

# Aquaculture of *Solea senegalensis* – Main Pathologies and Biosecurity

Declaração de autoria de trabalho.

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

*Luis Pedro Pereira e Silva da Rocha Calisto*

Copyright - A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## UNIVERSIDADE DO ALGARVE

MASTER IN AQUACULTURE AND FISHERIES

*Aquaculture of Solea senegalensis – Main Pathologies  
and Biosecurity*

**External Orientation:** Dr. Diogo Rosado

**External Co-orientation:** Dr. Alizia Estévez Toranzo

**Internal Orientation:** Dr. Maria Teresa Dinis

**Local of Internship:** Sole Hatchery SAFIESTELA – Sustainable Aquaculture Investments

**LUÍS PEDRO PORFÍRIO E SILVA DA ROCHA CALISTO**

**A44040**

Coimbra, 24 de Setembro de 2013

**AKNOWLEDGEMENTS:**

Em primeiro lugar, como não poderia deixar de ser, quero agradecer à minha família, porque se não fossem eles não estaria a ler isto, pelo menos agora.

A todos os amigos e colegas, não preciso de referir nomes, porque eles sabem quem são.

À Dra. Maria Teresa Dinis porque se não fosse o seu espírito de investigação e de inovação provavelmente a aquacultura do linguado ainda seria ficção.

À Dra. Alizia Estévez Toranzo, à Soledad Núñez García e à Sabela Balboa Méndez, do Instituto de Acuicultura de Santiago de Compostela por me terem recebido e cedido as instalações, materiais e conhecimento.

À Safiestela, por me ter permitido realizar o estágio, e a todo o pessoal que me ajudou em tudo o que era preciso, em especial à Marta, providenciando sempre um bom ambiente de trabalho.

<b>INDEX</b>	<b>PAGE</b>
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1. Characterization of the Local of Internship. ....	1
1.2. Aquaculture of <i>Solea senegalensis</i> .....	2
1.3. Objectives.....	5
<b>II. STATE OF THE ART.....</b>	<b>6</b>
2.1. Factors with importance on Aquaculture Fish health .....	6
2.1.1 Abiotic Factors.....	7
2.1.1.1. Pathology of Non Infectious Origin.....	8
2.1.2. Biotic Factors.....	11
2.1.2.1. Pathology of Bacterial Origin .....	11
2.1.2.2. Pathology of Viral Origin .....	23
2.1.2.3. Pathology of Fungal Origin .....	25
2.1.2.4. Pathology of Parasitological Origin .....	27
2.2. Pathogens Associated to Live Food.....	37
2.3. Biosecurity.....	38
<b>III. EXPERIMENTAL WORK.....</b>	<b>41</b>
3.1. Introduction and Objectives.....	41
3.2. Material and Method.....	41
3.2.1. Sampling.....	41
3.2.1.1. Water Samples.....	41
3.2.1.2. Fish Samples.....	41
3.2.1.3. Live Food Samples.....	45

3.2.2. Analytical Methods .....	46
3.2.2.1. Bacteriological Analysis of Water.....	46
3.2.2.2. Parasitological Analysis of the Sole.....	51
3.2.2.3. Bacteriological Analysis of Sole .....	54
3.3. Results.....	60
3.3.1. Bacteriological Results.....	61
3.3.2. Parasitological Results.....	65
3.3.3. Live Food Results.....	66
3.4. Discussion.....	66
3.5. Conclusion.....	70
<b>IV. BIBLIOGRAPHY .....</b>	<b>72</b>
<b>V. ANNEXES.....</b>	<b>xiv</b>

