθυολογίας – Ιχθυοπαθολογίας και το Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Καρδίτσα.

Οι ιχθυοκαλλιέργειες στην Ελλάδα αποτελούν έναν από τους πιο σημαντικούς τομείς της ζωικής παραγωγής με σημαντικό ποσοστό εξαγωγών της παραγόμενης ποσότητας. Ωστόσο, ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που αντιμετωπίζουν σήμερα οι ιχθυοκαλλιέργειες σε παγκόσμιο επίπεδο είναι τα νοσήματα και η παθολογία των εκτρεφόμενων ψαριών, καθώς επηρεάζουν την ανάπτυξη των ψαριών, με αποτέλεσμα να προκαλούν μείωση της παραγωγής, αύξηση του κόστους και προβλήματα στην ευζωία των ψαριών.

Συγκεκριμένα, η **μυξοβακτηριδίαση που αφορά την παρούσα μελέτη**, αποτελεί περιοριστικό παράγοντα εκτροφής πολλών θαλασσινών ψαριών σε περιοχές της Ευρώπης, της Αμερικής και της Ιαπωνίας.

Τα μυξοβακτήρια αποτελούν μία μεγάλη ομάδα βακτηριδίων που προσβάλλουν πολλά είδη ψαριών θαλασσινού και γλυκού νερού προκαλώντας συγκεκριμένες νοσολογικές καταστάσεις. Στα θαλασσινά είδη κύριο αίτιο της νόσου είναι το βακτήριο *Tenacibaculum maritimum*. Η νόσος έχει αναφερθεί στα είδη: Φαγκρί, Τσιπούρα, Λαβράκι, Σαργό, Συναγρίδα, Γλώσσα, Καλκάνι κ.ά. σε όλο τον κόσμο. Στην Ελλάδα η νόσος είναι πολύ συχνή με μεγάλες θνησιμότητες σε όλες τις εντατικές καλλιέργειες, αλλά δεν έχει μελετηθεί καλά και ελάχιστες ανακοινώσεις υπάρχουν.

### **Κύριοι στόχοι της έρευνας είναι:**

- Η απομόνωση και η ταυτοποίηση των παθογόνων μυξοβακτηριδίων (*Tenacibaculum maritimum*) από εκτρεφόμενα στην Ελλάδα ψάρια (Μεσογειακά θαλασσινά είδη). Γι' αυτό τον στόχο πραγματοποιήθηκαν 4 εποχικές δειγματοληψίες. Τα βακτήρια απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν βιοχημικά και μοριακά, ελέγχθηκε η λοιμογόνος δύναμή τους και στη συνέχεια κωδικοποιήθηκαν και αποθηκεύτηκαν.
- Ο έλεγχος της παθογόνου δράσης των απομονωμένων βακτηριδιακών στελεχών στα πιο ευαίσθητα είδη, που θα πραγματοποιήθηκε με πειραματικές μολύνσεις σε ιχθύδια λαβρακιού και τσιπούρας.
- Η ιστοπαθολογική μελέτη των ασθενών ψαριών.
- Η διατήρηση των απομονωμένων βακτηριδιακών στελεχών για μελλοντικές μελέτες (δημιουργία τράπεζας αναφοράς μυξοβακτηριδίων).

Η έρευνα υλοποιήθηκε σε 4 φάσεις:

1. Συλλογή παθολογικού υλικού και μυξοβακτηριδίων από τις Ελληνικές Υδατοκαλλιέργειες, με στόχο την μελέτη του ποσοστού μόλυνσης, της εποχικότητας και της παθολογίας των μυξοβακτηριδίων στα Μεσογειακά θαλασσινά είδη
2. Πειραματικές μολύνσεις για τον έλεγχο της παθογόνου δράσης των μυξοβακτηριδίων
3. Ταυτοποίηση, κωδικοποίηση, ταξινόμηση και αποθήκευση των απομονωμένων μικροβίων
4. Δημιουργία τράπεζας αναφοράς μυξοβακτηριδίων από τις Ελληνικές, θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες

Η παρούσα έρευνα αποτελεί την δεύτερη οργανωμένη προσπάθεια διεύρυνσης της πρώτης τράπεζας, μιας Τράπεζας αναφοράς μόνον για μυξοβακτηρίδια, απομονωμένων από τις Ελληνικές Ιχθυοκαλλιέργειες. Η πρώτη προσπάθεια αφορούσε το πρωτοποριακό πρόγραμμα «Ίδρυση Τράπεζας Παθογόνων Μικροβίων από τις Ελληνικές Υδατοκαλλιέργειες», το οποίο συγχρηματοδοτήθηκε από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων και την Ευρωπαϊκή Ένωση στο πλαίσιο του ΕΠ ΑΛΙΕΙΑ 2000-2006, Μέτρο 4.6. Το πρόγραμμα αυτό υλοποιήθηκε από το Εργαστήριο Ιχθυολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Παν/μίου Θεσσαλονίκης και τους συνεργαζόμενους φορείς, το Εργαστήριο Ιχθυολογίας και Ιχθυοπαθολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και το Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσιών Ερευνών Αθηνών. Η τράπεζα που δημιουργήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος αυτού περιελάμβανε βακτήρια εκτός των μυξοβακτηριδίων.

Η κύρια όμως, απαίτηση της ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας και κυρίως της θαλάσσιας είναι η δημιουργία εμβολίων και αυτεμβολίων από στελέχη βακτηρίων που κυριαρχούν στον ελληνικό χώρο, κάτι που αυτή η Τράπεζα μπορεί να δώσει στο άμεσο μέλλον. Μέχρις στιγμής, σήμερα, κυκλοφορεί μόνο ένα εμπορικό εμβολιακό σκεύασμα (FM-95) ως πατέντα του πανεπιστημίου Santiago de Compostela της Ισπανίας για την πρόληψη της μυξοβακτηρίασης στο καλκάνι.

Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας είναι πρωτότυπα καθώς δεν υπάρχει πληροφόρηση για τις μολύνσεις από τα μυξοβακτήρια, ιδίως στα θαλασσινά μεσογειακά είδη και η θεραπεία που επιχειρείται σήμερα στις περιπτώσεις αυτές είναι συνήθως εμπειρική. Έτσι, η επιτυχής υλοποίηση των στόχων του προτεινόμενου έργου καθίσταται πρωταρχικής σημασίας και θα συμβάλει σημαντικά στην βελτίωση της θεραπείας, της έγκαιρης και ακριβούς διάγνωσης και επομένως στην αύξηση της παραγωγικότητας και ποιότητας των εκτρεφόμενων αυτών ειδών.

**Επιστημονική Υπεύθυνη:** Αθανασοπούλου Φωτεινή, Καθηγήτρια.  
Εργαστήριο Ιχθυολογίας – Ιχθυοπαθολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Π.Θ.), Τ.Θ. 199, 431 00 - Καρδίτσα, Τηλ: 24410 66008, 66045, Fax: 24410 66041, e-mail: eathan@vet.uth.gr

**Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.**



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>**  
**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**



Alderman DJ, Smith P (2001). Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture* 196:211–243.

Alsina M, Blanch AR (1993). First isolation of *Flexibacter maritimus* from cultivated turbot (*Scophthalmus maximus*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 13:157-160.

Altinok I (2004). Toxicity and therapeutic effects of chloramine-T for treating *Flavobacterium columnare* infection of goldfish. *Aquaculture* 239: 47-56.

Anacker RL, Ordal EJ (1959). Studies on the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*. I. Serological typing. *Journal of Bacteriology* 78: 25-32.

Angelidis P, Giagnissi M, Vatsos I, Bithava K, Teliouis K, Solomakos N, Athanassopoulou F (2008). Aquaculture bacterial bank in Greece - methodology and first results. *Scientific Annals of the Danube Delta Institute, Tulcea – Romania*, 14: 5-8.

Arndt RE, Wagner EJ (1997). The Toxicity of Hydrogen Peroxide to Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* and Cutthroat Trout *Oncorhynchus clarki* Fry and Fingerlings. *Journal of the World Aquaculture Society* 28(2): 150-157.

Athanassopoulou F (1990). A study of the Myxosporean infections of *R. rutilus* L. with special reference to *Myxidium rhodei* Leger, 1905 in the renal tissue. Ph.D. Thesis, University of Stirling, Stirling. Pp. 153-186.

Austin B & Austin DA (1993). *Bacterial Fish Pathogens: Diseases in Farmed and Wild Fish*, 2nd edn. Ellis Horwood Ltd, Chichester.

Avendaño-Herrera R, Magariños B, Romalde JL, Toranzo AE (2003). An update on the antigenic diversity in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from marine fishes. *FHS/AFS Newsletter* 31(2): 24-26.

Avendaño-Herrera R, Rodríguez J, Magariños B, Romalde JL, Toranzo AE (2004). Intraspecific diversity of the marine pathogen *Tenacibaculum maritimum* as determined by randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Journal of Applied Microbiology* 96: 871-877.

Avendaño-Herrera R, Magariños B, López-Romalde S, Romalde JL, Toranzo AE (2004a). Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from marine fishes. *Diseases of Aquatic Organisms* 58: 1–8.

Avendaño-Herrera R, Magariños B, Toranzo AE, Beaz R, Romalde JL (2004b). Species-specific polymerase chain reaction primer sets for the diagnosis of *Tenacibaculum maritimum* infection. *Diseases of Aquatic Organisms* 62: 75–83.

Avendaño-Herrera R, Nuñez S, Magariños B, Toranzo AE (2004c). A non-destructive method for rapid detection of *Tenacibaculum maritimum* in farmed fish using nested PCR amplification. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 24(6): 280-286.

Avendaño-Herrera R, Irgang R, Núñez S, Romalde JL, Toranzo AE (2005a). Recommendation of an appropriate medium for in vitro drug susceptibility testing of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (1): 82–87.

Avendaño-Herrera R, Magariños B, Morinigo MA, Romalde JL, Toranzo AE (2005b). A novel O-serotype in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bulletin of the European Association Fish Pathologists* 25: 70-74.

Avendaño-Herrera R, Toranzo AE, Romalde JL, Lemos ML, Magariños B (2005c). Iron uptake mechanisms in the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11): 6947-6953.

Avendaño-Herrera R, Toranzo AE Magariños B (2006). Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Diseases of Aquatic Organisms* 71: 255-266.

Avendaño-Herrera R, Magariños B, Irgang R, Toranzo AE (2006a). Use of hydrogen peroxide against the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* and its effect on infected turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 257: 104– 110.

Avendaño-Herrera R, Toranzo AE Magariños B (2006b). A challenge model for *Tenacibaculum maritimum* infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 29: 371-374.

Avendaño-Herrera R, Irgang R, Magariños B, Romalde JL, Toranzo AE (2006c). Use of microcosm to determine the survival of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* in seawater. *Environmental Microbiology* 8: 921-928.

Avendaño-Herrera R, Núñez S, Barja JL, Toranzo AE (2008). Evolution of drug resistance and minimum inhibitory concentration to enrofloxacin in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated in fish farms. *Aquaculture International Journal* 16: 1–11.

Avendaño-Herrera R (2009). Identification of *Flexibacter maritimus* or *Tenacibaculum maritimum* from post-larvae of *Litopenaeus vannamei*?. Comment on Mouriño et al., (2008). *Brazilian Journal of Biology* 69(1): 225-226.

Bader JA, Shotts EB (1998). Identification of *Flavobacterium* and *Flexibacter* species by species-specific polymerase chain reaction primers to the 16S ribosomal RNA gene. *Journal of Aquatic Animal Health* 10(4): 311–319.

Ballarin L, Dall’Oro M, Bertotto D, Libertini A, Francescon A, Barbaro A (2004). Haematological parameters in *Umbrina cirrosa* (Teleostei, Sciaenidae): a comparison between diploid and triploid specimens. *Comparative Biochemistry and Physiology* 138: 45-51.

Bancroft JD, Gamble M (2007). Theory and Practice of Histological Techniques 5th ed., Churchill Livingstone., London. pp. 744.

Barcellos LJG, Nicolaiewsky S, De Souza SMG, Lulhier F (1999). The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. Aquaculture Research 30(11-12): 887-892.

Baxa DV, Kawai K, Kusuda R (1986). Characteristics of gliding bacteria isolated from diseased cultured flounder, *Paralichthys olivaceous*. Fish Pathology 21: 261-258.

Baxa DV, Kawai K, Kusuda R (1987). Experimental infection of *Flexibacter maritimus* in black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*) fry. Fish Pathology 22: 105-109.

Baxa DV, Kawai K, Kusuda R (1988b). *In vitro* and *in vivo* activities of *Flexibacter maritimus* toxins. Reports of USA Marine Biology Institute. Kochi University 10(1): 1-8.

Bernardet, JF (1986). '*Flexibacter columnaris*': first description in France and comparison with bacterial strains from other origins Diseases of Aquatic Organisms 6: 37-44.

Bernardet JF, Grimont PAD (1989). Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev. *Flexibacter psychrophilus* sp. nov. nom. rev. and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. International Journal of Systematic Bacteriology 39(3): 346-354.

Bernardet JF, Campbell AC, Buswell JA (1990). *Flexibacter maritimus* is the agent of 'Black patch necrosis' in Dove sole in Scotland. Diseases of Aquatic Organisms 8: 233-237.

Bernardet JF, Kerouault B, Michel C (1994). Comparative study on *Flexibacter maritimus* strains isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in France. *Fish Pathology* 29: 105–111.

Bernardet JF (1998). *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flexibacter* and *Chryseobacterium* infections in cultured marine fish. *Fish Pathology* 33: 229-238.

Booth NH, McDonald LE (1988). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 6th edition Iowa State Press, Ames, IO, USA, pp. 774–777.

Boran H, Altinok I (2013). Impacts of chloramine-T treatment on antioxidant enzyme activities and genotoxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* doi:10.1111/jfd.12122.

Bowker JD, Carty D, Erdahl DA (2000). The safety of Chloramine-T to various life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Study Protocol Number: BFTC-99-CHLT-TAS.

