

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Διαχειριστικές πρακτικές ευζωίας στην εντατική εκτροφή
ιχθύων»

ΑΝΤΩΝΙΑΔΟΥ ΕΛΕΝΗ

ΒΟΛΟΣ 2023

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2^{ος} Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



Ελένη Αντωνιάδου, 2023, «Διαχειριστικές πρακτικές ευζωίας στην εντατική εκτροφή ιχθύων»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- 1) Γκολομάζου Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Π.Θ. Προστασία-Ευζωία Ιχθύων
- 2) Παναγιωτάκη Παναγιώτα, Καθηγήτρια Π.Θ. Υδατοκαλλιέργειες
- 3) Καραπαναγιωτίδης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Π.Θ. Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή (με αλφαβητική σειρά):

- 1) Γκολομάζου Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας / Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος
- 2) Καραπαναγιωτίδης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας / Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος
- 3) Μαλανδράκης Εμμανουήλ, Επίκουρος Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών / Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής
- 4) Μήλιου-Μπαρσάκη Ελένη, Καθηγήτρια, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών / Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής
- 5) Νεοφύτου Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας / Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος
- 6) Παναγιωτάκη Παναγιώτα, Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας / Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος
- 7) Πούλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών / Τμήμα Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών

Στο σύζυγο μου Μανώλη και στην Ηλέκτρα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ελένης Γκολομάζου, την οποία ευχαριστώ από καρδιάς που επένδυσε σε εμένα και μου έδωσε την ευκαιρία εκπόνησης της παρούσας διατριβής, με συνεχή ηθική και επιστημονική καθοδήγηση.

Ευχαριστώ πολύ τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγήτρια Παναγιώτα Παναγιωτάκη και Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη για τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση και τις πολύτιμες και εποικοδομητικές συμβουλές σε κάθε βήμα της πορείας μου.

Επίσης, οφείλω ένα ευχαριστώ στην εταιρεία «BioMar AEBE» για την προμήθεια των πρώτων υλών για την κατάρτιση των σιτηρεσίων και την εταιρεία «ΣΕΛΟΝΤΑ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ Α.Ε» για την προμήθεια των ατόμων ιχθυδίων για την υλοποίηση των πειραμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στο διδάκτορα Πιερ Ψωφάκη για τις τόσες γνώσεις που μου μετέδωσε και τις τόσες πολλές ώρες που μου αφιέρωσε από το δικό του απαιτητικό πρόγραμμα. Η βοήθεια του ήταν ανεκτίμητη. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Όλγα Ντανταλή για την υλική αλλά και ψυχολογική στήριξη και βοήθεια όλες αυτές τις ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο, καθώς και στον επίκουρο καθηγητή κ. Μανώλη Μαλανδράκη και στο διδάκτορα κ. Αριστείδη Τσοπελάκο για την τόσο άμεση ανταπόκριση στις απορίες και προβληματισμούς μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους πτυχιούχους ιχθυολόγους πλέον Βικτώρια Καραμπέρη και Στέφανο Κλειτσογιάννη για την σημαντική βοήθεια τους κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και Λιλιάνα Κολαίτη και Σωτήρη Σακοράφα για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά τη διάρκεια των αναλύσεων στο εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών.

Ευχαριστώ τους γονείς μου, Γιώργο και Νίνα για την υπομονή, αγάπη και απέραντη ηθική και υλική υποστήριξη όλα αυτά τα απαιτητικά χρόνια σπουδών, την αδερφή μου Ναυσικά και το μικρό μου αδερφό, Αλέξανδρο, για την απέραντη αγάπη τους και στήριξη.

Ευχαριστώ και αφιερώνω τη διδακτορική αυτή διατριβή στο σύζυγο μου Μανώλη γιατί ήταν το μεγάλο μου στήριγμα όλα αυτά τα χρόνια και γιατί στάθηκε πραγματικά ακούραστος δίπλα μου. Τέλος, την αφιερώνω στην υπέροχη κόρη μας Ηλέκτρα, που το χαμόγελο της μου δίνει πάντα δύναμη.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	11
ABSTRACT	15
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	18
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	18
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	19
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	20
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	21
1.1. Ελληνική και παγκόσμια υδατοκαλλιέργεια-Στατιστικά στοιχεία	21
1.3. Υδατοκαλλιέργειες και ευζωία (welfare) ιχθύων	26
1.3.1. Νομοθετικό πλαίσιο	28
1.3.2. The great fish debate	31
1.4. Απόκριση στην καταπόνηση	35
1.4.1. Φυσιολογική απόκριση.....	35
1.4.2. Συμπεριφορά.....	38
1.4.3. Δείκτες καταπόνησης.....	40
1.5. Πρόσθετες ύλες ζωοτροφών.....	42
1.5.1. Φυτοβιοτικά (Phytobiotics) στις υδατοκαλλιέργειες.....	43
1.5.1.1. Κάνναβη (<i>Cannabis sativa</i>).....	47
1.5.1.2. Ρίγανη (<i>Origanum vulgare</i>)	49
1.5.1.3. Κανέλα (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	51
1.6. Σκοπός της διδακτορικής διατριβής	53
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	55
2.1. Πειραματικές συνθήκες εκτροφής ιχθύων	55
2.2. Πειραματικά σιτηρέσια.....	55
2.3. ΠΕΙΡΑΜΑ 1- Επίδραση της διατροφής με φαρμακευτικά φυτά στην ανάπτυξη, στην υγεία και στην ευζωία της τσιπούρας	57
2.3.1. Εισαγωγή	57
2.3.2. Πειραματικό πρωτόκολλο	58

2.4. ΠΕΙΡΑΜΑ 2 - Επίδραση οξείας καταπόνησης, προκληθείσας μέσω έντονων χειρισμών απόχης στην απόκριση καταπόνησης της τσιπούρας μετά από διατροφή με φαρμακευτικά φυτά	59
2.4.1. Εισαγωγή.....	59
2.4.2. Πειραματικό πρωτόκολλο	61
2.5. ΠΕΙΡΑΜΑ 3 – Η επίδραση της ασιτίας στην απόκριση καταπόνησης της τσιπούρας μετά από τροφοληψία με φαρμακευτικά φυτά	62
2.5.1. Εισαγωγή	62
2.5.2. Πειραματικό πρωτόκολλο	63
2.6. ΠΕΙΡΑΜΑ 4 – Επίδραση χρόνιας καταπόνησης στην τσιπούρα, προκληθείσας λόγω υψηλής πυκνότητας εκτροφής, μετά από χορήγηση σιτηρεσίων εμπλουτισμένα με φαρμακευτικά φυτά	64
2.6.1. Εισαγωγή	64
2.6.2. Πειραματικό πρωτόκολλο	66
2.8. Στατιστική ανάλυση.....	66
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	68
3.1. ΠΕΙΡΑΜΑ 1 - Επίδραση της διατροφής με φαρμακευτικά φυτά στην ανάπτυξη και στην απόκριση καταπόνησης της τσιπούρας	68
3.1.1. Θνησιμότητες, παράμετροι ανάπτυξης και αξιοποίησης της τροφής ..	68
3.1.2. Θρεπτική σύσταση.....	70
3.1.3. Αιματολογικές παράμετροι.....	72
3.1.4. Κορτιζόλη.....	74
3.1.5. Βλάβη του DNA	75
3.1.6. Ιστολογικές αλλοιώσεις	77
3.1.7. Προφίλ λιπαρών οξέων	78
3.1.8. Νευροδιαβιβαστές.....	81
3.1.9. Συμπεριφορά.....	82
3.2. ΠΕΙΡΑΜΑ 2 - Επίδραση οξείας καταπόνησης, προκληθείσας μέσω έντονων χειρισμών απόχης στην απόκριση καταπόνησης της τσιπούρας μετά από διατροφή με φαρμακευτικά φυτά	84
3.2.1. Αιματολογικές παράμετροι.....	84
3.2.2. Κορτιζόλη.....	86
3.2.3. Βλάβη του DNA	86

3.3. ΠΕΙΡΑΜΑ 3 - Η επίδραση της ασιτίας στην απόκριση καταπόνησης της τσιπούρας μετά από τροφοληψία με φαρμακευτικά φυτά	88
3.3.1. Αιματολογικές παράμετροι.....	88
3.3.2. Κορτιζόλη.....	90
3.3.3. Βλάβη του DNA	90
3.4. ΠΕΙΡΑΜΑ 4 - Επίδραση χρόνιας καταπόνησης στην τσιπούρα, προκληθείσας λόγω υψηλής πυκνότητας εκτροφής, μετά από χορήγηση σιτηρεσίων εμπλουτισμένα με φαρμακευτικά φυτά	92
3.4.1. Αιματολογικές παράμετροι.....	92
3.4.2. Κορτιζόλη.....	94
3.4.3. Βλάβη του DNA	94
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	97
4.1. ΠΕΙΡΑΜΑ 1 - Επίδραση της διατροφής με φαρμακευτικά φυτά στην ανάπτυξη και στην απόκριση καταπόνησης της τσιπούρας	97
4.1.1. Θνησιμότητες, παράμετροι ανάπτυξης και αξιοποίησης της τροφής ..	97
4.1.2. Θρεπτική σύσταση.....	102
4.1.3. Προφίλ λιπαρών οξέων	104
4.1.4. Αιματολογικές παράμετροι.....	106
4.1.5. Κορτιζόλη.....	107
4.1.6. Βλάβη του DNA	108
4.1.7. Ιστολογικές αλλοιώσεις	109
4.1.8. Νευροδιαβιβαστές.....	110
4.1.9. Συμπεριφορά.....	112
4.2. ΠΕΙΡΑΜΑ 2 - Επίδραση οξείας καταπόνησης, προκληθείσας μέσω έντονων χειρισμών απόχης στην απόκρισης καταπόνησης της τσιπούρας μετά από διατροφή με φαρμακευτικά φυτά	114
4.2.1. Αιματολογικές παράμετροι.....	114
4.2.2. Κορτιζόλη.....	115
4.2.3. Βλάβη του DNA	116
4.3. ΠΕΙΡΑΜΑ 3 - Η επίδραση της ασιτίας στην απόκριση καταπόνησης της τσιπούρας μετά από τροφοληψία με φαρμακευτικά φυτά	117
4.3.1. Αιματολογικές παράμετροι	117
4.3.2. Κορτιζόλη.....	117

4.3.3. Βλάβη του DNA	119
4.4. ΠΕΙΡΑΜΑ 4 - Επίδραση χρόνιας καταπόνησης στην τσιπούρα, προκληθείσας λόγω υψηλής πυκνότητας εκτροφής, μετά από χορήγηση σιτηρεσίων εμπλουτισμένα με φαρμακευτικά φυτά	120
4.4.1. Αιματολογικές παράμετροι.....	120
4.4.2. Κορτιζόλη.....	121
4.4.3. Βλάβη του DNA	122
4.5. ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΤΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΥΖΩΙΑΣ	123
4.5.1. Τεχνικές διαχείρισης.....	123
4.5.1.1. Ποιότητα νερού	123
4.5.1.2. Περιβάλλον εκτροφής	124
4.5.1.3. Ιχθυοπυκνότητα.....	125
4.5.2. Τροφοληψία	126
4.5.3. Διαχειριστικές πρακτικές	127
4.5.3.1. Handling	127
4.5.3.2. Μεταφορά των ζωντανών οργανισμών (Transport)	128
4.5.3.3. Ασιτία/Νηστεία (Starvation).....	129
4.5.3.4. Κτηνιατρικές θεραπείες	130
4.5.3.5. Διαλογή μεγεθών (Grading)	131
4.5.3.6. Δειγματοληψίες	132
4.5.3.7. Συγχρωτισμός (Crowding).....	133
4.5.3.8. Culling	134
4.5.4. Εξαλίευση και θανάτωση	135
6. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	137
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	140
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	185
8.1. Χημικές αναλύσεις	185
8.2. Παράμετροι ανάπτυξης και αξιοποίησης της τροφής.....	189
8.3. Αναλύσεις αίματος	190
8.3.1. Προσδιορισμός ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων	190
8.3.2. Μέτρηση αιματοκρίτη.....	191

8.3.3. Προσδιορισμός λευκών αιμοσφαιρίων.....	192
8.3.4. Κορτιζόλη του αίματος.....	192
8.4. Βλάβη του DNA (Comet assay).....	193
8.5. Ιστολογικές αναλύσεις.....	196
8.6. Νευροδιαβιβαστές εγκεφάλου.....	197

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ευζωία των ψαριών αποτελεί πλέον σημαντική προτεραιότητα τόσο για τους παραγωγούς όσο και για τους καταναλωτές, καθώς υπάρχει ολοένα και μεγαλύτερη ζήτηση για ασφαλή και ποιοτικά προϊόντα προερχόμενα από εκτροφές φιλικές προς τα ζώα. Στην υποβάθμιση της ευζωίας συμβάλλει σε ένα πολύ μεγάλο ποσοστό η καταπόνηση (stress), η οποία προκαλείται σε μεγάλο βαθμό από τις διαχειριστικές πρακτικές που εφαρμόζονται στις ιχθυοκαλλιέργειες. Στη διεθνή βιβλιογραφία, τις τελευταίες δύο δεκαετίες, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σχετικά με την ευεργετική χρήση των φαρμακευτικών φυτών στη διατροφή των παραγωγικών ζώων και πιο πρόσφατα αυξήθηκε ο αριθμός των επιστημονικών μελετών σχετικά με την εφαρμογή αυτών των εναλλακτικών πρόσθετων στην παραγωγή των ψαριών με σκοπό την υγεία και κατ' επέκταση την ευζωία. Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση της επίδρασης τριών φαρμακευτικών φυτών (αιθέριου ελαίου ρίγανης *Origanum vulgare*, αιθέριου ελαίου κανέλας *Cinnamomum zeylanicum* και ελαίου σπόρων βιομηχανικής κάνναβης *Cannabis sativa*) στην ανάπτυξη και θρεπτική αξία της τσιπούρας και στην απόκριση στο stress προκαλούμενο από έντονους χειρισμούς, ασιτία και υψηλή ιχθυοπυκνότητα. Στην κατάρτιση των σιτηρεσίων έγινε προσθήκη των φαρμακευτικών φυτών σε ποσοστό 1% και 2% της τροφής. Διεξήχθησαν συνολικά τέσσερα πειράματα.

Στο 1^ο πείραμα, διάρκειας 74 ημερών, τα ψάρια διατράφηκαν με τα πειραματικά σιτηρέσια και αξιολογήθηκε η ανάπτυξη και θρεπτική σύσταση του σώματος. Επίσης, διερευνήθηκε η κατάσταση της υγείας των ψαριών μέσω αιματολογικών παραμέτρων και το επίπεδο της καταπόνησης μέσω των επιπέδων της κορτιζόλης στο αίμα και της βλάβης του DNA στους ιστούς. Πραγματοποιήθηκαν ιστολογικές αναλύσεις, διερεύνηση του προφίλ λιπαρών οξέων και προσδιορισμός των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου μέσω μοντέλων πρόβλεψης και τέλος, αξιολογήθηκε η συμπεριφορά των ψαριών κατά την τροφοληψία. Η προσθήκη ελαίου σπόρων κάνναβης δεν επέφερε θνησιμότητες και έδειξε ανάπτυξη (χωρίς σημαντικές διαφορές) ενώ δεν επέφερε σημαντικές διαφοροποιήσεις στη θρεπτική σύσταση. Στις ομάδες με προσθήκη αιθέριων ελαίων ρίγανης και κανέλας παρατηρήθηκε μειωμένη επιβίωση, με τις ομάδες που διατρέφονταν σε ποσοστό 2% να έχουν το υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας. Στις ομάδες με προσθήκη 1% ρίγανης και κανέλας δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στην ανάπτυξη ενώ οι ομάδες με ποσοστό προσθήκης 2% έδειξαν σημαντικά χαμηλότερη κατανάλωση τροφής, αύξηση βάρους, ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (SGR) και χαμηλότερο συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) και συντελεστή διατήρησης λίπους (LR). Ο ηπατοσωματικός δείκτης (HSI) και ο δείκτης ευρωστίας (K) δεν έδειξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις σε καμία διατροφική ομάδα. Ο προσδιορισμός της θρεπτικής σύστασης των ομάδων ρίγανης και κανέλας σε ποσοστό 2% έδειξε σημαντική αύξηση των πρωτεϊνών, της τέφρας και της ενέργειας στο ολικό σώμα των ψαριών, ενώ το

λίπος ήταν σημαντικά χαμηλότερο. Οι αιματολογικές παράμετροι που προσδιορίστηκαν (Ht, RBC, WBC και DLC) και τα επίπεδα κορτιζόλης στο πλάσμα δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές σε καμία διατροφική ομάδα, ενώ η βλάβη του DNA ήταν υψηλότερη για την ομάδα OR1% στα ηπατοκύτταρα και στα κύτταρα του εντέρου. Περαιτέρω, η προσθήκη ελαίου σπόρων κάνναβης και αιθέριου ελαίου κανέλας σε ποσοστό 2% προκάλεσε ηπατική στεάτωση και κενотоπίωση του κυτταροπλάσματος, ενώ στα δείγματα του πρόσθιου εντέρου όλων των διατροφικών μεταχειρίσεων δεν βρέθηκαν ιστομορφολογικές αλλοιώσεις και παθολογικά ευρήματα. Ο προσδιορισμός του προφίλ λιπαρών οξέων στο ολικό σώμα των ψαριών έδειξε ότι τα πειραματικά έλαια διατήρησαν τη λιπιδική σύσταση και ποιότητα χωρίς ιδιαίτερες μεταβολές. Ο προσδιορισμός των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου με βάση τα μοντέλα πρόβλεψης δεν έδειξε σημαντικές διαφορές στην περίπτωση της προσθήκης των αιθέριων ελαίων ρίγανης και κανέλας στην τροφή των ψαριών, ενώ η προσθήκη του ελαίου σπόρων βιομηχανικής κάνναβης προκάλεσε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης 5-HT και σημαντική μείωση του μεταβολίτη της 5-HIAA στην ομάδα CAN2% σε σχέση με την ομάδα CAN1%. Επίσης, ο λόγος DOPAC/DA στο ρομβοειδή εγέφαλο βρέθηκε σημαντικά μεγαλύτερος στις ομάδες CAN1% και CIN2% από τις αντίστοιχες ομάδες CAN2% και CIN1%, χωρίς σημαντικές διαφορές από την ομάδα ελέγχου. Η μελέτη της διατροφικής συμπεριφοράς των ψαριών έδειξε ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης και κανέλας προκάλεσε δυσαρέσκεια στα ψάρια, πιθανότατα λόγω της έντονης μυρωδιάς, με αποτέλεσμα τη λήψη της τροφής κυρίως από τον πυθμένα της δεξαμενής, ενώ το έλαιο από σπόρους κάνναβης καταναλώθηκε από τα ψάρια ταχύτερα. Συμπερασματικά, η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης (*O.vulgare*) και κανέλας (*C.zeylanicum*) δεν είναι κατάλληλη για τη διατροφή σε νεαρά άτομα τσιπούρας σε αυτή την ποσότητα (20gr/Kg) καθώς αναστέλλει την ανάπτυξη και προκαλεί σημαντική αύξηση της θνησιμότητας. Η προσθήκη των εξεταζόμενων αιθέριων ελαίων σε ποσοστό 1% χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Το έλαιο σπόρων κάνναβης του είδους *C.sativa* σε ποσοστό 1% προτείνεται για χρήση στη διατροφή της τσιπούρας ως προαγωγός ανάπτυξης.

Το 2^ο πείραμα είχε ως σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της οξείας καταπόνησης, προκληθείσας μέσω έντονων χειρισμών της απόχης για 5min μετά από τροφοληψία των ψαριών με τα πειραματικά σιτηρέσια για 84 ημέρες. Στο τέλος, διερευνήθηκε η κατάσταση της υγείας των ψαριών μέσω αιματολογικών παραμέτρων και το επίπεδο της καταπόνησης μέσω των επιπέδων της κορτιζόλης στο πλάσμα και της βλάβης του DNA στο ήπαρ και στο αίμα. Ο προσδιορισμός των αιματολογικών παραμέτρων δεν έδειξε σημαντικές διαφορές στον Ht, RBC και WBC σε καμία διατροφική ομάδα, ενώ παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένος αριθμός λεμφοκυττάρων και σημαντικά μικρότερος αριθμός κοκκιοκυττάρων στις ομάδες που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης. Η κορτιζόλη στο πλάσμα του αίματος βρέθηκε μειωμένη μετά από την τροφοληψία με το έλαιο σπόρων κάνναβης και αιθέριο έλαιο κανέλας. Η βλάβη στο DNA στα ηπατοκύτταρα βρέθηκε εκτεταμένη σε όλες τις διατροφικές ομάδες εκτός από την ομάδα που διατρέφονταν με έλαιο σπόρων κάνναβης σε ποσοστό 1%, ενώ η βλάβη του DNA στα ερυθροκύτταρα ήταν σημαντικά υψηλότερη μόνο στην ομάδα

που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο κανέλας σε ποσοστό 2%. Συμπερασματικά, το έλαιο σπόρων κάνναβης σε ποσοστό 1% φάνηκε να είναι το πιο αποτελεσματικό ως παράγοντας anti-stress μετά από την υποβολή των ψαριών σε έντονους χειρισμούς, ωστόσο είναι σημαντικό να γίνουν περαιτέρω μελέτες σχετικά με την επίδραση αυτών των φαρμακευτικών φυτών στο οξύ stress.

Το 3^ο πείραμα είχε σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της ασιτίας 14 ημερών μετά από τροφολησία των ψαριών με τα πειραματικά σιτηρέσια για 84 ημέρες. Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας, διερευνήθηκε η κατάσταση της υγείας των ψαριών μέσω του αιματολογικού προφίλ και το επίπεδο της καταπόνησης μέσω των επιπέδων της κορτιζόλης στο πλάσμα και της βλάβης του DNA στο ήπαρ και στο αίμα. Από τα αποτελέσματα των αιματολογικών παραμέτρων παρατηρήθηκε ότι στις ομάδες που διατρέφονταν καθ' όλη τη διάρκεια και τις ομάδες που υποβλήθηκαν σε ασιτία παρατηρήθηκε μία τάση μείωσης του αριθμού RBC και WBC, με σημαντικές διαφορές στις ομάδες της κάνναβης και της κανέλας, αλλά χωρίς σημαντικές διαφορές από την ομάδα ελέγχου που σιτίζονταν κανονικά. Οι ομάδες που σιτίζονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης σε ποσοστό προσθήκης 1% (OR1%) καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος άλλα και αυτές που υποβλήθηκαν σε ασιτία είχαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό WBC από τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου. Τα επίπεδα της κορτιζόλης έδειξαν σημαντική μείωση της κορτιζόλης στο πλάσμα του αίματος μετά την υποβολή των ψαριών σε ασιτία σε όλες τις διατροφικές ομάδες εκτός της ομάδας που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης σε ποσοστό 2%. Χαμηλότερη βλάβη του DNA βρέθηκε, επίσης, σε όλες τις ομάδες που διατρέφονταν με τα φυτοφαρμακευτικά πρόσθετα, ενώ στο αίμα δεν φάνηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις, εκτός από την ομάδα που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο κανέλας σε ποσοστό 1% (CIN1%), η οποία μείωσε τη γενοτοξικότητα σημαντικά. Συμπερασματικά, η προσθήκη αιθέριου κανέλας σε ποσοστό 1% φάνηκε να είναι η πιο αποτελεσματική στην απόκριση του stress μετά την υποβολή των ψαριών σε stress λόγω παρατεταμένης ασιτίας διάρκειας 14 ημερών.

Το 4^ο πείραμα είχε ως σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης των φυτοφαρμακευτικών πρόσθετων στην απόκριση του stress λόγω χρόνιας καταπόνησης προκαλούμενης από αύξηση της πυκνότητας εκτροφής για δύο μήνες. Οι δύο ιχθυοπυκνότητες που εφαρμόστηκαν ήταν 1,2m³/Kg (χαμηλή ιχθυοπυκνότητα) και 2m³/Kg (υψηλή ιχθυοπυκνότητα). Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας, διερευνήθηκε η κατάσταση της υγείας των ψαριών μέσω του αιματολογικού προφίλ και το επίπεδο της καταπόνησης μέσω των επιπέδων της κορτιζόλης στο πλάσμα και της βλάβης του DNA στα ηπατοκύτταρα και ερυθροκύτταρα. Στην παρούσα μελέτη ενώ παρατηρήθηκε μία τάση μείωσης των WBC στις ομάδες σε υψηλή ιχθυοπυκνότητα δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές με την ομάδα ελέγχου που διατρέφονταν κανονικά. Η απόκριση της κορτιζόλης ήταν χαμηλότερη σε όλες τις ομάδες που διατρέφονταν με τα φυτοφαρμακευτικά πρόσθετα σε ποσοστό 2% στην υψηλή ιχθυοπυκνότητα, ενώ παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα σε όλες τις διατροφικές ομάδες με ποσοστό προσθήκης 1% στη χαμηλή και στην υψηλή ιχθυοπυκνότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη των φυτοφαρμακευτικών πρόσθετων σε

ποσοστό 1% ήταν πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με την προσθήκη σε ποσοστό 2% στη μείωση της βλάβης του DNA στα ηπατοκύτταρα στην υψηλή ιχθυοπυκνότητα, ωστόσο μόνο οι ομάδες που διατρέφονταν με έλαιο σπόρων κάνναβης και αιθέριο έλαιο ρίγανης σε ποσοστό 1% είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές. Στη βλάβη του DNA δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στις διατροφικές ομάδες και τις ομάδες ελέγχου στην υψηλή και χαμηλή ιχθυοπυκνότητα. Συμπερασματικά, δεν μπορούμε να πούμε ότι κάποιο από τα εξεταζόμενα φυτοφαρμακευτικά πρόσθετα ήταν απόλυτα αποτελεσματικό στη μείωση της απόκρισης καταπόνησης προκαλούμενη από χρόνιο stress λόγω υψηλής ιχθυοπυκνότητας για 2 μήνες, ωστόσο θέτει βάσεις για περαιτέρω διερεύνηση.

Τέλος, δημιουργήθηκε πρότυπο αξιολόγησης της ευζωίας των ιχθύων κατά την εντατική εκτροφή.

Ως γενικό συμπέρασμα της διδακτορικής διατριβής θα μπορούσαμε να πούμε ότι το έλαιο από σπόρους κάνναβης είναι ένας πολύ καλός υποψήφιος ως προαγωγός ανάπτυξης της τσιπούρας και τα αποτελέσματα που αφορούν την απόκριση της καταπόνησης ήταν ενθαρρυντικά. Τα αιθέρια έλαια ρίγανης και κανέλας, λόγω των ασταθών πτητικών ενώσεων που περιέχουν και της μεγάλης ποσότητας που δοκιμάστηκε, δεν έδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα τόσο στην ανάπτυξη της τσιπούρας όσο και στην απόκριση της καταπόνησης. Συστήνεται η περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης αυτών των αιθέριων ελαίων στην τσιπούρα σε μικρότερες ποσότητες.

Λέξεις-κλειδιά: φυτοφαρμακευτικά, stress, ευζωία, *O.vulgare*, *C.zeylanicum*, *C.sativa*, *S.aurata*

ABSTRACT

Fish welfare is a major priority for consumers besides producers, as there is a greater demand for safe and high-quality products from welfare-friendly farms. Stress, which is largely caused by the aquaculture practices applied in fish farms, contributes to the degradation of well-being. Over the past two decades, many studies have reported the beneficial use of medicinal plants in nutrition of several farm animal species and more recently the number of scientific studies has increased on the application of alternative additives in the production of fish in order to improve health and well-being. The purpose of this PhD thesis is to evaluate the effect of three medicinal plants (oregano essential oil *Origanum vulgare*, cinnamon essential oil *Cinnamomun zeylanicum* and industrial hemp seed oil *Cannabis sativa*), on growth, feed utilization and proximate composition as well as stress response caused by intense handling, starvation and high fish density. Formulation of diets included the partial and total replacement of soybean oil at a rate of 1% and 2% of the feed by the experimental phytopharmaceuticals. A total of four trials were conducted.

In the 1st trial, fish were fed with the experimental diets for 74 days. Growth and proximate composition of the total body were evaluated. Health status of fish was also investigated through hematological parameters and level of stress was evaluated through blood cortisol levels and DNA damage in tissues. Also, histological analyses, fatty acid profile, brain neurotransmitters through predictive models and fish feeding behavior were investigated. The addition of hemp seed oil did not cause mortality and enhanced growth (no significant differences) while it caused no significant differences in proximate composition. The groups supplemented with essential oils of oregano and cinnamon showed reduced survival, with the groups fed 2% having the highest mortality rate. In groups supplemented with 1% oregano and cinnamon, no significant differences in growth were observed, while the groups with the addition of 2% showed significantly lower feed consumption, weight gain, specific growth rate (SGR) and lower food conversion ratio (FCR) and lipid retention (LR). Hepatosomatic index (HSI) and condition factor (K) did not show significant differences in any dietary group. Determination of the proximate composition of the 2% oregano and cinnamon groups showed a significant increase in protein, ash and energy in the total body of the fish, while fat was significantly lower. Haematological parameters determined (Ht, RBC, WBC and DLC) and plasma cortisol levels showed no significant differences in any dietary group, while DNA damage was higher for the OR1% group in hepatocytes and intestinal cells. Furthermore, the addition of hemp seed oil and cinnamon essential oil at a rate of 2% induced hepatic steatosis and cytoplasmic vacuolation, while no histomorphological changes and pathological findings were found in the foregut samples of all dietary treatments. Determination of the fatty acid profile showed that the experimental oils maintained the lipid composition and quality without particular changes. Determination of brain

neurotransmitters based on predictive models showed no significant differences in the case of oregano and cinnamon essential oils, The determination of brain neurotransmitters based on predictive models showed no significant differences in the case of the addition of oregano and cinnamon essential oils to the fish feed, while the addition of hemp seed oil caused a significant increase in 5-HT concentration and a significant decrease in 5-HIAA in the CAN2% than CAN1% group. Also, DOPAC/DA ratio in medulla was found to be significantly greater in CAN1% and CIN2% groups than CAN2% and CIN1% groups, with no significant differences from the control group. Study of feeding behavior showed that the intense smell of essential oils of oregano and cinnamon was unpleasant for the fish. As a result, the food was consumed mainly from the bottom of the tank, while food containing hemp seed oil was consumed faster. In conclusion, the addition of essential oils of oregano (*O.vulgare*) and cinnamon (*C.zeylanicum*) are not suitable dietary additives for sea bream juveniles in this quantity (20gr/Kg) as they inhibit growth and cause significant increase in mortality rate. The addition of the tested essential oils at 1% needs further investigation. *C.sativa* hemp seed oil at 1% is recommended for use in sea bream juvenile's feed as growth promoter.

The 2nd trial aimed to investigate the effect of acute stress, induced by intense netting procedures for 5 min after feeding with the experimental diets for 84 days. Health status of fish was investigated through hematological parameters. Also, plasma cortisol levels and DNA damage in the liver and blood were evaluated. Determination of hematological parameters showed no significant differences in Ht, RBC and WBC in any dietary group, while a significantly increased number of lymphocytes and a significantly lower number of granulocytes were observed in the groups fed with oregano essential oil. Cortisol levels in plasma were found to be reduced after supplementation with hemp seed oil and cinnamon essential oil. DNA damage in hepatocytes was found to be extensive in all dietary groups except the 1% hemp seed oil group, while DNA damage in erythrocytes was significantly higher only in the 2% cinnamon essential oil group. In conclusion, hemp seed oil at a rate of 1% appeared to be the most effective as an anti-stress agent after submitting the fish to intense handling, however more studies need to be conducted on the effect of these medicinal plants on acute stress.

The 3rd trial aimed to investigate the effect of starvation for 14 days after feeding with the experimental diets for 84 days. At the end of the experimental trial, health status of fish through hematological profile, plasma cortisol and DNA damage in the liver and blood were evaluated. Hematological parameters showed that between groups fed during the whole experiment and starved groups, there was a trend towards a decrease in RBC and WBC counts, with significant differences in the hemp and cinnamon groups, but no significant differences were observed from the control group that was fed normally during the whole experiment. Groups fed with oregano essential oil at 1% (OR1%) throughout the experiment but also those subjected to starvation had a significantly higher percentage of WBC than the corresponding control groups. Cortisol levels showed a significant decrease in plasma cortisol after starvation in all

dietary groups except the group fed with 2% oregano essential oil. Lower DNA damage was also found in all groups fed with the tested phytopharmaceuticals, while no significant differences were seen in blood, except for the group fed 1% cinnamon essential oil, which significantly reduced genotoxicity. In conclusion, the addition of cinnamon essential oil at a rate of 1% appeared to be the most effective in the stress response after submitting the fish to prolonged starvation for 14 days.

The 4th trial aimed to investigate the effect of phytogetic additives on stress response due to chronic stress caused by an increase in stocking density for two months. Two fish densities were applied: 1.2m³/Kg (low fish density) and 2m³/Kg (high fish density). At the end of the experimental procedure, health status of fish was investigated through hematological profile. Also, plasma cortisol levels and DNA damage in hepatocytes and erythrocytes were evaluated. Results showed that while there was a trend towards a decrease in WBC counts in the groups at high fish density, no significant differences were found with the control group that was fed throughout the experiment. Cortisol response was lower in all groups fed with phytopharmaceutical additives at a rate of 2% at high fish density, while high levels of cortisol were observed in all dietary groups at 1% supplementation at low and high fish density. The results showed that the addition of phytopharmaceuticals in feed at a rate of 1% was more effective compared to the addition at 2% in reducing DNA damage in hepatocytes at the high fish density, however only the hemp seed oil and essential oil of oregano fed groups at a rate of 1% had significantly lower values. No significant differences were observed in DNA damage in erythrocytes between the dietary and control groups at high and low fish density. In conclusion, we cannot say that any of the tested phytopharmaceutical additives were completely effective in reducing stress response induced by chronic stress due to high fish density for 2 months, however, further investigation is needed.

Lastly, a protocol was created to evaluate the well-being of fish during intensive fish farming.

As a general conclusion, hemp seed oil is a promising candidate as growth promoter and health modulator and the results concerning stress response were encouraging. Essential oils of oregano and cinnamon, due to the unstable volatile molecules and the large quantity tested, did not show positive results on growth and stress response. Further investigation of the effect of these essential oils on sea bream in smaller quantities is recommended.

Keywords: phytopharmaceuticals, stress, welfare, *Origanum vulgare*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cannabis sativa*, *Sparus aurata*

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1. Παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού
Εικόνα 2. Περιοχές εγκατάστασης επιχειρήσεων και μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας
Εικόνα 3. Μεγαλύτερες χώρες παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού 2021
Εικόνα 4. Τσιπούρα (*S. aurata*)
Εικόνα 5. Φορείς πιστοποίησης ευζωίας εκτρεφόμενων ψαριών και ετικέτες (labels)
Εικόνα 6. Αναπαράσταση δεξαμενής και ζωνών βιντεοσκόπησης με σκοπό τη διερεύνηση της συμπεριφοράς κατά την τροφοληψία
Εικόνα 7. Ιστολογική ανάλυση ήπατος τσιπούρας διατρεφόμενη με (Α) τροφή χωρίς καμία προσθήκη (Β) τροφή με προσθήκη *C. zeylanicum* 2% (C) τροφή με προσθήκη *C. sativa* 2%.
Εικόνα 8. Απεικόνιση του αιματοκυτταρόμετρου και μεγεθυμένο μικρό τετράγωνο.
Εικόνα 9. Σεροτονίνη (5-HT)
Εικόνα 10. Ντοπαμίνη (DA)
Εικόνα 11. Νοραδρελίνη

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1. Συστατικά και θρεπτική σύσταση πειραματικών σιτηρεσίων
Πίνακας 2. Παράμετροι ανάπτυξης και αξιοποίησης της τροφής
Πίνακας 3. Θρεπτική σύσταση ολικού σώματος τσιπούρας (% επί ξηράς ουσίας)
Πίνακας 4. Αιματολογικές παράμετροι μετά την τροφοληψία 74 ημερών
Πίνακας 5. Σύσταση λιπαρών οξέων του λίπους (g/100g ιστού±SD) στο ολικό σώμα των ιχθύων
Πίνακας 6. Συγκέντρωση νευροδιαβιβαστών εγκεφάλου (ng/g±SD) βάση των μοντέλων πρόβλεψης 18:1n-9/n-3 LC PUFA και SFA/n-3 LC PUFA στο ολικό σώμα των ψαριών
Πίνακας 7. Αιματολογικές παράμετροι μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και υποβολή των ιχθύων σε οξύ stress
Πίνακας 8. Αιματολογικές παράμετροι μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και την υποβολή των ιχθύων σε ασιτία
Πίνακας 9. Αιματολογικές παράμετροι μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και την υποβολή των ιχθύων σε υψηλή ιχθυοπυκνότητα
Πίνακας 10. Πρωτόκολλο αφυδάτωσης, διαύγασης και εγκλεισμού σε παραφίνη (Johnson et al., 2009; Genten et al., 2009).

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

- Διάγραμμα 1. Επίπεδα κορτιζόλης μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά
- Διάγραμμα 2. Επίπεδο βλάβης του DNA στα ηπατοκύτταρα μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά
- Διάγραμμα 3. Επίπεδο βλάβης του DNA στα κύτταρα του εντέρου μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά
- Διάγραμμα 4. Επίπεδο βλάβης του DNA στα κύτταρα του νεφρού μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά
- Διάγραμμα 5. Επίπεδο βλάβης του DNA στα κύτταρα του σπλήνα μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά
- Διάγραμμα 6. Ποσοστό ψαριών στη ζώνη επιφάνειας 5sec πριν την έναρξη της τροφοληψίας
- Διάγραμμα 7. Χρόνος τροφοληψίας στην πάνω και κάτω ζώνη της δεξαμενής
- Διάγραμμα 8. Επίπεδα κορτιζόλης μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και υποβολή των ιχθύων σε οξύ stress
- Διάγραμμα 9. Επίπεδο βλάβης του DNA στα ηπατοκύτταρα μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και υποβολή των ιχθύων σε οξύ stress
- Διάγραμμα 10. Επίπεδο βλάβης του DNA στα ερυθροκύτταρα μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και υποβολή των ιχθύων σε οξύ stress
- Διάγραμμα 11. Επίπεδα κορτιζόλης μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και υποβολή των ψαριών σε ασιτία
- Διάγραμμα 12. Επίπεδα βλάβης του DNA στα ηπατοκύτταρα μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και υποβολή των ψαριών σε ασιτία
- Διάγραμμα 13. Επίπεδα βλάβης του DNA στα ερυθροκύτταρα μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και υποβολή των ψαριών σε ασιτία
- Διάγραμμα 14. Επίπεδα κορτιζόλης μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και την υποβολή των ψαριών σε υψηλή πυκνότητα εκτροφής
- Διάγραμμα 15. Επίπεδα βλάβης του DNA στα ηπατοκύτταρα μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και την υποβολή των ψαριών σε υψηλή πυκνότητα εκτροφής
- Διάγραμμα 16. Επίπεδα βλάβης του DNA στα ερυθροκύτταρα μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και την υποβολή των ψαριών σε υψηλή πυκνότητα εκτροφής

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

2-PE	2-phenoxyethanol
5-HIAA	5-Hydroxy-indoloacetic-acid, 5-Υδροξυ-ινδολοοξικό οξύ
5-HT	5-Hydroxytryptamine, Σεροτονίνη
DA	Dopamine, Ντοπαμίνη
DHA	Docosahexanoid Acid, Δοκοσαεξανοϊκό οξύ
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylacetic acid
EPA	Eicosapentanoic Acid, Εικοσαπεντανοϊκό οξύ
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FCR	Food Conversion Ratio, Συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής
HPI	Hypothalamus-Pituitary-Interrenal axis
HSI	Hepatosomatic index, Ηπατοσωματικός δείκτης
HFD	High Fish Density
Ht	Hematocrit, Αιματοκρίτης
HUFA	Highly Unsaturated Fatty Acids, Υψηλά Ακόρεστα Λιπαρά Οξέα
K	Condition factor, Δείκτης ευρωστίας
LFD	Low Fish Density
LR	Lipid Retention, Συντελεστής διατήρησης λίπους
MUFA	Monounsaturated Fatty Acids, μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
RBC	Red Blood Cells
ROS	Reactive Oxygen species
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis
SGR	Specific Growth Rate, Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης
WBC	White Blood Cells
MA	Μη Ανιχνεύσιμο
ΜΣ	Μη σημαντικό

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ελληνική και παγκόσμια υδατοκαλλιέργεια-Στατιστικά στοιχεία

Η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί έναν αναπτυσσόμενο, μείζονος οικονομικής σημασίας κλάδο παγκοσμίως. Η συμβολή του κλάδου των υδατοκαλλιεργειών στην παγκόσμια παραγωγή ιχθυηρών αυξάνεται συνεχώς από τα τέλη της δεκαετίας του '80, αν και με πιο αργό ρυθμό τα τελευταία δύο χρόνια (3,3% το 2018-2019 και 2,6% το 2019-2020 έναντι του 4,6% ετησίως κατά την περίοδο 2010–2018) (FAO, 2022a). Αυτό οφείλεται σε μία σειρά παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του αντίκτυπου της πολιτικής της Κίνας σχετικά με την προστασία από τον COVID-19 και τα μέτρα διαχείρισης της υγειονομικής κρίσης (FAO, 2022a). Σύμφωνα με την τελευταία έκθεση του FAO (2022a), η υδατοκαλλιέργεια, το 2020, συνεισέφερε το 49% της παγκόσμιας παραγωγής ιχθυηρών αγγίζοντας τους 88 εκατ. τόνους με αξία 273,38 δισ. ευρώ. Από το 2013, το μεγαλύτερο ποσοστό προσφοράς προϊόντων κατέχει η υδατοκαλλιέργεια σε σύγκριση με την αλιεία, ενώ η ετήσια κατά κεφαλήν κατανάλωση ψαριών έχει αυξηθεί ραγδαία. Το 2019 υπολογίστηκε στα 20,5 κιλά σε σύγκριση με το 1961 που ήταν στα 9,9 κιλά, ενώ για το 2020 τα προκαταρκτικά στοιχεία δείχνουν μία μείωση στα 20,2 κιλά (FAO, 2022a). Η αύξηση αυτή είναι συνδυαστικό αποτέλεσμα πολλών παραγόντων όπως η αύξηση του πληθυσμού, η αύξηση του κατά κεφαλήν εισοδήματος, η στροφή προς την υγιεινή διατροφή και γενικά τις τροφές με υψηλή διατροφική αξία κ.ά. (FAO, 2022a).