FIGURES INDEX	PAGE
<b>Figure 1</b> – Raceway tanks with <i>S. Senegalensis</i> .....	2
<b>Figure 2</b> – World distribution of <i>S. Senegalensis</i> .....	3
<b>Figure 3</b> – Black interradiial membrane of the pectoral fin.....	3
<b>Figure 4</b> – Unpigmented <i>Solea senegalensis</i> juvenile.....	7
<b>Figure 5</b> – <b>A.</b> Gas bubbles in the eyes of a Senegalese sole. <b>B.</b> Gas emboli in the gills of an European seabass.....	10
<b>Figure 6</b> – <b>A.</b> Spleen of gilthead seabream with multiple white foci caused by <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> . <b>B.</b> Histological section of spleen from gilthead seabream showing phagocytes containing numerous bacteria .....	13
<b>Figure 7</b> – Lesions in the caudal fin of a sole, caused by <i>Vibrio spp.</i> .....	19
<b>Figure 8</b> – External symptoms of tenacibaculosis (black patches and ulcers).....	20
<b>Figure 9</b> – <b>A, B.</b> Beginning of germination of <i>Ichthyophonus hoferi</i> spherical bodies in the intestine; <b>C.</b> Development of branched germination tubes (hyphae).....	27
<b>Figure 10</b> – <i>Amyloodinium ocellatum</i> life cycle; <b>A</b> - trophont; <b>B</b> - tomont; <b>C</b> – dinospore.....	28
<b>Figure 11</b> – Trophonts of <i>A. ocellatum</i> attached to the surface of the skin ( <b>A, B</b> ) and in the gill filaments stained with Lugol’s iodine ( <b>C</b> ).....	31
<b>Figure 12</b> – Scuticociliate with caudal cilium at the posterior end (pointed arrow) observed under phase contrast microscope.....	34
<b>Figure 13</b> – Diagram of a typical trichodinid life cycle; <b>A</b> – side view; <b>B</b> – top view; <b>C</b> – cilia; <b>D</b> denticle .....	35
<b>Figure 14</b> – Diagram of adult/sexual mature <i>Entobdella soleae</i> .....	37
<b>Figure 15</b> – Disinfection buckets for material .....	39
<b>Figure 16</b> – Sole euthanasia.....	42
<b>Figure 17</b> – Senegalese sole necropsy. <b>Legend:</b> <b>O</b> – operculum; <b>A</b> – gill arch; <b>G</b> – gills.....	42
<b>Figure 18</b> – Senegalese sole necropsy. <b>Legend:</b> <b>H</b> – heart; <b>G</b> – gill observed at stereoscope...	43

<b>Figure 19</b> – Senegalese sole necropsy. <b>Legend:</b> the yellow line represents the incision line; <b>G</b> – gallbladder; <b>I</b> – intestine; <b>L</b> – liver.....	43
<b>Figure 20</b> – Senegalese sole necropsy. <b>Legend:</b> <b>G</b> – gallbladder; <b>G</b> ♀ – female gonad; <b>I</b> – intestine; <b>L</b> – liver; <b>S</b> – spleen.....	44
<b>Figure 21</b> – Senegalese sole necropsy. <b>Legend:</b> <b>K</b> – kidney.....	44
<b>Figure 22</b> – Senegalese sole necropsy. <b>Legend:</b> <b>G</b> ♂ - male gonad; <b>G</b> ♀ - female gonad.....	45
<b>Figure 23</b> – Senegalese sole necropsy. <b>Legend:</b> <b>B</b> – brain.....	45
<b>Figure 24</b> – Rotipher sample in a water bath.....	46
<b>Figure 25</b> – Representation of the viable plate count method.....	49
<b>Figure 26</b> – Representation of the membrane filter system.....	50
<b>Figure 27</b> – Kidney access for bacterial sampling, on smaller fish.....	54
<b>Figure 28</b> – Antibiogram.....	55
<b>Figure 29</b> – Interpretation of the oxidase test. <b>Legend:</b> <b>A</b> – Positive; <b>B</b> – Negative.....	56
<b>Figure 30</b> – Interpretation of the catalase test. <b>Legend:</b> <b>A</b> – Positive; <b>B</b> – Negative.....	56
<b>Figure 31</b> – Interpretation of the indole test. <b>Legend:</b> <b>A</b> – Positive; <b>B</b> – Negative.....	57
<b>Figure 32</b> – Identification of a Gram- bacteria with the KOH test.....	58
<b>Figure 33</b> – Interpretation of the methyl red test. <b>Legend:</b> <b>A</b> – Positive; <b>B</b> – Negative.....	59
<b>Figure 34</b> – Amylase production.....	60
<b>Figure 35</b> – Esculin hydrolysis.....	60
<b>Figure 36</b> – <i>Vibrio anguillarum</i> Gram stained.....	61
<b>Figure 37</b> – Culture of <i>Vibrio anguillarum</i> in TCBS medium.....	62
<b>Figure 38</b> – <b>A.</b> <i>V. parahaemolyticus</i> , Gram stain; <b>B.</b> <i>V. parahaemolyticus</i> on TCBS, 24h.....	63
<b>Figure 39</b> – <b>A.</b> <i>V. harveyi</i> , Gram stain; <b>B.</b> <i>V. harveyi</i> on TCBS, 48h.....	64
<b>Figure 40</b> – Wet mount of a typical trichodinid.....	65
<b>Figure 41</b> – Foot dips at the entrance of the weaning (A) and of the egg room (B).....	70