Bowker JD, Carty D, Telles L, David B, Oviedo D (2008). Efficacy of Chloramine-T to Control Mortality in Freshwater-Reared Salmonids Diagnosed with Bacterial Gill Disease. *North American Journal of Aquaculture* 70(1): 20-26.

Bowker JD, Carty D, Trushenski JT, Bowman MP, Wandelaar N, Matthews M (2013). Controlling Mortality Caused by External Columnaris in Largemouth Bass and Bluegill with Chloramine-T or Hydrogen Peroxide. *North American Journal of Aquaculture* 75(3): 342-351.

Bruno DW, Raynard RS (1994). Studies on the use of hydrogen peroxide as a method for the control of sea lice on Atlantic salmon. *Aquaculture International* 2(1): 10-18.

Buller NB (2004). 'Bacteria from fish and other aquatic animals'. A practical identification manual. Textbook, CABI Publishing, 875 Massachusetts Avenue. pp. 178-183.

Bullock GL, Hsu TC, Shotts EB (1986). Columnaris disease of fishes. Fish disease Leaflet No.72, US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Division of Fisheries and Wetlands Research, Washington DC. pp. 9.

Bullock GL, Herman RL, Waggy C (1991). Hatchery Efficacy Trials with Chloramine-T for Control of Bacterial Gill Disease. *Journal of Aquatic Animal Health* 3(1): 48-50.

Burchard RP, Rittschof D, Bonaventura J (1990). Adhesion and motility of gliding bacteria on substrata with different surface free energies. *Applied Environmental Microbiology* 56: 2529-2534.

Cameron DE (1993). Evaluation of amoxycillin for the therapy of salmonid cutaneous erosion disease. In: Valentine, P. (Ed.), *Seeking and Solving: Papers from the Saltas 1993 Research and Development Review Seminar*, Hobart, Tasmania. pp. 129–133.

Campbell AC, Buswell JA (1982). An investigation into the bacterial etiology of 'black patch necrosis' in Dover sole, *Solea solea* L. *Journal of Fish Diseases* 5: 495–508.

Carson J, Schmidtke LM, McCosh P (1993). A salmonid vaccine against *Flexibacter maritimus* – dream or reality? In: Valentine, P. (Ed.), *Seeking and Solving: Papers from the Saltas 1993. Research and Development Review Seminar*, Hobart, Tasmania, pp. 113–120.

Carson J, Schmidtke L, Lewis T (1994). Development of a vaccine against disease: results of efficacy testing of three types of vaccine. In: Valentine, P. (Ed.), *Proceedings from the Saltas 1994 Research and Development Review Seminar*, Hobart, Tasmania. pp. 149–158.

Cepeda C, Santos Y (2002). First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. *Bulletin of the European Association Fish Pathologists* 22: 388-392.

Cepeda C, Garcia-Marcuez S, Santos Y (2003). Detection of *Flexibacter maritimus* in fish tissue using nested PCR amplification. *Journal of Fish Diseases* 26: 65-70.

Chao LN, Trewavas E (1990). Sciaenidae In J.C. Quero, J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post and L. Saldanha (eds.) Check-list of the fishes the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. Vol. 2. . pp. 813-826.

Chen MF, Henry-Ford D, Groff JM (1995). Isolation and characterization of *Flexibacter maritimus* from marine fishes of California. *Journal of Aquatic Animal Health* 7(4): 318-326.

Chen MF, Henry-Ford D, Groff JM (1995). Isolation of *Flexibacter maritimus* from California. *FHS/AFS Newsletter*. 22: 7 –11.

Choi DH, Kim YG, Hwang CY, Yi H, Chun J, Cho BC (2006) *Tenacibaculum litoreum* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 56: 635-640.

Cipriano RC, Ford LA, Starliper CE, Teska JD, Nelson JT, Jensen BN (1996b) Control of external *Aeromonas salmonicida*: topical disinfection of salmonids with Chloramine-T. *Journal of Aquatic Animal Health* 8: 52-57.

Cipriano RC, Novak BM, Flint DE, Cutting DC (2001). Reappraisal of the federal fish health recommendation for disinfecting eggs of Atlantic salmon in iodophor. *Journal of Aquatic Animal Health* 13: 320–327.

Company R, Sitjà-Bobadilla A, Pujalte MJ, Garay E, Alvarez-Pellitero P, Pérez-Sánchez J (1999). Bacterial and parasitic pathogens in cultured common dentex, *Dentex dentex* L. *Journal of Fish Diseases* 22: 299–309.

Costello MJ, Grant A, Davies IM, Cecchini S, Papoutsoglou S, Quigley D, Saroglia M (2001). The control of chemicals used in aquaculture in Europe. *Journal of Applied Ichthyology* 17: 173–180.

Crosbie PBB, Munday BL (1999). Environmental factors and chemical agents affecting the growth of the pathogenic marine ciliate *Uronema nigricans*. *Diseases of Aquatic Organisms* 36: 213–219.

Cruz-Lacierda ER, Pineda AJT, Nagasawa K (2012). In vivo treatment of the gill monogenean *Pseudorhabdosynochus lantauensis* (Monogenea, Diplectanidae) on orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) cultured in the Philippines. *AACL Bioflux* 5(5): 330-336.

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.

Dalsgaard I (2001). Selection of media for antimicrobial susceptibility testing of fish pathogenic bacteria. *Aquaculture* 196: 267–275.

Davis HS (1922). A new bacterial disease of fresh-water fishes. *Bull. U.S.A. Bur. Fish* 38: 261-280.

Debuf Y (1991). *The Veterinary Formulary* Pharmaceutical Press, London, UK.

Devesa S, Barja JL, Toranzo AE (1989). Ulcerative and skin and fin lesions in reared turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Journal of Fish Diseases* 12: 323–333.

Díaz-Rosales P, Chabrilón M, Moriñigo MA, Balebona M (2003). Survival against exogenous hydrogen peroxide of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* under different culture conditions. *Journal of Fish Diseases* 26: 305–308.

DIPNET report (2007). *Tenacibaculum maritimum* (*Flexibacter maritimus*). In *Review of Disease Interactions and Pathogen Exchange Between Farmed and Wild Finfish and Shellfish in Europe*. pp 260-262.



Derksen JA, Ostland VE, Ferguson HW (1999). Effects of hydrogen peroxide on clearance of formalin-killed *Flavobacterium branchiophilum* from the gills of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 22: 59–67.

Drury RA, Wallington EA (1980). *Carleton's Histological Techniques*. Oxford University Press, Oxford, London. pp. 520.

Eurostat,2011.

[http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics\\_explained/index.php?title=File:Aquaculture\\_production,\\_2007%E2%80%9311\\_\(tonnes\\_live\\_weight\)\\_AgriPB13.png&filetimestamp=20131028131642](http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/index.php?title=File:Aquaculture_production,_2007%E2%80%9311_(tonnes_live_weight)_AgriPB13.png&filetimestamp=20131028131642)

Failde LD, Losada AP, Bermudez R, Santos Y, Quiroga MI (2013). *Tenacibaculum maritimum* infection: Pathology and immunohistochemistry in experimentally challenged turbot (*Psetta maxima* L.). *Microbial Pathogenesis* 65: 82-88.

FAO (2008). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture, Rome. Fisheries Department Databases and Statistics: <http://www.fao.org/fi/statist/statist.asp>

FAO (2009). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture 2008. Rome 2009.  
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e.pdf>

FAO (2012). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The State of World Fisheries and Aquaculture 2012. Rome 2012.  
<http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>

Ferguson HW, Delannoy CMJ, Nicolson J, Sutherland J, Crumlish M (2010). Jellyfish as vectors of bacterial disease for farmed salmon (*Salmo salar*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22: 376-382.

FISHSTAT & FEAP (2008).

<http://www.feap.info/FileLibrary%5C11%5CProductionreport2008.pdf>.

Frerichs GN (1993). Isolation and identification of fish bacterial pathogens. In: Bacterial Diseases of Fish (ed. by V. Inglis, R.J. Roberts & N.R. Bromage). Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 257-283.

Frette L, Jorgensen NOG, Irming H, Kroer N (2004) *Tenacibaculum skagerrakense* sp. nov., a marine bacterium isolated from the pelagic zone in Skagerrak, Denmark. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology 54: 519-524.

Gaikowski MP, Rach JJ, Ramsay RT (1999). Acute toxicity of hydrogen peroxide treatments to selected lifestages of cold-, cool-, and warmwater fish. Aquaculture 178: 191–207.

Gaikowski MP, Larson WJ, Gingerich WH (2008). Survival of cool and warm freshwater fish following chloramine-T exposure. Aquaculture 275: 20-25.

Gaikowski MP, Densmore CL, Blazer VS (2009). Histopathology of repeated, intermittent exposure of chloramine-T to walleye (*Sander vitreum*) and (*Ictalurus punctatus*) channel cat fish. Aquaculture 287: 28-34.

Gilbert BC, King DM, Thomas CB (1984). The oxidation of some polysaccharides by the hydroxyl radical: an e. s. r. investigation. Carbohydr. Res. 125: 217–235.

Grant AN (2002). Medicines for sea lice. Pest Management Science 58: 521-527.

Handler J, Soltani H, Percival V (1997). The pathology of *Flexibacter maritimus* in aquaculture species of Tasmania, Australia. Journal of Fish Diseases 20: 159– 168.

Hansen GH, Bergh Ø, Michaelsen J, Knappskog D (1992). *Flexibacter ovolyticus* sp. nov., a Pathogen of Eggs and Larvae of Atlantic Halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. International Journal of Systematic Bacteriology 42: 451-458.

Harris JO, Powell MD, Attard M, Green TJ (2004). Efficacy of chloramine-T as a treatment for amoebic gill disease (AGD) in marine Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture Research 35:1448–1456.

Harris JO, Powell MD, Attard MG, DeHayr L (2005). Clinical assessment of chloramine-T and freshwater as treatments for the control of gill amoebae in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Research* 36:776–784.

Heindl H, Wiese J, Imhoff JF (2008). *Tenacibaculum adriaticum* sp. nov., from a bryozoan in the Adriatic Sea. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 58: 542-547.

Hikida M, Wakabayashi H, Egusa S, Masumura K (1979). *Flexibacter* sp., a gliding bacterium pathogenic to some marine fishes in Japan. *Bulletin of Japanese Society of Science in Fisheries* 45 (4): 421–428.

Hirazawa N, Hara T, Mitsuboshi T, Okazaki J, Hata K (1999). Iodophor disinfection of eggs of spotted halibut *Verasper variegates* and red sea bream *Pagrus major*. *Fish Science* 65: 333–338.

Hodgkin J, Kaiser D (1979). Genetics of gliding motility in *Myxococcus Xanthus* (*myxobacteriales*): genes controlling movement of single cells. *Molec. Gen. Genet.* 171: 167-176.

Hoiczuk E (2000). Gliding motility in cyanobacteria: observations and possible explanations. *Arch. Micro.* 174: 11-17.

Hyslop PA, Zhang Z, Pearson DV, Phebus LA (1995). Measurement of striatal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by microdialysis following global forebrain ischemia and reperfusion in the rat: correlation with the cytotoxic potential of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro. *Brain Res* 671: 181–186.

Johnson SC, Constible JM, Richard J (1993). Laboratory investigations on the efficacy of hydrogen peroxide against the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and its toxicological and histopathological effects on Atlantic salmon *Salmo salar* and chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Diseases of Aquatic Organisms* 17: 197–204.

Jung SY, Oh TK, Yoon JH (2006). *Tenacibaculum aestuarii* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment in Korea. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 56: 1577-1581.

Kaiser D (2000). Bacterial motility: How do pili pull?. *Current Biology* 10: 777-780.

Katharios P, Tsigenopoulos C (2010). First report of nodavirus outbreak in cultured juvenile shi drum, *Umbrina cirrosa* L., in Greece. *Aquaculture Research* 42: 147-152.

Kato F, Ishimaru K, Murata O, Kumai H (2006). The efficacy of immersion - vaccination against gliding bacterial disease in red sea bream *Pagrus major* and Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Science* 55: 97-101.

Kato F, Ishimaru K, Murata O, Kumai H (2007). The efficacy of immersion-vaccination against gliding bacterial disease in red sea bream *Pagrus major*. *Animal Diseases* 73: 51-54.

Kiemer MCB, Black KD (1997). The effects of hydrogen peroxide on the gill tissues of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture* 153: 181–189.

Kimberley AW (2004). *Finfish and shellfish Bacteriology manual techniques and procedures*. 15-28/A, Blackwell publishing company, USA.

King K, Farrell P (2002). Sensitivity of Juvenile Atlantic Sturgeon to Three Therapeutic Chemicals Used in Aquaculture. *North American Journal of Aquaculture* 64(1): 60-65.

Kolygas MN, Gourzioti E, Vatsos IN, Athanassopoulou F (2012). Identification of *Tenacibaculum maritimum* strains from marine farmed fish in Greece. *Journal of Veterinary Record* 170(24): 623.

Kunttu HMT, Sundberg LR, Pulkkinen K, Tellervo Valtonen E (2012). Environment may be the source of *Flavobacterium columnare* outbreaks at fish farms. *Environmental Microbiology Reports* 4(4): 398-402.

Lee YS, Baik KS, Park SY, Kim EM, Lee DH, Kahng HY, Jeon CO, Jung JS (2009). *Tenacibaculum crassostreae* sp. nov., isolated from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59: 1609-1614.

Leef MJ, Harris JO, Powell MD (2007). The respiratory effects of chloramine-T exposure in seawater acclimated and amoebic gill disease-affected Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture* 266 (1): 77-86.

Lumsden JS, Ostland VE, Ferguson HW (1998). Use of hydrogen peroxide to treat experimentally induced bacterial gill disease in rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health* 10: 230–240.

Magariños B, Pazos F, Santos Y, Romalde JL, Toranzo AE (1995). Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 21: 103–108.