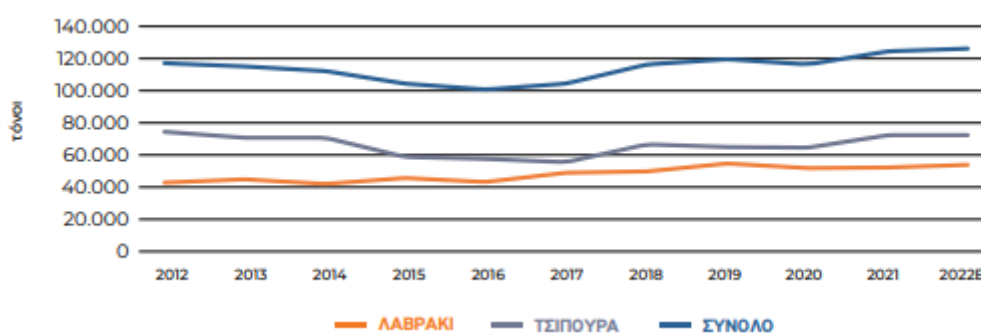
Η ραγδαία αύξηση της παγκόσμιας κατανάλωσης ιχθύων, η συνεχής ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας σε συνδυασμό με την υπεραλίευση και την υποβάθμιση των ιχθυαποθεμάτων (Olsen & Hasan, 2012) καθιστούν σαφή εικόνα της αναγκαιότητας παραγωγής ποιοτικής τροφής για τον ανθρώπινο πληθυσμό, αλλά και ανάγκη για πιο βιώσιμες πρακτικές. Αναλυτικότερα, εκτιμάται ότι για το 2020, από την παγκόσμια παραγωγή υδρόβιων ζώων (178 εκ. τόνους), οι 16 εκατ. τόνοι χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ιχθυελαίου και ιχθυαλεύρου (FAO, 2022a), μεγάλο μέρος των οποίων προορίστηκε για τροφές της ιχθυοκαλλιέργειας. Είναι, λοιπόν, ανάγκη να βρεθούν εναλλακτικές και αειφόρες πρώτες ύλες για την παρασκευή ιχθυοτροφών. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια υπάρχει ανάγκη διασφάλισης της ευζωίας των εκτρεφόμενων οργανισμών και μεγάλη ζήτηση για προϊόντα προερχόμενα από εκτροφές φιλικές προς τα ζώα (Olesen et al., 2011).

Η συμβολή της υδατοκαλλιέργειας στον τομέα της απασχόλησης είναι πολύ σημαντική και φτάνει τις 20,5 εκατ. θέσεις εργασίας (FAO, 2022a). Το μεγαλύτερο ποσοστό ανήκει σε μικρές μονάδες και εκμεταλλεύσεις, ιδίως σε αναπτυσσόμενες χώρες της Αφρικής και της Ασίας, γεγονός που δείχνει τις κοινωνικές και οικονομικές διαστάσεις του κλάδου (FAO, 2022a). Οι χώρες της Ασίας είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός προϊόντων υδατοκαλλιέργειας αγγίζοντας το 70% της παγκόσμιας

παραγωγής με την Κίνα να κατέχει την πρώτη θέση και την Αμερική, την Ευρώπη, την Αφρική και τέλος την Ωκεανία να ακολουθούν (FAO, 2022a).

Στην Ελλάδα, η υδατοκαλλιέργεια και κυρίως η ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί έναν από τους πλέον αναπτυσσόμενους τομείς και σημαντικότερους κλάδους της πρωτογενούς ζωικής παραγωγής, με σαφή εξαγωγικό χαρακτήρα και σημαντική θέση στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΛΟΠΥ, 2022). Η δεκαετία του 1980 ήταν καθοριστική για την ελληνική υδατοκαλλιέργεια, καθώς το 1981 δημιουργήθηκαν οι πρώτες μονάδες στην Ελλάδα με μόλις το 2% της εγχώριας παραγωγής αλιευτικών προϊόντων να προέρχεται από τις υδατοκαλλιέργειες (2000 τόνοι) και το υπόλοιπο 98% από τη συλλεκτική αλιεία (105.651 τόνοι) (ΕΛΟΠΥ, 2022). Επιπλέον, με την είσοδο της Ελλάδας στην Ε.Ε. ξεκίνησαν τα επιδοτούμενα και επενδυτικά προγράμματα σε τέτοιου είδους πρωτογενείς δραστηριότητες. Τα πρώτα εκτρεφόμενα είδη ήταν η τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), για τα οποία υπήρχε ήδη τεχνογνωσία (ΕΛΟΠΥ, 2021). Από το 2003 και μετά, παρατηρήθηκε στην Ελλάδα μία ραγδαία αύξηση στην παραγωγή προϊόντων υδατοκαλλιέργειας, η οποία ξεπέρασε την παραγωγή προϊόντων αλιείας. Στην οικονομική ανάπτυξη του κλάδου έχει συνδράμει η ιδανική γεωγραφική θέση της Ελλάδας με εκτεταμένη ακτογραμμή μήκους 16.000χλμ. σε συνδυασμό με τις κατάλληλες κλιματικές συνθήκες και την καλή ποιότητα νερού.

Το 2021, σύμφωνα με την ετήσια έκθεση του ΕΛΟΠΥ (2022), η ετήσια εγχώρια παραγωγή μεσογειακών ψαριών ανήλθε στους 131.250 τόνους και από αυτό το 96% αντιπροσώπευε την εκτροφή τσιπούρας και το λαβρακιού, ενώ περίπου το 4%, αντιπροσώπευε άλλα είδη εκτροφής. Πιο συγκεκριμένα, η ετήσια παραγωγή των δύο κύριων ειδών έφτασε τους 125.550 τόνους (73.050 τόνοι τσιπούρας και 52.500 τόνοι λαβρακιού) συνολικής αξίας 604.6 εκατ. ευρώ (Εικ.1). Σε σχέση με το 2020 καταγράφηκε μια αύξηση 7.3% ως προς τον όγκο παραγωγής αλλά και μία αύξηση 10% ως προς την αξία των πωλήσεων (ΕΛΟΠΥ, 2022).

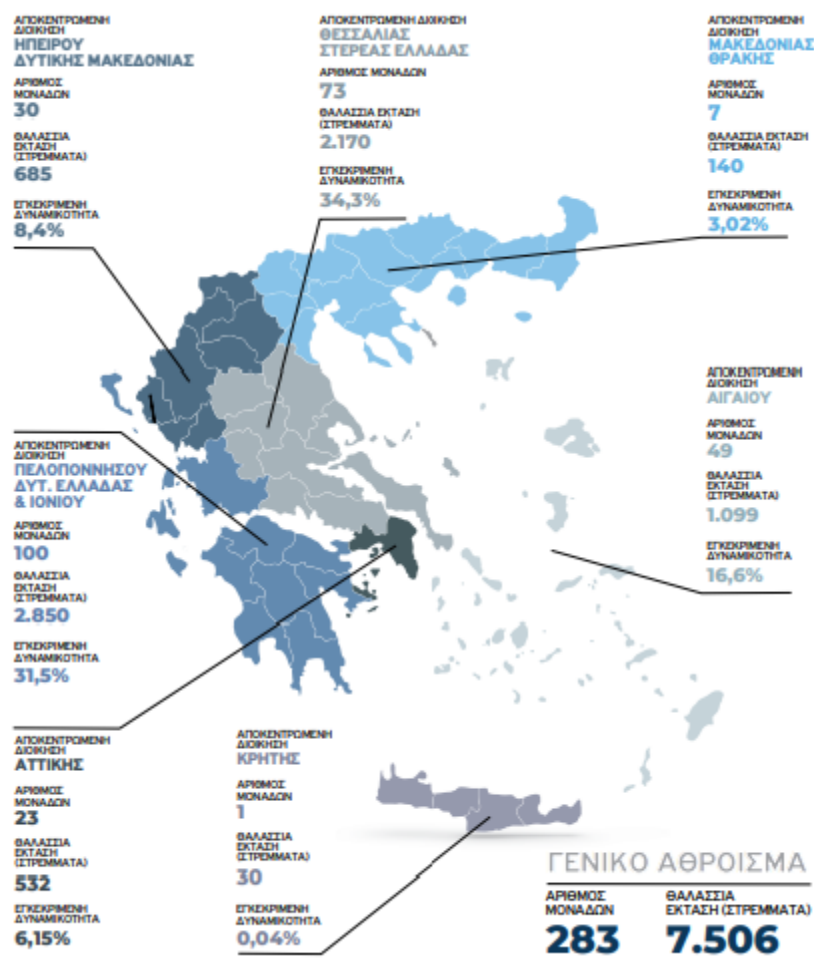


Εικόνα 1. Παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού

Πηγή: ΕΛΟΠΥ (2022)

Όσον αφορά τον τομέα της απασχόλησης στην Ελλάδα, το 2021, δραστηριοποιήθηκαν 73 επιχειρήσεις ιχθυοκαλλιέργειας με 283 πλωτές μονάδες (Εικ.2). Από αυτές το 63% αντιπροσώπευε μικρές και μικρομεσαίες επιχειρήσεις με

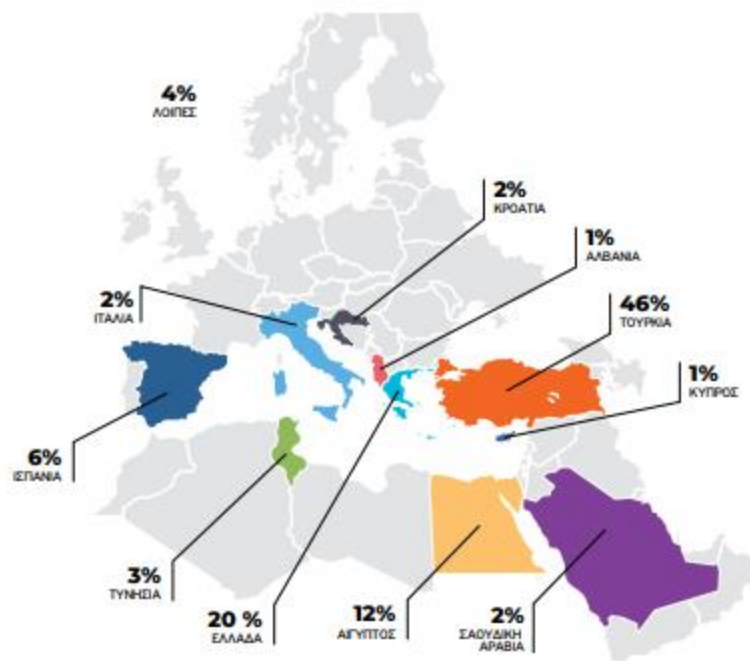
ετήσια δυναμικότητα μικρότερη των 500 τόνων. Οι θέσεις εργασίας για το μόνιμο και έκτακτο προσωπικό, το 2020, ανήλθαν στις 4236, με μία αύξηση 1,5% σε σχέση με το 2019, ενώ αν συνυπολογιστεί και το εργατικό δυναμικό διαφορετικών ειδικοτήτων σε άλλες υπηρεσίες του κλάδου ο αριθμός των θέσεων εργασίας ανέρχεται σε 12.000 (ΕΛΟΠΥ, 2022).



Εικόνα 2. Περιοχές εγκατάστασης επιχειρήσεων και μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας

Πηγή: ΥΠΑΑΤ, ΕΛΟΠΥ

Στην περιοχή της Μεσογείου, το 87% της παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού καλύπτεται από 5 χώρες, με την Ελλάδα να κατέχει τη δεύτερη θέση με ποσοστό 20%, και την Τουρκία να συμβάλλει στον μεγαλύτερο βαθμό (46%) με συνολική παραγωγή 290.000 τόνους. Η Τουρκία και η Ελλάδα είναι οι χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή και κατέχουν το 66% της παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού παγκοσμίως, ενώ ακολουθούν χώρες όπως η Αίγυπτος, η Ισπανία, η Τυνησία, η Ιταλία, η Κροατία και η Σαουδική Αραβία (ΕΛΟΠΥ, 2022) (Εικ.3).



Εικόνα 3. Μεγαλύτερες χώρες παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού 2021

πηγή: FEAP, ΕΛΟΠΥ

Το 2020, η πανδημία του κορονοϊού (Covid-19) και τα μέτρα διαχείρισης της υγειονομικής κρίσης προκάλεσαν μεγάλη δυσχέρεια στον κλάδο των υδατοκαλλιεργειών σε εθνικό και παγκόσμιο επίπεδο. Στην Ελλάδα υπήρχαν σημαντικές επιπτώσεις με αύξηση του κόστους παραγωγής λόγω της αναστολής των αεροπορικών μεταφορών και λόγω της διαχείρισης των συσσωρευμένων αδιάθετων προϊόντων (ΕΛΟΠΥ, 2022). Επίσης, επιχειρήσεις που δραστηριοποιούνταν στην προμήθεια αλιευτικών προϊόντων στα ξενοδοχεία, εστιατόρια και catering επλήγησαν περισσότερο. Όπως αναφέρεται στην ετήσια έκθεση ΕΛΟΠΥ (2022), το 2021, έγινε αισθητή η μακροχρόνια επίδραση της κρίσης του Covid-19 στις επιχειρήσεις του κλάδου λόγω του υψηλού πληθωρισμού και των ανατιμήσεων στα προϊόντα με αποτέλεσμα το υψηλό κόστος παραγωγής. Υψηλό κόστος παραγωγής παρατηρήθηκε και το 2022 λόγω της ενεργειακής κρίσης και της στρατιωτικής εισβολής της Ρωσίας στην Ουκρανία με περαιτέρω αναστάτωση στις αλυσίδες εφοδιασμού εμπορευμάτων και προμηθειών (ΕΛΟΠΥ, 2022). Ωστόσο, για το 2021 η εικόνα του κλάδου των υδατοκαλλιεργειών ήταν θετική καθώς υπήρξε αύξηση της παραγωγής αλλά και των εξαγωγών (ΕΛΟΠΥ, 2022).

1.2. Βιολογία και εκτροφή τσιπούρας

Το είδος *S. aurata* ανήκει στην οικογένεια των Σπαριδών (*Sparidae*) και απαντάται ευρέως στην Μεσόγειο, σε παράκτιες και υφάλμυρες περιοχές, αλλά και κατά μήκος των ακτών του Ανατολικού Ατλαντικού από τη Μεγάλη Βρετανία έως τη Σενεγάλη (FAO, 2022b). Αποτελεί μαζί με το λαβράκι τα κυριότερα είδη εκτροφής στην

Ελλάδα. Η τσιπούρα είναι ένα ψάρι ευρύαλο και ευρύθερμο και αντέχει σε μεγάλες μεταβολές θερμοκρασίας και αλατότητας. Συγκεκριμένα, επιβιώνει σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (4-30°C) με τη μέγιστη ανάπτυξη να επιτυγχάνεται στους 22-24°C και σε αλατότητα από 7‰ έως 40‰ με μέγιστη ανάπτυξη από 28‰ έως 32‰ (Παπουτσόγλου, 2008, Pavlidis & Mylonas, 2011). Τα νεαρά άτομα γεννιούνται στην ανοικτή θάλασσα κατά την περίοδο Οκτωβρίου-Δεκεμβρίου και μεταναστεύουν συνήθως στις αρχές της άνοιξης προς τα παράκτια ύδατα, όπου μπορούν να βρουν άφθονη τροφή. Στα τέλη του φθινοπώρου επιστρέφουν στην ανοικτή θάλασσα, όπου αναπαράγονται τα ενήλικα ψάρια. Στην ανοικτή θάλασσα η τσιπούρα απαντάται συνήθως σε βραχώδεις περιοχές και λιβάδια Ποσειδωνίας, αλλά αλιεύεται και σε αμμώδη εδάφη. Είναι ερμαφρόδιτο είδος, ωριμάζει ως αρσενικό σε ηλικία 2 ετών και στη συνέχεια ως θηλυκό κατά τη διάρκεια του δεύτερου ή του τρίτου έτους. (FAO, 2022b).



Εικόνα 4. Τσιπούρα (*S. aurata*)

πηγή: FAO (2022b)

Η τσιπούρα εκτρέφεται κυρίως εντατικά σε θαλάσσιους πλωτούς κλωβούς. Ο κύκλος παραγωγής ξεκινάει με την παραγωγή γόνου από τους γεννήτορες που διατηρούνται στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς. Μετά το προνυμφικό στάδιο και αφού έχουν απορροφήσει το λεκιθικό σάκο έως την 3^η με 4^η μέρα μετά την εκκόλαψη, οι ιχθυονύμφες διατρέφονται με τροχόζωα (*Branchionus plicatilis*) για περίπου 2 εβδομάδες. Μετά την περίοδο αυτή, γίνεται σταδιακή αντικατάσταση των τροχόζωων με ένα είδος γαρίδας του γένους *Artemia*. Κατά τον απογαλακτισμό, χορηγείται σύνθετη βιομηχανικά παρασκευασμένη ιχθυοτροφή (pellets) με διάμετρο κόκκων ανάλογη του μεγέθους των ψαριών. Μόλις τα ψάρια φτάσουν το βάρος των 2-10 g μεταφέρονται στους πλωτούς ιχθυοκλωβούς για το τελικό στάδιο της πάχυνσης με διάρκεια 10-16 μήνες. Το εμπορεύσιμο μέγεθος της τσιπούρας είναι 350-400 g ή και παραπάνω (FAO, 2022b; Pavlidis & Mylonas, 2011).

1.3. Υδατοκαλλιέργειες και ευζωία (welfare) ιχθύων

Η ανάπτυξη και η εντατικοποίηση της υδατοκαλλιέργειας έχει οδηγήσει σε αμφιλεγόμενες συζητήσεις και εγείρει ανησυχίες περί ηθικής σχετικά με την καλή διαβίωση των εκτρεφόμενων οργανισμών. Η κατάσταση της ευζωίας έχει άμεσες επιπτώσεις στην παραγωγή και γενικά στη βιωσιμότητα του κλάδου. Τα ψάρια που εκτρέφονται υπό καλές συνθήκες διαβίωσης είναι λιγότερο καταπονημένα και λιγότερο επιρρεπή σε ασθένειες και ως εκ τούτου απαιτούν λιγότερη φαρμακευτική αγωγή και θεραπεία. Επιπλέον, παρουσιάζουν καλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης και αξιοποίησης της τροφής και τελικά παρέχουν ένα προϊόν καλύτερης ποιότητας με προφανή οικονομικά οφέλη (Ross & Ross, 2009).

Ένας από τους πιο γνωστούς ορισμούς για την ευζωία δόθηκε από τον (Broom, 1986) ως «η κατάσταση ενός ζώου σε συνάρτηση με την ικανότητά του να αντεπεξέρχεται στις συνθήκες στις οποίες ζει». Γενικά, η εκτίμηση του επιπέδου της ευζωίας αποτελεί ένα πολυδιάστατο θέμα (Ashley, 2007; Conte, 2004; Huntingford et al., 2006). Δεν υπάρχει μία κοινώς αποδεκτή απόδοση του όρου και συχνά χρησιμοποιούνται συνώνυμες εκφράσεις όπως η ορθή μεταχείριση, η καλή διαβίωση και η ευημερία για να την περιγράψουν.

Στην υποβάθμιση της ευζωίας συμβάλλει σε ένα πολύ μεγάλο ποσοστό η καταπόνηση (stress), η οποία προκαλείται σε μεγάλο βαθμό από τις διαχειριστικές πρακτικές που εφαρμόζονται στις ιχθυοκαλλιέργειες. Για το stress γενικά έχουν διατυπωθεί αρκετοί ορισμοί χωρίς κάποιος από αυτούς να είναι διεθνώς αποδεκτός. Σύμφωνα με τον Sapolsky (1992) η απόκριση στην καταπόνηση είναι μια προσαρμοστική λειτουργία και προκαλείται από ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών μηχανισμών προκειμένου να αποκαταστήσει ο οργανισμός την ομοιόστασή του, με σκοπό την επιβίωση. Άλλοι ερευνητές ορίζουν την καταπόνηση απλά σαν κάθε απειλή ή διαταραχή της ομοιόστασης (Hinkle, 1987; Munck et al., 1984).

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί ο αριθμός των επιστημονικών μελετών που μελετούν την αλλόσταση (allostasis), δηλαδή την ικανότητα διατήρησης της σταθερότητας μέσω της αλλαγής και του αλλοστατικού φορτίου, όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την ικανότητα ενός οργανισμού να αντιμετωπίζει μια συγκεκριμένη πρόκληση εγκλιματίζοντας τη συμπεριφορά και τη φυσιολογία του (Samaras et al., 2018). Οι διάφορες φυσιολογικές μεταβολές που συμβαίνουν υπό την επίδραση ενός στρεσογόνου παράγοντα επιτρέπουν στο ζώο να προσαρμοστεί στις νέες συνθήκες. Όταν το ζώο καταφέρει να ξεπεράσει την απειλή, να επανέλθει στις συνθήκες pro-stress και να αποκαταστήσει την ομοιόστασή αναφερόμαστε στο stress ως eustress (Gorissen & Flik, 2016). Ωστόσο, όταν το stress αγγίζει ή υπερβαίνει τα όρια ανοχής των ψαριών δυσχεραίνει τον εγκλιματισμό τους και τότε το σώμα οδηγείται στην κατάσταση της αλλοστατικής υπερφόρτωσης (Samaras et al., 2018). Κάτι τέτοιο παρατηρείται συνήθως υπό την επίδραση χρόνιου stress όταν τα άτομα δεν είναι πλέον σε θέση να αντιμετωπίσουν επιτυχώς την απειλή και να αποκαταστήσουν την ομοιόστασή τους (Korte et al., 2007). Αυτό μπορεί τελικά να οδηγήσει σε μείωση της ανάπτυξης, της αναπαραγωγικής ικανότητας και εξασθένηση

του ανοσοποιητικού συστήματος καθιστώντας τα ψάρια ευάλωτα σε ασθένειες. Σε αυτήν την περίπτωση αναφερόμαστε στο stress ως distress (Gorissen & Flik, 2016; Iwama et al., 2004; Pickering & Pottinger, 1989; Schreck & Tort, 2016), στο οποίο έχουν επικεντρωθεί οι περισσότερες επιστημονικές μελέτες (Martínez-Porchas et al., 2009). Οι όροι “eustress” και “distress” εισήχθησαν για πρώτη φορά από τον Selye στις αρχές του ’70.

Θεωρείται ότι το βιβλίο της Ruth Harrison “Animal Machines”, που δημοσιεύθηκε το 1964, ξεκίνησε το κίνημα για την ευζωία των ζώων, αφού προκάλεσε δημόσια κατακραυγή. Μετά από μόλις 6 εβδομάδες από τη δημοσίευση του βιβλίου, η κυβέρνηση της Μεγάλης Βρετανίας, μετά από την έκθεση της επιτροπής Bramdell, σύστασε την Farm Animal Welfare Advisory Committee (FAWAC; που ονομάζεται Farm Animal Welfare Council-FAWC από το 1979), η οποία έδωσε μία λίστα με πέντε βασικές προϋποθέσεις για την εξασφάλιση της ευζωίας των ζώων που αργότερα ονομάστηκαν «Πέντε ελευθερίες» (Webster, 2005). Σύμφωνα με αυτές, η έννοια της ευζωίας προϋποθέτει την εξασφάλιση της απουσίας πείνας και δίψας, ενόχλησης και δυσφορίας, πόνου, τραυματισμού και ασθένειας, την δυνατότητα εκδήλωσης φυσικής συμπεριφοράς και τέλος την απουσία φόβου και ανησυχίας (FAWC, 1979).

Στη δεκαετία του 1970 και στις αρχές της δεκαετίας του 1980, ο όρος της ευζωίας των ζώων δεν ήταν αποδεκτός από τους περισσότερους επιστήμονες (Broom, 2011). Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, η ευζωία των ιχθύων άρχισε να κερδίζει το ενδιαφέρον και από το 2000 έως και σήμερα, η ευζωία των ψαριών αποτελεί σημαντική προτεραιότητα τόσο για τους παραγωγούς και τους επαγγελματίες που εμπλέκονται στον κλάδο της ιχθυοκαλλιέργειας όσο και για την επιστημονική κοινότητα, τους καταναλωτές, τις ΜΚΟ, τις ρυθμιστικές αρχές και την πολιτεία (ΕΛΟΠΥ, 2019).

Σήμερα, η Ε.Ε. διαθέτει ένα από τα υψηλότερα πρότυπα καλής μεταχείρισης των ζώων, με ένα ευρύ φάσμα νομοθετικών διατάξεων σχετικά με την ευζωία των εκτρεφόμενων ιχθύων. Επίσης, έχει σημαντική συμβολή στη βελτίωση των νομοθετικών κανόνων τρίτων χωρών, αν και ακόμα στα περισσότερα μέρη του κόσμου τα ψάρια εξακολουθούν να στερούνται νομικής προστασίας.

Οι διαχειριστικές πρακτικές που εφαρμόζονται στις εντατικές εκτροφές μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την ευζωία των ψαριών, οδηγώντας σε αυξημένη ευαισθησία σε ασθένειες, αναστολή της αναπαραγωγικής διαδικασίας, μείωση της ανάπτυξης και τελικά μείωση της παραγωγής (Barcellos et al., 1999). Διαχειριστικές πρακτικές όπως η πυκνότητα εκτροφής (Ortuño et al., 2002), η σύλληψη (Frisch & Anderson, 2000; Grutter & Pankhurst, 2000), ο περιορισμός (Grutter & Pankhurst, 2000), οι διάφοροι χειρισμοί (Frisch & Anderson, 2000; Grutter & Pankhurst, 2000; Thomas & Robertson, 1991), η διαλογή (Flos et al., 1988), η μεταφορά (Davis & Parker, 1986; Frisch & Anderson, 2000), η αναισθησία (Thomas & Robertson, 1991), η μέτρηση των βιομετρικών χαρακτηριστικών και η θανάτωση μπορούν να προκαλέσουν οξεία ή χρόνια καταπόνηση στα ψάρια. Η ιχθυοφόρτιση είναι ένας σύνθετος παράγοντας

εκτροφής, και μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα νερού, την ανάπτυξη, το stress και τις κοινωνικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ψαριών (Segner, 2019).

Η υποβαθμισμένη ποιότητα του νερού εκτροφής, καθώς και οι απότομες αλλαγές εκτός των ορίων ανοχής για κάθε είδος και χωρίς τη δυνατότητα εγκλιματισμού μπορούν να έχουν αρνητική επίδραση στην υγεία και ευζωία των ψαριών (ΕΛΟΠΥ, 2019). Οι παράγοντες της ποιότητας του νερού περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία, τη σκληρότητα, το pH, την περιεκτικότητα σε οξυγόνο, τη θολερότητα, τη συγκέντρωση σε αμμωνία, νιτρώδη και νιτρικά ιόντα κ.ά. Πλέον, στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας υπάρχει σύγχρονος εξοπλισμός και συστήματα που ελέγχουν, παρακολουθούν και αναφέρουν τυχόν απότομες αλλαγές επιτρέποντας γρήγορες διορθωτικές ενέργειες.

Η ευζωία των ψαριών επηρεάζεται εκτός από την αλίευση και την εκτροφή και από άλλες ανθρώπινες δραστηριότητες όπως η ψυχαγωγική αλιεία, η διατήρηση των ψαριών ως κατοικίδια ζώα στα ενυδρεία αλλά και η επιστημονική έρευνα (Huntingford et al., 2006). Η περίπτωση σύλληψης και θανάτωσης των περισσότερων σπονδυλωτών ζώων με μεθόδους απάνθρωπες θα προκαλούσε αποστροφή ή απέχθεια στους περισσότερους ανθρώπους, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στην περίπτωση των ψαριών (Phillips et al., n.d.). Αυτό εκφράζει η έννοια του σπισισμού ή ειδισμού (speciesism) δηλαδή τη διάκριση μεταξύ των διαφορετικών ζωικών ειδών, η οποία αποφέρει μια διαφορετική ηθική στάση, πολλές φορές ζημιογόνα, για ορισμένα είδη.

Η ευζωία μπορεί να οριστεί με τρεις ευρύτερες έννοιες. Η πρώτη είναι ο φυσικός τρόπος διαβίωσης, δηλαδή να μπορούν τα ζώα να εκφράσουν τη φυσιολογική τους συμπεριφορά, ειδικά σε συνθήκες εκτροφής, όπως στους φυσικούς πληθυσμούς. Στην περίπτωση της ιχθυοκαλλιέργειας κάτι τέτοιο καθίσταται δύσκολο, αν όχι αδύνατο (Segner, 2019). Η δεύτερη, η λειτουργική, βασίζεται στην καλή κατάσταση της υγείας και στη διατήρηση των φυσιολογικών λειτουργιών (Segner, 2019). Όσον αφορά την εκτίμηση της υγείας, είναι παγκοσμίως ο πιο αποδεκτός δείκτης ευζωίας και αποτελεί αναμφίβολα απαραίτητη προϋπόθεση για αυτήν (Ashley, 2007). Η έλλειψη σωματικής υγείας μπορεί να είναι αιτία και αποτέλεσμα έλλειψης ευζωίας (Ashley, 2007). Ωστόσο, για πολλούς η ευζωία υπερβαίνει την έννοια της σωματικής υγείας και συνεπάγεται με έλλειψη ψυχικής καταπόνησης (Segner, 2019). Έτσι, η τρίτη, βασίζεται στη λειτουργία των αισθήσεων, δηλαδή τα ζώα ως αισθανόμενα όντα μπορούν να βιώσουν θετικά και αρνητικά συναισθήματα και μπορούν να υποστούν ψυχική καταπόνηση από τις κακές συνθήκες διαβίωσης (Segner, 2019). Φυσικά, αυτό προϋποθέτει ότι τα ζώα έχουν νοητικές και συναισθηματικές δυνατότητες, κάτι το οποίο θεωρείται αμφιλεγόμενο στα ψάρια από κάποιους επιστήμονες (Arlinghaus et al., 2007; Rose et al., 2014) και υπάρχει διαφωνία για την αναγκαιότητα διασφάλισης ευζωίας (Dawkins, 2006; Fraser, 2009).

1.3.1. Νομοθετικό πλαίσιο

Η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) έχει θεσπίσει από το 1974 μέχρι σήμερα ένα ευρύ και λεπτομερές νομοθετικό πλαίσιο σχετικά με την καλή διαβίωση των ζώων. Με τη

Συνθήκη της Λισαβόνας (Δεκέμβριος 2009) – Άρθρο 13 αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά τα ζώα ως νοήμονα – ευαίσθητα όντα («sentient beings») τα οποία μπορούν να αντιληφθούν και να αισθανθούν.

«Κατά την διαμόρφωση και υλοποίηση των πολιτικών της Ευρωπαϊκής Ένωσης στους τομείς της αλιείας, της γεωργίας, των μεταφορών, της εσωτερικής αγοράς, της έρευνας και της τεχνολογικής ανάπτυξης και του διαστήματος η Ένωση και τα Κράτη-Μέλη λαμβάνουν πλήρως υπόψη τους τις απαιτήσεις καλής διαβίωσης των ζώων ως ευαίσθητων όντων, τηρώντας ταυτόχρονα όλες τις νομοθετικές ή διοικητικές διατάξεις και τα έθιμα των κρατών-μελών που αφορούν ιδίως στα θρησκευτικά τυπικά, τις πολιτιστικές παραδόσεις και την κατά τόπους πολιτιστική κληρονομιά». Συνθήκη της Λισαβόνας – Άρθρο 13

Το μεγαλύτερο μέρος της ευρωπαϊκής νομοθεσίας για την ευζωία των ζώων αναφέρεται στα ζώα εκτροφής, αλλά η ΕΕ έχει επίσης εγκρίνει νομοθεσία για την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς καθώς και σε άλλους τομείς, όπως ζώα που φυλάσσονται σε ζωολογικούς κήπους, ενυδρεία ή περιορισμό εμπορίου συγκεκριμένων προϊόντων για ηθικούς λόγους κ.ά.

Η νομοθεσία για την προστασία των ζώων εκτροφής καλύπτει όλα τα διαφορετικά στάδια της παραγωγής από την ίδια την εκτροφή μέχρι τη μεταφορά και τη θανάτωση. Η εκτροφή των ζώων καλύπτεται από πέντε οδηγίες (directives) που επιβάλλουν ελάχιστα πρότυπα. Οι οδηγίες, γενικά, ισχύουν για τα κράτη μέλη της ΕΕ ώστε να επιτύχουν ένα συγκεκριμένο αποτέλεσμα, αλλά με τη δυνατότητα να επιλέξουν τον τρόπο επίτευξης του αποτελέσματος αυτού με την ενσωμάτωση (μεταφορά) των οδηγιών στο εθνικό τους δίκαιο. Αντίθετα, η μεταφορά και η θανάτωση ζώων καλύπτονται από κανονισμούς που ισχύουν αυτόματα και ομοιόμορφα σε όλα τα κράτη μέλη της ΕΕ αμέσως μόλις τεθούν σε ισχύ, χωρίς να χρειάζεται να μεταφερθούν στο εθνικό δίκαιο.

Η νομοθεσία της ΕΕ για την καλή διαβίωση των ζώων περιλαμβάνει γενικές απαιτήσεις για την εκτροφή, τη μεταφορά και τη σφαγή των εκτρεφόμενων ιχθύων, καθώς και κανονισμούς σχετικά με την υγεία και τη βιολογική παραγωγή:

-Οδηγία 98/58 σχετικά με την προστασία των ζώων στα εκτροφεία

Σκοπός της οδηγίας είναι η θέσπιση γενικών κανόνων σχετικά με την προστασία των ζώων στα εκτροφεία και εφαρμόζεται στα ζώα (συμπεριλαμβανομένων των ιχθύων, των ερπετών και των αμφιβίων) που εκτρέφονται ή διατηρούνται για την παραγωγή τροφίμων, μαλλιού, δέρματος ή γούνας ή για άλλους σκοπούς γεωργικής εκμετάλλευσης, ενώ δεν εφαρμόζεται στα άγρια ζώα, στα ζώα που προορίζονται να συμμετάσχουν σε αγώνες ή σε άλλες πολιτιστικές εκδηλώσεις (εκθέσεις), στα πειραματόζωα ή τα ζώα εργαστηριακών δοκιμών και στα ασπόνδυλα.

-Κανονισμός 1/2005 σχετικά με την προστασία των ζώων κατά τη μεταφορά

Σκοπός του Κανονισμού είναι η ρύθμιση της μεταφοράς ζώντων σπονδυλωτών ζώων μεταξύ των κρατών μελών της ΕΕ και προβλέπει τη διενέργεια ελέγχων στα ζώα που

εισέρχονται στην ΕΕ ή εξέρχονται από αυτή. Οι λεπτομερείς κανόνες επιδιώκουν τη διαφύλαξη των συνθηκών καλής διαβίωσης των ζώων και την πρόληψη των τραυματισμών ή του περιττού πόνου που προκαλείται στα ζώα.

-Κανονισμός 1099/2009 σχετικά με την προστασία των ζώων κατά τη θανάτωση

Σκοπός του Κανονισμού είναι η θέσπιση κανόνων καλής μεταχείρισης για τη θανάτωση ή τη σφαγή των ζώων που εκτρέφονται για την παραγωγή τροφίμων και προϊόντων, όπως γούνα και δέρμα.

-Κανονισμός 2016/429 σχετικά με τις μεταδοτικές νόσους των ζώων

Ο κανονισμός 2016/429 αποσκοπεί στην πρόληψη και τον έλεγχο των νοσημάτων που μπορούν να μεταφερθούν σε άλλα ζώα ή ανθρώπους και αφορά μεταξύ άλλων και τα ζώα υδατοκαλλιέργειας, καθώς τα λοιμώδη νοσήματα αποτελούν πρόβλημα για την καλή διαβίωση των ιχθύων και περιοριστικό παράγοντα όσον αφορά την παραγωγικότητα της υδατοκαλλιέργειας. Ο νόμος για την υγεία των ζώων εντάσσεται σε μια δέσμη μέτρων που προτάθηκε από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή τον Μάιο του 2013 με στόχο την ενίσχυση της εφαρμογής των προτύπων υγείας και ασφάλειας για ολόκληρη την αγροδιατροφική αλυσίδα.

-Κανονισμός 2019/6 σχετικά με τα κτηνιατρικά φάρμακα

Ο κανονισμός 2019/6 θεσπίζει κανόνες για την πώληση, την παρασκευή, την εισαγωγή, την εξαγωγή, τη διάθεση, τη διανομή, τον έλεγχο και τη χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων.

-Κανονισμός 2018/848 σχετικά με τη βιολογική παραγωγή και την επισήμανση των βιολογικών προϊόντων

Ο κανονισμός της ΕΕ για τη βιολογική παραγωγή καθορίζει ειδικότερες απαιτήσεις για την καλή μεταχείριση των ζώων, όπως τη συμμετοχή προσώπων στην εκτροφή ζώων υδατοκαλλιέργειας με τις απαραίτητες βασικές γνώσεις και δεξιότητες όσον αφορά την υγεία και τις ανάγκες καλής μεταχείρισης, την ελαχιστοποίηση των χειρισμών των ζώων υδατοκαλλιέργειας και την ύπαρξη περιορισμών για τη χρήση τεχνητού φωτισμού, αερισμού, οξυγόνου, μείωσης της διάρκειας μεταφοράς κ.ά.

-Οδηγία 2010/63 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς

Σκοπός της οδηγίας 2010/63 είναι ο περιορισμός των δοκιμών στα ζώα στο ελάχιστο δυνατό επίπεδο και στη θέσπιση υποχρεωτικών προτύπων σχετικά με τη χρήση, τη στέγαση και τη φροντίδα τους, προκειμένου να προστατευτούν τα εργαστηριακά ζώα και να καταστεί δυνατή η περαιτέρω προαγωγή της έρευνας. Τα υψηλά πρότυπα καλής μεταχείρισης των ζώων ωφελούν τόσο τα ζώα όσο και την επιστήμη.

Όπως αναφέρουν οι Segner (2019), η βασική πρόκληση για την ανάπτυξη συστάσεων και κανονισμών για την ευζωία των εκτρεφόμενων ιχθύων είναι η περιορισμένη επιστημονική γνώση και πρακτική εμπειρία σε αυτόν τον κλάδο παραγωγής. Πιο

συγκεκριμένα, αναφέρουν ότι δεν είναι απόλυτα κατανοητό σε ποιο βαθμό οι έννοιες και οι ορισμοί για την ευζωία, όπως αυτές έχουν αναπτυχθεί για τα κοινά θερμόαιμα ζώα εκτροφής, μπορούν να εφαρμοστούν στα ψάρια. Επιπλέον, η εκτροφή ιχθύων περιλαμβάνει έναν εξαιρετικά μεγάλο αριθμό ειδών με διαφορετικά στάδια ζωής, όπου υπάρχουν διαφορετικές απαιτήσεις με σκοπό τη διασφάλιση της ευζωίας.

Τα τελευταία χρόνια η ευζωία των ιχθύων αποτελεί μια σημαντική προτεραιότητα των παραγωγών, καθώς έχει αποδειχτεί πλέον επιστημονικά ότι η καλή διαβίωση των εκτρεφόμενων οργανισμών έχει καθοριστικό ρόλο στην ποιότητα του τελικού προϊόντος και των καταναλωτών λόγω της ευαισθητοποίησης της κοινωνίας για την ορθή μεταχείριση και την ευζωία των εκτρεφόμενων ιχθύων.

