



18^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΙΧΘΥΟΛΟΓΩΝ

ΥΔΡΟΒΙΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΟΡΟΙ: Ανάδειξη-Προστασία-Βιώσιμη ανάπτυξη

ΘΕΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΟΤΗΤΕΣ

- Αλιεία & Θαλάσσια Οικοσυστήματα
- Εσωτερικά ύδατα & Παράκτια Ζώνη
- Υδατοκαλλιέργειες, Εμπορία
& Μεταποίηση Αλιευτικών προϊόντων

ΠΡΑΚΤΙΚΑ

3-6 Νοεμβρίου 2022, Μεσολόγγι

Εκτίμηση του οξειδωτικού στρες προκαλούμενου από την επικάθιση επιβιωτικών ασκιδίων
σε καλλιεργούμενα μύδια (*Mytilus galloprovincialis*)

Δημήτριος Κ. Παπαδόπουλος¹, Κωνσταντίνος Φειδάντσης¹, Αθανάσιος Λάττος¹, Ιωάννης
Α. Γιάντσης², Ιωάννης Α. Θεοδώρου³, Βασίλειος Μιχαηλίδης¹

¹Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Ζωολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο
Θεσσαλονίκης, 54124, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα- dkrapado@bio.auth.gr, kfeidant@bio.auth.gr, lattosad@bio.auth.gr,
michaeli@bio.auth.gr

²Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Μακεδονίας, 53100, Φλώρινα, Ελλάδα- igiantsis@uowm.gr

³Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Αλιείας και Υδατοκαλλιέργειών, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών-
jtheo@upatras.gr

ABSTRACT

Dimitrios Papadopoulos¹, Konstantinos Feidantsis¹, Athanasios Lattos¹, Ioannis A. Giantsis², John A. Theodorou³, Basile Michaelides¹: Assessment of oxidative stress caused by biofouling ascidians in cultured Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*)

Biofouling in marine aquaculture represents a crucial limitation to efficient and sustainable production. Biofouling in shellfish aquaculture leads to decrease in shellfish fitness. When organisms are under stress, physiological trade-offs take place, whereby energy is allocated away from growth and reproduction, as the organism focuses on physiological aspects that increase survival. Reduced growth rates, decreased flesh weight and lower survival along with the great cost of periodic removal of fouling organisms limits farm profitability. Since reactive oxygen species (ROS) are continuously generated in cellular level, in this work, we evaluated the possible oxidative stress caused by biofouling ascidians in farmed mussels using TBARS assay and measuring glutathione reductase activity in five seasonal samplings. Prooxidant/antioxidant balance can be overturned, leading to oxidative stress and thus harming the organism. Our results indicate oxidative stress caused by ascidians in mussels collected by all samplings where ascidians are present.

Keywords: Aquaculture, Biofouling, Oxidative stress, *Mytilus galloprovincialis*, Ascidians

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως επιβιωτικοί οργανισμοί θεωρούνται τα μη επιθυμητά είδη οργανισμών που επικάθονται και αναπτύσσονται σε φυσικές και τεχνητές επιφάνειες πλήττοντας ανθρώπινες δραστηριότητες, συμπεριλαμβανομένης της καλλιέργειας οστρακοειδών, ιχθύων και θαλάσσιων μακροφυκών. Η ανάπτυξη επιβιωτικών οργανισμών στις θαλάσσιες καλλιέργειες είναι από τους βασικούς ανασταλτικούς παράγοντες για μια αποδοτική και βιώσιμη καλλιέργεια (Dürr and Watson 2010). Στην καλλιέργεια των διθύρων οι επιβιώτες αυτοί προκαλούν αρνητικές συνέπειες όπως χαμηλότερο ρυθμό αύξησης, μειωμένο βάρος, μικρότερους δείκτες ευρωστίας, αυξημένη θνησιμότητα και υποβάθμιση της ποιότητας σάρκας τους. Τα παραπάνω οφείλονται στον ανταγωνισμό των επιβιωτών με το καλλιεργούμενο είδος (τροφή, οξυγόνο), στην δυσκολία που συναντούνε τα δίθυρα στο άνοιγμα και κλείσιμο των θυρίδων και στην ασφυξία που μπορεί να προκαλέσουν (Woods et al. 2012).