Magi GA, Avendaño-Herrera R, Toranzo AE, Romalde JL (2006). First report of *Tenacibaculum maritimum* serotype O3 infection in cultured turbot *Chelidonichthys lucernus* L. in Italy. *Ittiopatologia* 3: 113-119.

Mansell B, Powell MD, Ernst I, Nowak BF (2005). Effects of the gill monogenean *Zeuxapta seriolae* (Meserve, 1938) and treatment with hydrogen peroxide on pathophysiology of kingfish, *Seriola lalandi Valenciennes*, 1833. *Journal of Fish Diseases* 28: 253–262.

Merz A, Sheetz M, So M (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* 407: 98-102.

McAndrew KJ, Sommerville C, Wooten R, Bron JE (1998). The effects of hydrogen peroxide treatment on different life-cycle stages of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837). *Journal of Fish Diseases* 21: 222–228.

McVicar AH, White PG (1979). Fin and skin necrosis of cultivated Dover sole *Solea Solea* (L.). *Journal of Fish Diseases* 2: 557-562.

McVicar AH, White PG (1982). The prevention and cure of an infectious disease in cultivated juvenile Dover sole *Solea solea* (L.). *Aquaculture* 26: 213– 222.

Mitchell SO, Rodger HD (2011). A review of infectious gill disease in marine salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* 34: 411-432.

Mohamed AA, El-Galil A, Hashiem M (2011). Tenacibaculosis in Picasso Tigger Fish (*Rhinecanthus Assasi*) and Black Damsel Fish (*Neoglyphieodon Meles*) of Red Sea at Hurghada, Egypt. *Life Science Journal* 8(4): 1166-1171.

Mohamed AA, El-Galil A, Hashiem M (2012). Experimental infection of Tenacibaculosis and a Trial for Treatment by Plant Extract Carvacrol in Surge Wrasses Fish (*Thalassoma Purpureum*). *Life Science Journal* 9(2): 442-447.

Montgomery-Brock D, Sato VT, Brock JA, Tamaru CS (2001). The application of hydrogen peroxide as a treatment for the ectoparasite *Amyloodinium ocellatum* on the Pacific threadfin *Polydactylus sexfilis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 32: 250–254.

Mouriño JLP, Vinatea L, Buglione-Neto C, Ramirez CT, Vieira FN, Pedrotti F, Martins ML, Derner RB, Aguilar MA, Beltrame E (2008). Characterization and experimental infection of *Flexibacter maritimus* (Wakabayashi et al., 1986) in hatcheries of post-larvae of *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. *Brazilian Journal of Biology* 68 (1): 173-177.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard of Antimicrobial Susceptibility) (2001). Testing; Eleventh Information Supplement. NCCLS document M100-S11 NCCLS, Pennsylvania, USA.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2003). Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals;

A Report. NCCLS document M42-R [ISBN1-56238-501-1]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

NCIMB, National Collection of Marine and Industrial Bacteria (Aberdeen, UK).

Noga EJ (2000). Fish Disease: Diagnosis and Treatment. Blackwell Publishing, 1<sup>st</sup> ed., Iowa. pp.4-5,11-15,139-146,254-256,272-295.

Ofek I, Doyle RJ (1994). Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman & Hall, New York.

Oh YS, Kahng HY, Lee DH, Lee SB (2012). *Tenacibaculum jejuense* sp. nov., isolated from coastal seawater. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62: 414-419.

Ordal EJ, Rucker RR (1944). Pathogenic myxobacteria. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 56: 15-18.

Ostland VE, LaTrace C, Morrison D, Ferguson HW (1999). *Flexibacter maritimus* associated with bacterial stomatitis in Atlantic salmon smolts reared in net-pens in British Columbia. Journal of Aquatic Animal Health 11: 35-44.

Pazos F, Santos Y, Núñez S, Toranzo AE (1993). Increasing occurrence of *Flexibacter maritimus* in marine aquaculture of Spain. FHS/AFS Newsletter 21: 1-2.

Pazos F, Santos Y, Macías AR, Núñez S, Toranzo AE (1996). Evaluation of media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. Journal of Fish Diseases 19: 193-197.

Pazos F (1997). *Flexibacter maritimus*: estudio fenotípico, inmunológico y molecular. PhD Thesis. Universidad Santiago de Compostela.

Piñeiro-Vidal M, Riaza A, Santos Y (2008). *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot

(*Psetta maxima*) culture systems. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 21-25.

Piñeiro-Vidal M, Carballas CG, Barreiro OG, Riaza A, Santos Y (2008a). *Tenacibaculum soleae* sp. nov., isolated from diseased sole (*Solea senegalensis* Kaup). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 881-885.

Piñeiro-Vidal M, Riaza A, Santos Y (2008b). *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 21-25.

Piñeiro-Vidal M, Gijon D, Zarza C, Santos Y (2012). *Tenacibaculum dicentrarchi* sp. nov., a marine bacterium of the family *Flavobacteriaceae* isolated from European sea bass. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62: 425-429.

Popovic NT, Coz-Rakovac R, Strunjak-Perovic I (2007). Commercial phenotypic tests (API 20E) in diagnosis of fish bacteria: a review. Veterinarni Medicina 52: 49-53.

Powell MD, Perry SF (1997). Respiratory and acid-base disturbances in rainbow trout blood during exposure to chloramine-T under hypoxia and hyperoxia. Journal of Fish Biology 50: 418-428.

Powell MD, Clark GA (2003). In vitro survival and the effect of water chemistry and oxidative chemical treatments on isolated gill amoebae from AGD affected Atlantic salmon. Aquaculture 220:135-144.

Powell MD, Carson J, van Gelderen R (2004). Experimental induction of gill disease in Atlantic salmon *Salmo salar* smolts with *Tenacibaculum maritimum*. Diseases of Aquatic Organisms 61: 179-185.



Powell MD, Harris JO, Carson J, Hill JV (2005). Effects of gill abrasion and experimental infection with *Tenacibaculum maritimum* on the respiratory physiology of Atlantic salmon *Salmo salar* affected by amoebic gill disease. *Diseases of aquatic organisms* 63: 169-174.

Rach JJ, Schreier TM, Howe GE, Redman SD (1997). Effects of species, life stage, and water temperature on the toxicity of hydrogen peroxide to fish. *Progressive Fish-Culturist* 59: 41–46.

Rach JJ, Gaikowski MP, Ramsay RT (2000). Efficacy of hydrogen peroxide to control parasitic infestations on hatchery-reared fish. *Journal of Aquatic Animal Health* 12: 267–273.

Reed LJ, Muench H (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* 27: 493-497.

Riley TA (2000). Treatment of *Flavobacterium columnare* and toxicity of chloramine-T in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. MS thesis, Auburn University, Auburn, Alabama.

Roberts RJ (1989). *Fish pathology*. Bailliere, Tindall, London. pp. 467.

Roberts RJ (2001). *Fish Pathology*. 3<sup>rd</sup> Edition. W.B. Saunders publishing. pp 199.

Romalde JL, Ravelo C, López-Romalde S, Avendanõ-Herrera R, Magariñõs B, Toranzo AE (2005). Vaccination strategies to prevent important emerging diseases for Spanish aquaculture. In: Midtlyng, P.J. (Ed.), *Fish vaccinology*. Karger, Switzerland. pp. 85-95.

Russo RE, Curtis W, Yanong RPE (2007). Preliminary investigations of hydrogen peroxide treatment of selected ornamental fishes and efficacy against external bacteria and parasites in green swordtails. *Journal of Aquatic Animal Health* 19: 121–127.

Sakai M, Sliman MK, Bshida T, Kobayashi M (1993). Identification of pathogenic fish bacteria using the API ZYM system. *Can. Fish Aquaculture Science* 50(11): 137-141.

Salati F, Cubadda C, Viale I, Kusuda R (2005). Immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax* to *Tenacibaculum maritimum* antigens. *Fisheries Science* 71: 563-567.

Sanchez JG, Speare DJ, Johnson GJ (1997). Morphometric and histochemical assessment of the branchial tissue response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), associated with chloramine-T treatment. *Journal of Fish Diseases* 20(5): 375-381.

Santos Y, Pazos F, Barja JL (1999). *Flexibacter maritimus*, causal agent of flexibacteriosis in marine fish. In: Olivier, G. (Ed.), ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. No. 55. International Council for the Exploration of the Sea. Copenhagen, Denmark. pp. 1 –6.

Scapeclaus W (1992). *Fish diseases*. 2<sup>nd</sup> edition. Balkema publishing. pp 238.

Shephard KL (1994). Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4: 401-429.

Sheu SY, Lin KY, Chou JH, Chang PS, Aru, AB, Young CC, Chen WM (2007). *Tenacibaculum litopenaei* sp. nov., isolated from a shrimp mariculture pond. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 57: 1148-1153.

Smith P (2001). Accuracy, precision and meaning of antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture* 196:253–266.

Soltani M, Burke CM (1994). Responses of fish-pathogenic *Cytophaga/Flexibacter*-like bacteria (CFLB) to environmental conditions. *Bulletin of the European Association Fish Pathologists* 14: 185-187.

Soltani M (1995). Comparison of some physiological variables of four species of *Cytophaga*/*Flexibacter*-like bacteria (CFLB) and the pathogenesis and chemotherapy of disease caused by some of these pathogens, Ph.D thesis. Department of Aquaculture, University of Tasmania, Launceston.

Soltani M, Munday BL, Burke CM (1996). The relative susceptibility of fish to infections by *Flexibacter columnaris* and *Flexibacter maritimus*. *Journal of Aquaculture* 140: 259–264.

Sorongon ML, Bloodgood RA, Burchard RP (1991). Hydrophobicity, adhesion, and surface-exposed proteins of gliding bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 57: 3193-3199.

Speare DJ, Arsenault GJ (1997). Effects of intermittent hydrogen peroxide exposure on growth and columnaris disease prevention of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 2653–2658.

Speare DJ, Carvajal V, Horney BS (1999). Growth suppression and bronchitis in trout exposed to hydrogen peroxide. *Journal of Comparative Pathology* 120(4): 391–402.

Spormann A (1999). Gliding motility in bacteria: insights from studies of *Myxococcus Xanthus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 621-641.

Stirling report, Stirling Institute of Aquaculture (2004). Study of the market for aquaculture produced lubina y dorada species. Report to the European Commission, DG Fisheries.

Suzuki M, Nakagawa Y, Harayama S, Yamamoto S (2001). Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amyolyticum* sp. nov. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 51: 1639– 1652.

Tendencia EA (2001). Effect of iodine disinfection on the bacterial flora and hatching rate of grouper, *Epinephelus coioides* eggs at the cleavage and eyed stages. *Bulletin of European Association of Fish Pathology* 21: 160–163.

Ternengo S, Agostini S, Quilichini Y, Euzet L, Marchand B (2010). Intensive infestations of *Sciaenocotyle panzerii* (Monogenea, Microcotylidae) on *Argyrosomus regius* (Asso) under fish-farming conditions. *Journal of Fish Diseases* 33: 89-92.

Thomas-Jinu S, Goodwin AE (2004). Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque): efficacy of practical treatments for warmwater aquaculture ponds. *Journal of Fish Diseases* 27: 23–28.

Thomassen JM (1993). Hydrogen peroxide as a delousing agent for Atlantic salmon. In: Boxshall GA, Defaye D (Eds.). *Pathogens of Wild and Farmed Fish: Sea Lice*. Ellis Horwood, Chichester. pp. 85–91.

Thorburn MA, Moccia RD (1993). Use of chemotherapeutics on trout farms in Ontario. *Journal of Aquatic Animal Health* 5:85–91.

Toovey JPG, Lyndon AR (2000). Effects of hydrogen peroxide, dichlorvos and cypermethrin on subsequent fecundity of sealice, *Lepeophtheirus salmonis*, under fish farm conditions. *Bulletin of the European Association Fish Pathologists* 20(6): 224-228.

Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Journal of Aquaculture* 246: 37–61.

Toyama T, Tsukamoto KK, Wakabayashi H (1996). Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. *Fish Pathology* 31: 25–31.

Treasurer JW, Grant A (1997). The efficacy of hydrogen peroxide for the treatment of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. infested with sea lice (Copepoda:Caligidae). *Aquaculture* 148: 265-275.

Treasurer JW, Wadsworth S, Grant A (2000). Resistance of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer), to hydrogen peroxide on farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Research* 31: 855-860.

van Gelderen R, Carson J, Nowak B (2009). Experimental vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against marine flexibacteriosis. *Aquaculture* 288: 7–13.

van Gelderen R, Carson J, Nowak B (2011). Experimentally induced marine flexibacteriosis in Atlantic salmon smolts *Salmo salar*. II. Pathology. *Diseases of Aquatic Organisms* 95: 125-135.

Vatsos I, Yiagnisis M, Karakostas I (2006). *Ceratomyxa* spp. (Myxosporea) infection in cultured shi drum (*Umbrina cirrosa*) and cultured brown meagre (*Sciaena umbra*). *Bulletin of European Association in Fish Pathology* 26 (2): 93-96.

Vatsos IN (2007). *Tenacibaculum maritimum* (*Flexibacter maritimus*). In *Review of Disease Interactions and Pathogen Exchange Between Farmed and Wild Finfish and Shellfish in Europe*. Eds R. Raynard, T. Wahli, I. Vatsos, S. Mortensen. VESO. pp 459. [www.revistaaquatic.com/DIPNET/docs/index.asp](http://www.revistaaquatic.com/DIPNET/docs/index.asp). Accessed April 3, 2012.

Vilar P, Faílde LD, Bermúdez R, Vigliano F, Riaza A, Silva R, Santos Y, Quiroga MI (2012). Morphopathological features of a severe ulcerative disease outbreak associated with *Tenacibaculum maritimum* in cultivated sole, *Solea senegalensis* (L.). *Journal of Fish Diseases* 35(6): 437-445.

Vinogradov E, MacLean LL, Crump EM, Perry MB, Kay WW (2003). Structure of the polysaccharide chain of the lipopolysaccharide from *Flexibacter maritimus*. *European Journal of Biochemistry* 270: 810-1815.