Ωστόσο, υπάρχει ανάγκη για πιο ορθές πρακτικές στους τομείς που εφαρμόζεται η ευζωία (εκτροφή, μεταφορά και θανάτωση), στον καθορισμό δεικτών ευζωίας που θα είναι κοινοί, επικυρωμένοι, συγκεκριμένοι ανά είδος, και θα μπορούν να ελεγχθούν σε όλη την αλυσίδα παραγωγής, στην περαιτέρω έρευνα και καινοτομία, ειδικότερα όσον αφορά συγκεκριμένες ανά είδος παραμέτρους καλής διαβίωσης, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι διατροφικές ανάγκες στα διάφορα συστήματα εκτροφής και στην παροχή γνώσεων και δεξιοτήτων σχετικά με την καλή διαβίωση των ιχθύων στους παραγωγούς προϊόντων υδατοκαλλιέργειας και σε άλλους παράγοντες οι οποίοι χειρίζονται ζώντα εκτρεφόμενα ψάρια.

1.3.2. The great fish debate

Το ερώτημα για τον αν τα ψάρια είναι νοήμονα – ευαίσθητα όντα, τα οποία μπορούν να αντιληφθούν και να αισθανθούν απασχολεί τους επιστήμονες για πάνω από πενήντα χρόνια. Ο νεοφλοιός (neocortex), ο οποίος αποτελεί το εξωτερικό στρώμα του φλοιού του εγκεφάλου, μαζί με το μεταιχμιακό σύστημα (ιππόκαμπος και αμυγδαλή) συνιστούν τις περιοχές εκείνες του εγκεφάλου των θηλαστικών που εδράζονται ανώτερες γνωστικές λειτουργίες, όπως η μάθηση και η μνήμη.

Σύμφωνα με τον (Σαράντης, 2010) «Σε νευρωνικό επίπεδο, η μνήμη και η μάθηση χαρακτηρίζονται από μακροχρόνιες προσαρμοστικές μεταβολές των νευρωνικών κυκλωμάτων του εγκεφάλου ως απόκριση στο περιβάλλον». Οι προσαρμοστικές αυτές μεταβολές επιτρέπουν στον οργανισμό να αντιδρά ανάλογα στις αλλαγές του περιβάλλοντος, βασιζόμενος στη μνημονική αποθήκευση (Bear et al., 2001). Η περιοχή του ιππόκαμπου στον εγκέφαλο των θηλαστικών είναι σημαντική για την τοποθέτηση νέων πληροφοριών στη μακρόχρονη μνήμη, η οποία μπορεί να αφορά ώρες, μέρες, εβδομάδες ή χρόνια. Γενικά, είναι γνωστό ότι ο ιππόκαμπος σχετίζεται με την πληροφορία του χώρου και τη συνειρμική μάθηση (Eichenbaum et al., 1999; Jeffery et al., 2004), ενώ η αμυγδαλή σχετίζεται με την έκφραση των συναισθημάτων (Davis, 1992; Gallagher & Chiba, 1996). Η απουσία νεοφλοιού στα ψάρια οδήγησε σε αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με το κατά πόσο τα ψάρια έχουν τη δυνατότητα συναίσθησης (sentience) ή συνειδητής αίσθησης πόνου (Arlinghaus et al., 2007; Key,

2016; Rose, 2002; Rose et al., 2014). Αντίθετα, άλλοι ερευνητές υποστήριξαν ότι τα ψάρια έχουν αυτή τη δυνατότητα λόγω ανατομικών, φυσιολογικών και ηθολογικών ενδείξεων (Braithwaite & Huntingford, 2004; Chandroo et al., 2004; Sneddon, 2002; Sneddon et al., 2003). Αρχικά, φαίνεται ότι περιοχές στον πρόσθιο εγκέφαλο των ιχθύων διατηρούν αρκετές ομοιότητες με το μεταιχμιακό σύστημα των θηλαστικών (Broglia et al., 2005; Salas et al., 2006). Επιπλέον, μελέτες έχουν αποδείξει την παρουσία Α-δέλτα ινών, που μεταφέρουν τη νευρική διέγερση ταχύτατα και σχετίζονται με τον οξύ πόνο και τη μικρή παρουσία C ινών, που μεταφέρουν βραδύτερα τον πόνο, στο τρίδυμο νεύρο της πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) για πρώτη φορά με τη βοήθεια της ηλεκτροφυσιολογίας και της νευροανατομίας (Sneddon, 2002, 2003a). Αυτές οι ελεύθερες νευρικές απολήξεις των ινών Αδ και C λειτουργούν ως υποδοχείς πόνου στα ανώτερα σπονδυλωτά (Lynn, 1994). Ένα σχετικά μικρότερο ποσοστό των C ινών ανιχνεύτηκε στα ψάρια (Roques et al., 2010; Sneddon, 2002) σε αντίθεση με τα χερσαία σπονδυλωτά, όπου περίπου το 50% των αλγοϋποδοχέων αποτελείται από ίνες C (Young, 1977), αν και τα ερπετά έχουν επίσης πιο χαμηλά ποσοστά C ινών (Terashima & Liang, 1994).

Είναι πιθανό η αντίληψη του πόνου από τα ψάρια να είναι διαφορετική από αυτήν των ανθρώπων, λόγω της πολυπλοκότητας της δομής του εγκεφάλου. Σίγουρα το μόνο μυαλό που γνωρίζουμε πραγματικά είναι το ανθρώπινο, πράγμα που σημαίνει ότι δεν μπορούμε να ξέρουμε με βεβαιότητα πώς αντιλαμβάνεται ένας άλλος οργανισμός τον κόσμο που τον περιβάλλει (Sneddon & Sneddon, 2020). Ακόμα και σε αυτή την περίπτωση, αν η εμπειρία του πόνου είναι δυσάρεστη για τα ψάρια, δεν το καθιστά λιγότερο σημαντικό από άποψη βιολογίας και ηθικής (Sneddon et al., 2003).

Για να αποδειχθεί ότι ένα ζώο είναι ικανό να αντιληφθεί τον πόνο, πρέπει να αποδειχθεί ότι, πρώτον, το ζώο μπορεί να αντιληφθεί το δυσμενές αισθητήριο ερέθισμα και, δεύτερον, ότι αντιδρά σε αυτό τόσο φυσιολογικά όσο και συμπεριφορικά. Για να αποδειχτεί ότι αυτό δεν είναι απλώς ένα αντανάκλαστικό, είναι απαραίτητο να αποδειχτεί ότι το ζώο έχει την ικανότητα να μαθαίνει ότι το συγκεκριμένο ερέθισμα συνδέεται με μια δυσάρεστη κατάσταση και να το αποφεύγει. Όλα τα είδη ψαριών που έχουν μελετηθεί έχουν την ικανότητα να μαθαίνουν και να θυμούνται (Fernö et al., 2020). Η «μνήμη των τριών δευτερολέπτων» που έχει επικρατήσει και αποδίδεται στο χρυσόψαρο (*Carassius auratus*) είναι κάτι που επιστημονικά δεν ισχύει (Fernö et al., 2020), θεωρείται πλέον μύθος και καλό είναι να αποφεύγεται (Bone & Moore, 2008). Σε πείραμα όπου έγινε προσπάθεια εκμάθησης του halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) να αντιδράει σε ένα φωτεινό σήμα, με πελλέτες ως ανταμοιβή, δεν υπήρχε ανταπόκριση. Ενώ, όταν έγινε αντικατάσταση των πελλετών με γαρίδες, τα ψάρια αντέδρασαν έντονα και προσαρμόστηκαν εύκολα (Nilsson et al., 2010). Κάποιες καταστάσεις που προκαλούν θετικά ή αρνητικά συναισθήματα και συμβάλλουν σημαντικά στην επιβίωση και την αναπαραγωγή είναι πιο εύκολο για τα ψάρια να τις θυμούνται από τα συναισθηματικά ουδέτερα γεγονότα (Paul et al., 2005). Επίσης, η μνήμη και η μάθηση συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην ικανότητα προσανατολισμού των ψαριών, με σκοπό την αναζήτηση

περιβάλλοντος βιολογικής σημασίας, αναζήτηση τροφής ή για να επιστρέψουν στο περιβάλλον που γεννήθηκαν για αναπαραγωγή, όπως και στην ικανότητα των ψαριών να ακολουθούν διαδοχικά σημεία αναφοράς. Στην εντατική ιχθυοκαλλιέργεια, η ικανότητα μάθησης και μνήμης έχει πολλά οφέλη όπως η προσαρμογή των ατόμων στις συνθήκες εκτροφής και η ικανότητα να ανταπεξέρχονται πιο εύκολα στα διάφορα ερεθίσματα, συμβάλλοντας στην ευζωία. Η κλασική εξαρτημένη μάθηση είναι μια μορφή συνειρμικής μάθησης και έχει βρει εφαρμογή στις ιχθυοκαλλιέργειες συνδυάζοντας κυρίως οπτικά ή ηχητικά ερεθίσματα με την παροχή τροφής (Jobling et al., 2001).

Πλέον η έρευνα σχετικά με τους περιφερειακούς αλγοϋποδοχείς που ανιχνεύουν τα επιβλαβή ερεθίσματα στο ψάρι (Ashley et al., 2006, 2007; Mettam et al., 2012; Sneddon, 2002, 2003a), τις μεταβολές στην εγκεφαλική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια ενός επιβλαβούς ερεθίσματος (Dunlop & Laming, 2005; Nordgreen et al., 2007), καθώς και τις συμπεριφορικές αλλαγές (Alves et al., 2013; Roques et al., 2010; Sneddon, 2003b; Sneddon et al., 2003) είναι αρκετά εκτεταμένη.

Συμπερασματικά, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα ψάρια έχουν την ικανότητα αντίληψης του πόνου. Κατά τη διάρκεια ενός επιβλαβούς ερεθίσματος παρουσιάζουν δυσμενείς συμπεριφορικές και φυσιολογικές αντιδράσεις. Το ερώτημα που θέτει η (Sneddon, 2006) είναι όχι αν μπορούν να αισθανθούν τα ψάρια και να αντιδράσουν στον πόνο, αλλά αν γνωρίζουν ότι πονάνε και υποφέρουν. Στη συνέχεια αναφέρει ότι, καθώς, είναι σχεδόν αδύνατο να μπούμε μέσα στο μυαλό των ζώων και να γνωρίζουμε τι βιώνουν ή πώς νιώθουν πρέπει να δώσουμε στα ψάρια το πλεονέκτημα της αμφιβολίας και να πράττουμε σαν να είναι ικανά να αντιληφθούν τον πόνο (Sneddon, 2006).

1.3.3. Πρότυπα ευζωίας στις ιχθυοκαλλιέργειες

Με σκοπό τη διασφάλιση της ευζωίας στις ιχθυοκαλλιέργειες έχουν αναπτυχθεί αυστηρά πρότυπα πιστοποίησης από διάφορους φορείς. Αυτά αφορούν τις τεχνικές διαχείρισης, όπως το περιβάλλον εκτροφής, την ποιότητα νερού και την ιχθυοπυκνότητα, τη σωστή σίτιση όπως τη σύνθεση της τροφής και τη διαχείριση της τροφής, τις διαχειριστικές πρακτικές που εφαρμόζονται στις μονάδες αλλά και το τελικό στάδιο της εξαλίευσης και θανάτωσης.

Στην Ελλάδα, ο φορέας ΕΛΟΠΥ (Ελληνική Οργάνωση Παραγωγών Υδατοκαλλιέργειας) έχει αναπτύξει το πρότυπο ευζωίας Fish from Greece με σκοπό την προώθηση ψαριών υψηλής ποιότητας, ενώ η ΒΙΟ Ελλάς είναι ελληνικός φορέας πιστοποίησης βιολογικών μονάδων για παραγωγή ψαριών (τσιπούρα και λαβράκι) σύμφωνα με το Γερμανικό πρότυπο Naturland.

Στα διεθνή πρότυπα ευζωίας ανήκει η πιστοποίηση GLOBALG.A.P. που έχει ως στόχο την προστασία της υγείας και ευζωίας των ψαριών σε όλο τον κύκλο παραγωγής αλλά και η Best Aquaculture Practices (BAP) του οργανισμού Global Seafood Alliance. Στους κορυφαίους φορείς πιστοποίησης ανήκει και η Friends of the

Sea (FOS) η οποία έχει θεσπίσει πρότυπα καλής διαβίωσης των ψαριών ανά είδος, και η Aquaculture Stewardship Council (ASC) η οποία συνεχώς βελτιώνει και προτείνει νέα πρότυπα ευζωίας για τα εκτρεφόμενα ψάρια. Η οργάνωση Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA) η οποία δραστηριοποιείται στην Αγγλία και την Ουαλία έχει αναπτύξει πρωτόκολλα για τον σολωμό και την πέστροφα σχετικά με το περιβάλλον εκτροφής των ψαριών, τους χειρισμούς, τη μεταφορά και τη θανάτωση. Τέλος, για τον εκτρεφόμενο σολωμό έχει αναπτύξει πρωτόκολλο ευζωίας η Global Animal Partnership (GAP) με πιστοποίηση τριών διαφορετικών επιπέδων.

Φορέας-Πιστοποίηση	Ετικέτα
Fish from Greece	
BIO HELLAS - Naturland	
GLOBALG.A.P.	
Best Aquaculture practices	
Friends of the Sea	
Aquaculture Stewardship Council	
Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals	

Global Animal Partnership	
---------------------------	--

Εικόνα 5. Φορείς πιστοποίησης ευζωίας εκτρεφόμενων ψαριών και ετικέτες (labels)

1.4. Απόκριση στην καταπόνηση

1.4.1. Φυσιολογική απόκριση

Η απόκριση στην καταπόνηση είναι μια προσαρμοστική λειτουργία και προκαλείται από ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών μηχανισμών προκειμένου να αποκαταστήσει ο οργανισμός την ομοιόστασή του, με σκοπό την επιβίωση (Sapolsky, 1992). Ο μηχανισμός αντίδρασης των ιχθύων στην καταπόνηση περιλαμβάνει τρεις φάσεις: την πρωτογενή, τη δευτερογενή και την τριτογενή αντίδραση (Mazeaud et al., 1977; Wedemeyer & McLeay, 1981), που είναι γνωστός και ως Γενικό Σύνδρομο Προσαρμογής (General Adaptation Syndrome - GAS) και αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Selye (1956). Ο Selye, με σκοπό την κατανόηση της επίδρασης των στρεσογόνων παραγόντων στα θηλαστικά, παρατήρησε ομοιότητες στις αποκρίσεις των ζώων, τις οποίες θεώρησε ως ένα γενικό σύνδρομο απόκρισης. Το GAS περιλαμβάνει την αντίδραση συναγερμού, αντίστασης και τέλος, το στάδιο εξάντλησης (Ellis et al., 2012).

Η πρωτογενής αντίδραση των ιχθύων στην καταπόνηση ή αλλιώς αντίδραση συναγερμού, περιλαμβάνει την απελευθέρωση κατεχολαμινών (αδρεναλίνη= επινεφρίνη και νοραδρεναλίνη=νορεπινεφρίνη) από τα χρωμόφιλα κύτταρα, έπειτα από διέγερση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος (ΣΝΣ). Στα ανώτερα σπονδυλωτά τα επινεφρίδια αποτελούνται από τη μυελώδη μοίρα (ή μυελό των επινεφριδίων), όπου παράγονται οι κατεχολαμίνες και τη φλοιώδη μοίρα (ή φλοιό των επινεφριδίων), όπου παράγονται τα κορτικοστεροειδή. Αποτελούν, δηλαδή, δύο ενδοκρινείς αδένες σε έναν. Αντίθετα, στους ιχθύες η μυελώδης μοίρα αντιπροσωπεύεται από τα χρωμόφιλα κύτταρα και η φλοιώδης μοίρα αντιπροσωπεύεται από τον ενδονεφρικό ιστό (Bone & Moore, 2008).

Η ντοπαμίνη και η νοραδρεναλίνη εντοπίζονται στον εγκέφαλο, ενώ η κατεχολαμίνες, γενικά, εντοπίζονται στο πλάσμα, στο ΣΝΣ και στην καρδιά (Παπουτσόγλου, 1998). Το αμινοξύ τυροσίνη αποτελεί το πρόδρομο μόριο για την βιοσύνθεση των κατεχολαμινών, το οποίο μέσω του ενζύμου υδροξυλάση της τυροσίνης, μετατρέπεται σε L-3,4-διϋδροξυ-φαινυλαλανίνη (L-DOPA). Έπειτα, η L-DOPA αποκαρβοξυλιώνεται, μέσω της αποκαρβοξυλάσης της DOPA και σχηματίζεται η DA. Η DA αποτελεί το πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση της νοραδρεναλίνης και της αδρεναλίνης. Με τη βοήθεια του ενζύμου β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης, η

ντοπαμίνη μετατρέπεται σε νοραδρεναλίνη, η οποία μέσω του ενζύμου N-μεθύλ-τρανσφεράση δίνει την αδρεναλίνη οποία κινητοποιεί τις πηγές ενέργειας, έτσι ώστε να εκτελεστεί η αντίδραση 'πάλης ή φυγής' μέσω του ΣΝΣ (Lillesaar, 2011).

Η σεροτονίνη (serotonin), η οποία είναι γνωστή και ως 5-υδροξυτρυπταμίνη (5-HT), ανήκει στις μονοαμίνες και ειδικότερα στην κατηγορία στις ινδολαμινών. Το αμινοξύ τρυπτοφάνη αποτελεί την πρόδρομη ουσία, η οποία υδρολύεται και παράγεται L-υδροξύ-τρυπτοφάνη (5-HTP). Στη συνέχεια, αποκαρβοξυλιώνεται μέσω της αποκαρβοξυλάσης της 5-HTP με αποτέλεσμα της παραγωγή της 5-HT. Η 5-HT μεταβολίζεται από τη μονοαμινοοξειδάση-A (MAO-A) σε 5-υδροξυ-ινδολοξικό οξύ (5-HIAA), ο οποίος αποτελεί το βασικό μεταβολίτη της σεροτονίνης.

Η απόκριση των κατεχολαμινών μετά την καταπόνηση είναι εξαιρετικά γρήγορη, καθιστώντας τη μέτρηση τους δύσκολη (Pottinger, 2010). Αντίθετα, τα επίπεδα της κορτιζόλης αυξάνονται μερικά λεπτά μετά το οξύ stress που προκαλείται από την δειγματοληψία (Moliner et al., 1997) και έτσι ποσοτικοποιείται ευκολότερα. Αυτός είναι και ένας λόγος που η κορτιζόλη έχει επικρατήσει ως δείκτης καταπόνησης (Ellis et al., 2012). Οι νευροδιαβιβαστές συντίθενται στο προσυναπτικό νευρώνα (αποθηκεύονται στα συναπτικά κυστίδια) και μεταδίδουν τις νευρικές ώσεις μέσω των συνάψεων. Η προσυναπτική μεμβράνη της σύναψης χωρίζεται από την μετασυναπτική με τη συναπτική σχισμή. Μετά την απελευθέρωση τους, όταν η νευρική ώση φτάσει στα κομβία, οι νευροδιαβιβαστές προσδένονται στους υποδοχείς του μετασυναπτικού νευρώνα/κυττάρου.

Ο προσδιορισμός των κατεχολαμινών και της ντοπαμινεργικής δραστηριότητας, καθώς και ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της σεροτονίνης, του μεταβολίτη της (5-HIAA) και της σεροτονινεργικής δραστηριότητας συνδέονται με τον προσδιορισμό του stress που προκαλείται από τις διαχειριστικές πρακτικές που εφαρμόζονται στις υδατοκαλλιέργειες (Batzina et al., 2014; Ferrari et al., 2020; Papoutsoglou et al., 2008) και γενικά με τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού.

Κατά την πρωτογενή απόκριση ενεργοποιείται ο άξονας Υποθάλαμος-Υπόφυση-Ενδονεφρικός ιστός (Hypothalamus-Pituitary-Interrenal-HPI) (Wendelaar Bonga, 1997) (Flik et al., 2006) (Martos-Sitcha et al., 2014). Όταν ένας οργανισμός διεγείρεται από έναν στρεσογόνο παράγοντα, ο εκλυτικός παράγοντας κορτικοτροπίνης (CRH) εκκρίνεται από τον υποθάλαμο, δρα στην υπόφυση για να συνθέσει και να απελευθερώσει την επινεφριδιοφλοιοτρόπο ορμόνη (ACTH). Στη συνέχεια, η επινεφριδιοφλοιοτρόπος ορμόνη μέσω της κυκλοφορίας του αίματος διεγείρει τον ενδονεφρικό ιστό, έτσι ώστε τα κύτταρα του να συνθέσουν και να εκκρίνουν κορτικοστεροειδή, όπως την κορτιζόλη. Η κορτιζόλη δεν αποθηκεύεται αλλά συντίθενται ενδογενώς (*de novo*) από την χοληστερόλη όταν τα κύτταρα του ενδονεφρικού ιστού διεγείρονται από την αλληλουχία ορμονών (Ellis et al., 2012).

Η δράση της κορτιζόλης στα κύτταρα επιτυγχάνεται μέσω ειδικών κυτταροπλασματικών υποδοχέων. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο κορτιζόλης-

υποδοχέα εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου συνδέεται σε συγκεκριμένες θέσεις του DNA και επηρεάζει την έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων-στόχων (Beato & Sanchez-pacheco, 1996).

Η συγκέντρωση της κορτιζόλης στο πλάσμα χρησιμοποιείται ως δείκτης της απόκρισης της καταπόνησης και της ευζωίας. Τα επίπεδα της κορτιζόλης στο πλάσμα του αίματος αυξάνονται γρήγορα μετά την έκθεση του οργανισμού σε οξύ stress και οι φυσιολογικές της τιμές αποκαθίστανται μετά από λίγες ώρες. Όταν ο παράγοντας καταπόνησης είναι χρόνιος, τα επίπεδα της κορτιζόλης παραμένουν υψηλά για ημέρες ή και εβδομάδες (Wendelaar Bonga, 1997).

Η κορτιζόλη έχει επίδραση στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, λιπών και πρωτεϊνών όπως και στα ελεύθερα λιπαρά οξέα, προάγοντας τη λιπόλυση. Επίσης, εμπλέκεται στην ωσμωρύθμιση των τελεόστεων ιχθύων, καθώς έχει παρατηρηθεί αύξηση των επιπέδων στο αίμα των ευρύαλων ιχθύων όταν αυτοί μεταφέρονται σε θαλασσινό νερό, ενώ η έγχυση κορτιζόλης μεταβάλλει την διαπερατότητα των βραγχίων σε ιόντα και νερό (Bone & Moore, 2008).

Η αύξηση του επιπέδου κορτιζόλης και κατεχολαμινών ευθύνεται για τις δευτερογενείς αντιδράσεις του οργανισμού ή αλλιώς στάδιο αντίστασης. Η δευτερογενής αντίδραση περιλαμβάνει διάφορες βιοχημικές και φυσιολογικές μεταβολές, προκαλώντας ενεργοποίηση των ενεργειακών αποθεμάτων, όπως τα αποθέματα γλυκογόνου, αναερόβια γλυκόλυση και υψηλή μυϊκή δραστηριότητα. Έτσι, παρατηρείται αύξηση της γλυκόζης και του γαλακτικού οξέος στο πλάσμα του αίματος. Για αυτό το λόγο, η γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ παράλληλα με την κορτιζόλη χρησιμοποιούνται ως δείκτες μέτρησης της καταπόνησης στους ιχθύες (Acerete et al., 2004; Arends et al., 1999). Επίσης, το χρόνιο stress έχει μεγάλη επίδραση στις αιματολογικές παραμέτρους (Montero et al., 2001) και αυτό ερμηνεύεται λόγω της βελτίωσης της ικανότητας του αίματος να μεταφέρει μεγαλύτερα ποσοστά οξυγόνου με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις (Μαλανδράκης, 2014). Εκτός από την κορτιζόλη, η οποία έχει μελετηθεί περισσότερο, και τις κατεχολαμίνες υπάρχουν και άλλες ορμόνες που αποκρίνονται στην καταπόνηση όπως η CRH και η ACTH, η κορτιζόνη και άλλες στεροειδείς ορμόνες (Ellis et al., 2012).

Η φάση της τριτογενούς αντίδρασης ή εξάντλησης προϋποθέτει τη συνέχιση της εφαρμογής του στρεσογόνου παράγοντα ή την ανεπιτυχή προσαρμογή των ιχθύων στον παράγοντα αυτό και περιλαμβάνει μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, διαταραχή της αναπαραγωγικής διαδικασίας καθώς και ευαισθησία στις ασθένειες (Campbell et al., 1992; Pickering & Pottinger, 1989), προκαλώντας τελικά εξάντληση και θάνατο (Παπουτσόγλου, 1998).

1.4.2. Συμπεριφορά

Η συμπεριφορά αντιπροσωπεύει μία αντίδραση του οργανισμού ως απάντηση σε ένα ερέθισμα του περιβάλλοντος του (Bone & Moore, 2008; Martins et al., 2012). Η μελέτη της συμπεριφοράς των ζώων αποτελεί έναν από τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους επιστημονικούς κλάδους τα τελευταία χρόνια (Barnard, 2004) και έχει αποδειχτεί ότι αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την αξιολόγηση της ευζωίας (Martins et al., 2012). Από την παρατήρηση της συμπεριφοράς ενός ατόμου μπορεί να γίνει εξαγωγή πολύτιμων συμπερασμάτων ως προς την σημασία της ή το ρόλο της στην επιβίωση (Bone & Moore, 2008).

Όπως αναφέρεται στο προηγούμενο κεφάλαιο, η έκθεση του οργανισμού σε στρεσογόνους παράγοντες οδηγεί στην ενεργοποίηση μίας αλληλουχίας βιολογικών μηχανισμών με σκοπό την αντιμετώπιση τους (Carbonara et al., 2019). Όσο παρατείνεται η έκθεση του οργανισμού σε αυτούς τους παράγοντες ενεργοποιείται η φάση της τριτογενούς απόκρισης, με επίδραση στη συμπεριφορά και στην απόδοση. Το stress λοιπόν, εκτός από τις μεταβολές στις φυσιολογικές λειτουργίες, μπορεί να οδηγήσει και σε σημαντικές συμπεριφορικές αλλαγές, οι οποίες έχουν ταξινομηθεί και ερμηνευτεί με διάφορους τρόπους (Koolhaas et al., 1999)).

Οι συμπεριφορικές αλλαγές δεν εξαρτώνται μόνο από τον τύπο του στρεσογόνου παράγοντα αλλά και από τις στρατηγικές αντιμετώπισης καταστάσεων ή αλλιώς ηθολογικά πρότυπα (coping styles) που χαρακτηρίζουν τα άτομα ενός πληθυσμού (Carbonara et al., 2019; Martins et al., 2012). Αυτή η ατομική διαφοροποίηση στην απόκριση μπορεί να εξηγήσει γιατί μία κατάσταση που είναι ανεκτή σε ένα οργανισμό μπορεί να είναι επιζήμια στον άλλον (Martins et al., 2012). Υπάρχουν δύο κύριες στρατηγικές αντιμετώπισης καταστάσεων που σχετίζονται με συμπεριφορικές και φυσιολογικές αλλαγές, οδηγώντας σε διαφορετικές προσαρμοστικές αποκρίσεις για την αντιμετώπιση του στρεσογόνου παράγοντα (Carbonara et al., 2019): Η προδραστική (proactive ή active coping ή “fight or flight”) και η αναδραστική (reactive ή passive coping ή “conservation-withdrawal”) (Henry, 1993; Koolhaas et al., 1999). Η προδραστική αντίδραση ή αντίδραση «πάλης ή φυγής» (“fight or flight” response) είναι μια βιολογικά καθορισμένη και εξελικτικά απαραίτητη αντίδραση του οργανισμού που ενεργοποιείται όταν έρχεται σε επαφή με μία πιθανή απειλή και χαρακτηρίζεται συμπεριφορικά από κυριαρχική, επιθετική, στερεοτυπική και έντονη εξερευνητική συμπεριφορά και άλλα πρότυπα συμπεριφοράς που υποδεικνύουν μια ενεργή προσπάθεια εξουδετέρωσης του στρεσογόνου ερεθίσματος (Fokkema & Scheurink, 1987); (Sluyter et al., 1996). Αντίθετα, η αναδραστική αντίδραση χαρακτηρίζεται από υποτακτική, επιφυλακτική και ευέλικτη συμπεριφορά με χαμηλά επίπεδα επιθετικότητας (Øverli et al., 2005). Όσον αφορά τις φυσιολογικές μεταβολές, η προδραστική στρατηγική αντιμετώπισης καταστάσεων χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη παραγωγή κορτικοστεροειδών και υψηλή συμπαθητική αντιδραστικότητα, ενώ το αντίθετο ισχύει για την αναδραστική αντίδραση (Koolhaas et al., 1999; Øverli et al., 2007; Pottinger & Carrick, 2001b).

Τα ψάρια που χαρακτηρίζονται από χαμηλή απόκριση κορτιζόλης τείνουν να κερδίζουν τις μάχες για την κοινωνική ιεραρχία (Pottinger & Carrick, 2001a), με αποτέλεσμα να έχουν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στην τροφή και έτσι μεγαλύτερη ανάπτυξη και αξιοποίηση της τροφής σε σχέση με τα ψάρια που χαρακτηρίζονται από υψηλή απόκριση κορτιζόλης (Øverli et al., 2006). Επίσης, σε μελέτη στην πέστροφα τα άτομα με χαμηλότερη απόκριση κορτιζόλης παρουσίασαν μεγαλύτερη αντοχή στο stress προκαλούμενο από υψηλή πυκνότητα εκτροφής (Trenzado et al., 2006). Οι στρατηγικές αντιμετώπισης καταστάσεων φαίνεται να επηρεάζουν την προσαρμοστικότητα ενός ατόμου σε ένα καινούριο σύστημα διατροφής, στην εξερεύνηση ενός νέου περιβάλλοντος (Martins et al., 2012) και στην ικανότητα μάθησης και μνήμης (Moreira et al., 2004; Ruiz-Gomez et al., 2011).

Η μάθηση ανήκει στις ανώτερες γνωστικές λειτουργίες, δηλαδή σε ανώτερες νοητικές διαδικασίες του εγκεφάλου και ενώ παλιότερα θεωρούνταν ότι τα ψάρια δεν έχουν την ικανότητα μάθησης πλέον είναι αποδεδειγμένο ότι μπορούν να μαθαίνουν, όπως να ανταποκρίνονται σε ένα συγκεκριμένο περιβαλλοντικό ερέθισμα αλλά και με την παρατήρηση και αλληλεπίδραση μεταξύ των ατόμων (Bshary & Brown, 2014; Salena et al., 2021). Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες μάθησης που έχουν παρατηρηθεί και στους ιχθύες, όπως η αποτύπωση (imprinting), η εξοικείωση (habituation), η εξαρτημένη μάθηση (κλασσική και συντελεστική), η μάθηση μέσω της μεθόδου δοκιμής - σφάλματος και τέλος η κοινωνική μάθηση ή μάθηση μέσω παρατήρησης.

Οι δείκτες αξιολόγησης της ευζωίας που σχετίζονται με τη συμπεριφορά θα πρέπει μεταξύ άλλων να βασίζονται σε επιστημονικά δεδομένα και να γίνεται η καταγραφή αυτών για μία εκτεταμένη περίοδο. Οι δείκτες συμπεριφοράς έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι γρήγοροι και εύκολοι στην παρατήρηση και επομένως θεωρούνται καλοί δείκτες για την αξιολόγηση της συμπεριφοράς στη μονάδα (Martins et al., 2012).

Στα μειονεκτήματα των δεικτών συμπεριφοράς μπορεί να είναι ότι συχνά μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου και είναι δύσκολο να ποσοτικοποιηθούν. Επίσης, οι παρατηρητές χρειάζονται επαρκείς δεξιότητες για την παρατήρηση της «γλώσσας του σώματος» των ζώων. Πολλές μελέτες που χρησιμοποιούν τη συμπεριφορά ως δείκτη ευζωίας δείχνουν ότι οι αλλαγές στη συμπεριφορά μπορούν να ερμηνευθούν διαφορετικά ανάλογα με το είδος των ψαριών. Είναι επομένως απαραίτητη η κατανόηση της βιολογίας κάθε είδους πριν την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την ευζωία. Επιπλέον, όπως αναφέρεται παραπάνω, διαφορετικά άτομα του ίδιου είδους μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετικές στρατηγικές αντιμετώπισης του stress και κάτι που είναι ανεκτό από ορισμένα άτομα μπορεί να είναι επιζήμιο για άλλα. Επομένως, η αξιολόγηση της ευζωίας σε λίγα άτομα μπορεί να μην αντιπροσωπεύει την ευζωία μιας ομάδας (Martins et al., 2012). Για αυτό έχουν αναπτυχθεί δείκτες συμπεριφοράς για την αξιολόγηση της ευζωίας όχι μόνο σε μεμονωμένα άτομα αλλά ολόκληρης της ομάδας χρησιμοποιώντας την τεχνολογία επεξεργασίας βίντεο και ψηφιακών εικόνων, αποδίδοντας τον ακριβή τρόπο και χρόνο αντίδρασης των ιχθύων, καθώς και λογισμικών για συλλογή και ανάλυση δεδομένων. Η τεχνολογία για την μελέτη και παρατήρηση της

συμπεριφοράς τόσο σε συνθήκες εργαστηρίου όσο και στο πεδίο εξελίσσεται όλο και περισσότερο (Bone & Moore, 2008). Είναι σημαντικό ότι η μελέτη της συμπεριφοράς με αυτόν τον τρόπο αποτελεί μία μη επεμβατική μέθοδο (Martins et al., 2012) και δίνει τη δυνατότητα καταγραφής δεδομένων συμπεριφοράς χωρίς την ανάγκη παρουσίας του ερευνητή (Bone & Moore, 2008).

Παρά τα πλεονεκτήματα της μελέτης της συμπεριφοράς, η μέτρηση της φυσιολογικής απόκρισης του stress, είναι ο κύριος τρόπος ώστε να διασφαλιστεί η ευζωία των οργανισμών (Ashley, 2007; Conte, 2004; Huntingford et al., 2006), καθώς όμως το stress είναι μία προσαρμοστική λειτουργία για την επαναφορά της ομοιόστασης του οργανισμού, δεν ισοδυναμεί με την ύπαρξη ευζωίας (Ashley, 2007).

1.4.3. Δείκτες καταπόνησης

Οι δείκτες ευζωίας (Welfare Indicators) μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με πολλούς τρόπους, όπως άμεσους/βιολογικούς δείκτες που αφορούν το ίδιο το ψάρι (όπως θνησιμότητα, υγεία, εξωτερική μορφολογία και τραυματισμοί, δυσμορφίες, διατροφή και όρεξη για θρέψη, σωματική αύξηση, αναπνευστικός ρυθμός κ.ά.) ή σε έμμεσους/περιβαλλοντικούς (όπως θερμοκρασία, αλατότητα, οξυγόνο, pH, αμμωνία, νιτρώδη και νιτρικά ιόντα, θολερότητα, ιχθυοπυκνότητα, φωτισμός κ.ά.) που σχετίζονται με το περιβάλλον ή την τεχνολογία εκτροφής και διαχείρισης (Noble et al., 2020; ΕΛΟΠΥ, 2019). Επίσης, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε επιχειρησιακούς δείκτες ευζωίας (Operational Welfare Indicators, OWIs), δηλαδή σε αυτούς που μπορούν να εκτιμηθούν απευθείας στη μονάδα εκτροφής, και στους εργαστηριακούς δείκτες ευζωίας (Laboratory-based Welfare Indicators, LBWIs), οι οποίοι αφορούν δείγματα, τα οποία αποστέλλονται για ανάλυση σε εξειδικευμένα εργαστήρια (Noble et al., 2020; ΕΛΟΠΥ, 2019). Οι άμεσοι/βιολογικοί δείκτες μπορεί να αφορούν ατομικά ένα ψάρι (π.χ. επίπεδο κορτιζόλης) ή το σύνολο των ψαριών (π.χ. ποσοστό θνησιμότητας) (Noble et al., 2020).

1.4.3.1. Κορτιζόλη και κατεχολαμίνες

Όπως αναφέρεται παραπάνω, η ένταση και η διάρκεια του στρεσογόνου παράγοντα προκαλεί ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών μηχανισμών με σκοπό την διατήρηση της ομοιόστασης. Οι δείκτες φυσιολογίας αφορούν τη λειτουργική έννοια της ευζωίας, η οποία βασίζεται στην καλή κατάσταση της υγείας και στη διατήρηση των φυσιολογικών λειτουργιών (Segner, 2019). Η κορτιζόλη, γνωστή και ως “ορμόνη του stress”, σχετίζεται με την ευζωία των ιχθύων καθώς επηρεάζει φυσιολογικές και εγκεφαλικές λειτουργίες όπως και συμπεριφορικές μεταβολές. Παρά το γεγονός ότι θεωρείται ένας αξιόπιστος δείκτης της οξείας καταπόνησης (Sopinka et al., 2016), η αξία της έχει αμφισβητηθεί όταν χρησιμοποιείται λαμβάνοντας υπόψη μόνο τη λειτουργική έννοια της ευζωίας (Ellis et al., 2012). Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης έχουν παρατηρηθεί σε διάφορα είδη ιχθύων υπό την επίδραση στρεσογόνων

παραγόντων όπως συνωστισμός για μικρό χρονικό διάστημα (Merkin et al., 2010), μεταφορά (The et al., 2010), έκθεση στο αέρα (Arends et al., 1999) κ.ά. Ωστόσο, η αξία της αμφισβητείται σε περιπτώσεις χρόνιου stress κατά το οποίο τα επίπεδα της παραμένουν σταθερά (Barton et al., 2005; Tort et al., 1996). Η κορτιζόλη έχει επικρατήσει ως κοινός δείκτης καταπόνησης γιατί εκτός από το γεγονός ότι αυξάνεται σε μερικά λεπτά μετά το οξύ stress (Molinero et al., 1997) και έτσι ποσοτικοποιείται ευκολότερα, η δειγματοληψία αίματος αποτελεί μια σχετικά απλή, τυπική τεχνική και δυνητικά μη θανατηφόρα. Στα πλεονεκτήματα ανήκει και η ευκολία μέτρησης με ανοσοδοκιμασίες ενώ η δράση της ως “ορμόνη του stress” είναι εύκολα κατανοητή από τον απλό αναγνώστη και τα επίπεδα στο αίμα ερμηνεύονται εύκολα καθώς παρουσιάζουν μονόδρομη (αυξανόμενη) απόκριση (Ellis et al., 2012). Επίσης, ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον εντοπισμό χρόνιου stress σε εντατικές συνθήκες υδατοκαλλιέργειας (Batzina et al., 2014).

1.4.3.2. Βιοχημικοί δείκτες

Βιοχημικοί (γλυκόζη, γαλακτικό οξύ κ.ά.), αιματολογικοί, ωσμορρυθμιστικοί, ανοσολογικοί και συμπεριφορικοί δείκτες χρησιμοποιούνται, επίσης, για την μελέτη της καταπόνησης των ιχθύων. Τα υψηλά επίπεδα της γλυκόζης είναι αποτέλεσμα του αύξησης του καταβολισμού και της απελευθέρωσης γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος κατά τη δευτερογενή απόκριση του οργανισμού (Barton, 2002), ενώ το αυξημένο επίπεδο γαλακτικού οξέος είναι δείκτης αναερόβιου μεταβολισμού μετά την υποξία και την έντονη κολυμβητική δραστηριότητα (Wood et al., 1983). Η μέτρηση της γλυκόζης και του γαλακτικού οξέος ανήκουν στους επιχειρησιακούς δείκτες ευζωίας, καθώς η εκτίμηση τους μπορεί να γίνει απευθείας στη μονάδα εκτροφής.