**TABLES INDEX****PAGE**

<b>Table I</b> – Isolations of <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> from fish (1999).....	12
<b>Table II</b> – Characteristics of isolates of <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (2004).....	14
<b>Table III</b> – Vibriosis outbreaks caused by <i>Listonella anguillarum</i> (1999).....	17
<b>Table IV</b> – Treatments reported to be effective for treating <i>A. ocellatum</i> (2012).....	30
<b>Table V</b> – Chemical disinfectants used in aquaculture (2012).....	40
<b>Table VI</b> – Biochemical and morphological characterization of strains of <i>Vibrio harveyi</i> and <i>V. Parahaemolyticus</i> .....	62

## RESUMO

Devido ao crescimento da população global e ao aumento do consumo *per capita* de pescado, a demanda mundial de produtos pesqueiros triplicou entre os anos 1961 e 2001. Actualmente, os produtos pesqueiros constituem uma das mais importantes fontes de proteína animal do mundo. De uma forma geral, a aquacultura tem o potencial de contribuir para um aumento das reservas pesqueiras que estão em declínio ou em perigo de extinção. Este papel pode ser importante no acréscimo de espécies para fins recreativos, pescas comerciais, para a preservação de espécies selvagens e da cultura marítima e pesqueira.

A aquacultura converteu-se numa actividade socioeconómica relevante, oferecendo novas oportunidades nas regiões em que é implementada, devido à criação de postos de trabalho, à utilização mais eficaz dos recursos naturais e ao fomento do comércio local e internacional.

O linguado tem um elevado valor comercial e é, do ponto de vista zootécnico, uma das espécies mais promissoras para a aquacultura. Este facto deve-se a características como a robustez física e a resistência a condições adversas, aliadas a uma taxa de crescimento favorável.

A análise bacteriológica e parasitológica da água e dos peixes são essenciais para reduzir o risco de doenças e para assegurar um elevado nível de segurança, higio-sanitária. Há vários métodos possíveis de diagnóstico bacteriano, que incluem culturas bacterianas em diferentes meios de cultura, técnicas de coloração, antibiogramas, avaliação da mobilidade. testes bioquímicos rápidos tais como oxidase, catalase e indol, vermelho de metilo, Voges-Proskauer, amilase e hidrólise de Esculina. Em geral, estes métodos são fáceis de realizar, sem descurar a importância da assepsia em cada passo das técnicas utilizadas, bem como em todo o material, para garantir a ausência de contaminação externa. Deste modo realizaram-se colheitas em diferentes fases do processo de produção tendo sido identificados alguns casos de *Vibrio anguillarum*, *V. Harveyi*, *V. parahaemolyticus* and *Tenacibaculum maritimum*. Actualmente, as provas para análise parasitológica de linguado são vastas, permitindo um diagnóstico rápido, simples e confiável e requerendo poucos materiais. Os parasitas encontrados mais frequentemente na aquacultura do linguado senegalês foram ciliados, geralmente tricodinídeos como *Trichodina* spp..

De modo a poder controlar eventuais surtos epizoóticos por parte destes ou de outros agentes patogénicos foram revistas e criadas algumas medidas de biossegurança, tais como a instalação de pedilúvios, cada área possuir equipamento específico, o veículo de transporte de peixe era submetido a desinfecção rigorosa. Melhor do que aplicar um tratamento é prevenir o risco de doenças, deste modo o papel da biossegurança é essencial para uma produção correta e para garantir um alto nível de qualidade do peixe.