Vroegop SM, Decker DE, Buxser SE (1995). Localization of damage by reactive oxygen species in cultured cell. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 141–151.

Wakabayashi H, Hikida M, Masumura K (1984). *Flexibacter* infection in cultured marine fish in Japan. *Helgol Meeresunters* 37: 587-593.

Wakabayashi H, Hikida M, Masumura K (1986). *Flexibacter maritimus* sp. nov., a pathogen of marine fishes. International Journal of Systemic Bacteriology 36: 396-398.

Wang JT, Chou YJ, Chou JH, Chen CA, Chen WM (2008). *Tenacibaculum aiptasiae* sp. nov., isolated from a sea anemone *Aiptasia pulchella*. International Journal of Evolutionary Microbiology 58: 761-766.

Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (1989). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 4. Lippincott, Williams & Wilkins. pp. 440.

Wolgemuth C, Hoiczky E, Kaiser D, Oster G (2002). How myxobacteria glide. Curr. Biol. 12: 369-377.

Woo PTK, Bruno DW, Lim LHS (2003). Diseases And Disorders Of Finfish In Cage Culture. Cabi publishing. pp 138.

World Federation for Culture Collections Guidelines for the Establishment and Operation of Collections of Cultures of Microorganisms, 2nd Edition (June 1999-revised by the WFCC Executive Board <http://www.wfcc.info/guideline.html>).

Yamaguti S (1963). Systema Helminthum Vol. I-II. Interscience Publishers, New York.

Yanong RPE (2011). Use of Hydrogen Peroxide in Finfish Aquaculture. Program in Fisheries and Aquatic Sciences. University of Florida, pp. 1-7. DIS website at <http://edis.ifas.ufl.edu>.

Yiagnisis M, Athanassopoulou F (2011). Bacteria isolated from diseased wild and farmed marine fish in Greece. InTech. InTech Europe. [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)

Yiagnisis M (2011). Impact of stress and oregano essential oil supplementation on the intestinal microflora and health of farmed marine fish gilthead sea bream (*Sparus*

*aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in Greece. Ph.D. Thesis, University of Thessaly, Karditsa, pp. 210-220.

Yoon JH, Kahng SJ, Oh TK (2005). *Tenacibaculum lutimaris* sp. nov., isolated from a tidal flat in the Yellow Sea, Korea. *Journal of Evolutionary Microbiology* 55: 793-798.

Αθανασοπούλου Φ (2006). Νοσήματα των εκτρεφόμενων ψαριών στην Ελλάδα. Διδακτικές Σημειώσεις του μαθήματος της Ιχθυοπαθολογίας για τους φοιτητές του 7<sup>ου</sup> εξαμήνου. Παν/κές Εκδόσεις Θεσσαλίας.

Παπουτσόγλου Σ (1997). Εισαγωγή στις Υδατοκαλλιέργειες. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.

Ράγιας Β, Αθανασοπούλου Φ (2005). Χαρακτηριστικά εκτροφής και παθολογικά προβλήματα νέων ειδών εκτρεφόμενων ψαριών γλυκού νερού στην Ελλάδα. *Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρίας* 56(1): 40-45.

Στεργίου Κ (1991). Βιολογία, οικολογία και δυναμική του ψαριού *Cepola Macrophthalma* (L., 1758) (*Pisces Cepolidae*) στον Ευβοϊκό και Παγασητικό κόλπο, Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ). Τμήμα Βιολογίας. Τομέας Ζωολογίας. pp. 74-76.

Στεφανής Ι (2007). Ιχθυοκαλλιέργεια: η πρόκληση του μέλλοντος. Ομιλία στην Επιτροπή Αλιείας του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου ΕΒΕΑ. *Αλιευτικά Νέα* 312: 37-38.

Φώτης Γ (2003). Εκτροφή και Παθολογία ιχθύων. Τόμος Α', Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη. pp. 306-313.

[http<sup>1</sup>:http://portal.kathimerini.gr/4dcgi/warticleskathbreak108/06/2011393983](http://portal.kathimerini.gr/4dcgi/warticleskathbreak108/06/2011393983)

[http<sup>2</sup>](#): (Fao Fishery Statistic)

<http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?iso3=GRC&subject=6>

http<sup>3</sup>: <http://www.mass.gov/czm/wpfshlth.htm>

http<sup>4</sup>: <http://www.halamid.com/Aquaculture-desinfection.htm>

http<sup>5</sup>: [www.halamid.com](http://www.halamid.com)

http<sup>6</sup>: <http://el.wikipedia.org/wiki/>

http<sup>7</sup>: [http://a-giamarina.blogspot.gr/p/blog-page\\_3650.html](http://a-giamarina.blogspot.gr/p/blog-page_3650.html)

http<sup>8</sup>: <http://stilida.com/periballon/oikologia/o-maliakos-kolpos/>

http<sup>9</sup>: <http://www.sagiada.gr/>



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**Πίνακες 1-24.** Μέσοι συντελεστές ικανότητας απομόνωσης που παρουσίασαν τα θρεπτικά υποστρώματα (FMM, MA, AOA, TSA+2% NaCl, TCBS) σε κάθε δειγματοληψία, για κάθε είδος και μονάδα ξεχωριστά.

(σ.σ.\* Δ: Δέρμα, Β: Βράγχια, Ν: Νεφρός και Σ: Σπλήνας, χ: Δεν αναπτύχθηκε τίποτα, (+): αποικίες *T. maritimum* και (ο): Gram- βάκιλοι, κόκκοι)

**Πίνακας 1. 1<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Λαβράκι-Μονάδα Α-Μονάδα Β**

1η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Λαβράκι							1η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Λαβράκι						
		FMM	MA	AOA	TSA	TCBS			FMM	MA	AOA	TSA	TCBS
<b>A</b>	Δ (+)	0,36	0,12	0,16	0	#ΔΙΑΙΡ/0!	<b>B</b>	Δ (+)	0,56	0,12	0,28	0	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0	0	0	0	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (X)	0	0	0	0	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (O)	0,64	0,88	0,84	1	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (O)	0,44	0,88	0,72	1	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0	0,04	0,52	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (+)	0,12	0,08	0,52	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,16	0	0,08	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (x)	0	0	0	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (O)	0,84	0,96	0,4	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (O)	0,88	0,92	0,48	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0	0	0	0	0		N (+)	0	0	0	0	0
	N (X)	0,923077	0,666667	0,7142857	0,64	0,833333		N (X)	0,769231	0,416667	0,5	0,48	0,583333
	N (O)	0,076923	0,333333	0,2857143	0,36	0,166667		N (O)	0,230769	0,583333	0,5	0,52	0,416667
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,666667	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,333333	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (O)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,333333	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (O)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,666667	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 2. 1<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Τσιπούρα-Μονάδα Α-Μονάδα Β**

1η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Τσιπούρα							1η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Τσιπούρα						
		FMM	MA	AOA	TSA	TCBS			FMM	MA	AOA	TSA	TCBS
<b>A</b>	Δ (+)	0,16	0,2	0,04	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	<b>B</b>	Δ (+)	0,04	0,12	0	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0	0,04	0,08	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (X)	0,04	0	0,28	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (O)	0,84	0,76	0,88	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (O)	0,92	0,88	0,72	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0	0,12	0,12	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (+)	0	0,04	0,04	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,56	0,12	0,24	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (x)	0,64	0	0,36	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (O)	0,44	0,76	0,64	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (O)	0,36	0,96	0,6	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0	0	0	0	0		N (+)	0	0	0	0	0
	N (X)	1	0,636364	1	0,791667	0,833333		N (X)	1	0,916667	1	0,88	1
	N (O)	0	0,363636	0	0,208333	0,166667		N (O)	0	0,083333	0	0,12	0
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0	0		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0	0
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,714286	0		Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,833333	1
	Σ (O)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,285714	1		Σ (O)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,166667	0

**Πίνακας 3. 1<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Λυθρίνι-Μονάδα Α-Μονάδα Β**

1η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Λυθρίν							1η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Λυθρίν						
		FMM	MA	AOA	TSA	TCBS			FMM	MA	AOA	TSA	TCBS
A	Δ (+)	0,05	0,1	0	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B	Δ (+)	0,05	0,05	0	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,95	0,65	0,95	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (X)	0,85	0,35	1	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0	0,25	0,05	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (0)	0,1	0,6	0	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0	0	0,1	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (+)	0	0	0,05	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,05	0	0,4	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (x)	0,15	0,1	0,4	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,95	1	0,5	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (0)	0,85	0,9	0,55	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0	0	0	0	0		N (+)	0	0	0	0	0
	N (X)	1	1	1	0,9	1		N (X)	1	1	1	0,95	1
	N (0)	0	0	0	0,05	0		N (0)	0	0	0	0,05	0
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	1	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	1	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 4. 1<sup>η</sup> Δειγματοληψία- Φαγκρί-Μονάδα Α-Μονάδα Β**

1η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Φαγκρί							1η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Φαγκρί						
		FMM	MA	AOA	TSA	TCBS			FMM	MA	AOA	TSA	TCBS
A	Δ (+)	0,30	0,40	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B	Δ (+)	0,10	0,20	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,10	0,00	0,20	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (X)	0,40	0,10	0,40	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,60	0,60	0,80	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (0)	0,50	0,70	0,60	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,30	0,30	0,20	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (+)	0,10	0,10	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,20	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (x)	0,50	0,00	0,20	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,50	0,70	0,80	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (0)	0,40	0,90	0,80	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,20	0,20	0,00	0,00	0,00		N (+)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	N (X)	0,80	0,40	1,00	0,70	1,00		N (X)	1,00	0,80	1,00	1,00	1,00
	N (0)	0,00	0,40	0,00	0,30	0,00		N (0)	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	0,00		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,67	1,00		Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	1,00	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,33	0,00		Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 5. 1<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Μυλοκόπι-Συκιός-Μονάδα Α**

1η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Μυλοκόπι							1η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Συκιός						
		FMM	MA	AOA	TSA	TCBS			FMM	MA	AOA	TSA	TCBS
A	Δ (+)	0,40	0,47	0,40	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	A	Δ (+)	0,40	0,40	0,30	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (X)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,60	0,53	0,60	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (0)	0,60	0,60	0,70	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,33	0,13	0,47	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (+)	0,10	0,00	0,20	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (x)	0,30	0,30	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,67	0,87	0,53	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (0)	0,60	0,70	0,80	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,13	0,14	0,00	0,00	0,00		N (+)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	N (X)	0,50	0,00	0,50	0,40	0,75		N (X)	1,00	0,80	0,67	0,80	1,00
	N (0)	0,38	0,86	0,50	0,60	0,25		N (0)	0,00	0,20	0,33	0,20	0,00
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,25	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,75	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 6. 1<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Μυτάκι-Μονάδα Β**

1η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Μυτάκι						
	FMM	MA	AOA	TSA	TCBS	
B	Δ (+)	0,20	0,00	0,27	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,13	0,47	0,20	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,67	0,53	0,53	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,00	0,07	0,27	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,27	0,53	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,73	0,40	0,73	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	N (X)	1,00	0,71	1,00	1,00	1,00
	N (0)	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	1,00	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 7. 2<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Λαβράκι-Μονάδα Α-Μονάδα Β**

2η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Λαβράκι							2η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Λαβράκι						
	FMM	MA	AOA	TSA	TCBS			FMM	MA	AOA	TSA	TCBS	
A	Δ (+)	0,68	0,20	0,44	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B	Δ (+)	0,520	0,160	0,280	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,00	0,00	0,04	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (X)	0,000	0,000	0,120	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,32	0,80	0,52	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (0)	0,480	0,840	0,600	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,08	0,00	0,56	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (+)	0,200	0,080	0,440	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,20	0,00	0,08	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (x)	0,080	0,040	0,000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,72	1,00	0,36	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (0)	0,720	0,880	0,560	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00		N (+)	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000
	N (X)	0,92	0,75	1,00	0,92	1,00		N (X)	1,000	0,833	1,000	1,000	1,000
	N (0)	0,00	0,25	0,00	0,08	0,00		N (0)	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 8. 2<sup>η</sup> Δειγματοληψία- Τσιπούρα-Μονάδα Α-Μονάδα Β**

2η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Τσιπούρα							2η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Τσιπούρα						
	FMM	MA	AOA	TSA	TCBS			FMM	MA	AOA	TSA	TCBS	
A	Δ (+)	0,28	0,36	0,08	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B	Δ (+)	0,120	0,240	0,000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (X)	0,000	0,000	0,000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,72	0,64	0,92	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (0)	0,880	0,760	1,000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,00	0,20	0,16	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (+)	0,000	0,200	0,040	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,36	0,00	0,08	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (x)	0,400	0,040	0,120	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,64	0,80	0,76	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (0)	0,600	0,760	0,840	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00		N (+)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N (X)	1,00	0,75	1,00	0,85	1,00		N (X)	1,000	0,750	1,000	1,000	1,000
	N (0)	0,00	0,17	0,00	0,15	0,00		N (0)	0,000	0,250	0,000	0,000	0,000
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 9. 2<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Λυθρίνι-Μονάδα Α-Μονάδα Β**

2η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Λυθρίνι							2η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Λυθρίνι						
		FMM	MA	AOA	TSA	TCBS			FMM	MA	AOA	TSA	TCBS
A	Δ (+)	0,100	0,250	0,000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B	Δ (+)	0,050	0,100	0,000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,750	0,450	1,000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (X)	0,950	0,600	1,000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,150	0,300	0,000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (0)	0,000	0,300	0,000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,000	0,050	0,200	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (+)	0,000	0,000	0,050	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,000	0,000	0,400	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (x)	0,150	0,100	0,450	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	1,000	0,950	0,400	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (0)	0,850	0,900	0,500	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		N (+)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N (X)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		N (X)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	N (0)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		N (0)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 10. 2<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Φαγκρί-Μονάδα A-Μονάδα B**