1.4.3.3. Αιματολογικοί δείκτες

Οι αιματολογικές παράμετροι είναι σημαντικές για την αξιολόγηση της φυσιολογικής κατάστασης των ψαριών και της παρακολούθησης του stress και των παθολογικών αλλαγών (Fazio et al., 2012). Το αιματολογικό προφίλ μπορεί να δώσει πολύτιμα στοιχεία σχετικά με την κατάσταση των ψαριών κατά τη διάρκεια περιβαλλοντικών και διατροφικών αλλαγών (Fazio, 2019; Fazio et al., 2015). Πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι η μέθοδος είναι απλή, οικονομική και δεν χρειάζεται εξειδικευμένο πρωτόκολλο. Το αίμα είναι ένας ρευστός ιστός και περιέχει έμμορφα συστατικά (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια και θρομβοκύτταρα-αντίστοιχα των αιμοπεταλίων των θηλαστικών), τα οποία αιωρούνται μέσα στο πλάσμα. Κύρια λειτουργία του αίματος είναι η μεταφορά αερίων, νερού, μετάλλων, ορμονών, τοξινών, θρεπτικών συστατικών και άχρηστων ουσιών που παράγονται κατά τον μεταβολισμό. Αιματολογικές παράμετροι, όπως ο αριθμός ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων, η αιμογλοβίνη και ο αιματοκρίτης αποτελούν συχνές μετρήσεις για

την αξιολόγηση της υγείας, με νέες παραμέτρους να δοκιμάζονται για την αποτελεσματικότητα τους (Ravardshiri et al., 2021). Η ποσοτικοποίηση της απόκρισης ιδανικά απαιτεί μετρήσεις πριν και μετά την επίδραση του στρεσογόνου παράγοντα, καθώς τυχόν διαφοροποίηση μεταξύ των τιμών θα μπορούσε να είναι μία ένδειξη stress. Ωστόσο πιο συχνά υπολογίζεται το επίπεδο του εκάστοτε δείκτη μετά την επίδραση του στρεσογόνου παράγοντα (Sopinka et al., 2016). Η χειρωνακτική μέθοδος ανάλυσης του αίματος είναι η πιο συχνή, καθώς στα ψάρια όλα τα αιματοκύτταρα είναι εμπύρνα. Απαιτεί γνώσεις, δεξιότητες και εμπειρία για την παραγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει προσπάθειες με αυτοματοποιημένους αναλυτές (Fazio et al., 2012), με σκοπό τον περιορισμό της χρονοβόρας διαδικασίας που απαιτεί η χειρωνακτική μέθοδος.

Το stress αποτελεί έναν από τους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τις αιματολογικές παραμέτρους. Επιπλέον, stress μπορεί να προκληθεί και από την ίδια την δειγματοληψία αν γίνει από άτομο χωρίς την κατάλληλη εμπειρία ή αν η διαδικασία είναι μεγάλη σε διάρκεια (Witeska et al., 2022). Για τη μείωση του stress της δειγματοληψίας τα ψάρια πρέπει να απομακρύνονται αμέσως από το νερό, να αναισθητοποιούνται, έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται ο πόνος ή η δυσφορία και η αιμοληψία να γίνεται όσο το δυνατόν πιο γρήγορα. Η απώλεια συνείδησης μέσω της αναισθητοποίησης διασφαλίζει την ευζωία των ιχθύων κατά τη αιμοληψία.

Οι αλλαγές στις αιματολογικές παραμέτρους προκαλούμενες από stress εξαρτώνται από τον τύπο, το μέγεθος και το χρόνο επίδρασης του στρεσογόνου παράγοντα (Burgos-Aceves et al., 2019). Το stress μπορεί να μεταβάλλει τις τιμές αιματολογικών παραμέτρων όπως τον αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων, του αιματοκρίτη, της αιμογλοβίνης και του μέσου αριθμού ερυθροκυττάρων (MCV), άλλα και βιοχημικών παραμέτρων όπως τα επίπεδα κορτιζόλης, γλυκόζης και κατεχολαμινών. Επίσης, μπορεί να μεταβάλλει τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων, όπως και τον αριθμό κάθε τύπου λευκοκυττάρων (DLC). Τυπικά το οξύ stress προκαλεί μία αύξηση στον αριθμό των λευκοκυττάρων, ενώ το χρόνιο και/ή έντονο stress προκαλεί μείωση των λευκών αιμοσφαιρίων ως ένδειξη εξασθενημένης άμυνας (Tort, 2011).

1.5. Πρόσθετες ύλες ζωοτροφών

Η ταχεία ανάπτυξη της σύγχρονης ιχθυοκαλλιέργειας περιλαμβάνει την αυξανόμενη χρήση τυποποιημένων ιχθυοτροφών και την εντατικοποίηση των συστημάτων εκτροφής (Tal et al., 2009). Το ενδιαφέρον για εναλλακτικές πηγές στη διατροφή των ιχθύων έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες. Υπάρχει πλήθος μελετών που εξετάζουν εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών και λιπιδίων για να καταστεί εφικτή η αντικατάσταση ενός σημαντικού ποσοστού των ιχθυαλεύρων-ιχθυελαίων με σκοπό την προστασία των ιχθυοαποθεμάτων. Επιπλέον, εξετάζονται πρόσθετα ιχθυοτροφών στη διατροφή των ψαριών με στόχο τη βελτίωση της ανάπτυξης, την αποτελεσματικότητα της τροφής, την βελτίωση της κατάστασης της υγείας, την ανοχή στο stress και την αντοχή σε ασθένειες.

Το 2003 θεσπίστηκε ο κανονισμός 1831/2003 για τις πρόσθετες ύλες που χρησιμοποιούνται στη διατροφή των ζώων. Ο κανονισμός ορίζει μια τυποποιημένη διαδικασία για τη χορήγηση άδειας κυκλοφορίας σε πρόσθετες ύλες ζωοτροφών και θεσπίζει κανόνες για την επισήμανση, τη διάθεση στην αγορά και τη χρήση τους. Αναλυτικότερα, οι αιτήσεις για τη χορήγηση άδειας υποβάλλονται στην Επιτροπή, οι οποίες κοινοποιούνται στις χώρες της ΕΕ, προτού διαβιβαστούν στην Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA). Η EFSA είναι υπεύθυνη για τη διενέργεια της αξιολόγησης κινδύνου και γνωμοδοτεί εντός 6 μηνών από την παραλαβή μιας αίτησης. Με βάση τη γνωμοδότηση της EFSA, η Επιτροπή αποφασίζει εάν θα εγκρίνει ή θα απορρίψει τη χορήγηση άδειας για την πρόσθετη ύλη. Οι Κανονισμοί επικαιροποιούνται συνεχώς και προστίθενται νέες Εγκρίσεις Προσθέτων Υλών Ζωοτροφών, οι οποίες είναι διαθέσιμες στη σελίδα του ΥΠΑΑΤ.

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή οι πρόσθετες ύλες ζωοτροφών είναι ουσίες, μικροοργανισμοί ή παρασκευάσματα, πλην των πρώτων υλών ζωοτροφών και των προμιγμάτων, που προστίθενται σκόπιμα στις ζωοτροφές ή στο νερό προκειμένου να επιτελέσουν λειτουργίες όπως η ικανοποίηση των διατροφικών αναγκών των ζώων και η θετική επίδραση στα χαρακτηριστικά των ζωοτροφών ή των ζωικών προϊόντων, στο χρώμα των διακοσμητικών ιχθύων, στον περιορισμό των περιβαλλοντικών συνεπειών της ζωικής παραγωγής, στην επίδοση ή την καλή διαβίωση των ζώων κ.ά.

Υπάρχουν πολλές κατηγορίες πρόσθετων ζωοτροφών και οι χρήσεις τους ποικίλλουν. Περιλαμβάνουν συγκολλητικές ουσίες που βοηθούν στη συνεκτικότητα των συμπηκτων, χρωστικές ύλες-καροτενοειδή που προσδίδουν χρώμα στη σάρκα και το δέρμα, φάρμακα και αντιβιοτικά που έχουν εγκριθεί και συνταγογραφηθεί, αρωματικές και ελκυστικές ουσίες, πρεβιοτικά, προβιοτικά, εκχυλίσματα φαρμακευτικών φυτών, συντηρητικά, ένζυμα, αντιμικροβιακούς παράγοντες, αντιοξειδωτικές ουσίες κ.ά.

1.5.1. Φυτοβιοτικά (Phytobiotics) στις υδατοκαλλιέργειες

Η αυξανόμενη ζήτηση των καταναλωτών για ασφαλή και ποιοτικά εκτρεφόμενα ψάρια έχει ως αποτελέσματα να εντείνεται ολοένα και περισσότερο η προσπάθεια για την εύρεση και ανάπτυξη ασφαλών πρόσθετων και συμπληρωμάτων διατροφής (Dawood et al., 2018; Harikrishnan et al., 2011). Τα φυτοβιοτικά προέρχονται από διάφορα φαρμακευτικά βότανα και αντιπροσωπεύουν μια εναλλακτική λύση στα αντιβιοτικά και τα χημικά πρόσθετα (Awad & Awaad, 2017) λόγω του χαμηλού κόστους (Abasali & Mohamad, 2010; Volpatti et al., 2013), της εύκολης διαθεσιμότητας και της ελάχιστης περιβαλλοντικής επιβάρυνσης (Faheem et al., 2022). Ως φαρμακευτικά φυτά μπορούν να οριστούν τα φυτά που διαθέτουν θεραπευτικές ιδιότητες ή ασκούν ευεργετική φαρμακολογική επίδραση στον ανθρώπινο ή ζωικό οργανισμό (Namdeo, 2018). Τα φαρμακευτικά φυτά είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά καθώς και σε βιοενεργά συστατικά, τα οποία σύμφωνα με τον (Buchanan et al., 2000) χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες (i)

τερπένια και τερπενοειδή (περίπου 25.000 τύποι), (ii) αλκαλοειδή (περίπου 12.000 τύποι) και (iii) φαινολικές ενώσεις (περίπου 8000 τύποι).

Τα φυτογενή πρόσθετα μπορεί να προέρχονται από αποξηραμένους και αλεσμένους σπόρους, ρίζες, φύλλα, φλούδες, κλαδιά, φλοιούς, μίσχους, άνθη και φρούτα από βότανα και μπαχαρικά ή εκχυλίσματα από διαφορετικά μέρη φυτών με τη μορφή αιθέριων ελαίων (Erol-florian et al., 2011). Τα αιθέρια έλαια είναι ένα πολύπλοκο μίγμα διαφορετικών πτητικών ενώσεων και αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη ομάδα φυτογενών πρόσθετων ζωοτροφών (Phytogenic Feed Additives-PFAs) (Jacela et al., 2010; Yang et al., 2015; Zeng et al., 2015).

Η παραγωγή των αιθέριων ελαίων γίνεται σε ειδικούς εκκριτικούς μηχανισμούς των φυτών, που λέγονται ελαιαδένες (Φουνορμίτη, 2017). Τα αιθέρια έλαια έχουν διαφορετικές ιδιότητες, που οφείλονται στα συστατικά τους. Αυτά ανήκουν στα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και δεν απαιτούνται για την ομαλή διεξαγωγή των βασικών φυσιολογικών λειτουργιών σε αντίθεση με τους πρωτογενείς μεταβολίτες, όπως οι υδατάνθρακες, τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια (Azmir et al., 2013). Ο βιολογικός τους ρόλος δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρος, αν και θεωρείται ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες εμπλέκονται σε μία σειρά από οικοφυσιολογικούς ρόλους (Γαρδέλη, 2009) όπως η προσέλκυση επικονιαστών και η προστασία του φυτού.

Τις περισσότερες φορές οι βιοδραστικές ιδιότητες ενός αιθέριου ελαίου καθορίζονται από ένα ή δύο από τα κύρια συστατικά του (Bakkali et al., 2008). Ωστόσο, μερικές φορές η συνολική δραστηριότητα δεν μπορεί να αποδοθεί σε κανένα από τα κύρια συστατικά αλλά στο συνδυασμό τους. Επίσης, συνδυασμός διαφορετικών βοτάνων και αιθέριων ελαίων έχει αποδειχτεί ότι προάγει την ανάπτυξη (Zeng et al., 2015).

Με τα ισχυρά αρωματικά χαρακτηριστικά και τη βιοδραστικότητα τους, τα αιθέρια έλαια έχουν χρησιμοποιηθεί από την αρχαιότητα στην αρωματοθεραπεία, ως πρόσθετα γεύσης και αρωμάτων, στα καλλυντικά και στα τρόφιμα. Τα τελευταία χρόνια, συγκεντρώνουν το παγκόσμιο ενδιαφέρον, και χρησιμοποιούνται ευρέως ως φαρμακευτικά προϊόντα, φυσικά συντηρητικά, πρόσθετα και βιοκτόνα (Ambrosio et al., 2017; Prakash et al., 2015).

Ως προς τις φυσικές ιδιότητες, τα αιθέρια έλαια είναι διαυγή, συνήθως άχρωμα ή απαλά κίτρινα ελαιώδη υγρά και εξαιρετικά πτητικά. Χαρακτηρίζονται από υψηλό δείκτη διάθλασης. Τα περισσότερα είναι οπτικώς ενεργά με στροφική ικανότητα που είναι συνήθως πολύτιμη διαγνωστική ιδιότητα. Είναι λιποδιαλυτά και διαλυτά στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες (Baser & Buchbauer, 2015). Επίσης, είναι υδρόφοβα και παρουσιάζουν πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό, καθώς έχουν χαμηλότερη πυκνότητα (Baser & Buchbauer, 2015). Εξ' αιτίας της μοριακής τους δομής, είναι ασταθή και οξειδώνονται εύκολα όταν εκτίθενται στο φως, στον αέρα και στις υψηλές θερμοκρασίες (Martin et al., 2010). Συνεπώς, πρέπει να φυλάσσονται σε σκουρόχρωμα, ερμητικά κλειστά φιαλίδια και σε χαμηλές θερμοκρασίες (Turek & Stintzing, 2013).

Τα γενετικά χαρακτηριστικά του φυτού είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που καθορίζει τη χημική σύνθεση του αιθέριου ελαίου (De FreitasSouza et al., 2019). Οι μέθοδοι εξαγωγής των αιθέριων ελαίων, οι εδαφικές (εδαφική σύσταση, pH, οργανική ουσία κ.ά) και περιβαλλοντικές συνθήκες, οι συνθήκες καλλιέργειας και ο χρόνος συγκομιδής κ.λπ. (Barzalona & Casanova, 2008) επηρεάζουν, επίσης, τη χημική σύνθεση.

Τα αιθέρια έλαια απαντώνται σε διάφορα μέρη των φυτών όπως μπουμπούκια, λουλούδια, φύλλα, φρούτα, ξύλο, ρίζες ή ριζώματα ή μπορούν να υπάρχουν σε ολόκληρο το φυτό. Επίσης, η χημική σύσταση μπορεί να είναι διαφορετική στα επιμέρους όργανα του φυτού (Γαρδέλη, 2009). Οι κύριες μέθοδοι εξαγωγής είναι με απόσταξη ατμού και η εκχύλιση με διαλύτη (Capuzzo et al., 2013; Reyes-Jurado et al., 2015).

Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων κατατάσσονται σε δύο ομάδες χημικών ουσιών, τους υδρογονάνθρακες και τις οξυγονωμένες ενώσεις (Σκουμπής, 1998). Οι υδρογονάνθρακες αποτελούνται κυρίως από τερπένια, τα οποία είναι γνωστά ως η κύρια κατηγορία συστατικών αιθέριων ελαίων και είναι μια μεγάλη ομάδα φυσικών προϊόντων. Τα τερπένια παράγονται στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων και συντίθενται συνήθως κατά το βιοσυνθετικό μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος. Η δομή τους προκύπτει από τη συνένωση πολλών μονάδων ισοπρενίου (C_5H_8) και κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τον αριθμό αυτών των μονάδων στο σκελετό του άνθρακα (Dorman and Deans 2004). Τα κύρια τερπένια είναι τα μονοτερπένια ($C_{10}H_{16}$) και τα σεσκιτερπένια ($C_{15}H_{24}$). Τα διτερπένια ($C_{20}H_{32}$) και τα τριτερπένια ($C_{30}H_{40}$) βρίσκονται σε μικρότερη συγκέντρωση. Χαρακτηριστικό των τερπενίων είναι η έντονη οσμή με την οποία μπορούν να προστατέψουν τα φυτά, είτε αποτρέποντας τους φυτοφάγους οργανισμούς από το να τα καταναλώσουν, είτε προσελκύοντας θηρευτές ή/και παράσιτα των φυτοφάγων οργανισμών (Martin et al., 2003).

Όταν τα τερπένια υποστούν βιοχημικές τροποποιήσεις μέσω ενζύμων που προσθέτουν μόρια οξυγόνου και μετακινούν ή αφαιρούν ομάδες μεθυλίου (Caballero et al., 2003), οι ενώσεις που προκύπτουν ονομάζονται τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή. Τα τερπενοειδή αποτελούν μία μεγάλη κατηγορία ενώσεων με αντικαρκινικές, αντιπαρασιτικές, αντιμικροβιακές, αντιαλλεργικές, αντισπασμωδικές, αντιπεργλυκεριμικές, αντιφλεγμονώδεις και ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες (Ajikumar et al., 2008). Οι οξυγονωμένες ενώσεις περιλαμβάνουν κυρίως εστέρες, αλκοόλες, αλδεϋδες, κετόνες, φαινόλες και οξείδια (Φουνορμίτη, 2017).

Τα αιθέρια έλαια περιέχουν, επίσης, συστατικά που ανήκουν στην κατηγορία των αρωματικών ενώσεων (του φαινυλοπροπανίου), τα οποία συντίθενται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος, όπως η ευγενόλη, η κινναμαλδεϋδη και η σαφρόλη (Dhifi et al., 2016).

Ενώ τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται στη διατροφή των αγροτικών ζώων εδώ και τέσσερις δεκαετίες, η προσθήκη τους στη διατροφή των ψαριών είναι σχετικά

καινούρια (Amer et al., 2018). Τα τελευταία χρόνια αυτό φαίνεται να αλλάζει, καθώς πλήθος ερευνητών συμφωνεί ότι τα φαρμακευτικά φυτικά εκχυλίσματα έχουν θετικά αποτελέσματα στην παραγωγή ιχθύων, καθώς περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία θρεπτικών ουσιών, χημικών ενώσεων και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, με σεβασμό προς το περιβάλλον (Kalembe & Kunicka, 2005) και περιορισμένες παρενέργειες στα ζώα (Bandeira et al., 2017).

Οι αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων έχουν μελετηθεί εκτενώς και αποδίδονται κυρίως στα φαινολικά συστατικά, με πιο δραστικές ενώσεις, τη θυμόλη και την καρβακρόλη (Faheem et al., 2022). Λόγω της λιπόφιλης φύσης τους, τα αιθέρια έλαια προκαλούν αυξημένη διαπερατότητα των βακτηριακών κυτταρικών μεμβρανών που οδηγεί στη διαρροή κυτταρικών συστατικών και την απώλεια ιόντων (Oussalah et al., 2006; Saad et al., 2013). Γενικά, ο μηχανισμός αντιβακτηριακής δράσης προκαλείται από μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων στο βακτηριακό κύτταρο, οι οποίες εξαρτώνται από τον τύπο των χημικών συστατικών που υπάρχουν στο αιθέριο έλαιο (Burt, 2004; Nazzaro et al., 2013). Πλήθος μελετών αφορά την επίδραση των αιθέριων ελαίων ως προαγωγούς ανάπτυξης λόγω της ικανότητας βελτίωσης της πέψης, διεγείροντας την έκκριση πεπτικών ενζύμων (Lee et al., 2004) και απορρόφησης θρεπτικών συστατικών (Petrolli et al., 2012). Επιπλέον, η προσοχή έχει επικεντρωθεί στη χρήση φυτικών εκχυλισμάτων ως αναισθητικά στους εκτρεφόμενους ιχθύες, λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων τους στην υγεία (Hoseini, Mirghaed, et al., 2018; Zeppenfeld et al., 2014). Πλήθος μελετών δείχνουν ότι πολλά αιθέρια έλαια, που χρησιμοποιούνται ως αναισθητικά μειώνουν την καταπόνηση που προκαλούν οι διάφορες χειριστικές πρακτικές στις ιχθυοκαλλιέργειες (Benovit et al., 2012; Bodur, Afonso, et al., 2018; Bodur, León-Bernabeu, et al., 2018; da Cunha et al., 2010; Hoseini, Mirghaed, et al., 2018) μειώνοντας τα επίπεδα της κορτιζόλης στο πλάσμα (da Cunha et al., 2010; Zeppenfeld et al., 2014). Η μείωση της κορτιζόλης στο πλάσμα σε διάφορα είδη ψαριών πιθανώς οφείλεται στην ικανότητα των αιθέριων ελαίων να εμποδίζουν την αισθητηριακή μετάδοση στον υποθάλαμο και την επακόλουθη ενεργοποίηση της αλληλουχίας έκκρισης ορμονών (Gressler et al., 2014; Saccol et al., 2017). Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δράσης των αιθέριων ελαίων στην μείωση της κορτιζόλης δεν έχει εξακριβωθεί (Saccol, Jerez-Cepa, et al., 2018). Ένα από τα πιο γνωστά και αποτελεσματικά αιθέρια έλαια που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες είναι το γαρυφαλέλαιο, το οποίο προέρχεται από το δέντρο του είδους *Syzygium aromaticum*, και δεν προκαλεί παρενέργειες στα ψάρια (Javahery et al., 2012).

Τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται ευρέως ως φυσικά συντηρητικά στα ψάρια με τα πιο διαδεδομένα τη ρίγανη, το δενδρολίβανο, το θυμάρι, τη δάφνη, το φασκόμηλο, την κανέλα, το γαρύφαλλο και τον βασιλικό (Hussain et al., 2021). Ωστόσο, αναφέρεται ότι η εφαρμογή των αιθέριων ελαίων με σκοπό τη συντήρηση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Atarés & Chiralt, 2016). Σε μελέτες σχετικά με τη χρήση των αιθέριων ελαίων ως αναισθητικά στο είδος *Rhamdia* sp. (da Cunha et al., 2010) και στην τιλάπια (*Oreochromis niloticus*) (Hohlenwerger et al., 2016; Teixeira et al.,

2017) και την επίδραση τους στη γεύση και την οσμή, τα οποία είναι από τα βασικότερα κριτήρια για έναν καταναλωτή, δεν προκλήθηκε κάποια διαφοροποίηση.

Η γενική επίδραση των φυτογενών πρόσθετων είναι δύσκολο να ερμηνευτεί καθώς λίγα από αυτά έχουν δοκιμαστεί σε περισσότερα από ένα είδη ιχθύων κατά τη διάρκεια διαφορετικών στρεσογόνων παραγόντων, ενώ οι περισσότερες μελέτες εστιάζουν στα είδη γλυκού νερού (De FreitasSouza et al., 2019). Επιπλέον, ο τύπος και τα χαρακτηριστικά των στρεσογόνων παραγόντων που χρησιμοποιούνται μπορεί να διαφέρουν δυσκολεύοντας τη σύγκριση μεταξύ των αιθέριων ελαίων. Ενώ, άλλοι παράγοντες που εμποδίζουν την σύγκριση μεταξύ αιθέριων ελαίων είναι η ύπαρξη διαφορετικών χημειότυπων για το ίδιο είδος φυτού και η μεταβλητότητα της χημικής σύνθεσης των αιθέριων ελαίων ακόμη σε φυτά με τον ίδιο χημειότυπο (De FreitasSouza et al., 2019).

Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα φαρμακευτικά εκχυλίσματα φυτών μπορούν να αποτελέσουν τα ίδια στρεσογόνα παράγοντα για τους ιχθύες, αν οι συγκεντρώσεις τους δεν είναι κατάλληλες. Για αυτόν τον λόγο, είναι απαραίτητο να εκτιμηθεί η επίδραση τους σε διαφορετικά είδη ιχθύων, θαλασσινού και γλυκού νερού, έτσι ώστε να βρεθεί το ιδανικό εύρος συγκέντρωσης και ο ιδανικός τρόπος λήψης (Suttili et al., 2018).

1.5.1.1. Κάνναβη (*Cannabis sativa*)

Βασίλειο: Φυτά (Plantae)

Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)

Ομοταξία: Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)

Τάξη: Κνιδώδη (Urticales)

Οικογένεια: Κανναβοειδή (Cannabaceae)

Γένος: Κάνναβις (*Cannabis*)

Είδος: Κάνναβη η ήμερη (*C. sativa*)

Τα τελευταία χρόνια το φυτό *C. sativa* είναι στο κέντρο της προσοχής της επιστημονικής κοινότητας και τείνει να γίνει ένα από τα πιο μελετημένα φυτά (Chandra et al., 2017). Η *C. sativa* είναι ανθοφόρο φυτό της οικογένειας Cannabaceae (Linnaeus, 1753) που περιλαμβάνει τρία διακριτά είδη: *C. sativa* (κάνναβη η ήμερη), *C. indica* (ινδική κάνναβη) και *C. ruderalis* Janisch. Η διαφορά τους έγκειται σε μορφολογικά, φυτοχημικά και ανατομικά χαρακτηριστικά όπως το σχήμα των φύλλων και η περιεκτικότητά τους σε ορισμένες δραστικές ουσίες. Η προέλευση του φυτού εντοπίζεται στην Κεντρική και Δυτική Ασία αλλά μπορεί εύκολα να αναπτυχθεί και να καλλιεργηθεί παγκοσμίως, σε περιοχές με εύκρατο και ξηρό κλίμα. Περιλαμβάνει περισσότερες από 400 χημικές ενώσεις, περισσότερες από 60 από τις

οποίες είναι τερπενοχημικές ενώσεις γνωστές ως κανναβινοειδή, που βρίσκονται στη ρητίνη που παράγεται από τα άνθη (ταξιανθίες) και τα φύλλα (Adams & Martin, 1996; Atakan, 2012). Το πιο σημαντικό από αυτά τα κανναβινοειδή είναι η Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (THC) που είναι το κύριο ψυχοδραστικό συστατικό του φυτού (Adams & Martin, 1996) και η κανναβιδιόλη (CBD) που δεν προκαλεί ευφορία (Pandelides et al., 2020).

Λόγω των διαφόρων παρενεργειών των κανναβινοειδών, σε πολλές χώρες υπάρχει νομοθετικό πλαίσιο για τα ανώτατα όρια της THC στα προϊόντα. Η διαφορά μεταξύ της κάνναβης (hemp) και της μαριχουάνας είναι η ποσότητα σε THC. Η κάνναβη με περιεκτικότητα σε THC κάτω του 0,2%, ονομάζεται αλλιώς βιομηχανική, κλωστική ή ήμερη κάνναβη και καλλιεργείται ειδικά, έτσι ώστε να περιέχει τη συγκεκριμένη ποσότητα αυτού του ψυχοδραστικού συστατικού. Ποικιλίες οι οποίες προέρχονται από το φυτό *C. sativa* και περιέχουν ποσοστό THC πάνω από 0,3% χαρακτηρίζονται ως μαριχουάνα.

Το 2016 σύμφωνα με κοινή υπουργική απόφαση (Ν. 929/2016) νομιμοποιήθηκε εκ νέου η καλλιέργεια βιομηχανικής ή κλωστικής κάνναβης (*C. sativa* L. περιεκτικότητας σε THC κάτω του 0,2% στην Ελλάδα. Την άνοιξη του 2018 ψηφίστηκε από την ελληνική βουλή (Ν. 4523/2018) η καλλιέργεια και παραγωγή τελικών προϊόντων φαρμακευτικής κάνναβης *C. sativa* περιεκτικότητας σε THC άνω του 0,2% με αποκλειστικό σκοπό την παραγωγή τελικών προϊόντων φαρμακευτικής κάνναβης για την προμήθεια του κρατικού μονοπωλίου και τη διάθεση τους σε ασθενείς ή την εξαγωγή τους, για ιατρικούς και μόνο σκοπούς.

Η κάνναβη θεωρείται ένα από τα παλαιότερα φυτά που καλλιεργούνται και είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά και φαρμακευτικά οφέλη (Vonapartis et al., 2015). Η κάνναβη καλλιεργείται για μια πληθώρα αγροβιομηχανικών τομέων όπως η γεωργία, η κλωστοϋφαντουργία, η χαρτοποιία, οι δομικές κατασκευές, τα βιοκαύσιμα, τα τρόφιμα, η προσωπική φροντίδα και τα καλλυντικά (Salentijn et al., 2015).

Οι ίνες, τα αιθέρια έλαια και οι σπόροι είναι πολύτιμα προϊόντα που προέρχονται από διαφορετικά μέρη του φυτού. Οι σπόροι της κάνναβης θεωρούνται από τις πιο πλήρεις διατροφικές πηγές λόγω της υψηλής διατροφικής αξίας. Συγκεκριμένα, περιέχουν: 25-35% λίπη με μοναδική ισορροπημένη σύνθεση λιπαρών οξέων για τον ανθρώπινο οργανισμό, 20-25% εύπεπτες πρωτεΐνες, πλούσιες σε απαραίτητα αμινοξέα, 20-30% υδατάνθρακες, βιταμίνες και μεταλλικά στοιχεία (Farinon et al., 2020; Oomah et al., 2002). Από τους σπόρους της βιομηχανικής κάνναβης παράγεται έλαιο (hemp seed oil) υψηλής διατροφικής αξίας με τη μέθοδο της ψυχρής σύνθλιψης. Εκτός από τη θρεπτική του αξία, ο σπόρος κάνναβης είναι επίσης πλούσιος σε φυσικά αντιοξειδωτικά όπως το φαινολικές ενώσεις και τοκοφερόλες (Andre et al., 2016). Τα φυτοχημικά συστατικά του ελαίου κάνναβης ποικίλλουν λόγω του ευρέος φάσματος ποικιλιών κάνναβης, οι οποίες καλλιεργούνται και επεξεργάζονται υπό διαφορετικές συνθήκες.

Στοιχεία σύμφωνα με τον FAO (2019) έδειξαν ότι η παγκόσμια παραγωγή σπόρων κάνναβης έχει αυξηθεί τα τελευταία 60 χρόνια, με την παραγωγή να ξεπερνάει τους 100.000 τόνους (Moscarriello et al., 2021). Αυτό οφείλεται στην ταχεία αύξηση της αγοράς σπόρων κάνναβης κάθε χρόνο, αποτέλεσμα της αυξανόμενης ζήτησης για προϊόντα κάνναβης (Alonso-Esteban et al., 2020).

Οι σπόροι κάνναβης αλλά και τα προϊόντα που προέρχονται από αυτούς έχουν μελετηθεί αρκετά ως προς τις ευεργετικές τους ικανότητες. Υπάρχει μεγάλος αριθμός μελετών σχετικά με την επίδραση τους στην ανάπτυξη και επιβίωση άλλα και στη θρεπτική σύσταση και στο προφίλ λιπαρών οξέων στα κοτόπουλα κρεοπαραγωγής και ωοπαραγωγής (Eriksson & Wall, Gakhar et al., 2016 ; Khan et al., 2010) στους χοίρους (Mourot & Guillevis, 2015 Vodolazska & Lauridsen 2020, στις όρνιθες (Silversides & Lefrancois, 2005 (Goldberg et al., 2012) και στις αγελάδες (Winders et al., 2022). Ο αριθμός των μελετών σχετικά με τη διερεύνηση της συμπεριφοράς κατά την τροφολησία με σπόρους κάνναβης και των προϊόντων τους είναι περιορισμένη ωστόσο υπάρχει πρόσφατη μελέτη στις αγελάδες (Winders et al., 2022). Επίσης, διενεργούνται πολλές έρευνες στους αρουραίους, στα ποντίκια και στα κουνέλια γύρω από την ευεργετική τους δράση ενάντια σε καρδιαγγειακές παθήσεις (Farinon et al., 2020). Ωστόσο, αν και έχουν μελετηθεί αρκετά οι επιδράσεις φαρμακευτικών φυτών στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών, οι ιδιότητες της κάνναβης στον τομέα αυτό είναι ακόμα άγνωστες. Ο αριθμός των μελετών είναι μικρός ενώ για κάποια είδη ψαριών όπως το λαβράκι (Webster et al., 2000) και η τιλάπια (*O. niloticus*) (Saoud et al., 2018) έχει μελετηθεί η επίδραση των σπόρων κάνναβης στην ανάπτυξη, στην επιβίωση και στη θρεπτική σύσταση αλλά και στο αιματολογικό προφίλ.

1.5.1.2. Ρίγανη (*Origanum vulgare*)

Βασίλειο: Φυτά (Plantae)

Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)

Ομοταξία: Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)

Τάξη: Λαμιώδη (Lamiales)

Οικογένεια: Χειλανθή (Lamiaceae)

Γένος: Ορίγανον (*Origanum*)

Είδος: *O. vulgare*

Η ρίγανη (*O. vulgare*) είναι εγγενές φυτό της μεσογειακής χλωρίδας και ανήκει στην οικογένεια των χειλανθών (Lamiaceae family). Είναι γνωστό για τις φαρμακευτικές ιδιότητες του και χρησιμοποιείται στην ιατρική από τα αρχαία χρόνια (Chishti et al., 2013; Oniga et al., 2018).

Το αιθέριο έλαιο του φυτού (*O. vulgare*) περιέχει πάνω από 34 ενεργά συστατικά (Bampidis et al., 2005) και αποτελείται κυρίως από φαινόλες, καρβακρόλη και θυμόλη, 780–820 g/Kg, (Sivropoulou et al., 1996), καθώς και τα πρόδρομα μόρια p-κυμένιο (~70 g/ kg) και γ-τερπινένιο (~50 g/kg) αντίστοιχα (Adam et al., 1998).

Η ρίγανη *Origanum* sp., έχει αποδειχτεί ότι έχει αντιβακτηριακές (S. A. Burt & Reinders, 2003; J. L. T. M. de Oliveira et al., 2009; E. L. De Souza et al., 2006; Sivropoulou et al., 1996), αντιμυκητιακές (Cleff et al., 2010), αντιφλεγμονώδεις (Ocaña-Fuentes et al., 2010) και ανθελμινθικές ιδιότητες

Το αιθέριο έλαιο ρίγανης έχει χρησιμοποιηθεί στη δίαιτα διάφορων ζώων όπως πρόβατα (Dudko et al., 2018), γουρούνια (Ariza-Nieto et al., 2011; C. Cheng et al., 2017; Ranucci et al., 2015) και κοτόπουλα κρεοπαραγωγής (Ghazi et al., 2015; Giannenas et al., 2003; Mohiti-Asli & Ghanaatparast-Rashti, 2015). Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να μειώσει την ηπατοτοξικότητα και τη γενετοξικότητα στα ποντίκια (Habibi et al., 2015) και τη νεφροτοξικότητα (Mirzaei et al., 2016) στους αρουραίους.

Στους ιχθύες, το αιθέριο έλαιο ρίγανης έχει αποδείξει τις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιβακτηριακές του ιδιότητες, όπως και την ικανότητα του να προάγει την ανάπτυξη (Alagawany et al., 2020). Επιπλέον, έχει μελετηθεί και η αναισθητική (Bodur, Afonso, et al., 2018) και αντιγενετοξική του δράση (Khafaga et al., 2020).

Συγκεκριμένα, σε πολλές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η ρίγανη (*O. vulgare*) δρα ως παράγοντας ανάπτυξης και αποδοτικότητας της τροφής στον κυπρίνο (*Cyprinus carpio* L.) (Abdel-Latif et al., 2020), στην τιλάπια (*O. niloticus*) (El-Hawarry et al., 2018; Mohammadi et al., 2020), στο είδος *Astyanax altiparanae* (de Moraes França Ferreira et al., 2014), στο είδος *Ictalurus punctatus* (Zheng et al., 2009), στο λαβράκι (Dinardo et al., 2020), στην ιριδίζουσα πέστροφα (*O. mykiss*) (Ahmadifar et al., 2011) και στην *Tilapia zillii* (Mabrok & Wahdan, 2018). Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που διαφωνούν και καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης δεν βελτιώνει την ανάπτυξη (García Beltrán et al., 2020).

Το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου ρίγανης, η καρβακρόλη, (5-isopropyl-2-methylphenol), έχει αναγνωριστεί ως ασφαλές πρόσθετο τροφίμων από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και την επιτροπή FAO/WHO για τα πρόσθετα τροφίμων (JECFA) και έχει εφαρμοστεί στη διατροφή εκτρεφόμενων ζώων ως προαγωγός ανάπτυξης και υγείας (Can Baser, 2008). Η καρβακρόλη ειδικότερα εμφανίζει μια σειρά βιολογικών δράσεων όπως αντιμικροβιακή, αντινεοπλασματική, αντιμεταλλαξιογόνο, αντιγενετοξική, αναλγητική, αντισπασμωδική, αντιφλεγμονώδη, αντιαγγειογενετική, αντιπαρασιτική, αντιοξειδωτική, ηπατοπροστατευτική κ.ά. (Can Baser, 2008). Ο αριθμός των μελετών για την επίδραση της καρβακρόλης στα διάφορα είδη ψαριών τα τελευταία χρόνια αυξάνεται και ήδη έχουν μελετηθεί είδη όπως η τιλάπια (*O. niloticus*) (Rattanachaiakunsopon & Phumkhachorn, 2010), το λαβράκι (Volpatti et al., 2013), το

είδος *Ictalurus punctatus* (Zheng et al., 2009) και η πέστροφα (Yilmaz et al., 2015), άλλα και η συνεργατική δράση καρβακρόλης-θυμόλης στο sturgeon (*Huso huso*) (Ahmadifar et al., 2014) και στην τσιπούρα (Pérez-Sánchez et al., 2015). Η θυμόλη (2-isopropyl-5-ethylphenol) είναι γνωστή για τις αντιοξειδωτικές (Abd-Elhakim & Mohamed, 2016), αντιμικροβιακές (Marchese et al., 2016), και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της (Riella et al., 2012). Στον κλάδο των υδατοκαλλιεργειών υπάρχουν αντιφατικές μελέτες ως προς την επίδραση της θυμόλης στην ανάπτυξη των ιχθύων και στην αποδοτικότητα της τροφής. Η καρβακρόλη και η θυμόλη είναι ισομερείς ενώσεις που διαφέρουν μόνο ως προς τη θέση της υδροξυλομάδας στο βενζολικό δακτύλιο.

Ωστόσο, δεν υπάρχουν πολλές έρευνες που να εστιάζουν στις ιδιότητες του αιθέριου ελαίου ρίγανης ως πρόσθετο διατροφής στη μείωση της καταπόνησης των ιχθύων προκαλούμενη από τις διαχειριστικές πρακτικές που εφαρμόζονται στις υδατοκαλλιεργείες.

1.5.1.3. Κανέλα (*Cinnamomum zeylanicum*)

Βασίλειο: Φυτά (Plantae)

Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)

Ομοταξία: Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)

Τάξη: Δαφνώδη (Laurales)

Οικογένεια: Λαουρίδες (Lauraceae)

Γένος: Κιννάμωμον (*Cinnamomum*)

Είδος: *C. zeylanicum*

Η κανέλα χρησιμοποιείται ως φαρμακευτικό φυτό και μπαχαρικό παγκόσμια για αιώνες. Προέρχεται από ένα τροπικό αειθαλές φυτό (Ranasinghe et al., 2013) και ανήκει στην οικογένεια των Δαφνοειδών (Lauraceae). Το γένος *Cinnamomum* περιέχει περίπου 250 είδη (Teles et al., 2019). Κύριο είδος είναι η *C. zeylanicum* (ή *C. Verum*) που αλλιώς καλείται κανέλα Κεϋλάνης ή αυθεντική κανέλα (true cinnamon) (Muhammad & Dewettinck, 2017). Άλλα γνωστά είδη κανέλας είναι η *C. cassia*, γνωστή ως κασσία ή κινέζικη κανέλα που ευδοκιμεί στην Κίνα και την Ινδονησία και η *C. burmannii* ή κανέλα Ινδονησίας, της οποίας η επίδραση έχει μελετηθεί αρκετά στα εκτρεφόμενα ψάρια. Λόγω του υψηλού της κόστους, η *C. zeylanicum* έχει αντικατασταθεί από τη *C. cassia* στη βιομηχανία τροφίμων (Shimna et al., 2017).

Σχεδόν κάθε μέρος του φυτού της κανέλας, συμπεριλαμβανομένου του φλοιού, των φύλλων, των λουλουδιών, των φρούτων και των ριζών, έχει κάποια φαρμακευτική ή μαγειρική χρήση (Jayaprakasha & Rao, 2011; Ranasinghe et al., 2013). Τα πτητικά έλαια που λαμβάνονται από το φλοιό, τα φύλλα και τις ρίζες ποικίλλουν σημαντικά

στη χημική σύνθεση, γεγονός που υποδηλώνει ότι ποικίλλουν και στις φαρμακευτικές τους ιδιότητες (Shen et al 2002). Τα κύρια συστατικά είναι η κινναμαλδεΐδη (φλοιός), η ευγενόλη (φύλλα) και η καμφορά (ρίζες) (Wijesekera & Chichester, 1978). Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 80 χημικές ενώσεις ως συστατικά από διάφορα μέρη του φυτού (Jayaprakash & Rao, 2011). Έτσι, η κανέλα προσφέρει μια σειρά διαφορετικών ελαίων με διαφορετικά χαρακτηριστικά, καθένα από τα οποία έχει διαφορετική αξία. Αυτή η χημική ποικιλομορφία είναι πιθανό να είναι ο λόγος για τη μεγάλη ποικιλία των φαρμακευτικών ιδιοτήτων.

Η πιο απλή μέθοδος εξαγωγής αιθέριου ελαίου από το φυτό της κανέλας είναι η απόσταξη με ατμό, καθώς είναι σχετικά γρήγορη, οικονομική και δεν αλλοιώνει τα συστατικά (Wong et al., 2014).