Η μυδοκαλλιέργεια στην Ελλάδα περιλαμβάνει περισσότερες από 500 εγκαταστάσεις εκτροφής σε περιοχές όπως ο Θερμαϊκός, Μαλιακός, Σαρωνικός, Στρυμωνικός, Βιστωνικός, Αμβρακικός και Λωρίδα Σαγιάδας με συνολική δυναμικότητα παραγωγικότητας περί τους 40,000 τόνους (Theodorou et al., 2015). Η επικάθιση των εισβολικών ασκιδίων στα μύδια, απαιτεί επιπρόσθετη προσπάθεια για τον καθαρισμό και διαλογή τους, ενώ υποβαθμίζει την ποιότητά τους. Η διαχείριση των επιβιωτών εκτιμήθηκε το 2004 σε 5-10% του συνολικού κόστους παραγωγής (Lane and Willemsen 2004). Οι ενέργειες που εφαρμόζονται για το μετριασμό των επιπτώσεων ενδέχεται να ανεβάζουν το κόστος παραγωγής στην τελική τιμή του προϊόντος σε 20-30% για τις οστρακοκαλλιέργειες (Fitridge et al., 2012).

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) αναπτύσσονται συνεχώς εντός των κυττάρων ακόμα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Για το λόγο αυτό, οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει διάφορους αμυντικούς μηχανισμούς ώστε να αντιμετωπίζουν την οξειδωτική πίεση που δέχονται. Όταν οι

αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί υπερκεραστούν, λόγω αυξημένης παραγωγής ROS, ανατρέπεται η προοξειδωτική/αντιοξειδωτική ισορροπία, φαινόμενο που οδηγεί σε μια κατάσταση που καλείται οξειδωτική καταπόνηση (οξειδωτικό stress). Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του οξειδωτικού stress αποτελεί ένα αξιόπιστο εργαλείο εκτίμησης της καταπόνησης που δέχονται τα καλλιεργούμενα μύδια, λόγω της εγκατάστασης επιβιωτικών οργανισμών.

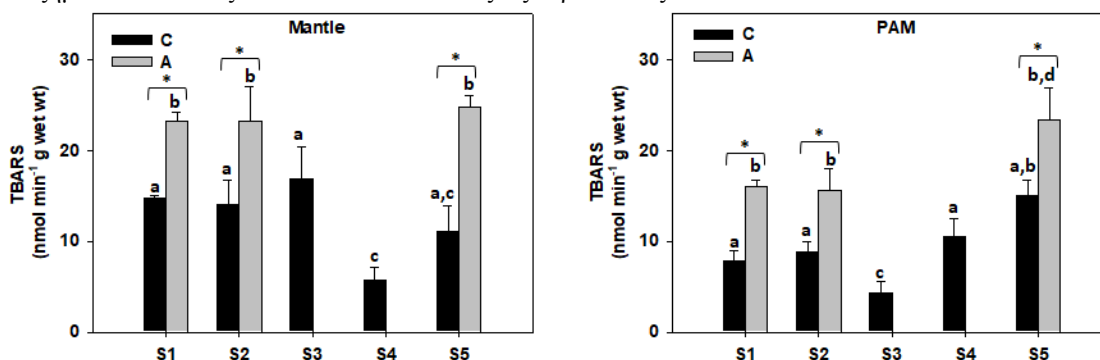
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την μελέτη του οξειδωτικού stress σε μύδια επιβαρυνμένα και μη, πραγματοποιήθηκε εποχική δειγματοληψία μυδιών στο πεδίο. Πιο συγκεκριμένα, σε 5 χρονικές στιγμές (Νοέμβριος του 2020 μέχρι Σεπτέμβριος του 2021: Νοέμβριος - S1, Φεβρουάριος - S2, Απρίλιος - S3, Ιούνιος - S4, Αύγουστος - S5) συλλέγονταν από 20 μύδια που έφεραν ασκίδια και 20 μύδια χωρίς ασκίδια. Η ανατομία λάμβανε χώρα επί τόπου και οι ιστοί του μανδύα (mantle) και του οπίσθιου προσαγωγού μυός (Posterior Adductor Muscle – PAM) αποθηκεύονταν άμεσα σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια μεταφέρονταν στο εργαστήριο όπου αποθηκεύονταν στους -80°C. Από τις συνολικά 5 δειγματοληψίες, σε 2 από αυτές (Μάρτιος, Ιούνιος) συλλέχθηκαν μόνο μη επιβαρυνμένα μύδια, καθώς η αφθονία και η ποικιλοτήτων ασκιδίων ήταν χαμηλές. Για την μελέτη του πιθανού οξειδωτικού stress, ως δείκτες, εξετάστηκαν η δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης (GR) καθώς και η υπεροξείδωση των λιπιδίων με τη μέθοδο TBARS.

Οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) παράγονται ως παραπροϊόντα της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων και μπορούν να ανιχνευθούν με την μέθοδο TBARS. Για την εκτίμηση της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων έγινε ομογενοποίηση των ιστών του μανδύα και του οπίσθιου προσαγωγού μυός των μυδιών, σύμφωνα με τη μέθοδο του Salach (1978). Το τελικό προϊόν, η μαλονδιαλδεΐδη (MDA), η οποία σχηματίζεται από την αποικοδόμηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων λόγω των ελεύθερων ριζών, ποσοτικοποιήθηκε μέσω αντίδρασης με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS). Τα επίπεδα των TBARS μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο στα 535 nm ($\epsilon = 1.5 \times 10^5 \text{ Lmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως nmoles ανά γραμμάριο υγρού βάρους ιστού. Η δραστηριότητα της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης (GR) προσδιορίστηκε επίσης φωτομετρικά, σύμφωνα με τη μέθοδο των Carlberg και Mannervik (1985), καταγράφοντας τις αλλαγές στην απορρόφηση του NADPH στα 340 nm.

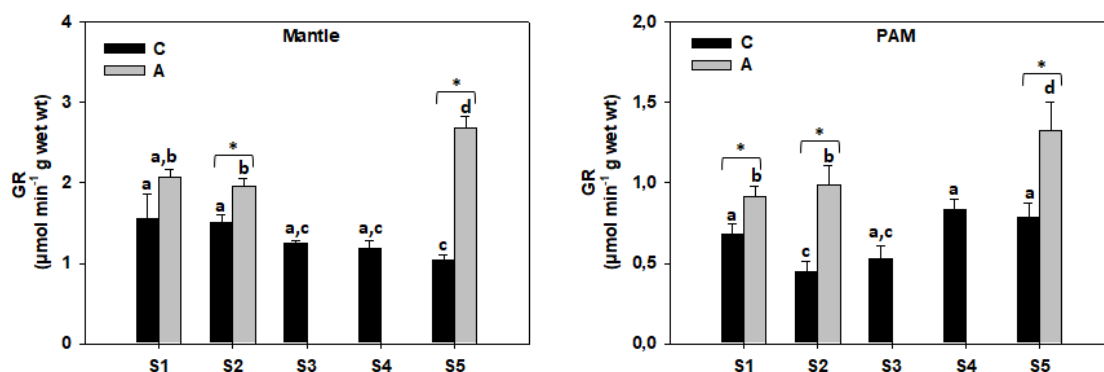
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων που εφαρμόστηκαν φαίνονται στις Εικόνες 1 και 2, από τις οποίες προκύπτει πως οι επιβαρυνμένοι με ασκίδια πληθυσμοί μυδιών που εξετάστηκαν παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού stress σε όλες τις περιπτώσεις.



Εικ.1: Αλλαγές στα επίπεδα των TBARS στον μανδύα (αριστερά) και στον οπίσθιο προσαγωγό μυ (δεξιά) των μυδιών *Mytilus galloprovincialis* στις 5 δειγματοληψίες. Οι τιμές αφορούν μέσες τιμές ± τυπική απόκλιση. Τα πεζά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιβαρυνμένων και μη μυδιών.

Fig.1: Changes in TBARS levels in mantle (left) and PAM (right) of *Mytilus galloprovincialis* in the five samplings. Values are means \pm SD. Lower case letters represent statistically significant differences between mussels with biofouling ascidians and mussels without ascidians.



Εικ. 2: Αλλαγές στη δραστηριότητα της ρεδοουκτάσης της γλουταθειόνης (GR) στον μανδύα (αριστερά) και στον οπίσθιο προσαγωγό μυ (δεξιά) των μυδιών *Mytilus galloprovincialis* στις 5 δειγματοληψίες. Οι τιμές αφορούν μέσες τιμές \pm τυπική απόκλιση. Τα πεζά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιβαρυσμένων και μη μυδιών.

Fig. 2: Changes in the activity of glutathione reductase (GR) in mantle (left) and PAM (right) of *Mytilus galloprovincialis* in the five samplings. Values are means \pm SD. Lower case letters represent statistically significant differences between mussels with biofouling ascidians and mussels without ascidians.

Τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με την εργασία του Sievers και των συνεργατών του (2013), όπου χρησιμοποιήθηκαν πειραματικοί αρμαθοί μυδιών οι οποίοι ενοφθαλμίστηκαν με χαμηλές προς μέτριες συγκεντρώσεις των ασκιδίων *Ciona intestinalis*, *Ectopleura crocea* και *Styela clava*. Η παρουσία των ασκιδίων μείωσε το ρυθμό αύξησης του κελύφους ενώ το βάρος της σάρκας των μυδιών ήταν μικρότερο σε ποσοστά 8-21%. Οι χαμηλότεροι ρυθμοί αύξησης και το μικρότερο βάρος πιθανότατα εξηγούνται αφενός από την προσπάθεια των μυδιών να αντιμετωπίσουν τον «παρασιτισμό» καταθέτοντας μέρος της διαθέσιμης ενέργειας σε μηχανισμούς άμυνας και αφετέρου αποδίδονται στον ανταγωνισμό για την διαθέσιμη τροφή με τους επιβιώτες. Η παρουσία των ασκιδίων επάγει την αντιοξειδωτική άμυνα των μυδιών και το φαινόμενο αυτό είναι υπαρκτό σε όλη τη διάρκεια του χρόνου. Οι Locke και Carman (2009) παρατήρησαν μειωμένη αύξηση, χειρότερη φυσική κατάσταση και μειωμένη επιβίωση των μυδιών *Mytilus edulis* σε συστήματα εκτροφής μακράς γραμμής που υπήρχε το ασκίδιο *Ciona intestinalis*.