2η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Φαγκρί							2η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Φαγκρί						
		FMM	MA	AOA	TSA	TCBS			FMM	MA	AOA	TSA	TCBS
A	Δ (+)	0,200	0,333	0,077	0,000	0,000	B	Δ (+)	0,300	0,400	0,000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,600	0,400	0,385	1,000	1,000		Δ (X)	0,100	0,000	0,200	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,200	0,267	0,538	0,000	0,000		Δ (0)	0,600	0,600	0,800	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,273	0,364	0,182	0,000	0,000		B (+)	0,300	0,300	0,200	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,455	0,091	0,273	0,000	0,000		B (x)	0,200	0,000	0,000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,182	0,455	0,455	0,000	0,000		B (0)	0,500	0,700	0,800	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,267	0,267	0,000	0,000	0,000		N (+)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N (X)	0,333	0,267	0,385	0,400	1,000		N (X)	1,000	0,800	1,000	1,000	1,000
	N (0)	0,400	0,467	0,615	0,600	0,000		N (0)	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000
	Σ (+)	0,300	0,300	0,200	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	0,200	0,000	0,000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	0,500	0,700	0,800	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 11. 2<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Μυλοκόπι-Συκιός-Μονάδα A**

2η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Μυλοκόπι							2η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Συκιός						
		FMM	MA	AOA	TSA	TCBS			FMM	MA	AOA	TSA	TCBS
A	Δ (+)	0,300	0,500	0,400	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	A	Δ (+)	0,300	0,400	0,400	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,000	0,000	0,000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (X)	0,000	0,000	0,200	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,700	0,500	0,600	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (0)	0,700	0,600	0,400	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,100	0,100	0,500	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (+)	0,000	0,000	0,300	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,000	0,000	0,000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (x)	0,400	0,300	0,200	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,900	0,900	0,500	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (0)	0,600	0,700	0,500	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		N (+)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N (X)	0,800	0,000	0,333	0,200	0,000		N (X)	1,000	0,600	1,000	0,400	1,000
	N (0)	0,200	1,000	0,667	0,800	1,000		N (0)	0,000	0,400	0,000	0,600	0,000
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,000	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,000	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	1,000	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 12. 2<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Μυτάκι-Μονάδα B**

2η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Μυτάκι						
		FMM	MA	AOA	TSA	TCBS
B	Δ (+)	0,200	0,000	0,267	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,067	0,400	0,400	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,733	0,600	0,333	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,000	0,000	0,133	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,333	0,333	0,000	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,667	0,667	0,867	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N (X)	1,000	0,857	1,000	1,000	1,000
	N (0)	0,000	0,143	0,000	0,000	0,000
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 13. 3<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Λαβράκι-Μονάδα Α-Μονάδα Β**

3η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Λαβράκι							3η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Λαβράκι						
		FMM	MA	AOA	TSA	TCBS			FMM	MA	AOA	TSA	TCBS
A	Δ (+)	0,72	0,44	0,44	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B	Δ (+)	0,72	0,44	0,36	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (X)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,28	0,56	0,56	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (0)	0,28	0,56	0,64	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,24	0,16	0,56	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (+)	0,16	0,16	0,52	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,36	0,08	0,08	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (x)	0,44	0,12	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,40	0,76	0,36	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (0)	0,40	0,72	0,48	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,08	0,08	0,00	0,00	0,00		N (+)	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00
	N (X)	0,92	0,75	1,00	0,92	1,00		N (X)	1,00	0,75	0,83	0,85	1,00
	N (0)	0,00	0,17	0,00	0,08	0,00		N (0)	0,00	0,25	0,00	0,15	0,00
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 14. 3<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Τσιπούρα-Μονάδα Α-Μονάδα Β**

3η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Τσιπούρα							3η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Τσιπούρα						
		FMM	MA	AOA	TSA	TCBS			FMM	MA	AOA	TSA	TCBS
A	Δ (+)	0,32	0,40	0,04	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B	Δ (+)	0,20	0,28	0,04	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,00	0,16	0,12	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (X)	0,00	0,12	0,08	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,68	0,44	0,84	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (0)	0,80	0,60	0,88	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,08	0,24	0,04	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (+)	0,04	0,16	0,08	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,56	0,08	0,24	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (x)	0,48	0,16	0,20	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,36	0,68	0,72	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (0)	0,48	0,68	0,72	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00		N (+)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	N (X)	1,00	0,75	1,00	0,85	1,00		N (X)	1,00	0,83	1,00	0,92	1,00
	N (0)	0,00	0,17	0,00	0,15	0,00		N (0)	0,00	0,17	0,00	0,08	0,00
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 15. 3<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Λυθρίνι-Μονάδα Α-Μονάδα Β**



3η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Λυθρίν							3η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Λυθρίν						
	FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS		FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS		
A	Δ (+)	0,25	0,40	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B	Δ (+)	0,15	0,20	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,05	0,05	0,10	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (X)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,70	0,55	0,90	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (0)	0,85	0,80	1,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,05	0,15	0,35	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (+)	0,00	0,05	0,15	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (X)	0,05	0,05	0,05	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (X)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,90	0,80	0,60	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (0)	1,00	0,95	0,85	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		N (+)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	N (X)	1,00	0,90	1,00	1,00	1,00		N (X)	1,00	0,80	1,00	0,70	1,00
	N (0)	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00		N (0)	0,00	0,20	0,00	0,30	0,00
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		
Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		

**Πίνακας 16. 3<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Φαγκρί-Μονάδα Α-Μονάδα Β**

3η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Φαγκρί							3η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Φαγκρί						
	FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS		FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS		
A	Δ (+)	0,30	0,60	0,30	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B	Δ (+)	0,60	0,70	0,10	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (X)	0,10	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,70	0,40	0,70	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (0)	0,30	0,30	0,90	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,60	0,70	0,30	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (+)	0,80	0,60	0,30	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (X)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (X)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,40	0,30	0,70	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (0)	0,20	0,40	0,70	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		N (+)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	N (X)	1,00	0,60	1,00	0,60	1,00		N (X)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	N (0)	0,00	0,40	0,00	0,40	0,00		N (0)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		
Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		

**Πίνακας 17. 3<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Μυλοκόπι-Συκιός-Μονάδα Α**

3η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Μυλοκόπι							3η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Συκιός						
	FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS		FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS		
A	Δ (+)	0,67	0,53	0,60	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	A	Δ (+)	0,60	0,40	0,30	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (X)	0,00	0,10	0,20	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,33	0,47	0,40	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (0)	0,40	0,50	0,50	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,53	0,33	0,33	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (+)	0,00	0,10	0,20	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (X)	0,00	0,20	0,07	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (X)	0,30	0,30	0,30	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,47	0,47	0,60	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (0)	0,70	0,60	0,50	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		N (+)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	N (X)	0,63	0,00	0,25	0,63	1,00		N (X)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	N (0)	0,38	1,00	0,75	0,38	0,00		N (0)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	1,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		
Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		

**Πίνακας 18. 3<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Μυτάκι-Μονάδα Β**

3η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Μυτάκι						
	FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS	
B	Δ (+)	0,20	0,00	0,13	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,13	0,27	0,47	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,67	0,73	0,40	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,00	0,13	0,33	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,40	0,07	0,07	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,60	0,80	0,60	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	N (X)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	N (0)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 19. 4<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Λαβράκι-Μονάδα Α-Μονάδα Β**

4η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Λαβράκι						4η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Λαβράκι							
	FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS		FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS		
A	Δ (+)	0,44	0,32	0,16	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B	Δ (+)	0,40	0,32	0,12	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,00	0,00	0,08	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (X)	0,00	0,00	0,08	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,56	0,68	0,76	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (0)	0,60	0,68	0,80	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,08	0,12	0,40	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (+)	0,08	0,08	0,32	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,44	0,00	0,12	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (x)	0,52	0,00	0,12	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,48	0,88	0,48	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (0)	0,40	0,92	0,56	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,00	0,08	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	0,00		N (+)	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	0,00
	N (X)	1,00	0,75	#ΔΙΑΙΡ/0!	1,00	1,00		N (X)	1,00	0,83	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,85	1,00
	N (0)	0,00	0,17	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	0,00		N (0)	0,00	0,17	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,15	0,00
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 20. 4<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Τσιπούρα-Μονάδα Α-Μονάδα Β**

4η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Τσιπούρα						4η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Τσιπούρα							
	FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS		FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS		
A	Δ (+)	0,36	0,48	0,12	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B	Δ (+)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,00	0,04	0,08	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (X)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,64	0,48	0,80	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Δ (0)	1,00	1,00	1,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,00	0,24	0,08	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (+)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,68	0,20	0,48	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (x)	0,36	0,00	0,12	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,32	0,56	0,44	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		B (0)	0,64	1,00	0,88	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00		N (+)	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	0,00
	N (X)	1,00	0,83	1,00	0,85	1,00		N (X)	1,00	0,83	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,92	1,00
	N (0)	0,00	0,08	0,00	0,15	0,00		N (0)	0,00	0,17	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,08	0,00
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!		Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 21. 4<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Λυθρίνι-Μονάδα Α-Μονάδα Β**

4η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Λυθρίνι						4η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Λυθρίνι						
	FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS		FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS	
A	Δ (+)	0,15	0,20	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Δ (+)	0,00	0,05	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,00	0,00	0,15	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Δ (X)	0,15	0,00	0,20	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,85	0,80	0,85	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Δ (0)	0,85	0,95	0,80	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,05	0,00	0,10	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B (+)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,20	0,10	0,10	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B (x)	0,20	0,05	0,10	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,75	0,90	0,80	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B (0)	0,80	0,95	0,90	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	0,00	N (+)	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	0,00
	N (X)	1,00	1,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	1,00	1,00	N (X)	1,00	0,80	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,90	1,00
	N (0)	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	0,00	N (0)	0,00	0,20	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,10	0,00
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 22. 4<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Φαγκρί-Μονάδα Α-Μονάδα Β**

4η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Φαγκρί						4η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Φαγκρί						
	FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS		FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS	
A	Δ (+)	0,10	0,10	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Δ (+)	0,10	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,10	0,00	0,30	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Δ (X)	0,00	0,00	0,20	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,80	0,90	0,70	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Δ (0)	0,90	1,00	0,80	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,10	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B (+)	0,00	0,10	0,10	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,20	0,00	0,10	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B (x)	0,20	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,70	1,00	0,90	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B (0)	0,80	0,90	0,90	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	0,00	N (+)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	N (X)	1,00	0,80	#ΔΙΑΙΡ/0!	1,00	1,00	N (X)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	N (0)	0,00	0,20	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	0,00	N (0)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 23. 4<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Μυλοκόπι-Συκιός-Μονάδα Α**

4η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Μυλοκόπι						4η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Συκιός						
	FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS		FMM	MA	ΑΟΑ	TSA	TCBS	
A	Δ (+)	0,13	0,20	0,13	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Δ (+)	0,30	0,50	0,40	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Δ (X)	0,00	0,00	0,10	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,87	0,80	0,87	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	Δ (0)	0,70	0,50	0,50	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,20	0,20	0,13	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B (+)	0,00	0,00	0,30	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (x)	0,00	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B (x)	0,40	0,40	0,40	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,80	0,80	0,87	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	B (0)	0,60	0,60	0,30	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	0,00	N (+)	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	0,00
	N (X)	0,75	0,57	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,63	0,75	N (X)	1,00	1,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,80	1,00
	N (0)	0,25	0,43	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,38	0,25	N (0)	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,20	0,00
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	1,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακας 24. 4<sup>η</sup> Δειγματοληψία-Μυτάκι-Μονάδα Β**



4η Δειγματοληψία Αποτελέσματα μικροβιολογικών - Μυτάκι						
	FMM	MA	AOA	TSA	TCBS	
B	Δ (+)	0,13	0,00	0,07	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (X)	0,13	0,20	0,47	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Δ (0)	0,73	0,80	0,47	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (+)	0,00	0,00	0,13	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (X)	0,60	0,27	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	B (0)	0,40	0,73	0,87	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	N (+)	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	0,00
	N (X)	1,00	1,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	1,00	1,00
	N (0)	0,00	0,00	#ΔΙΑΙΡ/0!	0,00	0,00
	Σ (+)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (X)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!
	Σ (0)	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!	#ΔΙΑΙΡ/0!

**Πίνακες 25-32.** Μέσοι συντελεστές ευαισθησίας για τα 4 κύρια υποστρώματα (FMM, MA, AOA και TSA). Ως Μέσος συντελεστής ευαισθησίας των υποστρωμάτων ορίστηκε η μέση τιμή των ποσοστών απομόνωσης των προαναφερθέντων υποστρωμάτων (όπως προκύπτουν από τους πίνακες ευαισθησίας), για κάθε είδος ξεχωριστά.

Για τα είδη: μυλοκόπι, μυτάκι και συκίος δεν υπάρχουν στοιχεία και από τις δύο μονάδες. Για να εξασφαλιστούν με ασφάλεια τα αποτελέσματα της μηδενικής υπόθεσης, διενεργήθηκαν 2 ξεχωριστοί έλεγχοι (t-test). Στον πρώτο έλεγχο συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα για τα είδη όπου μόνο σε αυτά υπήρχαν δεδομένα και από τις δύο περιοχές, ενώ στον δεύτερο έλεγχο συμπεριελήφθησαν όλα τα είδη.