Η κανέλα είναι γνωστή για τις αντιφλεγμονώδεις (Ranasinghe et al., 2013), αντιοξειδωτικές (Shan et al., 2009) και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Singh et al., 2007; Starliper et al., 2015; Wong et al., 2014), που οφείλονται κυρίως στην κινναμαλδεΐδη (cinnamaldehyde) που υπάρχει στο φλοιό του φυτού.

Η κινναμαλδεΐδη μαζί με την ευγενόλη και την λιναλοόλη αντιπροσωπεύουν τα τρία κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου που λαμβάνεται από το φλοιό της φυτού, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 82,5% της συνολικής σύνθεσης (Cheritoni et al., 2005). Η κινναμαλδεΐδη, αντιπροσωπεύει περίπου το 49,9-62,8% της συνολικής ποσότητας του ελαίου του φλοιού (Simić et al., 2004; Singh et al., 2007). Είναι αρωματική αλδεΐδη (Adabiardakani et al., 2012) και οι συγκεντρώσεις της μπορεί να ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με τους διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Afifi et al., 2009) καθώς και με τη μορφή που χρησιμοποιείται (σκόνη ή αιθέριο έλαιο).

Οι κουμαρίνες ή αλλιώς βενζο-α-πυρόνες είναι ετεροκυκλικές οργανικές ενώσεις και βρίσκονται φυσικά στο φυτό της κανέλας. Η κουμαρίνη χρήζει ιδιαίτερης προσοχής καθώς προκαλεί ηπατοξικότητα στα ζώα (Shimna et al., 2017). Ανάμεσα στα δύο είδη, η *C. zeylanicum* έχει αμελητέα ποσότητα κουμαρίνης στο φλοιό και στα φύλλα σε σχέση με το είδος *C. cassia* (Shimna et al., 2017).

Μελέτες σε ανθρώπους και ζώα αναφέρουν τις ποικίλες ευεργετικές ιδιότητες της κανέλας όπως αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιδιαβητικές, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, υπογλυκαιμικές ιδιότητες, καθώς και την ικανότητα της κανέλας στη μείωση των επιπέδων λιπιδίων (Goel & Mishra, 2020). Συγκεκριμένα, η θετική επίδραση της κανέλας έχει μελετηθεί σε διάφορα ζώα όπως στα κοτόπουλα (Saeed et al., 2018), στους χοίρους (Cottrell et al., 2020) και στους αρουραίους (Alsoodeeri et al., 2020) ενώ τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί ο αριθμός των μελετών για τα εκτρεφόμενα ψάρια. Στους ιχθύες έχει μελετηθεί η επίδραση της κανέλας στην ανάπτυξη (Ahmad et al., 2011; Amer et al., 2018; Sary et al., 2019; Stoyanova et al., 2018), οι αντιοξειδωτικές ικανότητες (Amer et al., 2018; Sary et al., 2019), οι αντιβακτηριακές (Abdel-Tawwab et al., 2018; Ahmad et al., 2011) και οι αναισθητικές ιδιότητες (Bandeira Junior et al., 2022; Golomazou et al., 2016). Επιπρόσθετα, έχει μελετηθεί η επίδραση το αιθέριου ελαίου κανέλας, σκόνης κανέλας

(dos Santos et al., 2016) και νανοσωματιδίων κανέλας (Abdel-Tawwab et al., 2018), ως πρόσθετα διατροφής, στο οξύ υποξικό stress.

1.6. Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Η ευζωία έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας αλλά και των καταναλωτών, όπου παρατηρείται ολοένα και περισσότερη ζήτηση σε προϊόντα προερχόμενα από εκτροφές φιλικές προς τα ζώα. Η ταχεία ανάπτυξη της σύγχρονης ιχθυοκαλλιέργειας και ο εντατικός τρόπος εκτροφής, εγείρει ανησυχίες για την καλή διαβίωση των ιχθύων, η οποία έχει αναδειχθεί σε θέμα μείζονος σημασίας.

Τα εκτρεφόμενα ψάρια προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση και για το λόγο αυτό είναι σημαντική η διερεύνηση για νέες ασφαλείς ουσίες χαμηλού κόστους, εύκολης διαθεσιμότητας, αποτελεσματικότητας και ασφάλειας προς το περιβάλλον. Έτσι, έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον για προϊόντα φυσικής προέλευσης τα οποία έχουν μεγάλο εύρος ευεργετικών ιδιοτήτων. Τα τελευταία χρόνια, πλήθος μελετών έχει αποδείξει τις ευεργετικές ιδιότητες των φυτοβιοτικών στην παραγωγή ιχθύων. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να εκτιμηθεί η επίδραση τους σε διαφορετικά είδη ιχθύων, θαλασσινού και γλυκού νερού, έτσι ώστε να βρεθεί το ιδανικό εύρος συγκέντρωσης και ο ιδανικός τρόπος χορήγησης.

Βασικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανάδειξη της ευεργετικής χρήσης τριών φαρμακευτικών φυτών (αιθέριων ελαίων ρίγανης *O. vulgare*, κανέλας *C. zeylanicum* και ελαίου σπόρων βιομηχανικής κάνναβης *C. sativa*) στην ιχθυοκαλλιεργητική βιομηχανία, αποσκοπώντας σε μία εκτροφή φιλικότερη προς το ζώο και το περιβάλλον, περιορίζοντας την καταπόνηση και προάγοντας την ευζωία. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η τσιπούρα ως ένα από τα κύρια είδη της Μεσογειακής υδατοκαλλιέργειας.

Οι επιμέρους στόχοι που τέθηκαν ήταν:

- Διερεύνηση της επίδρασης των φαρμακευτικών φυτών στην ανάπτυξη και θρεπτική αξία των ψαριών.
- Διερεύνηση της συμπεριφοράς κατά τη διάρκεια τροφοληψίας με τα φαρμακευτικά φυτά.
- Διερεύνηση της επίδρασης των φαρμακευτικών φυτών στην υγεία των ψαριών μέσω αιματολογικών, ιστολογικών αναλύσεων και προσδιορισμού των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου.
- Διερεύνηση της ικανότητας ανταπόκρισης ψαριών σε διαφορετικές δοκιμές πρόκλησης καταπόνησης (έντονοι χειρισμοί με απόχη, ασιτία και μεταβολή ιχθυοπυκνότητας) μετά από την πειραματική εφαρμογή φαρμακευτικών φυτών στη διατροφή.

- Ποσοτικοποίηση και συγκριτική αξιολόγηση του βαθμού καταπόνησης με τη χρήση τεχνικών όπως ο προσδιορισμός κορτιζόλης στο πλάσμα και η βλάβη του DNA.
- Δημιουργία προτύπου αξιολόγησης της ευζωίας των ιχθύων κατά την εντατική εκτροφή.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματικές συνθήκες εκτροφής ιχθύων

Όλες οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος (EL-43BIO/exp-01). Σε κάθε πειραματική μεταχείριση τα άτομα τσιπούρας (*S. aurata* L.), μεταφέρθηκαν από τον ιχθυογεννητικό σταθμό της εταιρείας «Philosofish» (Πελασγία Φθιώτιδας) στις εγκαταστάσεις του Τμήματος με παροχή οξυγόνου και εγκλιματίστηκαν για 14 ημέρες στις νέες συνθήκες.

Για τη διεξαγωγή του πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν γυάλινες δεξαμενές κλειστού κυκλώματος 125L (50cm x 50cm x 50cm). Η ποιότητα του νερού εκτροφής σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες διατηρήθηκε στο μέγιστο μέσω της λειτουργίας και καθημερινής συντήρησης των κατάλληλων βιολογικών (κεραμικά υλικά αποίκησης νιτροποιητικών βακτηρίων) και μηχανικών φίλτρων (σπόγγοι μικρής διαμέτρου και υαλοβάμβακες), έτσι ώστε να γίνεται κατακράτηση των στερεών σωματιδίων, τα οποία προέρχονταν από υπολείμματα τροφών ή στερεά περιττώματα των ιχθύων. Η θολρότητα του νερού των δεξαμενών διατηρήθηκε στο ελάχιστο μέσω καθημερινού σιφωνισμού των αιωρούμενων σωματιδίων.

Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε με σύστημα ψύξης-θέρμανσης του περιβάλλοντος χώρου (air-condition), ενώ η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε με χρονοδιακόπτη σε 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι.

2.2. Πειραματικά σιτηρέσια

Τα ιχθύδια χωρίστηκαν σε 7 διατροφικές ομάδες. Τα 7 σιτηρέσια καταρτίστηκαν έτσι ώστε να ικανοποιούν τις θρεπτικές απαιτήσεις της τσιπούρας και ήταν ισοενεργειακά (21,3 KJ/g) και ισοπρωτεϊνικά (535 g/Kg). Στο σιτηρέσιο που αποτελούσε το μάρτυρα δεν έγινε καμία προσθήκη, ενώ στα υπόλοιπα έξι σιτηρέσια έγινε προσθήκη φυτογενών πρόσθετων σε ποσοστό 1% ή 2%, όπως ελαίου σπόρων κάνναβης (*C. sativa*) (CAN1%, CAN2%), αιθέριου ελαίου ρίγανης (*O. vulgare*) (OR1%, OR2%) και αιθέριου ελαίου κανέλας (*C. zeylanicum*) (CIN1%, CIN2%) στη θέση του σογιέλαιου της τροφής.

Η γλουτένη καλαμποκιού χρησιμοποιήθηκε ως η κύρια πηγή φυτικών πρωτεϊνών και πηγή υδατανθράκων, ενώ το αλεύρι σίτου χρησιμοποιήθηκε ως ενισχυτικό της συνεκτικότητας των συμπékτων και ως πηγή ενέργειας. Όλα τα σιτηρέσια είχαν σταθερά επίπεδα προμιγμάτων βιταμινών και ανόργανων στοιχείων (0,3%), φωσφορικού μονοασβεστίου (0,3%) και βιταμινών E (0,1%) και C (0,1%). Το ιχθυέλαιο χρησιμοποιήθηκε ως η κύρια πηγή λιπιδίων. Όλα τα συστατικά

αναμίχθηκαν σε μίξερ (Maxximum MUMXL20G, Bosch) στο εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος και ακολούθησε πελλετοποίηση στις εγκαταστάσεις του Τμήματος με τη χρήση πελλετομηχανής τύπου California Pellet Mill (CL-2, Imeco GmbH, Ολλανδία) στη μορφή βυθιζόμενου σύμπηκτου διαμέτρου 1,5 mm. Στο τέλος, οι πελλέτες ξηράνθηκαν σε απαγωγό αερίων και σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε αεροστεγείς σάκους στους 4°C.

Πίνακας 1. Συστατικά και θρεπτική σύσταση πειραματικών σιτηρεσιών

Σιτηρέσια	CAN1 %	CAN2 %	OR1 %	OR2 %	CIN1 %	CIN2 %	CON TROL %
Συστατικά (g Kg ⁻¹ diet)							
Ιχθυάλευρο	535	535	535	535	535	535	535
Γλουτένη καλαμποκιού	242	242	242	242	242	242	242
Άλευρο σίτου	129	129	129	129	129	129	129
Ιχθυέλαιο	66	66	66	66	66	66	66
Σογιέλαιο	10	0	10	0	10	0	20
Αιθ. Έλαιο Ρίγανης	0	0	10	20	0	0	0
Αιθ. Έλαιο Κανέλας	0	0	0	0	10	20	0
Έλαιο κάνναβης	10	20	0	0	0	0	0
Vit & Min Premix	3	3	3	3	3	3	3
Φωσφορικό μονοασβέστιο	3	3	3	3	3	3	3
Vit C	1	1	1	1	1	1	1
Vit E	1	1	1	1	1	1	1
Θρεπτική σύσταση (g Kg ⁻¹)							
Ξηρά ουσία	922,0	923,3	918,9	920,7	920,7	920,6	920,7
ΟΑΟ	524,8	530,1	537,1	539,3	531,3	531,0	532,1
ΟΛΟ	154,3	155,7	147,3	146,0	139,1	133,0	159,8
Υδατάνθρακες ^a	149,0	145,0	142,3	142,8	137,6	155,0	136,0
Τέφρα	94,0	92,4	92,3	92,6	92,0	91,6	92,8
Ενέργεια (KJ g ⁻¹)	21,3	21,2	21,2	21,4	21,1	21,2	21,3

Σημειώσεις : ^aΤο ποσοστό των υδατανθράκων εκτιμήθηκε με αφαίρεση από το 100 του συνόλου των ποσοστών, ολικών πρωτεϊνών, ολικών λιπιδίων και τέφρας. ΟΑΟ: Ολικές αζωτούχες ουσίες, ΟΛΟ: Ολικές λιπαρές ου

2.3. ΠΕΙΡΑΜΑ 1- Επίδραση της διατροφής με φαρμακευτικά φυτά στην ανάπτυξη, στην υγεία και στην ευζωία της τσιπούρας

2.3.1. Εισαγωγή

Στα εντατικά συστήματα ιχθυοκαλλιέργειας, όπου απαιτούνται υψηλοί ρυθμοί ανάπτυξης τα ψάρια εκτίθενται σε πολλούς στρεσογόνους παράγοντες με αποτέλεσμα τη μειωμένη ανάπτυξη, παραγωγικότητα και τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Η ευζωία είναι ένα θέμα μείζονος σημασίας καθώς μπορεί να επηρεάσει την απόκριση στην καταπόνηση, την υγεία και την αντοχή των εκτρεφόμενων οργανισμών στις ασθένειες (Ashley, 2007), με επακόλουθες οικονομικές απώλειες. Η επαρκής και ισορροπημένη διατροφή είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της απόδοσης και διατήρησης της υγείας. Μεταξύ άλλων, έχει ισχυρή επίδραση στην ανοχή στο stress και ως εκ τούτου, η διατροφή των ψαριών πρέπει να περιέχει όλες τις θρεπτικές ουσίες και την ενέργεια που απαιτεί ο οργανισμός σε επαρκείς ποσότητες και αναλογίες (Trichet, 2010). Η διατροφή, η οποία δεν πληροί τις απαιτήσεις των ψαριών σε θρεπτικά συστατικά επηρεάζει όχι μόνο την ανάπτυξη και την αποτελεσματικότητα της τροφής, αλλά αυξάνει επίσης την ευαισθησία σε ασθένειες και προκαλεί συμπεριφορικές και παθολογικές αλλαγές (Oliva-Teles, 2012).

Τα φυτογενή πρόσθετα ζωοτροφών είναι μια σχετικά νέα κατηγορία πρόσθετων ζωοτροφών που κερδίζει συνεχώς το ενδιαφέρον στον κλάδο της υδατοκαλλιέργειας (Encarnaçao, 2016). Τα βιοενεργά συστατικά τους έχουν πολλαπλά οφέλη στα ψάρια καθώς δρουν ως διεγερτικά της όρεξης, αντιμικροβιακοί, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικοί παράγοντες (Dawood et al., 2021). Τα περισσότερα από τα ενεργά συστατικά του φυτού βρίσκονται στο αιθέριο έλαιο (Chakraborty et al., 2014) και πολλά από αυτά έχουν αναγνωριστεί ως ασφαλή και χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων (Encarnaçao, 2016).

Η ρίγανη χρησιμοποιείται συχνά στη διατροφή των ζώων, καθώς είναι πλούσια σε καρβακρόλη και θυμόλη, φυτοχημικά που είναι γνωστά για τις ισχυρές αντιβακτηριακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους, καθώς και για την συνεργατική τους δράση (S. Burt, 2004; Can Baser, 2008). Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι η ρίγανη έχει την ικανότητα να προάγει την ανάπτυξη (Alagawany et al., 2020). Η κανέλα φαίνεται επίσης να είναι αποτελεσματική για χρήση στη διατροφή στα υδρόβια είδη καθώς έχει αποδείξει ότι βελτιώνει την ανάπτυξη και υγεία των ψαριών (Encarnaçao, 2016). Ο αριθμός των μελετών σχετικά με την επίδραση των σπόρων κάνναβης στα ζώα είναι ακόμα πολύ περιορισμένος, ωστόσο κερδίζει ολοένα και περισσότερο το επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω της υψηλής διατροφικής αξίας (Farinon et al., 2020; Oomah et al., 2002).

Σκοπός του πειράματος είναι η διερεύνηση της επίδρασης των φαρμακευτικών φυτών στην ανάπτυξη και θρεπτική αξία των ψαριών, καθώς και στη συμπεριφορά κατά τη διάρκεια τροφοληψίας με αυτά. Επιπλέον, στόχος είναι η μελέτη της επίδρασης των φαρμακευτικών φυτών στην υγεία και ευζωία των ψαριών, προσδιορίζοντας την κορτιζόλη στο πλάσμα, το αιματολογικό προφίλ, τη βλάβη του DNA στους ιστούς, την ιστολογική εξέταση και τον προσδιορισμό των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου.

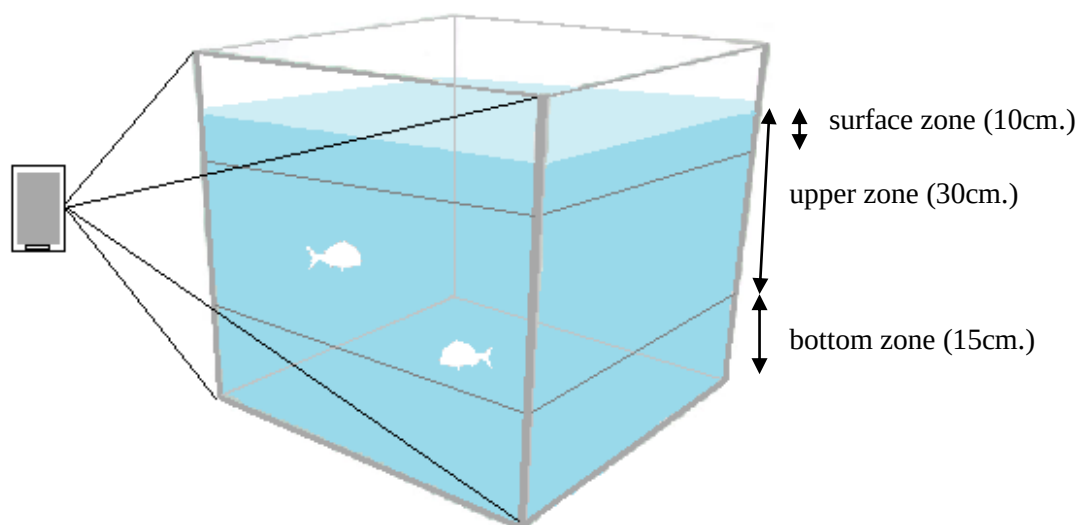
2.3.2. Πειραματικό πρωτόκολλο

Οι πειραματικές συνθήκες εκτροφής των ιχθύων περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.1. Πειραματικές συνθήκες εκτροφής ιχθύων. Τα συστατικά και η θρεπτική σύσταση των πειραματικών σιτηρεσίων περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.2. Πειραματικά σιτηρέσια.

Το μέσο βάρος των ιχθύων ήταν $5 \pm 0,12\text{g}$. Η ιχθυοφόρτιση στην αρχή του πειράματος ορίστηκε στα $1,2 \text{ Kg/m}^3$. Τα 630 ψάρια μοιράστηκαν τυχαία στις 21 δεξαμενές. Σε κάθε διατροφική ομάδα αναλογούσαν 90 ιχθύδια τσιπούρας, τα οποία χωρίστηκαν σε 3 υποομάδες, 30 ατόμων έκαστη, όπου τοποθετούνταν σε ξεχωριστή δεξαμενή με τυχαία επιλογή.

Η πειραματική σίτιση διήρκεσε 74 ημέρες. Οι ιχθύες σιτίζονταν δύο φορές την ημέρα (11:00 και 18:00) με το χέρι μέχρι το επίπεδο του κορεσμού (*ad libitum*).

Για την διερεύνηση της συμπεριφοράς κατά την τροφοληψία πραγματοποιήθηκε βιντεοσκόπηση των ιχθύων σε όλες τις δεξαμενές κάθε ομάδας (1^η ημέρα τροφοληψίας και 74^η ημέρα τροφοληψίας). Η κάμερα τοποθετήθηκε έξω από τη δεξαμενή σε απόσταση 50εκ. από τη μπροστινή επιφάνεια με δυνατότητα βιντεοσκόπησης όλης της περιοχής τροφοδοσίας αλλά και ολόκληρης της δεξαμενής. Η διάρκεια βιντεοσκόπησης για κάθε δεξαμενή ήταν περίπου 1min και μέχρι να καταναλωθεί και η τελευταία πελλέτα και ξεκινούσε 5sec πριν ο χειριστής ρίξει τις πελλέτες στη δεξαμενή. Η ανάλυση των video έγινε με το πρόγραμμα BORIS (Behavioral Observation Research Interactive Software) (Friard & Gamba, 2016). Η δεξαμενή παρατήρησης χωρίστηκε οπτικά σε ζώνη επιφάνειας, έτσι ώστε να προσδιοριστεί το ποσοστό των ψαριών, τα οποία “περίμεναν” την τροφή στην επιφάνεια και πάνω/κάτω ζώνη, με σκοπό τη μέτρηση του χρόνου τροφοληψίας των ιχθύων σε αυτές τις περιοχές. Η ανάλυση έγινε με τη βοήθεια πλέγματος (grid), το οποίο τοποθετήθηκε πάνω στην οθόνη του υπολογιστή. Οι 3 ζώνες αντιστοιχούσαν στην πάνω ζώνη (τα πρώτα 30εκ. από την επιφάνεια), την κάτω ζώνη (τα υπόλοιπα εκατοστά 15εκ. μέχρι τον πυθμένα της δεξαμενής) και την ζώνη επιφάνειας (τα 10εκ. από την επιφάνεια) (Εικ.6).



Εικόνα 6. Αναπαράσταση δεξαμενής και ζωνών βιντεοσκόπησης με σκοπό τη διερεύνηση της συμπεριφοράς κατά την τροφοληψία

Στη λήξη του πειράματος (75^η ημέρα), εξήντα τρία ψάρια υποβλήθηκαν σε ευθανασία με υπερδοσολογία MS-222 και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (-40°C) για χημική ανάλυση της θρεπτικής σύστασης του σώματος τους (ολόκληρο σώμα) και του προφίλ λιπαρών οξέων. Οι αντίστοιχες τεχνικές αναλύονται στο Παράρτημα (σελ. 186). Στη συνέχεια, οι ιχθύες αποψύχθηκαν, τεμαχίστηκαν σε μύλο και ελήφθησαν ομογενοποιημένα δείγματα από κάθε ψάρι. Για την λήψη του αίματος και τον προσδιορισμό της κορτιζόλης και του αιματολογικού προφίλ απομακρύνθηκαν από κάθε δεξαμενή 3 ιχθύες, οι οποίοι αναισθητοποιήθηκαν με διάλυμα MS-222 (15mg/l). Ύστερα από χορήγηση υπερβολικής δόσης του αναισθητικού (>25mg/l) με σκοπό τη θανάτωση έγινε αφαίρεση των ιστών για τον προσδιορισμό της βλάβης του DNA. Τέλος, 3 ιχθύες από κάθε δεξαμενή τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10% για ιστολογικές αναλύσεις. Όλες οι παραπάνω τεχνικές περιγράφονται στο Παράρτημα.

2.4. ΠΕΙΡΑΜΑ 2 - Επίδραση οξείας καταπόνησης, προκληθείσας μέσω έντονων χειρισμών απόχης στην απόκρισης καταπόνησης της τσιπούρας μετά από διατροφή με φαρμακευτικά φυτά

2.4.1. Εισαγωγή

Στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες, όπως και αναπόφευκτες διαχειριστικές πρακτικές μπορούν να προκαλέσουν οξύ ή χρόνιο stress σε όλο τον κύκλο παραγωγής στους εκτρεφόμενους οργανισμούς με αρνητικές

επιπτώσεις στην υγεία, στην ανάπτυξη, στην αναπαραγωγή και στην ανοσοποίηση. Χειρισμοί όπως η αλλαγή των διχτύων, οι καταδυτικές εργασίες ή η μεταφορά των κλωβών αλλά και χειρισμοί στα ψάρια όπως ο συγχρωτισμός για χειρισμούς ή δειγματοληψίες, η μεταφορά, οι θεραπείες και η εξαλίευση και θανάτωση μπορεί να έχουν αρνητικό αντίκτυπο στην ευζωία των ψαριών (ΕΛΟΠΥ, 2019). Ως εκ τούτου οι παραγωγοί πρέπει να γνωρίζουν ότι η διασφάλιση της καλής διαβίωσης των ψαριών είναι βασικό μέλημα στην καθημερινή διαχείριση της μονάδας (Segner, 2019).

Η σύλληψη των ιχθύων στις εντατικές εκτροφές είναι μία αναπόφευκτη μέθοδος (Grutter & Pankhurst, 2000) και περιλαμβάνει την απομάκρυνση του ψαριού με την απόχη και την έκθεση του στο αέρα (Fagundes & Urbinati, 2008). Η υποξία αποτελεί μία εξαιρετικά στρεσογόνα κατάσταση κατά την περίοδο εκτροφής (Ni et al., 2014) και η απομάκρυνση του ψαριού από το νερό πρέπει να πραγματοποιείται μόνο όταν είναι απολύτως απαραίτητο (Ashley, 2007; Segner, 2019). Καθώς οι μεταβολικές διεργασίες του οργανισμού απαιτούν οξυγόνο, η έκθεση σε υποξικές συνθήκες μπορεί να επηρεάσει αρνητικά μια μεγάλη ποικιλία βιοχημικών και φυσιολογικών λειτουργιών (Douxflis et al., 2012) με αποτέλεσμα τη μείωση της αντίστασης των ψαριών σε παθογόνους μικροοργανισμούς, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία στις ασθένειες (Kvamme et al., 2013). Η ευαισθησία των ψαριών στους έντονους χειρισμούς εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την θερμοκρασία, και έτσι οι χειρισμοί σε ακραίες θερμοκρασίες πρέπει να αποφεύγονται. Επιπλέον, ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται θα πρέπει να είναι σε πολύ καλή κατάσταση για να αποφεύγεται οποιοσδήποτε τραυματισμός των ψαριών (Segner, 2019).

Η απόκριση στο stress χαρακτηρίζεται από ταχεία αύξηση του επιπέδου των κατεχολαμινών στο πλάσμα, και βραδύτερη αλλά πιο παρατεταμένη αύξηση της κορτιζόλης. Οι ορμόνες αυτές ενεργοποιούν τη δευτερογενή απόκριση και προκαλούν μεταβολές στα επίπεδα της γλυκόζης, του γαλακτικού οξέος, του αιματολογικού προφίλ κ.ά. (Fagundes & Urbinati, 2008). Τυπικά, η κορτιζόλη αυξάνεται μέσα σε λίγα λεπτά έως και μία ώρα μετά την επίδραση του στρεσογόνου παράγοντα και η επαναφορά στα φυσιολογικά επίπεδα επέρχεται μέσα σε λίγες ώρες (Wendelaar Bonga, 1997). Η αύξηση του επιπέδου της κορτιζόλης στο πλάσμα χρησιμοποιείται ως δείκτης της κατάστασης του ψαριού μετά την επίδραση ενός στρεσογόνου παράγοντα (Baker et al., 2013).

Τα τελευταία χρόνια στο επίκεντρο των μελετών βρίσκονται τα αιθέρια έλαια λόγω των ποικίλων ιδιοτήτων τους (αντιμικροβιακών, αντιοξειδωτικών κ.ά.) (Souza et al., 2019) και της ικανότητας τους να βελτιώνουν την ανάπτυξη, να προάγουν την υγεία και ευζωία των ιχθύων (Zeppenfeld et al., 2014) και να μειώνουν το stress (Saccol, Jerez-Cera, et al., 2018). Πλήθος ερευνητών έχουν ασχοληθεί με τις αναισθητικές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων σε διάφορα είδη ιχθύων, καθώς διερευνώνται εναλλακτικές λύσεις για τη χρήση χημικών αναισθητικών στις υδατοκαλλιέργειες, οι οποίες έχει αποδειχτεί ότι ακόμα και σε μικρές ποσότητες μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση στους ιχθύες (Readman, 2013; Thomas & Robertson, 1991; Tort et al.,

2002). Και ενώ πιο συχνά τα αιθέρια έλαια εφαρμόζονται στο νερό πριν τους χειρισμούς, τα τελευταία χρόνια αξιολογείται η επίδραση τους διαμέσου της τροφής.

Τα αιθέρια έλαια παρουσιάζουν λιγότερες παρενέργειες από τις συνθετικές χημικές ενώσεις, αλλά η αποτελεσματικότητά τους στη μείωση του stress σχετίζεται με το χημειότυπο και τη συγκέντρωσή τους. Είναι, λοιπόν, πολύ σημαντικό να καθοριστεί η ιδανική συγκέντρωση και ο ιδανικός τρόπος χορήγησης των αιθέριων ελαίων για κάθε είδος, γλυκού και θαλασσινού νερού, καθώς μπορούν να αποτελέσουν από μόνα τους στρεσογόνο παράγοντα για τα ψάρια (Souza et al., 2019). Σκοπός του πειράματος είναι η διερεύνηση της επίδρασης των φαρμακευτικών φυτών στην ικανότητα ανταπόκρισης της τσιπούρας στην οξεία καταπόνηση λόγω έντονων χειρισμών με απόχη μετά από την πειραματική εφαρμογή φαρμακευτικών φυτών στη διατροφή προσδιορίζοντας την κορτιζόλη στο πλάσμα, το αιματολογικό προφίλ και τη βλάβη του DNA στο ήπαρ και στο αίμα.

2.4.2. Πειραματικό πρωτόκολλο

Οι πειραματικές συνθήκες εκτροφής των ιχθύων περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.1. Πειραματικές συνθήκες εκτροφής ιχθύων. Τα συστατικά και η θρεπτική σύσταση των πειραματικών σιτηρεσίων περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.2. Πειραματικά σιτηρέσια.

Το μέσο βάρος των ιχθύων ήταν $5 \pm 0,72$ g. Σε κάθε ομάδα αναλογούσαν τρία ενυδρεία των 15 ιχθυδίων τσιπούρας τα οποία τοποθετήθηκαν με τυχαία επιλογή. Η δοκιμή σίτισης διήρκεσε 84 ημέρες. Τα ψάρια σιτίζονταν δύο φορές την ημέρα (11:00 και 18:00) με το χέρι μέχρι το επίπεδο του κορεσμού (*ad libitum*).

Στη λήξη του πειράματος (85^η ημέρα), τρεις ιχθύες απομακρύνθηκαν από κάθε δεξαμενή και υποβλήθηκαν σε καταπόνηση από έντονους χειρισμούς της απόχης για 5 min. Τα ψάρια εγκλιματίστηκαν για 30 λεπτά εντός της δεξαμενής πριν από τη δειγματοληψία του αίματος, σύμφωνα με την καθιερωμένη επιστημονική διαδικασία. Έπειτα υποβλήθηκαν σε αναισθησία με MS-222 (15mg/l) για τη λήψη δειγμάτων αίματος με σκοπό τον προσδιορισμό της κορτιζόλης και του αιματολογικού προφίλ και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε ευθανασία με υπερδοσολογία MS-222 (>25mg/l), ζυγίστηκαν ατομικά και ελήφθησαν δείγματα για την διερεύνηση της γενοτοξικότητας με τη μέθοδο του κομήτη (single cell gel electrophoresis-SCGE). Οι παραπάνω τεχνικές αναλύονται στο Παράρτημα.

2.5. ΠΕΙΡΑΜΑ 3 – Η επίδραση της ασιτίας στην απόκριση καταπόνησης της τσιπούρας μετά από τροφοληψία με φαρμακευτικά φυτά

2.5.1. Εισαγωγή

Με την ταχεία ανάπτυξη του κλάδου των ιχθυοκαλλιεργειών, υπάρχει αυξανόμενη ανησυχία για την ευζωία των ιχθύων και ποιες πρακτικές τροφοληψίας και ασιτίας είναι ηθικά αποδεκτές και πρέπει να αξιολογηθούν επιστημονικά για τις συνέπειες τους στη φυσιολογία και συμπεριφορά των ιχθύων (Lines & Spence, 2012).

Η ασιτία των ιχθύων στις ιχθυοκαλλιέργειες θεωρείται μία ορθή πρακτική πριν τη μεταφορά τους, ώστε να μειωθεί ο μεταβολικός τους ρυθμός, η κατανάλωση οξυγόνου και η παραγωγή μεταβολικών προϊόντων. Εφαρμόζεται πριν την εξαίεση, ώστε να εξαλειφθεί το περιεχόμενο του πεπτικού σωλήνα και να μειωθεί ο κίνδυνος μόλυνσης. Επίσης, εφαρμόζεται για ζητήματα ευζωίας καθώς θεωρείται ότι οι ιχθύες μετά από μία περίοδο ασιτίας είναι πιο ήρεμοι και ανεκτικοί στο stress (Petri, 2003). Ωστόσο, η επιστημονική τεκμηρίωση για αυτό σχετίζεται με το μειωμένο μεταβολικό ρυθμό. Οι ιχθύες που δεν έχουν υποστεί ασιτία μπορεί να είναι λιγότερο ανθεκτικοί στο stress με βάση τη λογική ότι με την ασιτία εξοικονομείται ενέργεια για την πέψη και τις μεταβολικές διεργασίες και ο ιχθύς έχει χαμηλότερες απαιτήσεις σε οξυγόνο, λιγότερη παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και, συνεπώς, διατηρεί εύκολα διαθέσιμη ενέργεια για την αντιμετώπιση του stress (Petri, 2003).

Οι επιπτώσεις που μπορεί να έχουν τέτοια διαστήματα ασιτίας εξαρτώνται από τη διάρκεια της νηστείας, τη φυσιολογική κατάσταση των ψαριών και περιβαλλοντικές παραμέτρους, όπως η θερμοκρασία. Η ασιτία είναι μία συχνή διαδικασία στο φυσικό κύκλο της ζωής τους, λόγω της αναπαραγωγής, της μετανάστευσης και των κλιματικών αλλαγών (Babaei et al., 2020). Όμως, η στέρηση τροφής κατά την διάρκεια περιόδων που αυτή δεν συμβαίνει φυσιολογικά, μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της ευζωίας.

Η ασιτία μπορεί να προκαλέσει συνθήκες οξειδωτικού stress μέσω της ενίσχυσης της παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου (Morales et al., 2004). Όταν η ασιτία εφαρμόζεται για μεγάλα χρονικά διαστήματα οι ιχθύες χάνουν βάρος (Caruso et al., 2011; Chatzifotis et al., 2011) και αλλάζει η σύσταση του σώματός τους (Einen et al., 1998), ενώ έχει παρατηρηθεί και αύξηση της συγκέντρωσης λυσοζύμης, ενός ανοσολογικού δείκτη του μη ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος στη βλέννα του δέρματος (Caruso et al., 2011). Η επαναφορά της παροχής τροφής οδηγεί αρχικά σε αυξημένη κατανάλωση (Aranda, 2001), η οποία έχει ως τελικό αποτέλεσμα την επανάκαμψη του βάρους (Chatzifotis et al., 2011).

Η αντοχή των ιχθύων στην ασιτία διαφέρει από είδος σε είδος. Όπως αναφέρουν οι Navarro & Gutiérrez (1995) και οι (McCue, 2010), η πλειοψηφία των ιχθύων μπορεί να αντέξει μερικές μέρες ή εβδομάδες ασιτίας, ενώ κάποια είδη όπως το ευρωπαϊκό χέλι, *Anguilla Anguilla*, μπορούν να αντέξουν περίπου τέσσερα έτη ασιτίας (Boétius & Boétius, 1985). Στην τσιπούρα, ακόμα και η βραχυχρόνια νηστεία (7 ημερών)

μπορεί να οδηγήσει σε μείωση βάρους, κάτι που δεν παρατηρείται στο λαβράκι (Ferreira Pinto et al., 2007; Peres et al., 2011). Το λαβράκι χαρακτηρίζεται από ανοχή σε περίοδο βραχυχρόνιας νηστείας, ενώ και μετά από μακροχρόνια νηστεία μπορεί να επανέλθει γρήγορα σε φυσιολογικά επίπεδα βάρους, όταν αρχίζει ξανά η παροχή τροφής (Chatzifotis et al., 2011). Η τσιπούρα είναι ένα είδος που δεν εμφανίζει ταχεία επαναφορά βάρους στα επίπεδα εκείνα των ψαριών που δεν έχουν υποστεί νηστεία (Peres et al., 2011; Skrzynska et al., 2017), αν και έχει παρατηρηθεί υψηλότερος αυξητικός ρυθμός κατά την επανέναρξη του ταΐσματος (Bavčević et al., 2010).

Κατά τη διάρκεια της περιόδου ασιτίας, οι ιχθύες αναπτύσσουν διάφορους μηχανισμούς για να καλύψουν τις μεταβολικές ανάγκες (Babaei et al., 2020). Η προσαρμογή στην ασιτία περιλαμβάνει μειωμένο μεταβολικό ρυθμό, μειωμένη δραστηριότητα σε όλους τους ιστούς που σχετίζονται με την εξωγενή διατροφή και μειωμένη κολυμβητική δραστηριότητα. Παρατηρείται μειωμένη ημερήσια απώλεια σωματικής μάζας με την πάροδο του χρόνου και η θερμοκρασία παίζει καθοριστικό ρόλο (Petri, 2003).

Στα πρώτα στάδια της ασιτίας στα περισσότερα είδη ιχθύων το γλυκογόνο του ήπατος αποτελεί την άμεση ενεργειακή λύση για τη διατήρηση της γλυκόζης στο αίμα. Σχεδόν παράλληλα καταβολίζεται και λιπώδης ιστός για την απόκτηση ενέργειας. Όταν η ασιτία συνεχιστεί τότε αρχίζει και ο καταβολισμός μυϊκής πρωτεΐνης (Echevarría et al., 1997; Metón et al., 2003; Navarro & Gutiérrez, 1995).

Αν και πολλές μελέτες αναφέρουν την επίδραση της ασιτίας και επανασίτισης, η σημασία του σιτηρεσίου πριν και μετά από την περίοδο της ασιτίας έχει διερευνηθεί ελάχιστα (Babaei et al., 2020). Επίσης, παρά το γεγονός ότι γίνεται εκτενής μελέτη γύρω από τα αιθέρια έλαια στις ιχθυοκαλλιέργειες, οι γνώσεις για την επίδραση τους στην αντίδραση των ιχθύων απέναντι σε συγκεκριμένους στρεσογόνους παράγοντες, όπως η ασιτία, είναι ανεπαρκείς. Σκοπός του πειράματος ήταν να μελετηθεί κατά πόσο η περίοδος ασιτίας 14 ημερών μετά από τροφοληψία με τα πειραματικά σιτηρέσια μεταβάλλει τη συγκέντρωση κορτιζόλης στο αίμα και το αιματολογικό προφίλ, και προκαλεί γεντοτοξικότητα στο γενετικό υλικό.

Σκοπός του πειράματος είναι η διερεύνηση της επίδρασης των φαρμακευτικών φυτών στην ικανότητα ανταπόκρισης της τσιπούρας στην καταπόνηση μετά από υποβολή των ψαριών σε περίοδο ασιτίας 14 ημερών μετά από την πειραματική εφαρμογή φαρμακευτικών φυτών στη διατροφή προσδιορίζοντας την κορτιζόλη στο πλάσμα, το αιματολογικό προφίλ και τη βλάβη του DNA στο ήπαρ και στο αίμα.

2.5.2. Πειραματικό πρωτόκολλο

Οι πειραματικές συνθήκες εκτροφής των ιχθύων περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.1. Πειραματικές συνθήκες εκτροφής ιχθύων. Πριν την έναρξη της σίτισης τα ιχθύδια διανεμήθηκαν στις ίδιες 7 διατροφικές ομάδες. Τα συστατικά και η θρεπτική σύσταση των πειραματικών σιτηρεσίων περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.2. Πειραματικά

σιτηρέσια. Το μέσο βάρος των ιχθύων ήταν 5g. Σε κάθε ομάδα αναλογούσαν έξι δεξαμενές των 15 ιχθυδίων τσιπούρας τα οποία τοποθετήθηκαν με τυχαία επιλογή.

Η δοκιμή σίτισης διήρκεσε 84 ημέρες. Τα ψάρια σιτίζονταν δύο φορές την ημέρα (11:00 και 18:00) με το χέρι μέχρι το επίπεδο του κορεσμού (*ad libitum*).

Στο τέλος της δοκιμής σίτισης (85η ημέρα εκτροφής), ξεκίνησε ασιτία για 14 ημέρες στις μισές δεξαμενές της κάθε ομάδας. Μετά τις 14 ημέρες ασιτίας (99η ημέρα) έγινε αναισθησία με MS-222 (15mg/l) για τη λήψη δειγμάτων αίματος με σκοπό τη μέτρηση της κορτιζόλης και του αιματολογικού προφίλ και ευθανασία με υπερδοσολογία MS-222 (>25mg/l) για τη διερεύνηση της γενοτοξικότητας με SCGE, που περιγράφονται στο Παράρτημα.