**ABSTRACT**

Due to the growing global population and increasing per capita consumption of fish, the global demand for fish products tripled between 1961 and 2001. The fish products are currently one of the most important sources of animal protein in the world. In general, aquaculture has the potential to contribute for an increase in fish stocks that are declining or endangered. This role may be important in the increase of species for recreational, commercial fisheries, and for the preservation of wildlife species and marine and fishing tradition.

Aquaculture has become an important socio-economic activity, providing new opportunities in the areas where it is implemented, due to the creation of jobs, to the most efficient use of natural resources and promotion of local and international trade.

Senegalese sole, a high commercial value fish is, in terms of livestock, one of the most promising species for aquaculture. That is due to characteristics such as physical strength and resistance to harsh conditions associated with an interesting growth rate.

The bacteriological and parasitological analysis of water and fish are essential to reduce the risk of disease and to ensure a high level of hygio-sanitary security. There are several possible methods of bacterial diagnosis, these include bacterial cultures in different media, staining techniques, antibiograms, rapid biochemical tests (oxidase, catalase and indole), assessment of mobility, indole, methyl red, Voges-Proskauer, amylase and Esculin hydrolysis. In general, these methods are easy to perform, without neglecting the importance of asepsis in every step on the techniques used, as well as in all material, to ensure the absence of external contamination. Therefore samples were performed at different stages of the production process, in some cases *Vibrio anguillarum*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* and *Tenacibaculum maritimum* were identified. Nowadays, the proofs for parasitological analysis of sole are vast, allowing a rapid diagnosis, simple and reliable and require few materials. The parasites found in the aquaculture of Senegalese sole were most often ciliate, trichodinids as *Trichodina* spp..

In order to be able to control animal diseases from any of these or other pathogens some biosecurity measures were revised and created, such as installing footbaths, each area has specific equipment, the vehicle used for transporting fish was subjected to rigorous disinfection. Better than applying a treatment is to prevent the risk of disease, so the role of biosecurity is essential for a correct production performance and for guarantee high level of quality of the fish.

## LIST OF ABBREVIATIONS

$\Delta P$  – Gas supersaturation

**O/129** – Vibriostatic compound

**AOA** - Anacker and Ordal agar

**BFNNV** – Barfin flounder Nervous Necrosis Virus

**CFUs** – Colony forming units

**CNS** – Central nervous system

**Cu<sup>2+</sup>** – Copper

**DNA** - Deoxyribonucleic acid

**ELISA** – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

**EO-30** – Oxytetracycline

**FFC-30** – Florfenicol

**FMM** – *Flavobacterium maritimus* Medium

**H<sub>2</sub>O** – Water

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Hydrogen peroxide

**IFAT** – Indirect Fluorescent Antibody Test

**IHC** – Immunohistochemistry

**KOH** - Potassium hydroxide

**M.P.N.**– Most probable number method

**MHA** – *Mueller-Hinton* Agar

**MR** – Methyl Red

**NH<sub>3</sub>** – Ammonia

**NV-30** - Novobiocin

**O<sub>2</sub>** – Oxygen

**RGNNV** – Red-spotted grouper Nervous Necrosis Virus

**RT-PCR** – *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*

**SJNNV** – Striped jack Nervous Necrosis Virus

**SXT** – Trimethoprim-sulfamethoxazole

**TCBS** –Thiosulphate, Citrate, Bile and Sucrose Agar

**TFTC** – Too few to count

**TMTC** – Too many to count

**TPNNV** –Tiger puffer Nervous Necrosis Virus

**TSA** –Trypticase Soy Agar

**U.V.** – Ultra Violet radiation

**VER** – Viral Encephalopathy and Retinopathy

**VP** – Voges-Proskauer

**Zn<sup>2+</sup>** – Zinc

## **ANNEXES**

# **ANNEX I**

# ANNEX II

# **ANNEX III**

# **ANNEX IV**