**Πίνακας 25. 1<sup>η</sup> Δειγματοληψία**

<b>1η Δειγματοληψία (Μέσος Συντελεστής Απομόνωσης)</b>		
	Μονάδα Α (Αιγαίο)	Μονάδα Β (Ιόνιο)
Λαβράκι	0,2	0,28
Τσιπούρα	0,106666667	0,04
Λυθρίνι	0,041666667	0,025
Φαγκρί	0,25	0,083333333
Μυλοκόπι	0,366666667	
Μυτάκι		0,09
Συκίος	0,233333333	

**Πίνακας 26.** Έλεγχος t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις:

<b>Λαβράκι-Τσιπούρα-Λυθρίνι-Φαγκρί</b>		
Έλεγχος t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις		
	<i>Μονάδα Α (Αιγαίο)</i>	<i>Μονάδα Β (Ιόνιο)</i>
Μέσος	0,149583333	0,107083333
Διακύμανση	0,008704398	0,013900694
Μέγεθος δείγματος	4	4
Διάμεση διακύμανση	0,011302546	
Υποτιθέμενη διαφορά μέσων	0	
βαθμοί ελευθερίας	6	
t	0,565347896	
P(T<=t) μονόπλευρη	0,296166378	
t κρίσιμο, μονόπλευρο	1,943180274	
P(T<=t) δίπλευρη	0,592332756	
t κρίσιμο, δίπλευρο	2,446911846	
<b>Σύνολο</b>		
Έλεγχος t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις		
	<i>Μονάδα Α (Αιγαίο)</i>	<i>Μονάδα Β (Ιόνιο)</i>
Μέσος	0,199722222	0,103444444
Διακύμανση	0,013033796	0,010491728
Μέγεθος δείγματος	6	5
Διάμεση διακύμανση	0,011903988	
Υποτιθέμενη διαφορά μέσων	0	
βαθμοί ελευθερίας	9	
t	1,457283662	
P(T<=t) μονόπλευρη	0,089513489	
t κρίσιμο, μονόπλευρο	1,833112923	
P(T<=t) δίπλευρη	0,179026978	
t κρίσιμο, δίπλευρο	2,262157158	

Αποτελέσματα: Μετά τον έλεγχο του t-test με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις προέκυψε: πως και στις δύο περιπτώσεις πινάκων η πιθανότητα είναι μικρότερη των ορίων εμπιστοσύνης ( $P=0,59$  και  $0,18$ , αντίστοιχα), στοιχεία που υποδεικνύουν πως για τη 1η δειγματοληψία η ευαισθησία των υποστρωμάτων είναι ανεξάρτητη της περιοχής δειγματοληψίας.

**Πίνακας 27. 2<sup>η</sup> Δειγματοληψία**

<b>2η Δειγματοληψία (Μέσος Συντελεστής Απομόνωσης)</b>		
	<i>Μονάδα Α (Αιγαίο)</i>	<i>Μονάδα Β (Ιόνιο)</i>
Λαβράκι	0,326666667	0,28
Τσιπούρα	0,18	0,1
Λυθρίνι	0,1	0,033333333
Φαγκρί	0,238073038	0,25
Μυλοκόπι	0,316666667	
Μυτάκι		0,10
Συκιός	0,233333333	

**Πίνακας 28.** Έλεγχος t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις:

<b>Λαβράκι-Τσιπούρα-Λυθρίνι-Φαγκρί</b>		
Έλεγχος t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις		
	<i>Μονάδα Α (Αιγαίο)</i>	<i>Μονάδα Β (Ιόνιο)</i>
Μέσος	0,211184926	0,165833333
Διακύμανση	0,009131197	0,014002778
Μέγεθος δείγματος	4	4
Διάμεση διακύμανση	0,011566987	
Υποτιθέμενη διαφορά μέσων	0	
βαθμοί ελευθερίας	6	
t	0,596344769	
P(T<=t) μονόπλευρη	0,286370391	
t κρίσιμο, μονόπλευρο	1,943180274	
P(T<=t) δίπλευρη	0,572740782	
t κρίσιμο, δίπλευρο	2,446911846	

<b>Σύνολο</b>		
Έλεγχος t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις		
	<i>Μονάδα Α (Αιγαίο)</i>	<i>Μονάδα Β (Ιόνιο)</i>
Μέσος	0,232456617	0,152666667
Διακύμανση	0,007259126	0,011368889
Μέγεθος δείγματος	6	5
Διάμεση διακύμανση	0,009085687	
Υποτιθέμενη διαφορά μέσων	0	
βαθμοί ελευθερίας	9	
t	1,382399562	
P(T<=t) μονόπλευρη	0,100093187	
t κρίσιμο, μονόπλευρο	1,833112923	
P(T<=t) δίπλευρη	0,200186374	
t κρίσιμο, δίπλευρο	2,262157158	

Αποτελέσματα: Μετά τον έλεγχο του t-test με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις προέκυψε: πως και στις δύο περιπτώσεις πινάκων η πιθανότητα είναι μικρότερη των ορίων εμπιστοσύνης ( $P=0,57$  και  $0,2$ , αντίστοιχα), στοιχεία που υποδεικνύουν πως για τη 2η δειγματοληψία η ευαισθησία των υποστρωμάτων είναι ανεξάρτητη της περιοχής δειγματοληψίας.

**Πίνακας 29. 3<sup>η</sup> Δειγματοληψία**

<b>3η Δειγματοληψία (Μέσος Συντελεστής Απομόνωσης)</b>		
	<i>Μονάδα Α (Αιγαίο)</i>	<i>Μονάδα Β (Ιόνιο)</i>
Λαβράκι	0,426666667	0,28
Τσιπούρα	0,186666667	0,133333333
Λυθρίνι	0,2	0,091666667
Φαγκρί	0,466666667	0,516666667
Μυλοκόπι	0,5	
Μυτάκι		0,13
Συκιός	0,266666667	

**Πίνακας 30.** Έλεγχος t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις:

<b>Λαβράκι-Τσιπούρα-Λυθρίνι-Φαγκρί</b>		
Έλεγχος t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις		
	<i>Μονάδα Α (Αιγαίο)</i>	<i>Μονάδα Β (Ιόνιο)</i>
Μέσος	0,32	0,255416667
Διακύμανση	0,021688889	0,036858102
Μέγεθος δείγματος	4	4
Διάμεση διακύμανση	0,029273495	
Υποτιθέμενη διαφορά μέσων	0	
βαθμοί ελευθερίας	6	
t	0,533824084	
P(T<=t) μονόπλευρη	0,306325758	
t κρίσιμο, μονόπλευρο	1,943180274	
P(T<=t) δίπλευρη	0,612651516	
t κρίσιμο, δίπλευρο	2,446911846	

<b>Σύνολο</b>		
Έλεγχος t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις		
	<i>Μονάδα Α (Αιγαίο)</i>	<i>Μονάδα Β (Ιόνιο)</i>
Μέσος	0,341111111	0,231
Διακύμανση	0,019527407	0,030624444
Μέγεθος δείγματος	6	5
Διάμεση διακύμανση	0,024459424	
Υποτιθέμενη διαφορά μέσων	0	
βαθμοί ελευθερίας	9	
t	1,162712438	
P(T<=t) μονόπλευρη	0,137424024	
t κρίσιμο, μονόπλευρο	1,833112923	
P(T<=t) δίπλευρη	0,274848048	
t κρίσιμο, δίπλευρο	2,262157158	

Αποτελέσματα: Μετά τον έλεγχο του t-test με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις προέκυψε: πως και στις δύο περιπτώσεις πινάκων η πιθανότητα είναι μικρότερη των ορίων εμπιστοσύνης ( $P=0,61$  και  $0,27$ , αντίστοιχα), στοιχεία που υποδεικνύουν πως για τη 3η δειγματοληψία η ευαισθησία των υποστρωμάτων είναι ανεξάρτητη της περιοχής δειγματοληψίας.

**Πίνακας 31. 4<sup>η</sup> Δειγματοληψία**

<b>4η Δειγματοληψία (Μέσος Συντελεστής Απομόνωσης)</b>		
	<i>Μονάδα Α (Αιγαίο)</i>	<i>Μονάδα Β (Ιόνιο)</i>
Λαβράκι	0,253333333	0,22
Τσιπούρα	0,213333333	0
Λυθρίνι	0,083333333	0,008333333
Φαγκρί	0,05	0,05
Μυλοκόπι	0,166666667	
Μυτάκι		0,06
Συκιάς	0,25	

**Πίνακας 32.** Έλεγχος t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις:

<b>Λαβράκι-Τσιπούρα-Λυθρίνι-Φαγκρί</b>		
Έλεγχος t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις		
	<i>Μονάδα Α (Αιγαίο)</i>	<i>Μονάδα Β (Ιόνιο)</i>
Μέσος	0,15	0,069583333
Διακύμανση	0,009711111	0,010534028
Μέγεθος δείγματος	4	4
Διάμεση διακύμανση	0,010122569	
Υποτιθέμενη διαφορά μέσων	0	
βαθμοί ελευθερίας	6	
t	1,130357142	
P(T<=t) μονόπλευρη	0,150738424	
t κρίσιμο, μονόπλευρο	1,943180274	
P(T<=t) δίπλευρη	0,301476849	
t κρίσιμο, δίπλευρο	2,446911846	

<b>Σύνολο</b>		
Έλεγχος t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις		
	<i>Μονάδα Α (Αιγαίο)</i>	<i>Μονάδα Β (Ιόνιο)</i>
Μέσος	0,169444444	0,066777778
Διακύμανση	0,007428519	0,007939877
Μέγεθος δείγματος	6	5
Διάμεση διακύμανση	0,007655789	
Υποτιθέμενη διαφορά μέσων	0	
βαθμοί ελευθερίας	9	
t	1,937754597	
P(T<=t) μονόπλευρη	0,042306805	
t κρίσιμο, μονόπλευρο	1,833112923	
P(T<=t) δίπλευρη	0,08461361	
t κρίσιμο, δίπλευρο	2,262157158	

Αποτελέσματα: Μετά τον έλεγχο του t-test με υποτιθέμενες ίσες διακυμάνσεις προέκυψε: πως και στις δύο περιπτώσεις πινάκων η πιθανότητα είναι μικρότερη των ορίων εμπιστοσύνης ( $P=0,3$  και  $0,08$ , αντίστοιχα), στοιχεία που υποδεικνύουν πως για τη 4η δειγματοληψία η ευαισθησία των υποστρωμάτων είναι ανεξάρτητη της περιοχής δειγματοληψίας.

Συμπερασματικά: και για τις 4 δειγματοληψίες δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά σε ότι αφορά την ευαισθησία των υποστρωμάτων ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή.

**Πίνακες 33-48.** Για την σύγκριση ικανότητας απομόνωσης του *T. maritimum* από τα θρεπτικά υποστρώματα ανάλογα με το όργανο απομόνωσης (δέρμα, βράγχια, σπλήνας, νεφρός) πραγματοποιήθηκε έλεγχος για το εάν η ικανότητα απομόνωσης του βακτηρίου *T. maritimum* από τα υποστρώματα εξαρτάται από το όργανο όπου έγινε η απομόνωση και ο ενοφθαλμισμός. Εξετάστηκε εάν υπάρχει ειδικότητα οργάνου- υποστρώματος και εάν αυτή η ειδικότητα είναι στατιστικά σημαντική.

Από τα πρώτα κιόλας στοιχεία όπως προκύπτουν από τους πίνακες ευαισθησίας ο σπλήνας και ο νεφρός δεν αποτελούν όργανα όπου το βακτήριο εντοπίζεται. Έτσι, έγινε έλεγχος ειδικότητας μόνο για τα βράγχια και το δέρμα.

Δεδομένου ότι δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις περιοχές Α και Β εφεξής για τον έλεγχο ειδικότητας και τους υπόλοιπους ελέγχους τα δεδομένα των δύο σημείων θα συνυπολογίζονται.

**Πίνακας 33. 1<sup>η</sup> Δειγματοληψία - Βράγχια**

Βράγχια				
		FMM	MA	ΑΟΑ
1η Δειγ. (Α-Β)	Λαβράκι	0,06	0,06	0,52
	Τσιπούρα	0	0,08	0,08
	Λυθρίνι	0	0	0,075
	Φαγκρί	0,2	0,2	0,1
	Μυλοκόπι	0,333333	0,133333	0,466667
	Μυτάκι	0	0,066667	0,266667
	Συκίος	0,1	0	0,2

**Πίνακας 34.** Έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση:

Ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση				
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση
Λαβράκι	3	0,64	0,21333333	0,07053333
Τσιπούρα	3	0,16	0,05333333	0,00213333
Λυθρίνι	3	0,075	0,025	0,001875
Φαγκρί	3	0,5	0,16666667	0,00333333
Μυλοκόπι	3	0,93333333	0,31111111	0,02814815
Μυτάκι	3	0,33333333	0,11111111	0,01925926
Συκίος	3	0,3	0,1	0,01
FMM	7	0,69333333	0,09904762	0,01600635
MA	7	0,54	0,07714286	0,00509418
ΑΟΑ	7	1,70833333	0,24404762	0,03406653

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Γραμμές	0,175616	6	0,02926927	2,26036754	0,108041	2,99612
Στήλες	0,115178	2	0,05758902	4,44740722	0,03588	3,885294
Σφάλμα	0,155387	12	0,0129489			
Σύνολο	0,44618	20				

**Πίνακας 35. 1<sup>η</sup> Δειγματοληψία - Δέρμα**

Δέρμα				
		FMM	MA	ΑΟΑ
1η Δειγ. (Α-Β)	Λαβράκι	0,46	0,12	0,22
	Τσιπούρα	0,1	0,16	0,02
	Λυθρίνι	0,05	0,075	0
	Φαγκρί	0,2	0,3	0
	Μυλοκόπι	0,4	0,466667	0,4
	Μυτάκι	0,2	0	0,266667
	Συκιός	0,4	0,4	0,3

**Πίνακας 36.** Έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση:

Ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση					
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	Πλήθος	Αθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση	
Λαβράκι	3	0,8	0,26666667	0,030533333	
Τσιπούρα	3	0,28	0,093333333	0,004933333	
Λυθρίνι	3	0,125	0,041666667	0,001458333	
Φαγκρί	3	0,5	0,166666667	0,023333333	
Μυλοκόπι	3	1,266666667	0,422222222	0,001481481	
Μυτάκι	3	0,466666667	0,155555556	0,019259259	
Συκιός	3	1,1	0,366666667	0,003333333	
FMM	7	1,81	0,258571429	0,026014286	
MA	7	1,521666667	0,217380952	0,030436905	
ΑΟΑ	7	1,206666667	0,172380952	0,026984127	