2.6. ΠΕΙΡΑΜΑ 4 – Επίδραση χρόνιας καταπόνησης στην τσιπούρα, προκληθείσας λόγω υψηλής πυκνότητας εκτροφής, μετά από χορήγηση σιτηρεσίων εμπλουτισμένα με φαρμακευτικά φυτά

2.6.1. Εισαγωγή

Η αύξηση της πυκνότητας εκτροφής στην ιχθυοκαλλιέργεια είναι μία αποτελεσματική μέθοδος με σκοπό τον μετριασμό του λειτουργικού κόστους, και έτσι την εγγύηση μιας βιώσιμης και κερδοφόρας επιχείρησης. Ωστόσο, η ιχθυοπυκνότητα είναι ένας σύνθετος παράγοντας εκτροφής, ο οποίος περιλαμβάνει πολλές αλληλένδετους παραμέτρους, όπως την ποιότητα νερού, το φυσικό χώρο και τη διαθεσιμότητα της τροφής (Ellis et al., 2002; Hastein, 2005) με πολλές αρνητικές επιδράσεις στην επιβίωση, στην ανάπτυξη, στην παραγωγή, στη συμπεριφορά και στην υγεία (de Oliveira et al., 2012; El-Sayed, 2002).

Η αρνητική επίδραση της υψηλής ιχθυοπυκνότητας στην απόδοση των ψαριών σχετίζεται, γενικά, με την επιδείνωση της ποιότητας του νερού ή και την αύξηση της επιθετικής συμπεριφοράς (Ellis et al., 2002). Έχει μελετηθεί ότι η υψηλή ιχθυοπυκνότητα αποτελεί ένα χρόνιο στρεσογόνο παράγοντα, ο οποίος στους τελεόστεους ιχθύες μπορεί να αυξήσει τους σωματικούς τραυματισμούς, όπως και τη μεταβολή ορισμένων αιματολογικών, βιοχημικών και ανοσολογικών παραμέτρων (Nardocci et al., 2014).

Λόγω του ανταγωνισμού για χώρο και τροφή, αυξάνονται τα επίπεδα της καταπόνησης και οι ιχθύες σε υψηλότερη πυκνότητα τείνουν να έχουν χαμηλότερη ανάπτυξη (El-Sayed, 2002), παραγωγή (Hengsawat et al., 1997) και ευαισθησία στις ασθένειες (Ashley, 2007).

Η επίδραση της υψηλής πυκνότητας εκτροφής στην ανάπτυξη, στην ευζωία, στη φυσιολογία, στην υγεία, καθώς και στην ανοσοποίηση των εκτρεφόμενων ιχθύων έχει μελετηθεί σε διάφορα είδη (North et al., 2006; Salas-Leiton et al., 2010; Sirakov & Ivancheva, 2008; Yousefi et al., 2012). Στο σολομό του Ατλαντικού (Fivelstad, 2014) έχει μελετηθεί ότι ο μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης και αποδοτικότητας της τροφής

είναι αποτέλεσμα της έλλειψης όρεξης των ιχθύων λόγω χαμηλής συγκέντρωσης διαλυμένου οξυγόνου. Το διαλυμένο οξυγόνο είναι η πιο σημαντική και κρίσιμη παράμετρος και παίζει καθοριστικό ρόλο στον οξειδωτικό μεταβολισμό των ψαριών. Σε υψηλή ιχθυοπυκνότητα τα ψάρια εμφανίζουν φυσιολογικούς μηχανισμούς που βελτιώνουν αποτελεσματικά την πρόσληψη οξυγόνου, όπως παραγωγή ερυθρών κυττάρων, μεταξύ άλλων (Perry et al., 2009).

Όπως αναφέρουν οι Araújo-Luna et al. (2018), αυτές οι φυσιολογικές αποκρίσεις συμβαίνουν λόγω της παραγωγής κορτικοστεροειδών, όπως η κορτιζόλη από την ενεργοποίηση του άξονα HPI και περιλαμβάνει την κινητοποίηση/χρησιμοποίηση των αποθηκών ενέργειας για την τροφοδοσία αυτών των φυσιολογικών αποκρίσεων (Mommensen et al., 1999).

Οι αλλαγές στο επίπεδο της κορτιζόλης, της γλυκόζης και άλλων παραμέτρων χρησιμοποιούνται ως δείκτες stress αν και η απόκριση στην καταπόνηση έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζεται από το είδος, το στάδιο ανάπτυξης, την κατάσταση των ψαριών και την περίοδο δειγματοληψίας μεταξύ άλλων παραγόντων (Mommensen et al., 1999).

Επίσης, έχει μελετηθεί ότι η αυξημένη πυκνότητα εκτροφής προκαλεί οξειδωτικό stress που χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species-ROS) (Braun et al., 2010). Η συσσώρευση των ROS είναι τοξική, προκαλώντας κυτταρική οξειδωτική βλάβη (Evans & Cooke, 2004) και μη αναστρέψιμες τροποποιήσεις στο DNA. Οι διάφορες ρυθμιστικές λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος εξαρτώνται από την ισορροπία μεταξύ των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών. Έτσι, η ανοσολογική απόκριση σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τη συσσώρευση των ROS (Knight, 2000). Οι (Huo et al., 2017), απέδειξαν ότι η χαμηλή ιχθυοπυκνότητα προκάλεσε την πιο ισχυρή ανοσοποίηση στο καλκάνι (*Scophthalmus maximus*) εμβολιασμένο κατά του *Edwardsiella tarda*.

Μελετώντας την απόκριση στην καταπόνηση προκαλούμενη από υψηλή ιχθυοπυκνότητα σε συνδυασμό με την επίδραση των φαρμακευτικών φυτών, μπορεί να συμβάλλει στη βελτίωση της ευζωίας και σε αυξημένη απόδοση και παραγωγικότητα. Σκοπός του πειράματος ήταν να μελετηθεί η επίδραση των αιθέριων ελαίων *C. zeylanicum*, *O. vulgare* και ελαίου *C. sativa* στην καταπόνηση της τσιπούρας προκαλούμενη από αυξημένη πυκνότητα εκτροφής.

Σκοπός του πειράματος είναι η διερεύνηση της επίδρασης των φαρμακευτικών φυτών στην ικανότητα ανταπόκρισης της τσιπούρας στη χρόνια καταπόνηση λόγω μεταβολής της ιχθυοπυκνότητας μετά από την πειραματική εφαρμογή φαρμακευτικών φυτών στη διατροφή προσδιορίζοντας την κορτιζόλη στο πλάσμα, το αιματολογικό προφίλ και τη βλάβη του DNA στο ήπαρ και στο αίμα.

2.6.2. Πειραματικό πρωτόκολλο

Οι πειραματικές συνθήκες εκτροφής των ιχθύων περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.1. Πειραματικές συνθήκες εκτροφής ιχθύων. Πριν την έναρξη του πειραματισμού δημιουργήθηκαν έξι πειραματικές διατροφικές μεταχειρίσεις και μία ομάδα ελέγχου για κάθε μία από τις δύο διαφορετικές ιχθυοφορτίσεις που εφαρμόστηκαν. Τα συστατικά και η θρεπτική σύσταση των πειραματικών σιτηρεσίων περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.2. Πειραματικά σιτηρέσια. Σε κάθε διατροφική μεταχείριση αναλογούσαν έξι ενυδρεία (τρία για τη μεταχείριση 1,2 Kg/m³ (χαμηλή ιχθυοπυκνότητα; LFD) και τρία για τη μεταχείριση 2Kg/m³ (υψηλή ιχθυοπυκνότητα; HFD), τα οποία τοποθετήθηκαν με τυχαία επιλογή. Οι ιχθύες σιτίζονταν με το χέρι, δύο φορές την ημέρα (11:00 και 18:00), συγκεκριμένη ποσότητα σύμφωνα με τη βιομάζα της δεξαμενής, με πελλέτα 1,5mm για συνολικό διάστημα 8 εβδομάδων. Η ποιότητα του νερού εκτροφής διατηρήθηκε στο μέγιστο και η θολερότητα του νερού των δεξαμενών διατηρήθηκε στο ελάχιστο μέσω καθημερινού σιφωνισμού των αιωρούμενων σωματιδίων.

Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας (61^η ημέρα εκτροφής), έγινε αναισθησία με MS-222 (15mg/l) για τη λήψη αίματος με σκοπό τη μέτρηση της κορτιζόλης και του αιματολογικού προφίλ και ευθανασία με υπερδοσολογία MS-222 (>25mg/l) προκειμένου να ληφθούν δείγματα για τη διερεύνησης της γενοτοξικότητας με τη μέθοδο SCGE, που περιγράφονται στο Παράρτημα.

2.7. Συνθήκες εκτροφής

Η ποιότητα του νερού εκτροφής σε όλα τα πειράματα διατηρήθηκε στο μέγιστο και η θολερότητα του νερού των δεξαμενών διατηρήθηκε στο ελάχιστο, μέσω καθημερινού σιφωνισμού των στερεών υπολειμμάτων. Η συγκέντρωση της αμμωνίας (<0,1 mg/l), τα νιτρώδη (NO₂) και νιτρικά (NO₃) ιόντα μετρούνταν με ειδικά χρωματογραφικά τεστ και η ενεργός οξύτητα του νερού (pH:8) παρακολουθούνταν καθημερινά και δεν διαπιστώθηκαν ιδιαίτερες μεταβολές. Το διαλυμένο οξυγόνο κατά τη διάρκεια των πειραμάτων κυμαινόταν από 6,5 έως 10,5 mg/l και κάθε δεξαμενή διέθετε αεριστήρα διάχυσης αέρα (αερόπετρα). Η αλατότητα διατηρήθηκε σταθερή (30±0,5‰) με προσθήκη γλυκού νερού όποτε κρίθηκε απαραίτητο. Η θερμοκρασία του νερού ήταν σταθερή στους 21±1°C καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

2.8. Στατιστική ανάλυση

Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το IBM SPSS Statistics ver. 26. Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (Standard Deviation=SD). Τα ποσοστιαία δεδομένα τροποποιήθηκαν πριν την στατιστική ανάλυση. Τα δεδομένα σχετικά με την θνησιμότητα, τις παραμέτρους ανάπτυξης και αξιοποίησης της τροφής, τη θρεπτική σύσταση, τις αιματολογικές παραμέτρους και

τον προσδιορισμό του βαθμού καταπόνησης (βλάβη του DNA και επίπεδα κορτιζόλης) ελέγχθηκαν για την κανονικότητα τους με το Shapiro-Wilk test και για την ομοιογένεια της παραλλακτικότητας μέσω του Levene's test, πριν τη στατιστική επεξεργασία με τη μέθοδο Ανάλυσης της Διακύμανσης Μονής Κατεύθυνσης (one-way ANOVA). Οι διαφορές κρίθηκαν στατιστικά σημαντικές για τιμές $p < 0,05$. Σε αυτήν την περίπτωση τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε Tukey's test για τον εντοπισμό των διαφορών μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων.

Για τον προσδιορισμό του προφίλ λιπαρών οξέων στο ολικό σώμα των ιχθύων και των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου χρησιμοποιήθηκε η μη-παραμετρική ανάλυση Kruskal-Wallis με πολλαπλές συγκρίσεις κατά ζεύγη (post-hoc test) διορθωμένες κατά Bonferroni για τον έλεγχο του σφάλματος τύπου I, λόγω των πολλαπλών συγκρίσεων.

Τα δεδομένα διερεύνησης της συμπεριφοράς ελέγχθηκαν για την κανονικότητα τους με το Shapiro-Wilk test και για την ομοιογένεια της παραλλακτικότητας μέσω του Levene's test, πριν τη στατιστική επεξεργασία. Για το ποσοστό των ψαριών στη ζώνη επιφάνειας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος mixed ANOVA, ακολουθούμενη από συγκρίσεις κατά ζεύγη (post hoc tests), μετά από διόρθωση κατά Bonferroni, με τις διατροφικές μεταχειρίσεις ως between-subjects factor και το χρόνο (ημέρα 1^η και ημέρα 74^η) ως within-subjects factor. Για το χρόνο τροφοληψίας στην πάνω και κάτω ζώνη της δεξαμενής χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος three-way mixed ANOVA, ακολουθούμενη από συγκρίσεις κατά ζεύγη (post hoc tests), μετά από διόρθωση κατά Bonferroni, με τις διατροφικές μεταχειρίσεις και τις ζώνες ως between-subjects factors και το χρόνο (ημέρα 1^η και ημέρα 74^η) ως within-subjects factor. Οι διαφορές κρίθηκαν στατιστικά σημαντικές για τιμές $p < 0,05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΠΕΙΡΑΜΑ 1 - Επίδραση της διατροφής με φαρμακευτικά φυτά στην ανάπτυξη και στην απόκριση καταπόνησης της τσιπούρας

3.1.1. Θνησιμότητες, παράμετροι ανάπτυξης και αξιοποίησης της τροφής

Όσον αφορά στις θνησιμότητες οι ομάδες που διατρέφονταν με έλαιο από σπόρους *C. sativa* δεν παρουσίασαν στατιστικές διαφορές με την ομάδα ελέγχου και είχαν το χαμηλότερο ποσοστό από όλες τις υπόλοιπες διατροφικές ομάδες. Οι περισσότερες θνησιμότητες παρατηρήθηκαν στις ομάδες που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης. Συγκεκριμένα, η ομάδα με το μεγαλύτερο ποσοστό προσθήκης ρίγανης (OR2%) είχε σημαντικά περισσότερες θνησιμότητες από την ομάδα OR1% αλλά και μικρότερο ποσοστό επιβίωσης από όλες τις διατροφικές ομάδες. Η προσθήκη αιθέριου ελαίου κανέλας επέφερε στατιστικά σημαντικές θνησιμότητες μόνο στην υψηλή ποσότητα προσθήκης (2% της τροφής), ενώ η ομάδα CIN1% είχε μικρότερο ποσοστό επιβίωσης το οποίο δεν διέφερε σημαντικά από την ομάδα ελέγχου και τις ομάδες CAN1% και CAN2%.

Οι τιμές των παραμέτρων αύξησης όπως η κατανάλωση τροφής, το τελικό βάρος, η αύξηση βάρους και ο ημερήσιος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (SGR) στις ομάδες CAN1%, CAN2% ήταν μεγαλύτερες αλλά όχι στατιστικά σημαντικές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στις ομάδες OR2% και CIN2% οι τιμές αύξησης ήταν σημαντικά χαμηλότερες. Αντίθετα, οι αντίστοιχες τιμές στις ομάδες OR1% και CIN1% δεν ήταν σημαντικά διαφορετικές από την ομάδα ελέγχου.

Ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) δεν είχε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και τις διατροφικές ομάδες εκτός από την ομάδα CIN2%, η οποία είχε σημαντικά υψηλότερο FCR. Ο συντελεστής διατήρησης λίπους (Lipid retention, LR) βρέθηκε σημαντικά μικρότερος μόνο στις ομάδες OR2% και CIN2%, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες διατροφικές ομάδες και την ομάδα ελέγχου. Ο ηπατοσωματικός δείκτης (HSI) και ο δείκτης ευρωστίας (K) δεν βρέθηκαν να παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διατροφικές μεταχειρίσεις και στην ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 2. Παράμετροι ανάπτυξης και αξιοποίησης της τροφής

Παράμετροι	CAN1%	CAN2%	OR1%	OR2%	CIN1%	CIN2%	CONTROL%
Επιβίωση(%)	94,44 ± 5,09 ^c	98,89 ± 1,92 ^c	75,00 ± 11,78 ^b	55,56 ± 9,62 ^a	88,99 ± 7,11 ^{bc}	73,33 ± 3,34 ^{ab}	95,55 ± 3,85 ^c
Καταν.τροφής (gr/ιχθύ)	55,47 ± 5,13 ^c	53,62 ± 3,51 ^c	46,27 ± 1,06 ^{bc}	31,37 ± 1,80 ^a	42,12 ± 3,92 ^b	32,62 ± 0,51 ^a	49,80 ± 2,74 ^{bc}
Τελ.μήκος(cm)	14,72 ± 0,45	14,69 ± 0,25	13,82 ± 0,44	11,95 ± 0,59	13,42 ± 0,50	11,74 ± 0,13	14,27 ± 0,35
Αρχικό βάρος (gr/ιχθύ)	4,89 ± 0,07	4,89 ± 0,07	4,91 ± 0,09	4,84 ± 0,00	5,00 ± 0,10	4,90 ± 0,04	4,94 ± 0,03
Τελικό βάρος (gr/ιχθύ)	49,47 ± 4,48 ^c	50,34 ± 2,53 ^c	42,92 ± 4,06 ^{bc}	26,09 ± 4,39 ^a	37,41 ± 3,97 ^b	24,21 ± 1,73 ^a	45,58 ± 3,98 ^{bc}
Αύξηση βάρους (gr/ιχθύ)	44,58 ± 4,44 ^c	45,45 ± 2,48 ^c	38,01 ± 3,97 ^{bc}	21,25 ± 4,38 ^a	32,41 ± 3,87 ^b	19,31 ± 1,75 ^a	40,65 ± 4,01 ^{bc}
SGR (%/ημέρα)	3,12 ± 0,12 ^c	3,15 ± 0,05 ^c	2,93 ± 0,10 ^{bc}	2,26 ± 0,22 ^a	2,71 ± 0,12 ^b	2,16 ± 0,10 ^a	3,00 ± 0,13 ^{bc}
FCR	1,25 ± 0,07 ^a	1,18 ± 0,03 ^a	1,22 ± 0,10 ^a	1,51 ± 0,22 ^{ab}	1,30 ± 0,05 ^a	1,70 ± 0,13 ^b	1,23 ± 0,06 ^a
LR (%)	77,00 ± 3,45 ^b	78,78 ± 1,74 ^b	83,36 ± 1,19 ^b	56,38 ± 10,36 ^a	76,32 ± 3,02 ^b	54,73 ± 3,35 ^a	76,18 ± 5,28 ^b
HSI (%)	1,97 ± 0,04	2,00 ± 0,04	1,94 ± 0,01	2,00 ± 0,03	2,01 ± 0,05	1,94 ± 0,03	1,96 ± 0,08
K	1,55 ± 0,01 ^{ab}	1,59 ± 0,03 ^{ab}	1,62 ± 0,00 ^b	1,52 ± 0,03 ^{ab}	1,55 ± 0,08 ^{ab}	1,50 ± 0,06 ^a	1,56 ± 0,02 ^{ab}

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές σε κάθε γραμμή που φέρουν διαφορετικό εκθέτη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (p<0,05) μεταξύ των διατροφικών ομάδων. SGR, ειδικός ρυθμός ανάπτυξης; FCR, συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής; LR, συντελεστής διατήρησης λίπους; HSI, ηπατοσωματικός δείκτης; K, δείκτης ευρωστίας

3.1.2. Θρεπτική σύσταση

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της θρεπτικής σύστασης σε ολόκληρο το σώμα των ψαριών. Η περιεκτικότητα σε υγρασία δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις διατροφικές ομάδες και την ομάδα του μάρτυρα. Οι πρωτεΐνες ήταν σημαντικά υψηλότερες στις ομάδες OR2% και CIN2% σε σύγκριση με τις ομάδες της κάνναβης και την ομάδα του μάρτυρα. Όσον αφορά τις δόσεις στις ομάδες της ρίγανης και της κανέλας οι πρωτεΐνες ήταν υψηλότερες στην υψηλότερη δόση με σημαντικές διαφορές μόνο στην ομάδα της ρίγανης. Αντίθετα, η λιποπεριεκτικότητα στο σώμα των ψαριών ήταν σημαντικά χαμηλότερη στις ομάδες OR2% και CIN2% σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες διατροφικές ομάδες και την ομάδα του μάρτυρα. Η τέφρα παρουσίασε σημαντικά την υψηλότερη τιμή στην ομάδα CIN2% ενώ οι σημαντικά χαμηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στις ομάδες CAN2% και OR1% σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Όσον αφορά τις δόσεις οι ομάδες OR2% και CIN2% παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη τιμή από τις ομάδες OR1% και CIN1% ενώ οι ομάδες CAN1% και CAN2% δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές. Η ολική ενέργεια στο σώμα των ψαριών ήταν σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα CAN2% και σημαντικά χαμηλότερη στην ομάδα CIN2% σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα, ενώ μόνο στην ομάδα της κανέλας παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δόσεων.

Πίνακας 3. Θρεπτική σύσταση ολικού σώματος τσιπούρας (% επί ξηράς ουσίας)

	CAN1%	CAN2%	OR1%	OR2%	CIN1%	CIN2%	CONTROL %
Υγρασία(%)	64,70±0,40 ^{ab}	64,38±0,64 ^a	64,79±1,50 ^{ab}	66,99±1,43 ^{ab}	65,65±0,75 ^{ab}	67,25±0,24 ^b	65,33± 1,87 ^{ab}
Πρωτεΐνες(%)	49,64±1,24 ^a	49,65±0,17 ^a	48,66±1,72 ^a	53,90±1,87 ^c	50,52±0,63 ^{ab}	52,94±0,34 ^{bc}	49,72±0,68 ^a
Λίπος(%)	37,79±1,29 ^b	36,94±1,39 ^b	38,46±2,21 ^b	31,50±2,76 ^a	36,99±0,97 ^b	32,05±0,91 ^a	37,17±0,57 ^b
Τέφρα(%)	10,51±0,37 ^{abc}	9,53±0,09 ^a	9,56±0,72 ^a	11,93±0,75 ^{cd}	10,03±0,29 ^{ab}	12,96±0,44 ^d	11,25±0,78 ^{bc}
Ενέργεια (KJ/Kg)	25,20±0,28 ^{bc}	26,26±0,23 ^c	24,64±0,18 ^{ab}	24,90±0,73 ^{ab}	25,86±0,22 ^{bc}	23,66±0,19 ^a	25,57±0,87 ^{bc}

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές σε κάθε γραμμή που φέρουν διαφορετικό εκθέτη υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0,05) μεταξύ των διατροφικών ομάδων.

3.1.3. Αιματολογικές παράμετροι

Στον Πίνακα 4 φαίνονται οι τιμές των αιματολογικών παραμέτρων μετά την τροφοληψία με φαρμακετικά φυτά διάρκειας 74 ημερών. Οι τιμές του αιματοκρίτη κυμάνθηκαν μεταξύ 25,22% έως 34,78% χωρίς στατιστικές διαφορές ανάμεσα στις διατροφικές ομάδες και την ομάδα ελέγχου. Παρομοίως, ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, εκτός από την ομάδα OR1%, η οποία είχε σημαντικά υψηλότερο αριθμό RBC από την ομάδα CIN2%. Ομοίως, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων αλλά και τα λεμφοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων και της ομάδας του μάρτυρα.

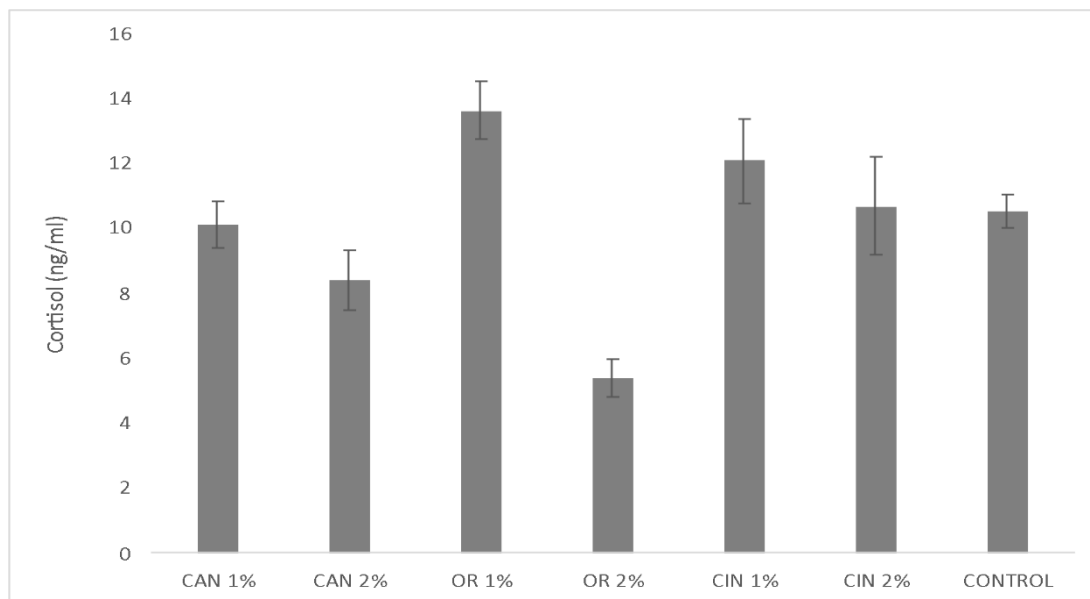
Πίνακας 4. Αιματολογικές παράμετροι μετά την τροφοληψία 74 ημερών

	CAN1%	CAN2%	OR1%	OR2%	CIN1%	CIN2%	CONTROL
Αιματοκρίτης (%)	32,78±4,67	34,22±5,74	34,00±1,00	33,50±7,21	34,00±2,73	25,22±1,71	34,78±7,38
RBC (10 ⁶ /mm ³)	0,98±0,15 ^{ab}	0,80±0,30 ^{ab}	1,48±0,45 ^b	0,99±0,13 ^{ab}	1,10±0,30 ^{ab}	0,57±0,03 ^{ab}	0,99±0,17 ^a
WBC (10 ⁶ /mm ³)	66,00±1,45	43,00±2,21	71,00±1,5	75,00±2,78	64,00±3,44	41,00±2,71	53,00±3,5
Λεμφοκύτταρα (%)	61,00±2,59	61,00±1,58	56,00±2,65	57,00±2,25	63,00±0,88	63,00±1,73	59,00±5,78
Κοκκιοκύτταρα (%)	39,00±2,65	39,00±1,71	39,00±1,71	39,00±2,00	39,00±0,85	39,00±1,35	39,00±5,79
Μονοκύτταρα (%)	0,67±0,14	0,67±0,24	0,50±0,32	0,50±0,12	0,67±0,04	0,67±0,21	0,67±0,14

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=3). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων (p<0,05).

3.1.4. Κορτιζόλη

Τα επίπεδα κορτιζόλης στο πλάσμα μετά την τροφοληψία με τα φυτοφαρμακευτικά φυτά διάρκειας 74 ημερών φαίνονται στο Διάγραμμα 1. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διατροφικές ομάδες αλλά και ούτε με την ομάδα ελέγχου.

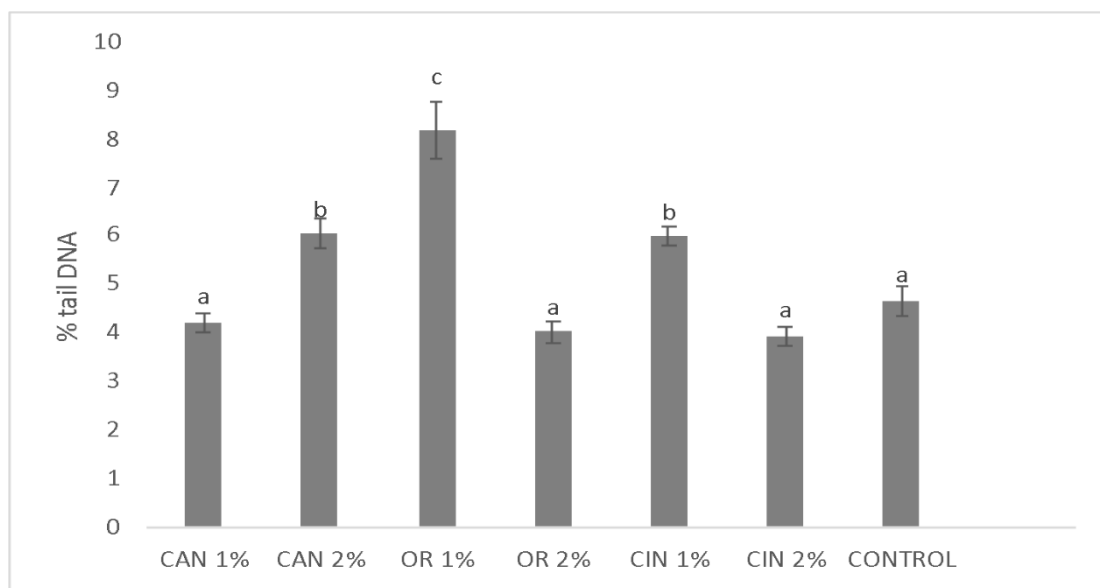


Διάγραμμα 1. Επίπεδα κορτιζόλης μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση (n=3). Μεταξύ των διατροφικών ομάδων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ($p>0,05$).

3.1.5. Βλάβη του DNA

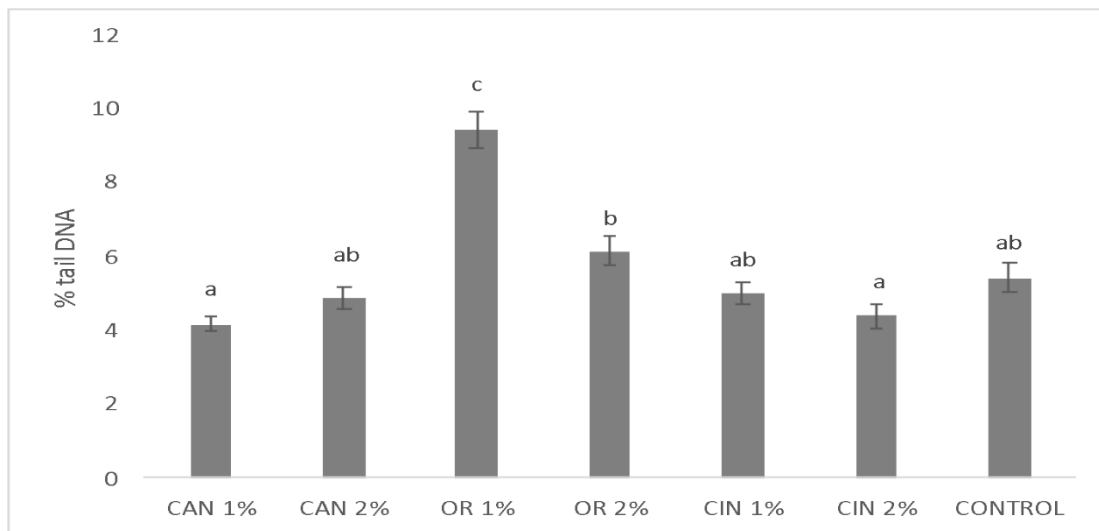
Η βλάβη στο DNA στα ηπατοκύτταρα έδειξε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διατροφικές ομάδες (Διαγρ. 2). Οι ομάδες CAN1%, OR2% και CIN2% δεν είχαν σημαντικές διαφορές με την ομάδα ελέγχου, ενώ αντίθετα οι ομάδες CAN2%, OR1% και CIN1% παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη γενotoξικότητα από την ομάδα ελέγχου, ιδιαίτερα η ομάδα OR1% που είχε την υψηλότερη τιμή. Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των δόσεων όπου η ομάδα CAN2% είχε σημαντικά υψηλότερη βλάβη στο DNA των ηπατοκυττάρων από την ομάδα CAN1%, ενώ οι ομάδες OR2% και CIN2% είχαν σημαντικά μικρότερη βλάβη στο DNA από τις αντίστοιχες ομάδες OR1% και CIN1%.



Διάγραμμα 2. Επίπεδο βλάβης του DNA στα ηπατοκύτταρα μετά την τροφολησία με φυτοφαρμακευτικά

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων ($p<0,05$).

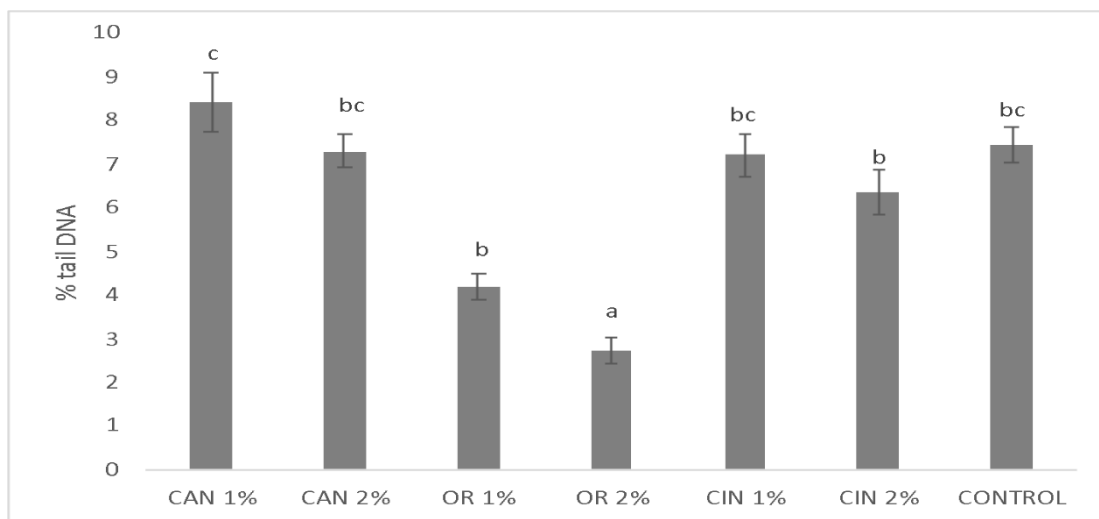
Σημαντικές διαφορές στη βλάβη του DNA στα κύτταρα εντέρου έδειξε η ομάδα OR1%, η οποία είχε σημαντικά υψηλότερη γενotoξικότητα από όλες τις υπόλοιπες διατροφικές ομάδες και την ομάδα ελέγχου (Διαγρ. 3). Στις υπόλοιπες ομάδες δεν παρατηρήθηκαν διαφορές συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των δόσεων παρατηρήθηκαν στις ομάδες OR1% και OR2%, ενώ οι ομάδες της κάνναβης και της κανέλας δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές.



Διάγραμμα 3. Επίπεδο βλάβης του DNA στα κύτταρα του εντέρου μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων ($p<0,05$).

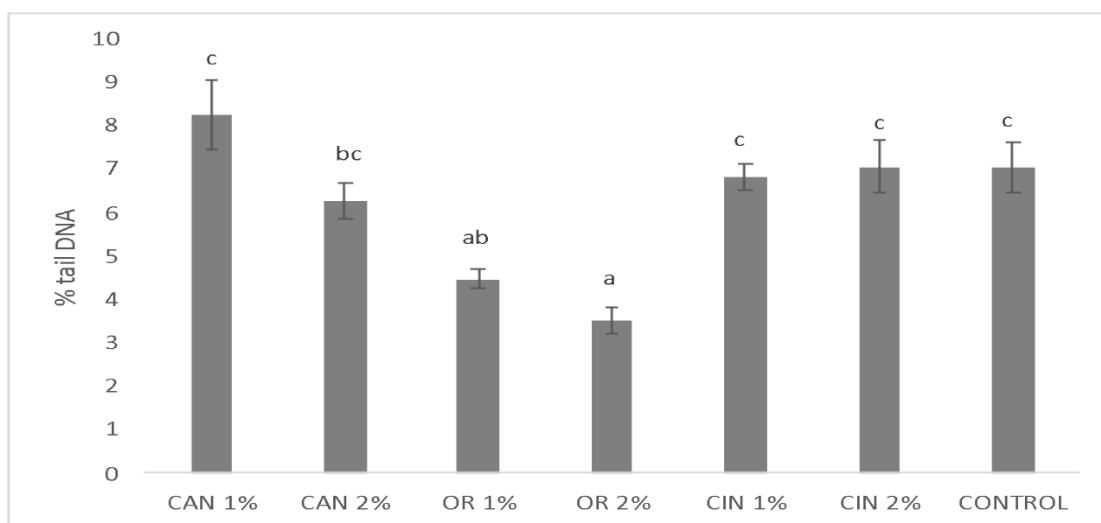
Τα επίπεδα βλάβης του DNA στα κύτταρα του νεφρού ήταν σημαντικά χαμηλότερα στην ομάδα OR2% σε σύγκριση με τις υπόλοιπες διατροφικές ομάδες και την ομάδα ελέγχου (Διαγρ. 4). Στις υπόλοιπες ομάδες δεν παρατηρήθηκαν διαφορές συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Μεταξύ των δόσεων σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο στις ομάδες της ρίγανης, όπου η ομάδα OR2% είχε σημαντικά χαμηλότερη βλάβη στο DNA από την ομάδα OR1%. Στις ομάδες της κάνναβης και της κανέλας δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δόσεων.



Διάγραμμα 4. Επίπεδο βλάβης του DNA στα κύτταρα του νεφρού μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων ($p<0,05$).

Στον σπλήνα η ομάδα OR2% είχε σημαντικά χαμηλότερη βλάβη στο DNA από τις ομάδες της κάνναβης και της κανέλας αλλά και από την ομάδα ελέγχου (Διαγρ. 5). Ωστόσο, συγκριτικά με την ομάδα OR1% δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές. Οι ομάδες CAN1%, CAN2%, CIN1% και CIN2% δεν είχαν σημαντικές διαφορές με την ομάδα ελέγχου.

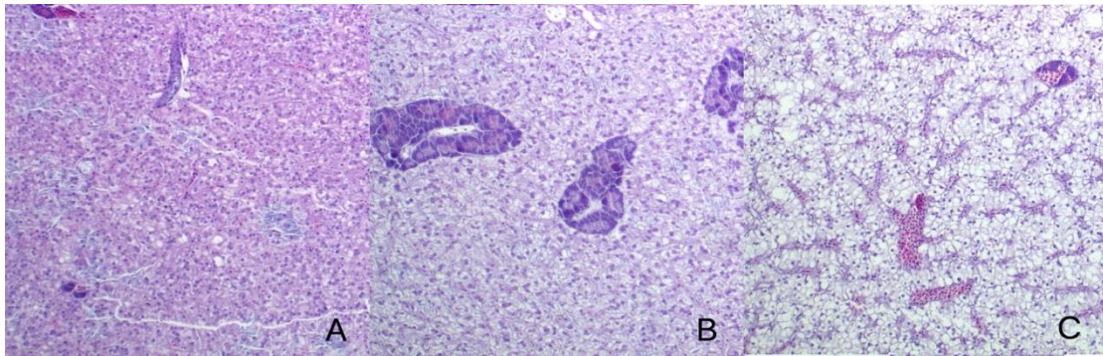


Διάγραμμα 5. Επίπεδο βλάβης του DNA στα κύτταρα του σπλήνα μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων ($p<0,05$).

3.1.6. Ιστολογικές αλλοιώσεις

Στην παρούσα μελέτη, στα δείγματα ήπατος που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικές αλλοιώσεις, ενώ στα δείγματα ήπατος των ομάδων που διατρέφονταν με έλαιο κάνναβης και αιθέριο έλαιο κανέλας σε ποσοστό 2%, παρατηρήθηκε ηπατική στεάτωση (hepatic steatosis). Κενοτοπίωση του κυτταροπλάσματος (hepatocellular vacuolation) παρατηρήθηκε λόγω συσσώρευσης λίπους σε μορφή μικρών σταγονιδίων στα ηπατοκύτταρα, ενώ δεν παρατηρήθηκε νέκρωση και φλεγμονώδης διήθηση. Στα δείγματα του πρόσθιου εντέρου όλων των διατροφικών μεταχειρίσεων δεν βρέθηκαν ιστομορφολογικές αλλοιώσεις και παθολογικά ευρήματα.



Εικόνα 7. Ιστολογική ανάλυση ήπατος τσιπούρας διατρεφόμενη με (Α) τροφή χωρίς καμία προσθήκη (Β) τροφή με προσθήκη *C. zeylanicum* 2% (C) τροφή με προσθήκη *C. sativa* 2%.

3.1.7. Προφίλ λιπαρών οξέων

Μετά τη λήξη του διατροφικού πειράματος διάρκειας 74 ημερών, η περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) σε όλες τις διατροφικές ομάδες δεν έδειξε σημαντικές διαφορές με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μία τάση αύξησης του επιπέδου SFA ανάμεσα στις δύο χορηγούμενες δόσεις, με το ποσοστό 2% να παρουσιάζει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε σχέση με το ποσοστό 1%, με σημαντικές διαφορές μόνο στην ομάδα που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης (Πιν. 5). Το παλμιτικό (16:0), στεατικό οξύ (18:0) και μυριστικό οξύ (14:0) ήταν τα κύρια λιπαρά οξέα ανάμεσα στα SFA.

Η περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) και το επίπεδο ελαϊκού οξέος (18:1n-9) δεν ήταν στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στις διατροφικές μεταχειρίσεις και την ομάδα ελέγχου (Πιν. 5).

Σημαντικά μικρότερο επίπεδο n-6 έδειξαν σε σχέση με την ομάδα ελέγχου οι ομάδες CAN1%, OR1% και CIN2% ($p < 0,05$), ενώ όσον αφορά τις δόσεις μόνο οι ομάδες CAN1% και CAN2% είχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Το αραχιδονικό οξύ (ARA, 20:4n-6), δεν έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.