Το οξειδωτικό stress έχει βλαπτικά αποτελέσματα για το κύτταρο και όλο τον οργανισμό, ενώ στην περίπτωση της μυδοκαλλιέργειας μπορεί να οδηγήσει σε απώλειες παραγωγής και υποβάθμιση της ποιότητας του προϊόντος. Η αποτροπή της εγκατάστασης επιβιωτικών οργανισμών και η διαχείριση αυτών, εφόσον έχουν εγκατασταθεί, αποτελούν κρίσιμα σημεία μελλοντικής έρευνας, με τελικό σκοπό την ανάπτυξη αποδοτικών και βιώσιμων μεθόδων μετριασμού των επιπτώσεων στην μυδοκαλλιέργεια.

ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Η εργασία είναι μέρος του προγράμματος με τίτλο «Ανάπτυξη βέλτιστων πρακτικών ελέγχου ξενικών ειδών ασκιδίων και λοιπών ειδών (μαλάκια, σπόγγοι) στις εγκαταστάσεις των μυδοκαλλιεργειών και μετριασμό των οικονομικών επιπτώσεων της εισβολής» υποστηριζόμενο (Κωδικός ΟΠΣ 5048463) που χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «ΑΛΙΕΙΑΣ ΚΑΙ ΟΑΛΑΣΣΑΣ 2014-2020» στα πλαίσια της πρόσκλησης «Προστασία και αποκατάσταση της Θαλάσσιας βιοποικιλότητας και των οικοσυστημάτων και καθεστάτα αντιστάθμισης στο πλαίσιο των βιώσιμων αλιευτικών δραστηριοτήτων - Δράση: συμμετοχή σε άλλες δράσεις που αποσκοπούν στη διατήρηση και βελτίωση της βιοποικιλότητας και των υπηρεσιών οικοσυστήματος, όπως η αποκατάσταση συγκεκριμένων Θαλάσσιων και παράκτιων οικοτόπων για τη στήριξη βιώσιμων αλιευτικών αποθεμάτων, συμπεριλαμβανομένης της επιστημονικής προετοιμασίας και αξιολόγησής τους - Χωροκατακτητικά Ξένα Είδη».

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Carlberg, I., & Mannervik, B. (1985). [59] Glutathione reductase. In *Methods in enzymology* (Vol. 113, pp. 484-490). Academic press.
- Dürr, S., & Watson, D. I. (2010). Biofouling and antifouling in aquaculture. *Biofouling*, 12, 267-287.
- Fitridge, I., Dempster, T., Guenther, J., & De Nys, R. (2012). The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. *Biofouling*, 28(7), 649-669.
- Lane, A., & Willemsen, P. (2004). Collaborative effort looks into biofouling. *Fish Farming Int*, 44, 34-35.
- Locke, A., & Carman, M. (2009). Ecological interactions between the vase tunicate (*Cionaintestinalis*) and the farmed blue mussel (*Mytilusedulis*) in Nova Scotia, Canada. *Aquatic Invasions*, 4(1), 177-187.
- Salach Jr, J. I. (1978). [49] Preparation of monoamine oxidase from beef liver mitochondria. In *Methods in enzymology* (Vol. 53, pp. 495-501). Academic Press.
- Sievers, M., Fitridge, I., Dempster, T., & Keough, M. J. (2013). Biofouling leads to reduced shell growth and flesh weight in the cultured mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Biofouling*, 29(1), 97-107.
- Theodorou, J. A., Perdikaris, C., & Filippopoulos, N. G. (2015). Evolution through innovation in aquaculture: the case of the hellenic mariculture industry (Greece). *Journal of Applied Aquaculture*, 27(2), 160-181.
- Woods, C., Floerl, O., & Hayden, B. J. (2012). Biofouling on Greenshell™ mussel (*Perna canaliculus*) farms: a preliminary assessment and potential implications for sustainable aquaculture practices. *Aquaculture International*, 20(3), 537-557.