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ							
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F	
Γραμμές	0,357965	6	0,059660802	5,01888703	0,008579	2,99612	
Στήλες	0,026018	2	0,013008862	1,094335349	0,365957	3,885294	
Σφάλμα	0,142647	12	0,011887257				
Σύνολο	0,52663	20					

**Πίνακας 37. 2<sup>η</sup> Δειγματοληψία - Βράγχια**

Βράγχια				
		FMM	MA	ΑΟΑ
2η Δειγ. (Α-Β)	Λαβράκι	0,14	0,04	0,5
	Τσιπούρα	0	0,2	0,1
	Λυθρίνι	0	0,025	0,125
	Φαγκρί	0,286364	0,331818	0,190909
	Μυλοκόπι	0,1	0,1	0,5
	Μυτάκι	0	0	0,133333
	Συκιός	0	0	0,3

**Πίνακας 38.** Έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση:

Ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση				
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση
Λαβράκι	3	0,68	0,22666667	0,05853333
Τσιπούρα	3	0,3	0,1	0,01
Λυθρίνι	3	0,15	0,05	0,004375
Φαγκρί	3	0,809090909	0,26969697	0,00517218
Μυλοκόπι	3	0,7	0,23333333	0,05333333
Μυτάκι	3	0,133333333	0,04444444	0,00592593
Συκίος	3	0,3	0,1	0,03
FMM	7	0,526363636	0,07519481	0,01200405
MA	7	0,696818182	0,09954545	0,01549387
ΑΟΑ	7	1,849242424	0,26417749	0,03022014

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ					
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P κριτήριο F
Γραμμές	0,159588	6	0,02659802	1,70938181	0,202061 2,99612
Στήλες	0,147959	2	0,07397964	4,75446845	0,030156 3,885294
Σφάλμα	0,18672	12	0,01556002		
Σύνολο	0,494268	20			

**Πίνακας 39. 2<sup>η</sup> Δειγματοληψία - Δέρμα**

Δέρμα				
		FMM	MA	ΑΟΑ
2η Δειγ. (Α-Β)	Λαβράκι	0,6	0,18	0,36
	Τσιπούρα	0,2	0,3	0,04
	Λυθρίνι	0,075	0,175	0
	Φαγκρί	0,25	0,366667	0,038462
	Μυλοκόπι	0,3	0,5	0,4
	Μυτάκι	0,2	0	0,266667
	Συκίος	0,3	0,4	0,4

**Πίνακας 40.** Έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση:

Ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση				
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση
Λαβράκι	3	1,14	0,38	0,0444
Τσιπούρα	3	0,54	0,18	0,0172
Λυθρίνι	3	0,25	0,08333333	0,007708333
Φαγκρί	3	0,655128205	0,218376068	0,027679706
Μυλοκόπι	3	1,2	0,4	0,01
Μυτάκι	3	0,466666667	0,155555556	0,019259259
Συκίος	3	1,1	0,366666667	0,003333333
FMM	7	1,925	0,275	0,026458333
MA	7	1,921666667	0,27452381	0,028321032
ΑΟΑ	7	1,505128205	0,215018315	0,033360045



ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Γραμμές	0,286333	6	0,047722118	2,361470309	0,096743	2,99612
Στήλες	0,016658	2	0,008328755	0,412138215	0,671259	3,885294
Σφάλμα	0,242504	12	0,020208646			
Σύνολο	0,545494	20				

**Πίνακας 41. 3<sup>η</sup> Δειγματοληψία - Βράγχια**

Βράγχια				
3η Δειγ. (A-B)		FMM	MA	ΑΟΑ
	Λαβράκι	0,2	0,16	0,54
	Τσιπούρα	0,06	0,2	0,06
	Λυθρίνι	0,025	0,1	0,25
	Φαγκρί	0,7	0,65	0,3
	Μυλοκόπι	0,533333	0,333333	0,333333
	Μυτάκι	0	0,133333	0,333333
	Συκιάς	0	0,1	0,2

**Πίνακας 42.** Έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση:

Ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση				
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση
Λαβράκι	3	0,9	0,3	0,0436
Τσιπούρα	3	0,32	0,10666667	0,00653333
Λυθρίνι	3	0,375	0,125	0,013125
Φαγκρί	3	1,65	0,55	0,0475
Μυλοκόπι	3	1,2	0,4	0,01333333
Μυτάκι	3	0,46666667	0,15555556	0,02814815
Συκιάς	3	0,3	0,1	0,01
FMM	7	1,51833333	0,21690476	0,08155595
MA	7	1,67666667	0,23952381	0,03923122
ΑΟΑ	7	2,01666667	0,28809524	0,02148836

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Γραμμές	0,547698	6	0,09128294	3,58024301	0,028602	2,99612
Στήλες	0,018524	2	0,00926204	0,3632699	0,70279	3,885294
Σφάλμα	0,305956	12	0,0254963			
Σύνολο	0,872177	20				

**Πίνακας 43. 3<sup>η</sup> Δειγματοληψία - Δέρμα**

Δέρμα				
		FMM	MA	ΑΟΑ
3η Δειγ. (Α-Β)	Λαβράκι	0,72	0,44	0,4
	Τσιπούρα	0,26	0,34	0,04
	Λυθρίνι	0,2	0,3	0
	Φαγκρί	0,45	0,65	0,2
	Μυλοκόπι	0,666667	0,533333	0,6
	Μυτάκι	0,2	0	0,133333
	Συκιός	0,6	0,4	0,3

**Πίνακας 44.** Έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση:

Ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση				
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση
Λαβράκι	3	1,56	0,52	0,0304
Τσιπούρα	3	0,64	0,213333333	0,024133333
Λυθρίνι	3	0,5	0,166666667	0,023333333
Φαγκρί	3	1,3	0,433333333	0,050833333
Μυλοκόπι	3	1,8	0,6	0,004444444
Μυτάκι	3	0,333333333	0,111111111	0,01037037
Συκιός	3	1,3	0,433333333	0,023333333
FMM	7	3,096666667	0,442380952	0,050506349
MA	7	2,663333333	0,38047619	0,042134921
ΑΟΑ	7	1,673333333	0,239047619	0,044895238

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Γραμμές	0,643606	6	0,107267725	7,087680045	0,002097	2,99612
Στήλες	0,152084	2	0,076041799	5,024437142	0,025988	3,885294
Σφάλμα	0,181613	12	0,015134392			
Σύνολο	0,977303	20				

**Πίνακας 45. 4<sup>η</sup> Δειγματοληψία - Βράγχια**

Βράγχια				
		FMM	MA	ΑΟΑ
4η Δειγ. (Α-Β)	Λαβράκι	0,08	0,1	0,36
	Τσιπούρα	0	0,12	0,04
	Λυθρίνι	0,025	0	0,05
	Φαγκρί	0,05	0,05	0,05
	Μυλοκόπι	0,2	0,2	0,133333
	Μυτάκι	0	0	0,133333
	Συκιός	0	0	0,3

**Πίνακας 46.** Έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση:

Ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση					
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση	
Λαβράκι	3	0,54	0,18	0,0244	
Τσιπούρα	3	0,16	0,05333333	0,00373333	
Λυθρίνι	3	0,075	0,025	0,000625	
Φαγκρί	3	0,15	0,05	7,2222E-35	
Μυλοκόπι	3	0,53333333	0,17777778	0,00148148	
Μυτάκι	3	0,13333333	0,04444444	0,00592593	
Συκιάς	3	0,3	0,1	0,03	
FMM	7	0,355	0,05071429	0,00525357	
MA	7	0,47	0,06714286	0,00589048	
ΑΟΑ	7	1,06666667	0,15238095	0,01653598	

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Γραμμές	0,075449	6	0,01257482	1,66496588	0,212854	2,99612
Στήλες	0,0417	2	0,02085013	2,76065572	0,103202	3,885294
Σφάλμα	0,090631	12	0,0075526			
Σύνολο	0,20778	20				

**Πίνακας 47. 4<sup>η</sup> Δειγματοληψία - Δέρμα**

Δέρμα				
		FMM	MA	ΑΟΑ
4η Δειγ. (Α-Β)	Λαβράκι	0,42	0,32	0,14
	Τσιπούρα	0,18	0,24	0,06
	Λυθρίνι	0,075	0,125	0
	Φαγκρί	0,1	0,05	0
	Μυλοκόπι	0,133333	0,2	0,133333
	Μυτάκι	0,133333	0	0,066667
	Συκιάς	0,3	0,5	0,4

**Πίνακας 48.** Έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση:

Ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων χωρίς αλληλεπίδραση					
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση	
Λαβράκι	3	0,88	0,29333333	0,02013333	
Τσιπούρα	3	0,48	0,16	0,0084	
Λυθρίνι	3	0,2	0,06666667	0,00395833	
Φαγκρί	3	0,15	0,05	0,0025	
Μυλοκόπι	3	0,46666667	0,15555556	0,00148148	
Μυτάκι	3	0,2	0,06666667	0,00444444	
Συκιάς	3	1,2	0,4	0,01	
FMM	7	1,34166667	0,19166667	0,015471296	
MA	7	1,435	0,205	0,028991667	
ΑΟΑ	7	0,8	0,114285714	0,018998942	

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Γραμμές	0,312524	6	0,052087302	9,158526375	0,000665	2,99612
Στήλες	0,033588	2	0,016793783	2,95285608	0,090602	3,885294
Σφάλμα	0,068248	12	0,005687302			
Σύνολο	0,414359	20				

Πίνακες 49-52. Τελική σύγκριση δειγματοληψιών ως προς την ικανότητα απομόνωσης του *T. maritimum* από τα υποστρώματα, ανά όργανο.

### Πίνακας 49. Βράγχια

Βράγχια				
	FMM	MA	ΑΟΑ	
1η Δειγμ. (A-B)	0,06	0,06	0,52	Λαβράκι
	0	0,08	0,08	Τσιπούρα
	0	0	0,075	Λυθρίνι
	0,2	0,2	0,1	Φαγκρί
	0,333333	0,133333	0,466667	Μυλοκόπι
	0	0,066667	0,266667	Μυτάκι
	0,1	0	0,2	Συκιός
2η Δειγμ. (A-B)	0,14	0,04	0,5	Λαβράκι
	0	0,2	0,1	Τσιπούρα
	0	0,025	0,125	Λυθρίνι
	0,286364	0,331818	0,190909	Φαγκρί
	0,1	0,1	0,5	Μυλοκόπι
	0	0	0,133333	Μυτάκι
	0	0	0,3	Συκιός
3η Δειγμ. (A-B)	0,2	0,16	0,54	Λαβράκι
	0,06	0,2	0,06	Τσιπούρα
	0,025	0,1	0,25	Λυθρίνι
	0,7	0,65	0,3	Φαγκρί
	0,533333	0,333333	0,333333	Μυλοκόπι
	0	0,133333	0,333333	Μυτάκι
	0	0,1	0,2	Συκιός
4η Δειγμ. (A-B)	0,08	0,1	0,36	Λαβράκι
	0	0,12	0,04	Τσιπούρα
	0,025	0	0,05	Λυθρίνι
	0,05	0,05	0,05	Φαγκρί
	0,2	0,2	0,133333	Μυλοκόπι
	0	0	0,133333	Μυτάκι
	0	0	0,3	Συκιός

Πίνακας 50. Έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων με αλληλεπίδραση:

Ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων με αλληλεπίδραση				
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	FMM	ΜΑ	ΑΟΑ	Σύνολο
1η Δειγμ. (Α-Β)				
Πλήθος	7	7	7	21
Άθροισμα	0,693333	0,54	1,708333	2,941667
Μέσος όρος	0,099048	0,077142857	0,244048	0,140079
Διακύμανση	0,016006	0,00509418	0,034067	0,022309
2η Δειγμ. (Α-Β)				
Πλήθος	7	7	7	21
Άθροισμα	0,526364	0,696818182	1,849242	3,072424
Μέσος όρος	0,075195	0,099545455	0,264177	0,146306
Διακύμανση	0,012004	0,015493871	0,03022	0,024713
3η Δειγμ. (Α-Β)				
Πλήθος	7	7	7	21
Άθροισμα	1,518333	1,676666667	2,016667	5,211667
Μέσος όρος	0,216905	0,23952381	0,288095	0,248175
Διακύμανση	0,081556	0,039231217	0,021488	0,043609
4η Δειγμ. (Α-Β)				
Πλήθος	7	7	7	21
Άθροισμα	0,355	0,47	1,066667	1,891667
Μέσος όρος	0,050714	0,067142857	0,152381	0,090079
Διακύμανση	0,005254	0,005890476	0,016536	0,010389
Σύνολο				
Πλήθος	28	28	28	28
Άθροισμα	3,09303	3,383484848	6,640909	
Μέσος όρος	0,110465	0,120838745	0,237175	
Διακύμανση	0,029735	0,019614198	0,025473	

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ							
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F	
Δείγμα	0,27697	3	0,092323	3,916969	0,011948	2,731807	
Στήλες	0,277174	2	0,138587	5,879792	0,004312	3,123907	
Αλληλεπίδραση	0,046188	6	0,007698	0,326598	0,920936	2,227404	
Μέσα σε	1,697044	72	0,02357				
Σύνολο	2,297375	83					