Στα αθροίσματα των n-3 και των n-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας (n-3 LC PUFA) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών μεταχειρίσεων και της ομάδας ελέγχου. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν στατιστικές διαφορές ανάμεσα στις δύο χορηγούμενες δόσεις στην ομάδα που διατρέφονταν με έλαιο σπόρων κάνναβης, όπου η ομάδα CAN2% είχε σημαντικά υψηλότερο επίπεδο n-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) σε σχέση με την ομάδα CAN1% ($p < 0,05$).

Τέλος, ο λόγος n-3/n-6 βρέθηκε αυξημένος και μεγαλύτερος του 1 σε όλες τις διατροφικές μεταχειρίσεις με σημαντικές διαφορές στις ομάδες CAN1%, OR1%, CIN1% και CIN2% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 5. Σύσταση λιπαρών οξέων του λίπους (g/100g ιστού±SD) στο ολικό σώμα των ιχθύων

	CAN1%	CAN2%	OR1%	OR2%	CIN1%	CIN2%	CONTROL
14:0	3,19±0,06 ^a	3,16±0,13 ^a	3,48±0,09 ^{ab}	3,72±0,18 ^b	3,48±0,16 ^{ab}	4,16±0,56 ^b	3,24±0,04 ^a
15:0	0,26±0,00 ^a	0,25±0,01 ^a	0,32±0,01 ^b	0,33±0,00 ^b	0,28±0,00 ^{ab}	0,35±0,05 ^b	0,26±0,01 ^a
16:0	17,23±0,15 ^{ab}	16,70±0,16 ^a	16,92±0,45 ^{ab}	17,48±0,01 ^b	17,29±0,77 ^{ab}	18,41±1,89 ^b	17,43±0,14 ^{ab}
iso 17:0	0,19±0,01 ^a	0,20±0,00 ^{ab}	0,23±0,02 ^b	0,24±0,00 ^b	0,22±0,01 ^{ab}	0,25±0,01 ^b	0,20±0,00 ^{ab}
17:0	0,28±0,02 ^a	0,30±0,01 ^{ab}	0,33±0,01 ^{bc}	0,34±0,00 ^{bc}	0,30±0,03 ^{ab}	0,38±0,05 ^c	0,30±0,00 ^{ab}
18:0	5,42±0,32 ^b	4,88±0,16 ^{ab}	4,47±0,22 ^a	4,59±0,02 ^a	4,71±0,12 ^{ab}	5,22±0,60 ^b	4,70±0,13 ^a
iso 19:0	0,21±0,01 ^{ab}	0,17±0,00 ^a	0,25±0,04 ^b	0,23±0,00 ^b	0,20±0,00 ^{ab}	0,26±0,06 ^b	0,18±0,01 ^a
19:0	0,28±0,01 ^a	0,69±0,03 ^c	0,26±0,05 ^a	0,31±0,01 ^{ab}	0,37±0,03 ^{abc}	0,31±0,08 ^{ab}	0,39±0,03 ^{abc}
iso 20:0	0,09±0,00 ^b	0,03±0,00 ^a	0,06±0,01 ^{ab}	0,04±0,00 ^{ab}	0,04±0,00 ^{ab}	0,10±0,08 ^b	0,03±0,00 ^a
20:0	0,33±0,00 ^b	0,29±0,01 ^{ab}	0,27±0,01 ^a	0,26±0,00 ^a	0,26±0,01 ^a	0,32±0,05 ^{ab}	0,27±0,00 ^a
iso 21:0	0,41±0,07 ^a	0,66±0,09 ^c	0,49±0,02 ^{ab}	0,50±0,02 ^{ab}	0,54±0,04 ^{bc}	0,43±0,06 ^a	0,58±0,10 ^{bc}
21:0	0,21±0,02 ^a	0,51±0,02 ^{ab}	0,61±0,02 ^b	0,59±0,02 ^b	0,52±0,03 ^{ab}	0,48±0,18 ^a	0,49±0,01 ^{ab}
22:0	0,33±0,01 ^b	0,21±0,01 ^{ab}	0,17±0,01 ^a	0,18±0,01 ^a	0,20±0,01 ^{ab}	0,23±0,02 ^b	0,20±0,01 ^a
24:0	0,05±0,00 ^a	0,04±0,01 ^a	0,11±0,07 ^b	0,13±0,08 ^b	0,03±0,02 ^a	MA	0,02±0,01 ^a
25:0	1,12±0,078 ^a	1,14±0,14 ^a	1,46±0,17 ^{ab}	1,50±0,20 ^{ab}	1,19±0,17 ^a	1,63±0,16 ^b	1,28±0,32 ^{ab}
SFA	29,83±0,56 ^a	30,11±0,34 ^{ab}	29,68±0,77 ^a	31,83±0,77 ^{bc}	30,59±0,80 ^{abc}	33,80±0,74 ^c	30,44±0,22 ^{abc}
15:1	MA	0,03±0,00 ^a	0,04±0,02 ^a	0,04±0,00 ^a	0,04±0,00 ^a	0,12±0,12 ^b	0,04±0,00 ^a
16:1n-9	0,54±0,00 ^a	0,56±0,03 ^a	0,71±0,00 ^b	0,74±0,00 ^b	0,57±0,06 ^{ab}	0,61±0,06 ^{ab}	0,57±0,07 ^a
16:1n-7	6,41±0,08 ^{ab}	5,81±0,17 ^a	6,91±0,19 ^b	6,93±0,10 ^b	6,45±0,24 ^{ab}	7,05±0,45 ^b	6,02±0,03 ^a
16:1n-5	0,10±0,01 ^a	0,11±0,00 ^a	0,14±0,00 ^b	0,14±0,01 ^b	0,12±0,00 ^{ab}	0,14±0,01 ^b	0,11±0,00 ^a
17:1n-7	0,27±0,07	0,31±0,01	0,34±0,02	0,34±0,01	0,34±0,02	0,33±0,09	0,29±0,01
18:1n-9	24,69±0,11	24,23±0,10	23,55±0,15	23,97±0,10	25,18±0,30	24,43±1,47	25,75±0,23
18:1n-7	3,69±0,19 ^{ab}	3,45±0,03 ^a	3,94±0,02 ^b	3,93±0,01 ^b	3,70±0,04 ^{ab}	4,01±0,23 ^b	3,50±0,08 ^a
18:1n-5	MA	0,02±0,00 ^a	0,03±0,00 ^b	0,03±0,00 ^b	0,02±0,00 ^{ab}	0,03±0,00 ^b	0,02±0,00 ^a
19:1	0,17±0,02 ^c	0,11±0,00 ^{abc}	0,10±0,01 ^{ab}	0,09±0,01 ^a	0,12±0,01 ^{bc}	0,09±0,03 ^{ab}	0,11±0,00 ^{ab}
20:1n-11	0,57±0,03 ^{bc}	0,42±0,02 ^a	0,52±0,08 ^{abc}	0,56±0,01 ^{bc}	0,49±0,01 ^{ab}	0,81±0,03 ^c	0,46±0,00 ^{ab}
20:1n-9	2,91±0,03 ^c	2,15±0,05 ^a	2,91±0,04 ^c	2,89±0,01 ^{bc}	2,41±0,02 ^{abc}	2,74±0,22 ^{bc}	2,23±0,10 ^{ab}
20:1n-7	0,22±0,03 ^b	0,18±0,01 ^a	0,21±0,02 ^{ab}	0,22±0,00 ^b	0,20±0,00 ^{ab}	0,25±0,04 ^b	0,18±0,00 ^a

22:1n-11	1,27±0,01 ^a	1,42±0,07 ^a	1,84±0,06 ^{bc}	1,82±0,03 ^{bc}	1,66±0,02 ^{abc}	1,90±0,17 ^c	1,48±0,01 ^{ab}
22:1n-9	0,79±0,07 ^c	0,52±0,02 ^a	0,62±0,03 ^{bc}	0,61±0,02 ^{bc}	0,56±0,02 ^{ab}	0,61±0,04 ^{bc}	0,53±0,00 ^{ab}
24:1 isomers	0,59±0,04	0,62±0,06	0,80±0,01	0,82±0,02	0,72±0,06	0,80±0,03	0,72±0,07
MUFA	42,48±0,86	40,05±0,24	43,30±0,51	43,19±0,39	42,67±0,16	42,46±0,89	41,93±0,31
16:3n-3	0,08±0,10	0,02±0,02	0,02±0,00	0,03±0,02	0,05±0,05	0,03±0,00	0,02±0,00
16:4n-3	0,01±0,00	MA	MA	MA	0,01±0,00	MA	MA
18:3n-3	1,22±0,07 ^a	2,50±0,05 ^b	1,14±0,02 ^a	1,14±0,19 ^a	1,48±0,07 ^{ab}	1,05±0,29 ^a	1,59±0,08 ^{ab}
18:4n-3	0,48±0,13	0,90±0,03	0,90±0,06	0,84±0,05	0,88±0,04	0,85±0,20	0,76±0,02
20:3n-3	0,31±0,17 ^a	0,65±0,02 ^c	0,58±0,02 ^{bc}	0,56±0,00 ^{abc}	0,53±0,05 ^{ab}	0,46±0,17 ^{ab}	0,57±0,01 ^{bc}
20:5n-3	4,00±0,32 ^{ab}	4,13±0,17 ^{ab}	3,53±0,32 ^a	4,01±0,17 ^{ab}	4,45±0,18 ^b	3,69±1,67 ^{ab}	3,78±0,11 ^{ab}
21:5n-3	0,27±0,02	0,30±0,02	0,32±0,02	0,31±0,02	0,31±0,12	0,26±0,12	0,30±0,03
22:5n-3	1,28±0,03 ^a	1,97±0,04 ^c	1,76±0,06 ^{ab}	1,84±0,07 ^{abc}	1,78±0,12 ^{abc}	1,33±0,64 ^{ab}	1,87±0,02 ^{bc}
22:6n-3	4,50±0,04 ^{ab}	4,73±0,16 ^b	4,58±0,30 ^{ab}	4,70±0,08 ^b	4,84±0,20 ^b	4,00±1,75 ^a	4,57±0,02 ^{ab}
n-3	13,06±0,96 ^a	15,21±0,40 ^b	13,02±0,91 ^a	13,16±0,33 ^a	14,37±0,60 ^{ab}	12,97±0,41 ^a	13,49±0,22 ^{ab}
n-3 LC PUFA	10,62±0,47	11,79±0,35	10,98±0,92	11,07±0,36	11,96±0,52	10,73±0,51	11,54±0,35
18:2n-6	9,13±0,13 ^{ab}	11,89±0,27 ^c	8,19±0,03 ^a	9,35±0,04 ^{abc}	9,80±0,27 ^{bc}	9,08±9,70 ^{ab}	11,45±0,42 ^c
18:3n-6	0,18±0,00 ^a	0,22±0,00 ^{ab}	0,23±0,02 ^b	0,23±0,00 ^b	0,23±0,01 ^b	0,22±0,03 ^b	0,21±0,01 ^{ab}
20:2n-6	0,36±0,01 ^{bc}	0,39±0,01 ^c	0,28±0,08 ^a	0,30±0,02 ^{ab}	0,34±0,01 ^{abc}	0,31±0,03 ^{ab}	0,37±0,02 ^{bc}
20:3n-6	0,28±0,01 ^{ab}	0,39±0,01 ^b	0,27±0,07 ^a	0,23±0,00 ^a	0,28±0,02 ^{ab}	0,21±0,07 ^a	0,29±0,03 ^b
20:4n-6	0,26±0,04	0,17±0,00	0,25±0,07	0,22±0,00	0,17±0,06	0,12±0,03	0,14±0,00
22:2n-6	0,20±0,03	0,25±0,02	0,27±0,08	0,32±0,01	0,24±0,01	0,34±0,04	0,29±0,04
22:4n-6	0,24±0,10	0,15±0,01	0,24±0,08	0,18±0,04	0,15±0,03	0,14±0,05	0,16±0,03
22:5n-6	0,21±0,14	0,14±0,01	0,19±0,04	0,19±0,12	0,18±0,04	0,17±0,08	0,16±0,03
n-6	10,85±0,18 ^a	13,61±0,23 ^b	10,13±0,36 ^a	11,06±0,18 ^{ab}	11,37±0,25 ^{ab}	10,64±0,45 ^a	13,13±0,46 ^b
SFA/MUFA	0,70±0,04 ^a	0,75±0,01 ^{ab}	0,69±0,09 ^a	0,74±0,03 ^{ab}	0,72±0,06 ^a	0,80±0,08 ^b	0,73±0,06 ^{ab}
n-3/n-6 PUFA	1,21±0,04 ^b	1,13±0,02 ^{ab}	1,28±0,01 ^b	1,19±0,07 ^{ab}	1,26±0,02 ^b	1,22±0,04 ^b	1,03±0,06 ^a
18:1n-9/n-3LC PUFA	2,61±0,02 ^b	2,05±0,06 ^a	2,14±0,09 ^a	2,16±0,17 ^a	2,12±0,07 ^a	2,37±0,02 ^{ab}	2,22±0,07 ^{ab}
SFA/n-3 LC PUFA	2,91±0,06 ^{ab}	2,55±0,04 ^a	2,70±0,02 ^{ab}	2,87±0,13 ^{ab}	2,57±0,04 ^a	3,15±0,06 ^b	2,65±0,09 ^{ab}

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές σε κάθε γραμμή που φέρουν διαφορετικό εκθέτη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (p<0,05) μεταξύ των διατροφικών ομάδων. MA: Μη Ανιχνεύσιμο, Λιπαρά οξέα που δεν ανιχνεύθηκαν ή η ποσότητα που υπολογίστηκε ήταν ελάχιστη δεν αναφέρονται στον πίνακα. SFA: Κορεσμένα λιπαρά οξέα (saturated Fatty Acids), MUFA: Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (monounsaturated fatty acids), PUFA: Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids), EPA: Eicosapentaenoic acid, DHA: Docosahexaenoic acid.

3.1.8. Νευροδιαβιβαστές

Με βάση του λόγους πρόβλεψης των νευροδιαβιβαστών 18:1n-9/n-3 LC PUFA και SFA/n-3 LC PUFA στο ολικό σώμα των ψαριών δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην ντοπαμίνη (DA) σε καμία διατροφική ομάδα. Σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση σεροτονίνης (5-HT) και χαμηλότερη συγκέντρωση 5-HIAA (p<0,05) βρέθηκε στην ομάδα CAN2% σε σχέση με την ομάδα CAN1%, χωρίς σημαντικές διαφορές από την ομάδα ελέγχου. Ο λόγος DOPAC/DA βρέθηκε μεγαλύτερος στο ρομβοειδή εγκέφαλο της ομάδας CAN1% και CIN2%, ενώ ο λόγος 5-HIAA/5-HT στον τελικό και ρομβοειδή εγκέφαλο δεν έδειξε σημαντικές διαφορές σε καμία διατροφική ομάδα.

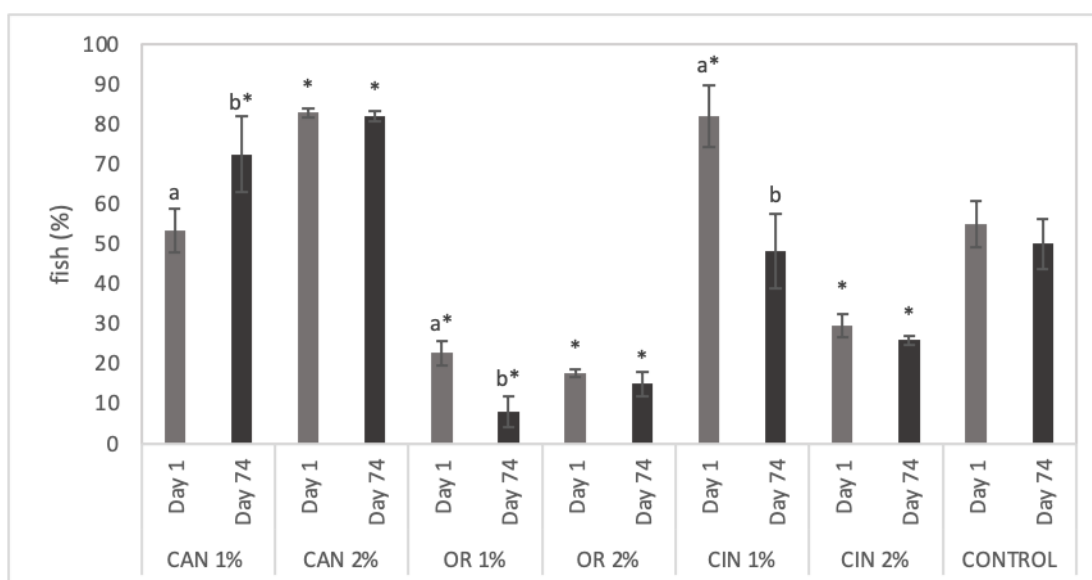
Πίνακας 6. Συγκέντρωση νευροδιαβιβαστών εγκεφάλου (ng/g $\pm$ SD) βάση των μοντέλων πρόβλεψης 18:1n-9/n-3 LC PUFA και SFA/n-3 LC PUFA στο ολικό σώμα των ψαριών

	CAN1%	CAN2%	OR1%	OR2%	CIN1%	CIN2%	CONTROL%
DA τελικού εγκεφάλου	1,337 $\pm$ 0,0010	1,142 $\pm$ 0,0029	1,138 $\pm$ 0,0061	1,134 $\pm$ 0,0068	1,140 $\pm$ 0,0039	1,129 $\pm$ 1,5392	1,138 $\pm$ 0,0007
5-HIAA/5-HT τελικού εγκεφάλου	0,765 $\pm$ 0,0053	0,810 $\pm$ 0,0049	0,804 $\pm$ 0,0010	0,806 $\pm$ 0,0074	0,804 $\pm$ 0,0055	0,796 $\pm$ 1,4941	0,796 $\pm$ 0,0044
5-HT μέσου εγκεφάλου	1,683 $\pm$ 0,0168 ^a	1,969 $\pm$ 0,0234 ^b	1,946 $\pm$ 0,0014 ^{ab}	1,962 $\pm$ 0,0053 ^{ab}	1,938 $\pm$ 0,230 ^{ab}	1,841 $\pm$ 0,0362 ^{ab}	1,897 $\pm$ 0,0356 ^{ab}
DOPAC/DA μέσου εγκεφάλου	1,073 $\pm$ 0,0072	1,088 $\pm$ 0,0031	1,083 $\pm$ 0,0016	1,081 $\pm$ 0,0050	1,084 $\pm$ 0,0035	1,068 $\pm$ 0,2592	1,079 $\pm$ 0,0018
5-HIAA ρομβοειδούς εγκεφάλου	1,222 $\pm$ 0,0010 ^b	1,157 $\pm$ 0,0065 ^a	1,167 $\pm$ 0,0016 ^{ab}	1,172 $\pm$ 0,0024 ^{ab}	1,164 $\pm$ 0,0098 ^{ab}	1,207 $\pm$ 0,0133 ^{ab}	1,175 $\pm$ 0,0083 ^{ab}
DOPAC/DA ρομβοειδούς εγκεφάλου	1,132 $\pm$ 0,0097 ^b	1,081 $\pm$ 0,0059 ^a	1,091 $\pm$ 0,0056 ^{ab}	1,098 $\pm$ 0,0050 ^{ab}	1,086 $\pm$ 0,0101 ^a	1,131 $\pm$ 0,0056 ^b	1,095 $\pm$ 0,0071 ^{ab}
5-HIAA/5-HT ρομβοειδούς εγκεφάλου	1,109 $\pm$ 0,0010	1,121 $\pm$ 0,0021	1,118 $\pm$ 0,0006	1,114 $\pm$ 0,0018	1,119 $\pm$ 0,0030	1,101 $\pm$ 0,0065	1,116 $\pm$ 0,0964

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση (n=3). Οι τιμές σε κάθε γραμμή που φέρουν διαφορετικό εκθέτη υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (p<0,05) μεταξύ των διατροφικών ομάδων. DA: ντοπαμίνη, 5-HIAA: 5-Υδροξυ-ινδολοοξικό οξύ, 5-HT: σεροτονίνη, DOPAC: 3,4-Διυδροξυφαινυλοξικό οξύ

3.1.9. Συμπεριφορά

Σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ημερών στη ζώνη επιφάνειας 5 δευτερόλεπτα πριν πέσει η τροφή στο νερό παρατηρήθηκαν σε όλες τις ομάδες που διατρέφονταν με τα εξεταζόμενα φυτοφαρμακευτικά σε ποσοστό προσθήκης 1%. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό των ψαριών στη ζώνη επιφάνειας μειώθηκε σημαντικά μετά από 74 ημέρες τροφολησίας με την τροφή που περιείχε αιθέριο έλαιο ρίγανης και κανέλας, ενώ το ποσοστό αυξήθηκε σημαντικά στην περίπτωση του ελαίου σπόρων κάνναβης. Σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν σε όλες τις διατροφικές ομάδες με ποσοστό προσθήκης 2% και τις δύο ημέρες, με το έλαιο κάνναβης να παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερες τιμές ενώ τα αιθέρια έλαια ρίγανης και κανέλας σημαντικά χαμηλότερες. Σημαντικά υψηλότερο ποσοστό ψαριών στη ζώνη επιφάνειας παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του ελαίου σπόρων κάνναβης σε ποσοστό 2% και του αιθέριου ελαίου κανέλας σε ποσοστό 1%. Το αιθέριο έλαιο ρίγανης σε ποσοστό 1% παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό και στις δύο ημέρες.

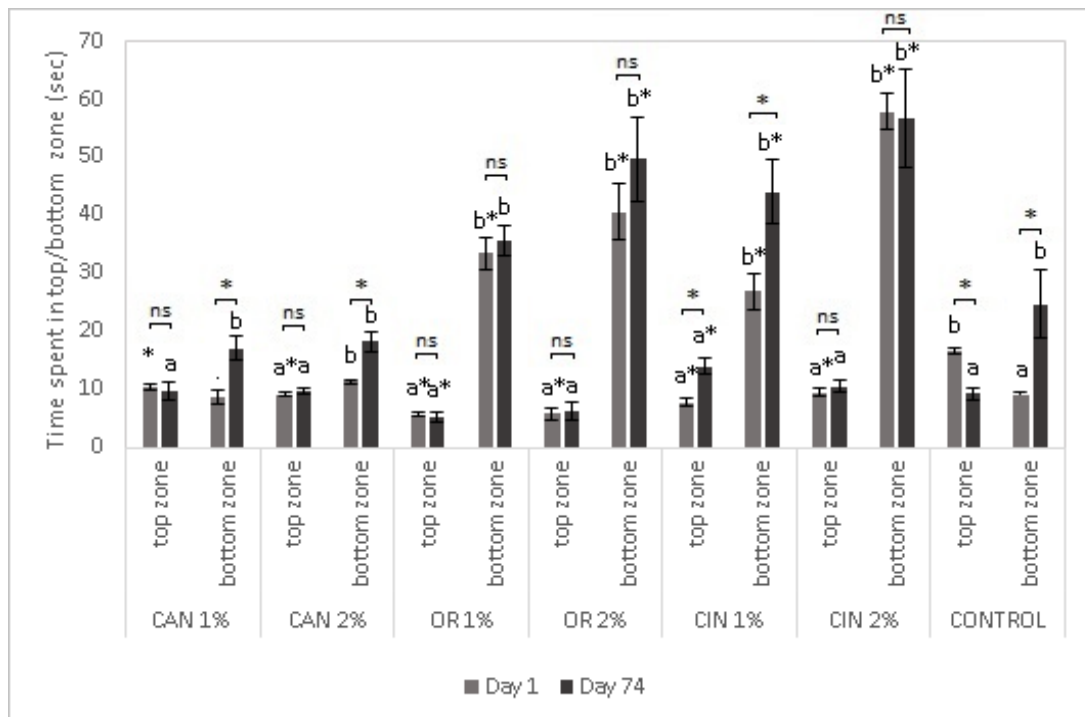


Διάγραμμα 6. Ποσοστό ψαριών στη ζώνη επιφάνειας 5sec πριν την έναρξη της τροφολησίας

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ημερών εντός διατροφικών ομάδων, ενώ οι αστερίσκοι (*) υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μίας συγκεκριμένης ημέρας σε σύγκριση με την αντίστοιχη ημέρα της ομάδας ελέγχου ($p<0,05$).

Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν σε όλες τις διατροφικές ομάδες μεταξύ των δύο ζωνών (Διαγρ. 7). Ο χρόνος τροφολησίας στην κάτω ζώνη ήταν σημαντικά μεγαλύτερος σε όλες τις περιπτώσεις, με εξαίρεση την ομάδα ελέγχου όπου παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερες τιμές στην πάνω ζώνη την 1^η ημέρα (DAY 1) και την ομάδα CAN1%, όπου δεν παρατηρήθηκαν στατιστικές διαφορές. Σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου σημαντικά μικρότερος χρόνος παρατηρήθηκε στην

πάνω ζώνη την 1^η ημέρα στις ομάδες που διατρέφονταν με έλαιο από σπόρους κάνναβης. Ο χρόνος τροφοληψίας στην πάνω ζώνη ήταν σημαντικά χαμηλότερος στις ομάδες που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης, ενώ σημαντικά μεγαλύτερος στην κάτω ζώνη. Στις ομάδες που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο κανέλας παρατηρήθηκε το ίδιο μοτίβο με εξαίρεση το χρόνο τροφοληψίας στην πάνω ζώνη την ημέρα 74, όπου ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου. Μεταξύ των ημερών εντός των ζωνών σημαντικές διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν στην περίπτωση του ελαίου σπόρων κάνναβης 1% και 2%, όπου ο χρόνος τροφοληψίας φάνηκε να είναι σημαντικά μεγαλύτερος την ημέρα 74 σε σχέση με την ημέρα 1 στην κάτω ζώνη, στην περίπτωση του αιθέριου ελαίου κανέλας σε ποσοστό 1% μεταξύ των ημερών και στις δύο ζώνες και στην ομάδα ελέγχου. Στις ομάδες που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές.



Διάγραμμα 7. Χρόνος τροφοληψίας στην πάνω και κάτω ζώνη της δεξαμενής

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση (n=3). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ζωνών εντός διατροφικής ομάδας, ενώ οι αστερίσκοι δίπλα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου. Οι αστερίσκοι που είναι τοποθετημένοι πάνω από τις στήλες υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ημερών εντός ζώνης (πάνω/κάτω) ($p < 0,05$), ns: not significant

3.2. ΠΕΙΡΑΜΑ 2 - Επίδραση οξείας καταπόνησης, προκληθείσας μέσω έντονων χειρισμών απόχης στην απόκρισης καταπόνησης της τσιπούρας μετά από διατροφή με φαρμακευτικά φυτά

3.2.1. Αιματολογικές παράμετροι

Ο αιματοκρίτης μετά την υποβολή των ψαριών σε οξύ stress κυμάνθηκε σε όλες τις ομάδες μεταξύ 41% και 52% με σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών μεταχειρίσεων και της ομάδας ελέγχου. Στατιστικές διαφορές παρατηρήθηκαν στις ομάδες που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο κανέλας, όπου η ομάδα CIN1% παρουσίασε σημαντικά υψηλότερο αιματοκρίτη από την ομάδα CIN2%. Μεταξύ των ομάδων CAN1%-CAN2% και OR1%-OR2% δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές. Οι ομάδες CAN1%, CAN2% και CIN1% παρουσίασαν τις μεγαλύτερες τιμές αιματοκρίτη χωρίς σημαντικές διαφορές με την ομάδα ελέγχου. Ο αριθμός των RBC και WBC δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων και την ομάδα ελέγχου, ενώ ο τύπος των λευκοκυττάρων έδειξε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό λεμφοκυττάρων στις ομάδες OR1% και OR2% σε σύγκριση με τις υπόλοιπες διατροφικές ομάδες και την ομάδα ελέγχου. Μεταξύ των δόσεων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές. Αντίθετα, το ποσοστό των κοκκιοκυττάρων ήταν σημαντικά μικρότερο στις ομάδες OR1% και OR2% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ οι υπόλοιπες ομάδες δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές. Παρομοίως, μεταξύ των δόσεων δεν παρατηρήθηκαν στατιστικές διαφορές. Τα μονοκύτταρα δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διατροφικές ομάδες και στην ομάδα ελέγχου.

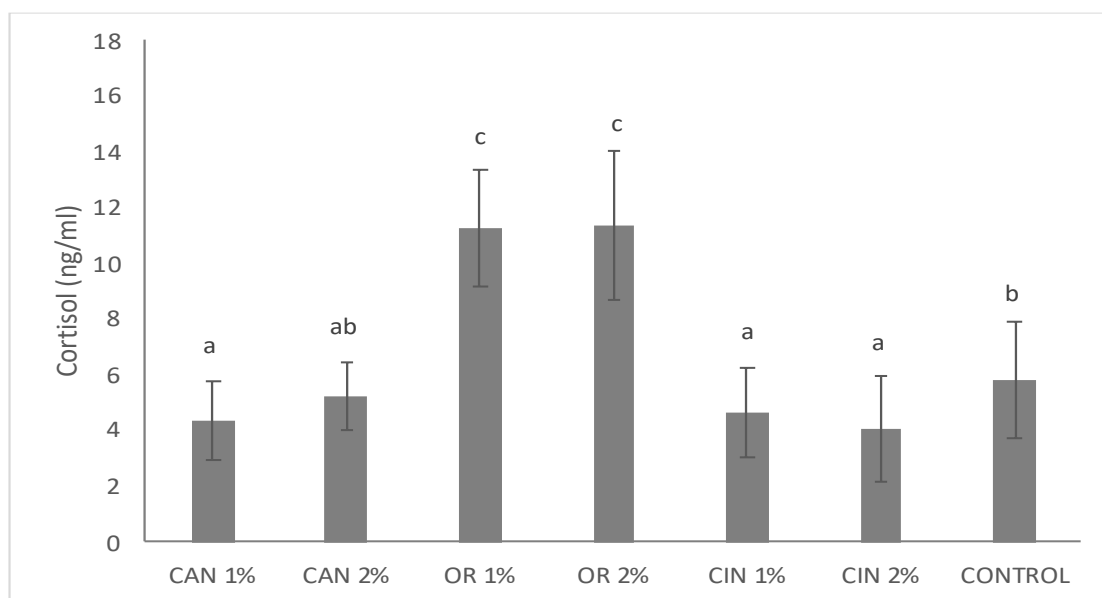
Πίνακας 7. Αιματολογικές παράμετροι μετά την τροφολησία με φυτοφαρμακευτικά και υποβολή των ιχθύων σε οξύ stress

	CAN1%	CAN2%	OR1%	OR2%	CIN1%	CIN2%	CONTROL
Αιματοκρίτης (%)	50,00±3,06 ^b	52,00±2,00 ^b	46,00±0,58 ^{ab}	41,00±3,00 ^a	49,00±2,08 ^b	43,00±1,73 ^a	46,00±0,58 ^{ab}
RBC (10 ⁶ /mm ³)	2,24±0,75	2,09±1,17	1,78±0,04	1,67±0,19	1,82±0,24	1,49±0,32	1,61±0,20
WBC (10 ⁶ /mm ³)	34,24±13,96	48,52±8,32	34,81±1,91	50,19±0,84	26,92±2,76	38,78±12,23	31,79±3,27
Λεμφοκύτταρα (%)	56,67±11,15 ^a	63,33±3,21 ^{ab}	67,33±0,58 ^b	67,67±1,15 ^b	60,33±1,53 ^a	58,67±0,58 ^a	59,67±2,52 ^a
Κοκκιοκύτταρα (%)	42,33±11,15 ^b	36,00±3,61 ^{ab}	32,00±0,00 ^a	32,00±1,00 ^a	38,67±1,53 ^{ab}	41,00±1,00 ^b	39,67±3,06 ^b
Μονοκύτταρα (%)	1,00±0,14	0,67±0,24	0,67±0,32	0,67±0,12	1,00±0,04	0,67±0,21	0,67±0,14

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=3). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων (p<0,05).

3.2.2. Κορτιζόλη

Στις ομάδες OR1% και OR2% τα επίπεδα κορτιζόλης διέφεραν σημαντικά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και τις υπόλοιπες διατροφικές ομάδες (Διαγρ.8). Οι τιμές στις ομάδες CAN1%, CIN1% και CIN2% ήταν σημαντικά χαμηλότερες από την ομάδα ελέγχου, ενώ οι ομάδες που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης (OR1% και OR2%) παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερες τιμές σε σχέση με τις άλλες διατροφικές ομάδες και την ομάδα ελέγχου.

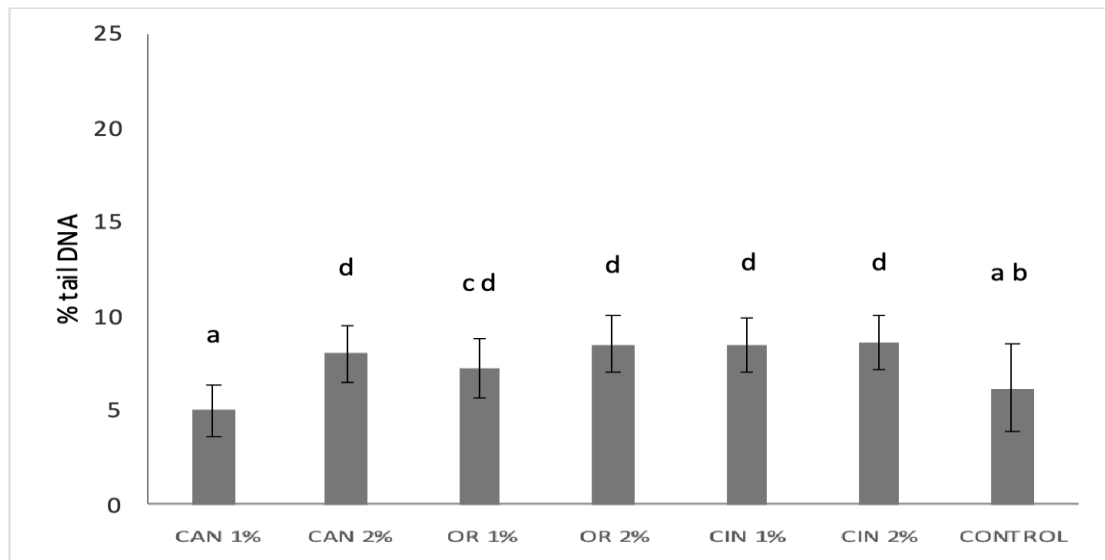


Διάγραμμα 8. Επίπεδα κορτιζόλης μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και υποβολή των ιχθύων σε οξύ stress

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων ($p<0,05$).

3.2.3. Βλάβη του DNA

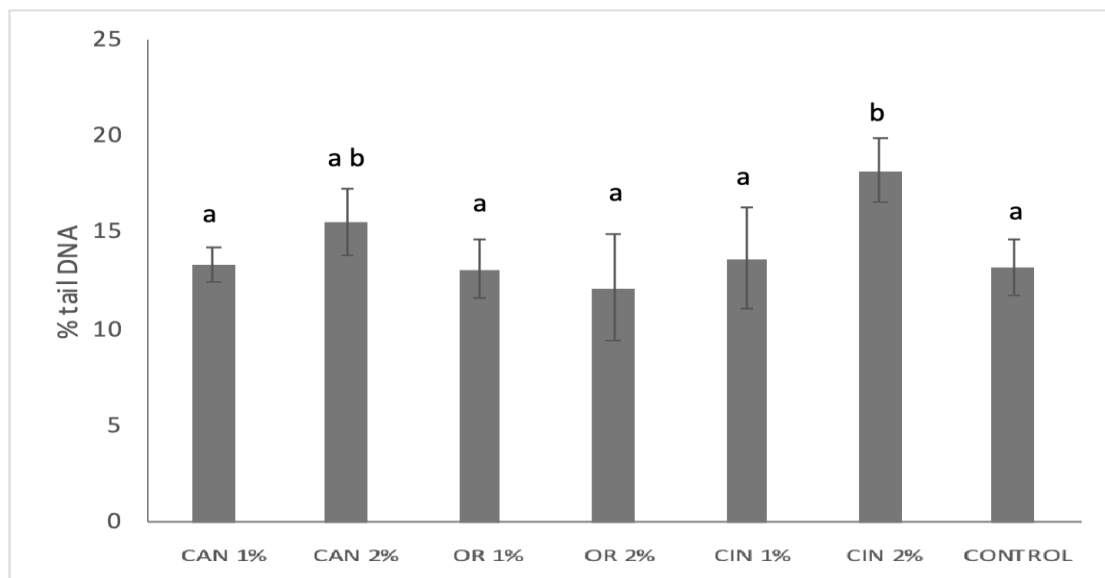
Μετά την υποβολή των ψαριών σε οξύ stress, τα φυτοφαρμακευτικά δεν μείωσαν τη γενοτοξικότητα στα ηπατοκύτταρα, εκτός από την ομάδα CAN1%, στην οποία η βλάβη του DNA διατηρήθηκε στο ίδιο επίπεδο με την ομάδα ελέγχου (Διαγρ. 9) Σημαντική αύξηση της γενοτοξικότητας παρατηρήθηκε σε όλες τις άλλες διατροφικές ομάδες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα CAN1%.



Διάγραμμα 9. Επίπεδο βλάβης του DNA στα ηπατοκύτταρα μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και υποβολή των ιχθύων σε οξύ stress

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων ($p<0,05$).

Στις ομάδες που διατρέφονταν με φυτοφαρμακευτικά, στις περισσότερες περιπτώσεις η βλάβη του DNA στα ερυθροκύτταρα διατηρήθηκε στο ίδιο επίπεδο με την ομάδα ελέγχου, με εξαίρεση την ομάδα CIN2%, η οποία παρουσίασε σημαντικά υψηλότερη γενοτοξικότητα (Διαγρ.10). Ανάμεσα στις δύο χορηγούμενες δόσεις, η ομάδα CIN2% ήταν η μόνη ομάδα που παρουσίασε σημαντικά υψηλότερη τιμή σε σχέση με την ομάδα CIN1% ($p<0,05$), καθώς δεν παρατηρήθηκαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των δύο δόσεων στις ομάδες που διατρέφονταν με έλαιο κάνναβης και αιθέριο έλαιο ρίγανης.



Διάγραμμα 10. Επίπεδο βλάβης του DNA στα ερυθροκύτταρα μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και υποβολή των ιχθύων σε οξύ stress

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων ($p<0,05$).

3.3. ΠΕΙΡΑΜΑ 3 - Η επίδραση της ασιτίας στην απόκριση καταπόνησης της τσιπούρας μετά από τροφοληψία με φαρμακευτικά φυτά

3.3.1. Αιματολογικές παράμετροι

Στον Πίνακα 8 φαίνονται οι αιματολογικές παράμετροι μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και την υποβολή των ιχθύων σε ασιτία διάρκειας δύο εβδομάδων. Σημαντικά χαμηλότερη τιμή αιματοκρίτη παρουσίασε η ομάδα CIN2% η οποία διατρέφονταν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου. Όλες οι άλλες διατροφικές μεταχειρίσεις δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές με την ομάδα ελέγχου αλλά ούτε και μεταξύ των χορηγούμενων δόσεων. Οι ομάδες που διατρέφονταν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στον αριθμό των RBC. Ομοίως, στις ομάδες που υποβλήθηκαν σε ασιτία δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μία μείωση στον αριθμό των RBC στις ομάδες που υποβλήθηκαν σε ασιτία σε σύγκριση με τις ομάδες που διατρέφονταν κανονικά, με σημαντικές διαφορές να παρατηρούνται στις ομάδες της κάνναβης και της κανέλας.

Οι ομάδες που διατρέφονταν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στον αριθμό των WBC, εκτός από την ομάδα OR1%, η οποία είχε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό. Ομοίως, στις ομάδες που υποβλήθηκαν σε ασιτία δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου, εκτός από την ομάδα OR1%, η οποία είχε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό. Στις ομάδες που διατρέφονταν με έλαιο κάνναβης και αιθέριο έλαιο κανέλας και υποβλήθηκαν σε ασιτία βρέθηκε σημαντικά χαμηλότερος αριθμός WBC σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ομάδες που διατρέφονταν κανονικά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Στο λευκοκυτταρικό τύπο δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στις διατροφικές ομάδες και τις ομάδες ελέγχου.