## Πίνακας 51. Δέρμα

Δέρμα				
	FMM	ΜΑ	ΑΟΑ	
1η Δειγμ. (Α-Β)	0,46	0,12	0,22	Λαβράκι
	0,1	0,16	0,02	Τσιπούρα
	0,05	0,075	0	Λυθρίνι
	0,2	0,3	0	Φαγκρί
	0,4	0,466667	0,4	Μυλοκόπι
	0,2	0	0,266667	Μυτάκι
2η Δειγμ. (Α-Β)	0,4	0,4	0,3	Συκιάς
	0,6	0,18	0,36	Λαβράκι
	0,2	0,3	0,04	Τσιπούρα
	0,075	0,175	0	Λυθρίνι
	0,25	0,366667	0,038462	Φαγκρί
	0,3	0,5	0,4	Μυλοκόπι
3η Δειγμ. (Α-Β)	0,2	0	0,266667	Μυτάκι
	0,3	0,4	0,4	Συκιάς
	0,72	0,44	0,4	Λαβράκι
	0,26	0,34	0,04	Τσιπούρα
	0,2	0,3	0	Λυθρίνι
	0,45	0,65	0,2	Φαγκρί
4η Δειγμ. (Α-Β)	0,666667	0,533333	0,6	Μυλοκόπι
	0,2	0	0,133333	Μυτάκι
	0,6	0,4	0,3	Συκιάς
	0,42	0,32	0,14	Λαβράκι
	0,18	0,24	0,06	Τσιπούρα
	0,075	0,125	0	Λυθρίνι
4η Δειγμ. (Α-Β)	0,1	0,05	0	Φαγκρί
	0,133333	0,2	0,133333	Μυλοκόπι
	0,133333	0	0,066667	Μυτάκι
	0,3	0,5	0,4	Συκιάς

**Πίνακας 52.** Έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων με αλληλεπίδραση:

Ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων με αλληλεπίδραση				
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	FMM	ΜΑ	ΑΟΑ	Σύνολο
<i>1η Δειγμ. (Α-Β)</i>				
Πλήθος	7	7	7	21
Άθροισμα	1,81	1,521666667	1,206667	4,538333
Μέσος όρος	0,258571	0,217380952	0,172381	0,216111
Διακύμανση	0,026014	0,030436905	0,026984	0,026331
<i>2η Δειγμ. (Α-Β)</i>				
Πλήθος	7	7	7	21
Άθροισμα	1,925	1,921666667	1,505128	5,351795
Μέσος όρος	0,275	0,27452381	0,215018	0,254847
Διακύμανση	0,026458	0,028321032	0,03336	0,027275
<i>3η Δειγμ. (Α-Β)</i>				
Πλήθος	7	7	7	21
Άθροισμα	3,096667	2,663333333	1,673333	7,433333
Μέσος όρος	0,442381	0,38047619	0,239048	0,353968
Διακύμανση	0,050506	0,042134921	0,044895	0,048865
<i>4η Δειγμ. (Α-Β)</i>				
Πλήθος	7	7	7	21
Άθροισμα	1,341667	1,435	0,8	3,576667
Μέσος όρος	0,191667	0,205	0,114286	0,170317
Διακύμανση	0,015471	0,028991667	0,018999	0,020718
<i>Σύνολο</i>				
Πλήθος	28	28	28	
Άθροισμα	8,173333	7,541666667	5,185128	
Μέσος όρος	0,291905	0,269345238	0,185183	
Διακύμανση	0,03516	0,033845543	0,029937	

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Δείγμα	0,384825	3	0,128275	4,131539	0,009247	2,731807
Στήλες	0,177162	2	0,088581	2,853063	0,064207	3,123907
Αλληλεπίδραση	0,051184	6	0,008531	0,274759	0,947054	2,227404
Μέσα σε	2,235439	72	0,031048			
Σύνολο	2,84861	83				

**Πίνακας 53.** Περιγραφικά στατιστικά στοιχεία ποσοστού εμφάνισης του βακτηρίου *Tenacibaculum maritimum* για το σύνολο των υπό εξέταση ιχθύων.

Ποσοστό Προσβολής %	
Μέσος	0,3925
Τυπικό σφάλμα	0,047788597
Διάμεσος	0,3925
Επικρατούσα τιμή	#Δ/Υ
Μέση απόκλιση τετραγώνου	0,106858551
Διακύμανση	0,01141875
Κύρτωση	1,049474989
Ασυμμετρία	1,047095219
Εύρος	0,27
Ελάχιστο	0,29
Μέγιστο	0,56
Άθροισμα	1,9625
Πλήθος	5

**Πίνακας 54.** Περιγραφικά στατιστικά στοιχεία ποσοστού εμφάνισης του βακτηρίου *Tenacibaculum maritimum* για το λαβράκι και για την τσιπούρα.

Ποσοστό Προσβολής % (Λαβράκια)		Ποσοστό Προσβολής % (Τσιπούρα)	
Μέσος	0,64	Μέσος	0,26
Τυπικό σφάλμα	0,052915026	Τυπικό σφάλμα	0,0391578
Διάμεσος	0,62	Διάμεσος	0,27
Επικρατούσα τιμή	#Δ/Υ	Επικρατούσα τιμή	#Δ/Υ
Μέση απόκλιση τετραγώνου	0,105830052	Μέση απόκλιση τετραγώνου	0,078315601
Διακύμανση	0,0112	Διακύμανση	0,006133333
Κύρτωση	-0,285714286	Κύρτωση	-0,768431002
Ασυμμετρία	0,863918795	Ασυμμετρία	-0,599580687
Εύρος	0,24	Εύρος	0,18
Ελάχιστο	0,54	Ελάχιστο	0,16
Μέγιστο	0,78	Μέγιστο	0,34
Άθροισμα	2,56	Άθροισμα	1,04
Πλήθος	4	Πλήθος	4

**Πίνακας 55.** Περιγραφικά στατιστικά στοιχεία ποσοστού εμφάνισης του βακτηρίου *Tenacibaculum maritimum* για το λυθρίνι και για το φαγκρί.

Ποσοστό Προσβολής % (Λυθρίνι)		Ποσοστό Προσβολής % (Φαγκρί)	
Μέσος	0,1875	Μέσος	0,475
Τυπικό σφάλμα	0,065748891	Τυπικό σφάλμα	0,149303941
Διάμεσος	0,15	Διάμεσος	0,45
Επικρατούσα τιμή	#Δ/Υ	Επικρατούσα τιμή	#Δ/Υ
Μέση απόκλιση τετραγώνου	0,131497782	Μέση απόκλιση τετραγώνου	0,298607881
Διακύμανση	0,017291667	Διακύμανση	0,089166667
Κύρτωση	2,23486718	Κύρτωση	-0,41610621
Ασυμμετρία	1,443058836	Ασυμμετρία	0,422521414
Εύρος	0,3	Εύρος	0,7
Ελάχιστο	0,075	Ελάχιστο	0,15
Μέγιστο	0,375	Μέγιστο	0,85
Άθροισμα	0,75	Άθροισμα	1,9
Πλήθος	4	Πλήθος	4

**Πίνακας 56.** Περιγραφικά στατιστικά στοιχεία ποσοστού εμφάνισης του βακτηρίου *Tenacibaculum maritimum* για το μυλοκόπι και για τον συκίο.

Ποσοστό Προσβολής % (Μυλοκόπι)		Ποσοστό Προσβολής % (Συκίος)	
Μέσος	0,51625	Μέσος	0,475
Τυπικό σφάλμα	0,110281741	Τυπικό σφάλμα	0,047871355
Διάμεσος	0,4995	Διάμεσος	0,45
Επικρατούσα τιμή	#Δ/Υ	Επικρατούσα τιμή	0,4
Μέση απόκλιση τετραγώνου	0,220563483	Μέση απόκλιση τετραγώνου	0,095742711
Διακύμανση	0,04864825	Διακύμανση	0,009166667
Κύρτωση	1,163282936	Κύρτωση	-1,289256198
Ασυμμετρία	0,43813236	Ασυμμετρία	0,854563038
Εύρος	0,534	Εύρος	0,2
Ελάχιστο	0,266	Ελάχιστο	0,4
Μέγιστο	0,8	Μέγιστο	0,6
Άθροισμα	2,065	Άθροισμα	1,9
Πλήθος	4	Πλήθος	4

**Πίνακας 57.** Περιγραφικά στατιστικά στοιχεία ποσοστού εμφάνισης του βακτηρίου *Tenacibaculum maritimum* για το μυτάκι.

Ποσοστό Προσβολής % (Μυτάκι)	
Μέσος	0,26625
Τυπικό σφάλμα	0,054501338
Διάμεσος	0,266
Επικρατούσα τιμή	0,266
Μέση απόκλιση τετραγώνου	0,109002676
Διακύμανση	0,011881583
Κύρτωση	1,500105204
Ασυμμετρία	0,013761034
Εύρος	0,267
Ελάχιστο	0,133
Μέγιστο	0,4
Άθροισμα	1,065
Πλήθος	4

**Πίνακας 58.** Περιγραφικά στατιστικά στοιχεία ποσοστού εμφάνισης του βακτηρίου *Tenacibaculum maritimum* (Συγκεντρωτικά).

Ποσοστό Προσβολής % (Σύνολο)		
Λαβράκι	64,00%	± 10,58%
Τσιπούρα	26,00%	± 7,83%
Λυθρίνι	18,70%	± 13,14%
Φαγκρί	47,50%	± 29,86%
Μυλοκόπι	51,60%	± 22,05%
Μυτάκι	26,60%	± 10,90%
Συκιός	47,50%	± 9,50%

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές ποσοστού προσβολής του βακτηρίου ανάλογα με το είδος και για τις τέσσερες δειγματοληψίες λαμβάνοντας υπόψη την τυπική απόκλιση. Πιο συγκεκριμένα, στο λαβράκι τελικώς το βακτήριο εντοπίζεται σε σχετικά μεγάλα ποσοστά και στις 4 εποχές, με μικρές διακυμάνσεις ανά εποχή. Αντίθετα η τσιπούρα παρά τις μεγάλες ιχθυοπυκνότητες που διαχειριστικά υιοθετούνται κατά την εκτροφή της, παρουσιάζει μικρό ποσοστό προσβολής και με μικρή διακύμανση ανά εποχή. Επίσης μικρά ποσοστά προσβολής με μικρή διακύμανση ανά εποχή προκύπτουν και για το λυθρίνι. Τα είδη της οικογένειας Sciaenidae τελικώς παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά προσβολής. Πιο συγκεκριμένα ο συκιός προσβάλλεται σε μεγάλο ποσοστό με μικρή διακύμανση ανά εποχή, ενώ στο μυλοκόπι το ποσοστό προσβολής αυξάνεται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία.



**Πίνακας 59.** Σύγκριση μεγέθους ψαριών και ποσοστού Προσβολής (λαβράκι)  
Παρακάτω ακολουθεί έλεγχος τετραγώνου Χ παράγοντα (Chi square-test):

Λαβράκι				
Δειγματοληψία	1η Κλάση	2η Κλάση	Σύνολο	
	0.5-3g	>6g		
1 <sup>η</sup> Άνοιξη	57,5	60	117,5	0,228822
2 <sup>η</sup> Καλοκαίρι	72	60	132	0,257059
3 <sup>η</sup> Φθινόπωρο	84	72	156	0,303797
4 <sup>η</sup> Χειμώνας	48	60	108	0,210321
Σύνολο	261,5	252	513,5	

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές ποσοστού προσβολής του βακτηρίου ανά κλάση μεγέθους και ανά δειγματοληψία. Τα δειγματοληπτικά υποκείμενα χωρίστηκαν σε δύο κλάσεις μεγέθους. Η πρώτη κλάση μεγέθους είναι από 0,5-3g και η δεύτερη κλάση μεγέθους πάνω από τα 6g.

Αποτελέσματα: Μετά τον έλεγχο τετραγώνου παράγοντα x προκύπτει πως μεταξύ των δύο κλάσεων μεγέθους υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=1,08396E^{-61}$ ), ως προς τα ποσοστά προσβολής για το λαβράκι.

**Πίνακας 60.** Σύγκριση μεγέθους ψαριών & ποσοστού Προσβολής (τσιπούρα)  
Παρακάτω ακολουθεί έλεγχος τετραγώνου Χ παράγοντα (Chi square-test):

Τσιπούρα				
Δειγματοληψία	1η Κλάση	2η Κλάση	Σύνολο	
	0.5-3g	>15g		
1 <sup>η</sup> Άνοιξη	20	12	32	0,062317429
2 <sup>η</sup> Καλοκαίρι	36	24	60	0,11684518
3 <sup>η</sup> Φθινόπωρο	40	28	68	0,132424537
4 <sup>η</sup> Χειμώνας	48	0	48	0,093476144
Σύνολο	144	64	208	

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές ποσοστού προσβολής του βακτηρίου ανά κλάση μεγέθους και ανά δειγματοληψία. Τα δειγματοληπτικά υποκείμενα χωρίστηκαν σε δύο κλάσεις μεγέθους. Η πρώτη κλάση μεγέθους είναι από 0,5-3g και η δεύτερη κλάση μεγέθους πάνω από τα 15g.

Αποτελέσματα: Μετά τον έλεγχο τετραγώνου παράγοντα x προκύπτει πως μεταξύ των δύο κλάσεων μεγέθους υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=3,8203E^{-128}$ ), ως προς τα ποσοστά προσβολής για τη τσιπούρα.

**Πίνακας 61.** Σύγκριση μεγέθους ψαριών & ποσοστού Προσβολής (λυθρίνι)

Παρακάτω ακολουθεί έλεγχος τετραγώνου Χ παράγοντα (Chi square-test):

Λυθρίνι				
Δειγματοληψία	1η Κλάση	2η Κλάση	Σύνολο	
	40-60g	>80g		
1 <sup>η</sup> Άνοιξη	10	5	15	0,029211295
2 <sup>η</sup> Καλοκαίρι	25	10	35	0,068159688
4 <sup>η</sup> Χειμώνας	20	5	25	0,048685492
Σύνολο	55	20	75	

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές ποσοστού προσβολής του βακτηρίου ανά κλάση μεγέθους και ανά δειγματοληψία. Τα δειγματοληπτικά υποκείμενα χωρίστηκαν σε δύο κλάσεις μεγέθους. Η πρώτη κλάση μεγέθους είναι από 40-60g και η δεύτερη κλάση μεγέθους πάνω από τα 80g.

Αποτελέσματα: Μετά τον έλεγχο τετραγώνου παράγοντα x προκύπτει πως μεταξύ των δύο κλάσεων μεγέθους υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=2,8798E^{-142}$ ), ως προς τα ποσοστά προσβολής για το λυθρίνι.