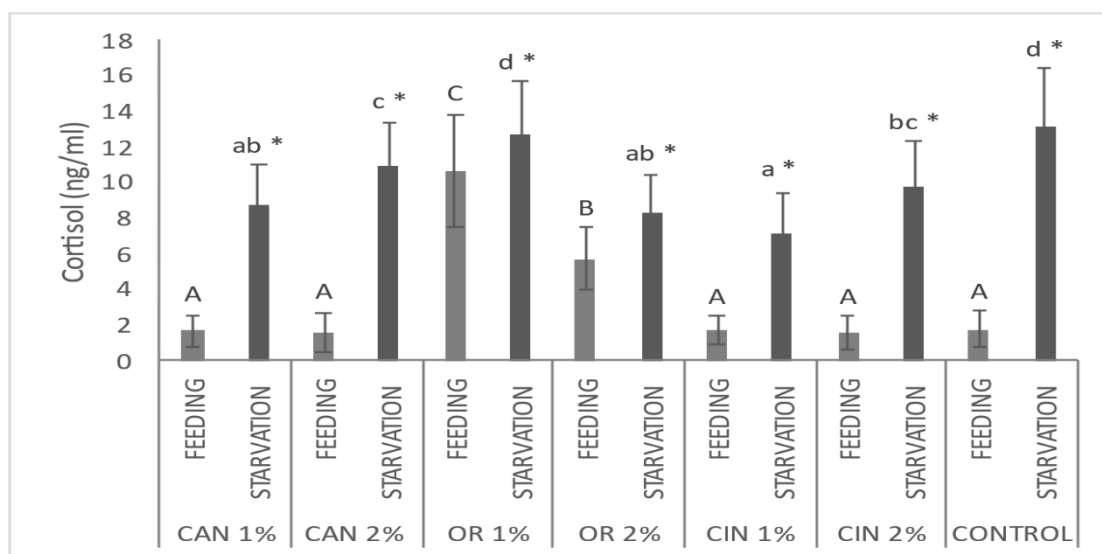
Πίνακας 8. Αιματολογικές παράμετροι μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και την υποβολή των ιχθύων σε ασιτία

	CAN1%		CAN2%		OR1%		OR2%		CIN1%		CIN2%		CTRL	
	ΤΡΟΦΟΛΗΨΙΑ	ΛΕΙΨΙΑ	ΤΡΟΦΟΛΗΨΙΑ	ΛΕΙΨΙΑ	ΤΡΟΦΟΛΗΨΙΑ	ΛΕΙΨΙΑ	ΤΡΟΦΟΛΗΨΙΑ	ΛΕΙΨΙΑ	ΤΡΟΦΟΛΗΨΙΑ	ΛΕΙΨΙΑ	ΤΡΟΦΟΛΗΨΙΑ	ΛΕΙΨΙΑ	ΤΡΟΦΟΛΗΨΙΑ	ΛΕΙΨΙΑ
Αιματοκρίτης (%)	33,00±4,73 ^{ab}	37,00±7,55 ^{ab}	29,00±5,03 ^{ab}	40,00±6,03 ^b	31,00±1,00 ^{ab}	33,00±2,08 ^{ab}	29,00±3,06 ^{ab}	29,00±6,43 ^{ab}	31,00±3,79 ^a _b	36,00±5,51 ^a _b	25,00±5,57 ^a	29,00±4,51 ^{ab}	40,00±1,00 ^b	42,00±3,61 ^b
RBC (10 ⁶ /mm ³)	2,47±0,25 ^c	1,23±0,25 ^a	2,39±0,48 ^c	1,98±0,34 ^{bc}	1,83±0,19 ^{abc}	1,43±0,59 ^{ab}	1,91±0,28 ^{bc}	1,43±0,14 ^{ab}	1,89±0,19 ^{bc}	1,06±0,21 ^a	2,00±0,33 ^c	1,61±0,48 ^{ab}	1,98±0,08 ^{bc}	1,81±0,08 ^{abc}
WBC (10 ⁶ /mm ³)	38,65±5,30 ^{bc}	19,54±4,08 ^a	35,65±5,90 ^b	27,98±3,92 ^{ab}	48,69±1,95 ^c	47,68±3,39 ^c	32,08±5,75 ^{ab}	31,32±13,50 ^{ab}	35,65±3,26 ^b	21,15±2,94 ^a	40,75±5,45 ^{bc}	18,71±12,00 ^a	31,59±0,82 ^{ab}	24,81±7,98 ^{ab}
Λεμφοκύτταρα (%)	62,00±1,00	64,00±4,36	59,67±6,03	65,00±1,00	69,67±0,58	68,33±1,15	64,33±3,51	66,67±2,52	64,33±1,15	65,00±4,58	62,33±3,21	67,33±1,15	59,67±10,41	63,33±2,52
Κοκκιοκύτταρα (%)	38,00±1,00	35,67±4,73	40,00±5,57	35,00±1,00	30,33±0,58	31,67±1,15	35,33±3,06	33,33±2,52	35,00±0,00	35,00±4,58	37,67±3,21	32,67±1,15	40,33±10,41	36,33±3,06
Μονοκύτταρα (%)	0,33±0,58	0,44±0,14	0,33±0,43	0,44±0,55	0,44±0,18	0,50±0,43	0,33±0,48	0,50±0,58	0,33±0,58	0,44±0,15	0,33±0,58	0,33±0,58	0,33±0,38	0,44±0,25

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=3). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων (p<0,05).

3.3.2. Κορτιζόλη

Η υποβολή των ψαριών σε ασιτία αύξησε σημαντικά το επίπεδο κορτιζόλης σε όλες τις διατροφικές ομάδες, με τις ομάδες σε ασιτία που προηγουμένως είχαν διατραφεί με CAN1%, CAN2%, OR2%, CIN1%, and CIN2% να εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα κορτιζόλης σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου. Μεταξύ των ομάδων που διατρέφονταν κανονικά, οι ομάδες που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης (OR1%) έδειξαν σημαντικά υψηλότερο επίπεδο κορτιζόλης σε σύγκριση με τις υπόλοιπες διατροφικές ομάδες και την ομάδα ελέγχου.



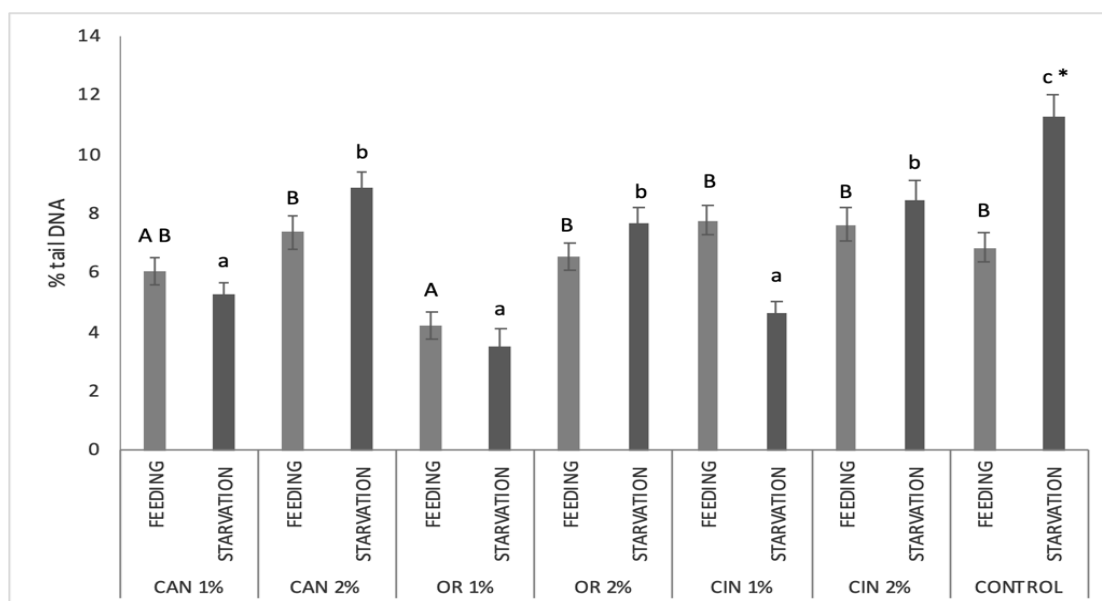
Διάγραμμα 11. Επίπεδα κορτιζόλης μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και υποβολή των ψαριών σε ασιτία

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$). Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα (ομάδες σίτισης) και διαφορετικά πεζά γράμματα (ομάδες ασιτίας) υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων ($p < 0,05$). Οι αστερίσκοι (*) υποδηλώνουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σίτισης και ασιτίας εντός διατροφικής ομάδας.

3.3.3. Βλάβη του DNA

Η ασιτία στην ομάδα ελέγχου αύξησε σημαντικά τη βλάβη του DNA στα ηπατοκύτταρα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου που σιτίζονταν κανονικά. Ωστόσο, η προσθήκη φυτοφαρμακευτικών στη δίαιτα των ομάδων που στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε ασιτία, εκτός από την ομάδα CAN2%, μείωσε σημαντικά τη γενοτοξικότητα σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου. Μεταξύ των ομάδων που διατρέφονταν κανονικά, η βλάβη του DNA στα ηπατοκύτταρα ήταν παρόμοια μεταξύ των ομάδων που διατρέφονταν με φυτοφαρμακευτικά και της ομάδας ελέγχου, εκτός από την ομάδα OR1%, η οποία παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερη βλάβη στο DNA.

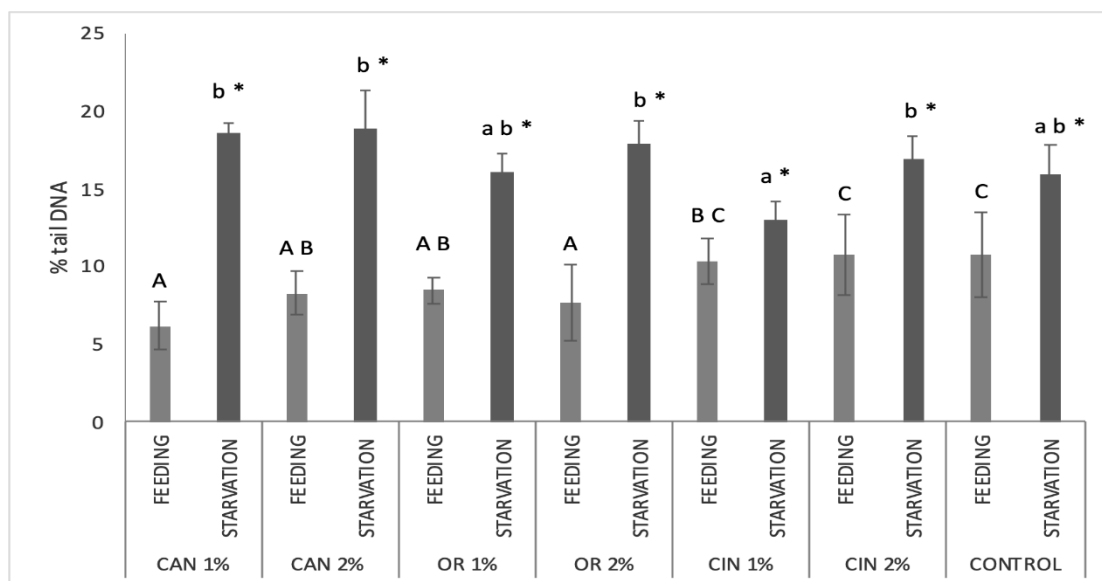
Επίσης, η ομάδα αυτή παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερη βλάβη στο DNA σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα που σιτίζονταν με 2% αιθέριου ελαίου ρίγανης.



Διάγραμμα 12. Επίπεδα βλάβης του DNA στα ηπατοκύτταρα μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και υποβολή των ψαριών σε ασιτία

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$). Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα (ομάδες σίτισης) και διαφορετικά πεζά γράμματα (ομάδες ασιτίας) υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων ($p < 0,05$). Οι αστερίσκοι (*) υποδηλώνουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σίτισης και ασιτίας εντός διατροφικής ομάδας.

Η βλάβη του DNA έδειξε ότι η ασιτία προκαλεί σημαντικά υψηλότερη γενοτοξικότητα στα ερυθροκύτταρα σε σχέση με την συνεχή σίτιση των ψαριών. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ασιτίας, συμπεριλαμβανομένης και της ομάδας ελέγχου. Η δόση δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά τη βλάβη του DNA, εκτός από την ομάδα CIN1%, η οποία έδειξε σημαντικά χαμηλότερη τιμή σε σχέση με την ομάδα CIN2%. Μεταξύ των ομάδων που διατρέφονταν κανονικά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, σημαντική μείωση της βλάβης του DNA φάνηκε σε όλες τις ομάδες που σιτίζονταν με έλαιο από σπόρους κάνναβης (1% and 2%) και αιθέριο έλαιο ρίγανης (1% and 2%) σε σχέση με την αντίστοιχη την ομάδα ελέγχου.



Διάγραμμα 13. Επίπεδα βλάβης του DNA στα ερυθροκύτταρα μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και υποβολή των ψαριών σε ασιτία

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$). Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα (ομάδες σίτισης) και διαφορετικά πεζά γράμματα (ομάδες ασιτίας) υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων ($p<0,05$). Οι αστερίσκοι (*) υποδηλώνουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σίτισης και ασιτίας εντός διατροφικής ομάδας.

3.4. ΠΕΙΡΑΜΑ 4 - Επίδραση χρόνιας καταπόνησης στην τσιπούρα, προκληθείσας λόγω υψηλής πυκνότητας εκτροφής, μετά από χορήγηση σιτηρεσίων εμπλουτισμένα με φαρμακευτικά φυτά

3.4.1. Αιματολογικές παράμετροι

Σε όλες τις ομάδες ο αιματοκρίτης κυμάνθηκε μεταξύ 18% και 27,33% χωρίς στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων που διατρέφονταν με φυτοφαρμακευτικά της ομάδας ελέγχου. Παρόμοια, ο αριθμός των RBC δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διατροφικές ομάδες αλλά και με την ομάδα ελέγχου. Οι ομάδες που διατρέφονταν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στον αριθμό των WBC και στο λευκοκυτταρικό τύπο. Ομοίως, στις ομάδες που υποβλήθηκαν σε ασιτία δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των LFD και HFD σε καμία διατροφική ομάδα αλλά και ούτε μεταξύ των χορηγούμενων δόσεων.

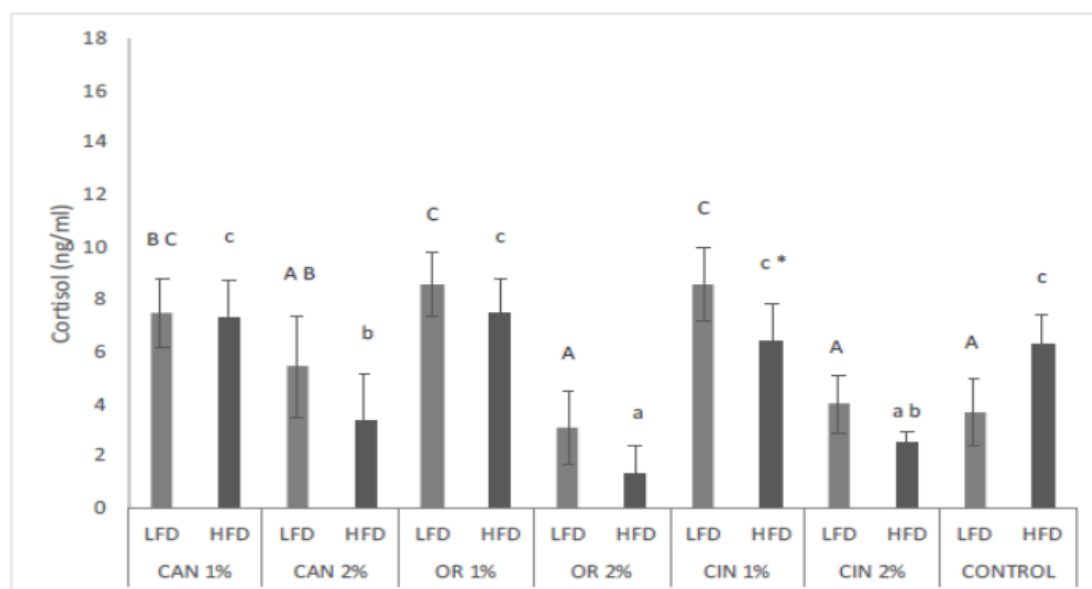
Πίνακας 9. Αιματολογικές παράμετροι μετά την τροφολησία με φυτοφαρμακευτικά και την υποβολή των ιχθύων σε υψηλή ιχθυοπυκνότητα

	CAN1%		CAN2%		OR1%		OR2%		CIN1%		CIN2%		CTRL	
	LFD	HFD	LFD	HFD	LFD	HFD	LFD	HFD	LFD	HFD	LFD	HFD	LFD	HFD
Αιματοκρίτης (%)	20,33±5,11	25,50±3,61	26,67±0,76	21,17±4,37	20,83±2,25	22,33±4,51	20,67±8,25	19,00±5,63	20,83±2,57	18,00±0,50	19,50±5,89	18,67±3,51	22,75±1,09	27,33±1,63
RBC (10 ⁶ /mm ³)	2,99±0,30	2,69±0,27	2,93±0,29	4,08±0,41	1,99±0,20	2,62±0,26	1,86±0,19	2,56±0,26	2,94±0,29	2,50±0,25	2,56±0,26	2,27±0,23	2,16±0,22	3,09±0,31
WBC (10 ⁶ /mm ³)	45,75±11,71 ^{ab}	36,18±3,52 ^{ab}	45,63±15,67 ^{ab}	39,39±11,70 ^{ab}	34,43±16,01 ^{ab}	24,99±9,89 ^a	36,73±10,93 ^{ab}	26,07±8,32 ^a	73,50±19,68 ^b	57,76±17,00 ^{ab}	46,98±23,56 ^{ab}	41,72±14,02 ^{ab}	38,70±8,03 ^{ab}	55,78±21,56 ^{ab}
Λεμφοκύτταρα (%)	58,50±1,80	61,50±1,00	57,33±4,04	61,00±9,73	63,33±13,38	60,00±4,50	58,33±8,52	59,50±3,50	52,67±11,06	57,83±5,06	63,83±2,84	57,83±2,57	63,75±2,46	64,75±1,25
Κοκκιοκύτταρα (%)	40,17±2,25	40,00±3,50	42,17±4,04	38,50±10,04	36,33±13,18	39,50±3,77	37,83±10,61	40,17±3,62	40,67±4,86	37,17±4,07	35,67±2,52	42,00±2,65	33,81±1,50	35,17±1,13
Μονοκύτταρα (%)	0,67±0,07	0,50±0,05	0,67±0,07	0,50±0,05	0,67±0,07	0,50±0,05	0,67±0,07	0,44±0,04	0,44±0,04	0,67±0,07	0,67±0,07	0,50±0,05	0,44±0,04	0,50±0,05

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπική απόκλιση (n=3). Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων (p<0,05).

3.4.2. Κορτιζόλη

Στις ομάδες που διατρέφονταν με το ίδιο σιτηρέσιο, η πυκνότητα εκτροφής δεν επηρέασε τα επίπεδα κορτιζόλης σε όλες τις διατροφικές ομάδες, με εξαίρεση την ομάδα CIN1% στην οποία παρατηρήθηκε σημαντικά χαμηλότερο επίπεδο κορτιζόλης στην HFD σε σχέση με τη LFD. Στην LFD, στις ομάδες CAN1%, OR1% και CIN1% τα επίπεδα κορτιζόλης αυξήθηκαν σημαντικά σε σύγκριση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου και τις υπόλοιπες διατροφικές ομάδες. Στην HFD, στις ομάδες CAN2%, OR2% και CIN2% παρατηρήθηκαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα κορτιζόλης σε σύγκριση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου και τις υπόλοιπες διατροφικές ομάδες. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο δόσεων παρατηρήθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις στις ομάδες LFD και HFD, καθώς η υψηλότερη δόση χορήγησης αποδείχτηκε πιο αποτελεσματική στη μείωση της κορτιζόλης.



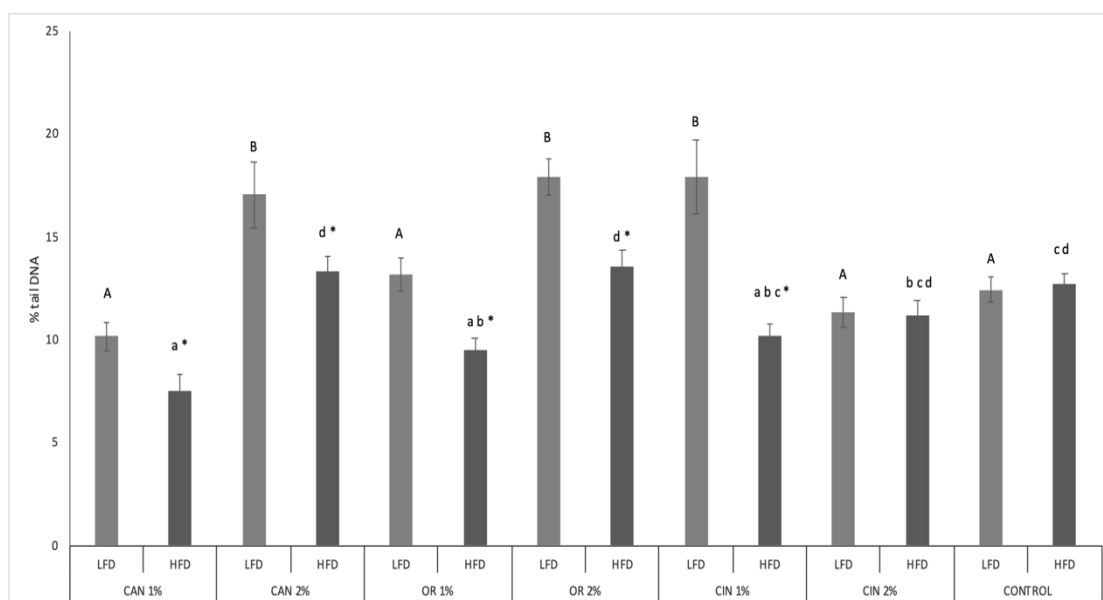
Διάγραμμα 14. Επίπεδα κορτιζόλης μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και την υποβολή των ψαριών σε υψηλή πυκνότητα εκτροφής

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$). Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα (ομάδες LFD) και διαφορετικά πεζά γράμματα (ομάδες HFD) υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων ($p<0,05$). Οι αστερίσκοι (*) υποδηλώνουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων LFD και HFD εντός διατροφικής ομάδας.

3.4.3. Βλάβη του DNA

Η επίδραση των φυτοφαρμακευτικών στη γενotoξικότητα στα ηπατοκύτταρα ήταν περισσότερο εμφανής στις ομάδες που διατηρήθηκαν σε υψηλή πυκνότητα εκτροφής (HFD) σε σχέση με τις ομάδες σε χαμηλή πυκνότητα εκτροφής (LFD), καθώς στις

περισσότερες περιπτώσεις, εκτός από την ομάδα CIN2%, παρατηρήθηκε σημαντικά χαμηλότερη βλάβη στο DNA στις ομάδες HFD. Οι ομάδες OR1% και CAN1% στην HFD έδειξαν χαμηλότερη γενotoξικότητα σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, στις ομάδες HFD, οι οποίες διατρέφονταν με φυτοφαρμακευτικά σε ποσοστό 1% η γενotoξικότητα ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τις ομάδες που διατρέφονταν με ποσοστό 2% ($p < 0.05$), εκτός από τις ομάδες της κανέλας όπου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο χορηγούμενων δόσεων. Όσον αφορά τις ομάδες LFD, οι διατροφικές ομάδες CAN1%, OR1% και CIN2% δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου, ενώ οι ομάδες CAN2%, OR2% και CIN1% αύξησαν σημαντικά τη βλάβη του DNA σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στις ομάδες LFD, οι οποίες σιτίζονταν με αιθέριο έλαιο κανέλας 1% (CIN1%) παρατηρήθηκε υψηλότερη βλάβη του DNA σε σχέση με την ομάδα CIN2% ($p < 0.05$), ενώ σε όλες τις άλλες διατροφικές ομάδες παρατηρήθηκε το αντίθετο αποτέλεσμα.

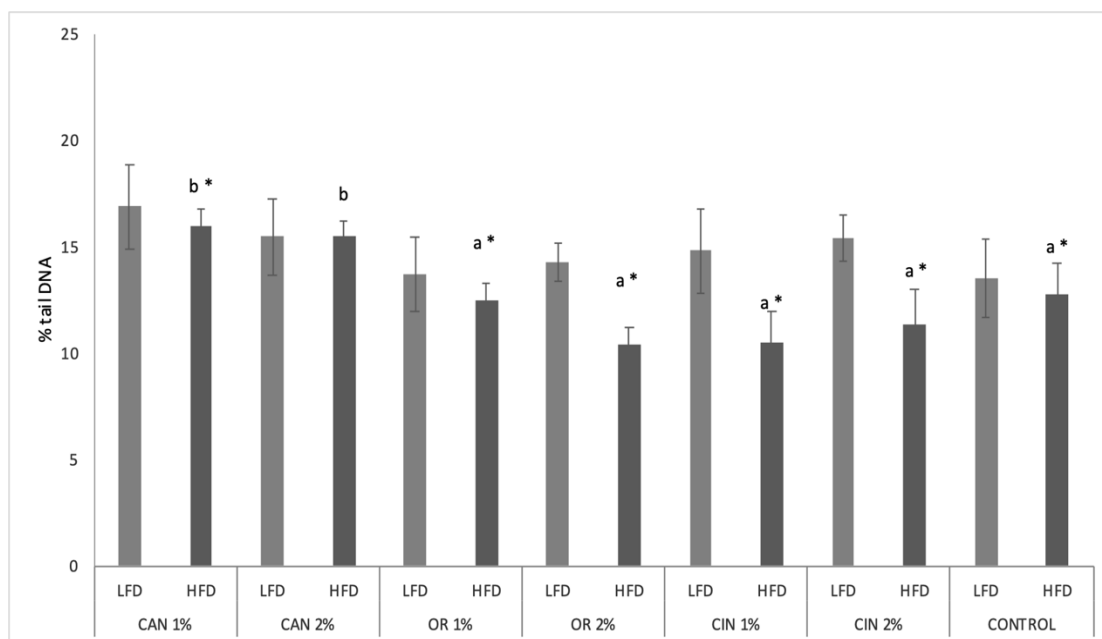


Διάγραμμα 15. Επίπεδα βλάβης του DNA στα ηπατοκύτταρα μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και την υποβολή των ψαριών σε υψηλή πυκνότητα εκτροφής

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση ($n=3$). Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα (ομάδες LFD) και διαφορετικά πεζά γράμματα (ομάδες HFD) υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων ($p < 0.05$). Οι αστερίσκοι (*) υποδηλώνουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων LDF και HDF εντός διατροφικής ομάδας.

Τα φυτοφαρμακευτικά πρόσθετα αποδείχθηκαν πιο αποτελεσματικά στις ομάδες HFD σε σύγκριση με τις ομάδες LFD της ίδιας διατροφικής ομάδας μειώνοντας την γενotoξικότητα στα ερυθροκύτταρα. Όσον αφορά και τις δύο πυκνότητες εκτροφής που εξετάστηκαν (LFD and HFD), δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο δόσεων που χορηγήθηκαν. Στις ομάδες HFD οι ομάδες που διατρέφονταν με έλαιο κάνναβης (CAN1% and CAN2%) παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη βλάβη του DNA σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και τις άλλες διατροφικές ομάδες. Στις

ομάδες LFD, δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική επίδραση των φυτοφαρμακευτικών στη γενετοξικότητα των ερυθροκυττάρων .



Διάγραμμα 16. Επίπεδα βλάβης του DNA στα ερυθροκύτταρα μετά την τροφοληψία με φυτοφαρμακευτικά και την υποβολή των ψαριών σε υψηλή πυκνότητα εκτροφής

Σημείωση: Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση (n=3). Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα (ομάδες LFD) και διαφορετικά πεζά γράμματα (ομάδες HFD) υποδηλώνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων ($p < 0,05$). Οι αστερίσκοι (*) υποδηλώνουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων LFD και HFD εντός διατροφικής ομάδας.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. ΠΕΙΡΑΜΑ 1 - Επίδραση της διατροφής με φαρμακευτικά φυτά στην ανάπτυξη και στην απόκριση καταπόνησης της τσιπούρας

4.1.1. Θνησιμότητες, παράμετροι ανάπτυξης και αξιοποίησης της τροφής

Η προσθήκη των τριών φυτοφαρμακευτικών στη διατροφή της τσιπούρας επηρέασε σημαντικά την επιβίωση. Οι ομάδες που διατρέφονταν με έλαιο από σπόρους *C. sativa* δεν παρουσίασαν στατιστικές διαφορές με την ομάδα ελέγχου και είχαν το χαμηλότερο ποσοστό θνησιμότητας. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρήσει και οι Saoud et al. (2018), όπου έγινε προσθήκη παρόμοιας ποσότητας (21,3gr/Kg) ελαίου σπόρων βιομηχανικής κάνναβης στο σιτηρέσιο της τιλάπιας (*O. niloticus*). Ωστόσο, δεν υπάρχουν άλλες δημοσιευμένες επιστημονικές μελέτες για την επίδραση του ελαίου από σπόρους βιομηχανικής κάνναβης στην επιβίωση εκτρεφόμενων ψαριών. Οι περισσότερες θνησιμότητες παρατηρήθηκαν στις ομάδες που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης. Συγκεκριμένα, η ομάδα με το μεγαλύτερο ποσοστό προσθήκης (OR2%) είχε σημαντικά περισσότερες θνησιμότητες από την ομάδα OR1%. Η τοξική επίδραση των αιθέριων ελαίων εξαρτάται σημαντικά από τη δόση χορήγησης, καθώς ενώ μπορεί να αποτελούν μία ασφαλή λύση σε μικρές δόσεις, σε υψηλές δόσεις μπορεί να προκαλέσουν τοξικότητα (De FreitasSouza et al., 2019) περιορίζοντας τις ευεργετικές φαρμακευτικές ιδιότητες τους. Σε μελέτες που έγινε καταρτισμός σιτηρεσίου με προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε μικρότερες ποσότητες (0,125 έως 3ml/Kg) στο είδος *A. altiparanae* (de Moraes França Ferreira et al., 2014), στο είδος *Rhamdia* sp. (Cararo et al., 2017), στην τιλάπια (*O. niloticus*) (Shourbela et al., 2021) και στην ιριδίζουσα πέστροφα (*O. mykiss*) (Diler et al., 2017) το ποσοστό επιβίωσης ήταν υψηλό και δεν ήταν σημαντικά διαφορετικό από την ομάδα ελέγχου. Γενικότερα, σε μελέτες που έγινε προσθήκη ρίγανης σε οποιαδήποτε άλλη μορφή στη διατροφή ιχθύων τα ποσοστά επιβίωσης ήταν πολύ υψηλά (Abdel-Latif et al., 2020; Ahmadifar et al., 2011, 2014; El-Hawarry et al., 2018; Mohammadi et al., 2020). Η προσθήκη αιθέριου ελαίου κανέλας επέφερε στατιστικά σημαντικές διατροφικές θνησιμότητες μόνο στην υψηλή ποσότητα προσθήκης (2% της τροφής), ενώ η ομάδα CIN1%, αν και είχε μικρότερο ποσοστό επιβίωσης, αυτό δεν ήταν σημαντικά διαφορετικό από την ομάδα ελέγχου. Το ποσοστό θνησιμότητας πιθανόν να οφείλεται στην τοξικότητα της κανέλας λόγω της υψηλής χορηγούμενης ποσότητας αιθέριου ελαίου και της υψηλής περιεκτικότητας σε ευγενόλη, της οποίας η τοξική δράση έχει αποδειχτεί (Kamatou et al., 2012). Η μελέτη στην τιλάπια (*O. niloticus*) που διατράφηκε με αιθέριο έλαιο κανέλας σε χαμηλό ποσοστό (0,35 και 0,70 g/kg) είχε υψηλό ποσοστό επιβίωσης (Sary et al., 2019). Άλλες μελέτες που χρησιμοποίησαν υψηλές δόσεις κανέλας (10 έως 50 gr/Kg) είχαν υψηλά ποσοστά επιβίωσης, άλλα η μορφή χορήγησης της κανέλας ήταν διαφορετική, όπως νανοσωματίδια ή σκόνη από το φλοιό και τα φύλλα του φυτού της κανέλας (Abdel-Tawwab et al., 2018; Ahmad et al., 2011; Dairun et al., 2018; Habiba et al., 2021; Rahmawati & Ubaidillah, 2018; Ravardshiri et al., 2021; Stoyanova et al., 2018).

Αυτή η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων πιθανόν να οφείλεται στο συνδυασμό του συγκεκριμένου είδους, στη μορφή χορήγησης και στις χορηγούμενες δόσεις.

Όσον αφορά στην κατανάλωση τροφής και στην ανάπτυξη, οι τιμές στις ομάδες CAN1% και CAN2% ήταν μεγαλύτερες από την ομάδα ελέγχου αλλά όχι στατιστικά σημαντικές. Όσον αφορά στον δείκτη μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων (CAN1%, CAN2%) και την ομάδα ελέγχου. Ο αριθμός των μελετών για την επίδραση του ελαίου *C. sativa* σε εκτρεφόμενα ψάρια είναι πολύ περιορισμένος. Ωστόσο, αντίθετα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, παρατηρείται μειωμένη ανάπτυξη και υψηλότερο FCR μετά από τροφοληψία της τιλάπιας (*O. niloticus*) με έλαιο από σπόρους *C. sativa* σε παρόμοια ποσότητα (21,3gr/kg) (Saoud et al., 2018). Αυτό μπορεί να σχετίζεται με την ύπαρξη κάποιου άλλου κανναβινοειδούς στους σπόρους, όπως κανναβιδιόλης (CBD), του οποίου η ύπαρξη στο έλαιο σπόρων κάνναβης έχει αποδειχτεί (Jang et al., 2020; Kleinhenz et al., 2020). Ο συντελεστής διατήρησης λίπους (Lipid retention, LR), ο οποίος εκφράζει την ποσοστιαία μεταβολή της περιεκτικότητας ενός ιστού σε λίπος σε συνάρτηση με την ποσότητα διαιτητικού λίπους που χορηγήθηκε υπολογίστηκε στο ολικό σώμα του ψαριού, δεν βρέθηκε να παρουσιάζει σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες που διατρέφονταν με έλαιο από σπόρους *C. sativa* και στην ομάδα ελέγχου. Ο ηπατοσωματικός δείκτης (HSI) θεωρείται ένας καλός δείκτης της ανάπτυξης των ψαριών (Cho, 2011) και χρησιμοποιείται ως έμμεσος δείκτης της ενεργειακής κατάστασης (Dinardo et al., 2020). Από την άλλη, ο δείκτης ευρωστίας (K) χρησιμοποιείται ως δείκτης υγείας, ευημερίας και διατροφικής κατάστασης του ψαριού και βασίζεται στην υπόθεση ότι τα ψάρια με το μεγαλύτερο βάρος σε ένα δεδομένο μήκος βρίσκονται σε καλύτερη φυσιολογική κατάσταση (Froese, 2006). Στην παρούσα μελέτη, ο ηπατοσωματικός δείκτης και ο δείκτης ευρωστίας δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων CAN1%, CAN2% και της ομάδας ελέγχου.

Αντίθετα, η κατανάλωση τροφής και η ανάπτυξη ήταν σημαντικά χαμηλότερες στην ομάδα OR2% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν μια αρνητική επίδραση της ρίγανης στην αποδεκτικότητα/γευστικότητα της τροφής και ως εκ τούτου μια κατασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη της τσιπούρας όταν αυτή χορηγείται σε υψηλά διαιτητικά επίπεδα. Η μειωμένη κατανάλωση της τροφής στις ομάδες OR2% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου πιθανότατα να οφείλεται στην έντονη οσμή της ρίγανης (Dinardo et al., 2020) που μπορεί να κατέστησε την τροφή μη γευστική με αποτέλεσμα τη μειωμένη τροφοληψία και ανάπτυξη. Ένας ακόμη λόγος εξήγησης της μειωμένης κατανάλωσης πιθανόν να είναι η δυσκολία των ψαριών να υποστηρίξουν την υψηλή περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις καθώς ήταν πολύ νεαρά (αρχικό βάρος 4,84gr) με αποτέλεσμα την αναστολή απορρόφησης θρεπτικών συστατικών λόγω της περιορισμένης ικανότητας των πεπτικών ενζύμων, όπως αναφέρεται σε παρόμοια μελέτη στο είδος *Pangasianodon hypophthalmus* μετά από τροφοληψία με φύλλα του είδους *Cinnamomum burmannii* (Setiawati et al., 2016). Αυτή η αρνητική επίδραση της ρίγανης στην κατανάλωση της τροφής και στην ανάπτυξη που μπορεί να

οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα βιοενεργών συστατικών δείχνει τη σημασία της κατάλληλης δόσης χορήγησης εκχυλισμάτων φαρμακευτικών φυτών, καθώς η επίδραση της ρίγανης στην ανάπτυξη και οι ευεργετικές της ιδιότητες στην υγεία των ψαριών αποδίδονται στα πολύτιμα φυτοχημικά της. Έχει αναφερθεί η συνεργατική επίδραση της καρβακρόλης-θυμόλης στην ανάπτυξη του είδους *I. punctatus* (Zheng et al., 2009). Η βελτίωση της ανάπτυξης αποδίδεται, επίσης, στην ικανότητα αυτών των βιοενεργών φυτοχημικών να αυξάνουν την έκκριση πεπτικών ενζύμων, τα οποία με τη σειρά τους οδηγούν στην αύξηση κατανάλωσης τροφής (Radhakrishnan et al., 2015; R.Zhang et al., 2020). Οι Abdel-Latif et al. (2020) αναφέρουν ότι η προσθήκη καρβακρόλης και θυμόλης στη διατροφή των ιχθύων μπορεί να επηρεάσει την δομή των εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων, το οποίο οδηγεί σε βελτίωση της πέψης και απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών. Ομοίως, μελέτες με προσθήκη ρίγανης σε διάφορες μορφές έδειξαν ενίσχυση της ανάπτυξης και αξιοποίησης της τροφής στην τιλάπια (*O. niloticus*) (Abdel-Latif & Khalil, 2014; El-Hawarry et al., 2018; Mohammadi et al., 2020), στο είδος *A. altiparanae* (de Moraes França Ferreira et al., 2014) και στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) (Dinardo et al., 2020). Επίσης, οι Diler et al. (2017) παρατήρησαν αύξηση ανάπτυξης στην ιριδίζουσα πέστροφα μετά από τροφοληψία με αιθέριο έλαιο του είδους *Origanum onites*. Επιπρόσθετα, χορήγηση τροφής με προσθήκη καρβακρόλης και/ή θυμόλης έδειξε θετικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη της πέστροφας (*O. mykiss*) (Ahmadifar et al., 2011), του είδους *H. huso* (Ahmadifar et al., 2014) και της τιλάπιας (*O. niloticus*) (Abd El-Naby et al., 2020; Amer et al., 2018).

Η κατασταλτική επίδραση της ρίγανης στην ανάπτυξη έχει αναφερθεί και σε άλλα σπονδυλωτά (Giannenas et al., 2003; Giannenas et al., 2005). Στα κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής, η επιβράδυνση της ανάπτυξης στα άτομα που διατρέφονταν με ρίγανη αποδόθηκε στη διαταραχή του ανώτερου στρώματος των ώριμων εντεροκυττάρων του εντερικού βλεννογόνου από την καρβακρόλη και τη θυμόλη, τα οποία είναι τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου ρίγανης (Giannenas et al., 2003; Sikkema et al., 1995; Weber & De Bont, 1996). Σε μελέτες στην τσιπούρα (García Beltrán et al., 2020) και στην τιλάπια (*O. niloticus*) (Espirito Santo et al., 2020), η προσθήκη σκόνης από αποξηραμένα φύλλα ρίγανης δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές στις παραμέτρους ανάπτυξης και αξιοποίησης της τροφής, ενώ η προσθήκη του εμπορικού σκευάσματος Next Enhance NE[®]150, που περιέχει καρβακρόλη και θυμόλη στη διατροφή της τσιπούρας δεν παρουσίασε διαφορές στο τελικό βάρος και στο SGR αλλά έδειξε σημαντικά μειωμένη κατανάλωση τροφής (Pérez-Sánchez et al., 2015). Ομοίως, μετά από τροφοληψία με καρβακρόλη ή θυμόλη δεν παρατηρήθηκαν στατιστικές διαφορές στο λαβράκι (Volpatti et al., 2013) και στην ιριδίζουσα πέστροφα (Yilmaz et al., 2015). Ωστόσο, στη μελέτη των τελευταίων, το FCR παρουσίασε μικρότερες τιμές στις ομάδες που σιτίζονταν με θυμόλη και καρβακρόλη σε σύγκριση με την ομάδα του μάρτυρα. Αντίθετα, η επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης (εμπορικό σκεύασμα Ropadiar Powder plus- ως πηγή αιθέριου ελαίου) στην ανάπτυξη του κυπρίνου ήταν θετική με τις τιμές να είναι υψηλότερες στη δόση των 20gr/Kg (Abdel-Latif et al., 2020). Αυτό μπορεί να οφείλεται στη χαρακτηριστική

αρωματική γεύση του αιθέριου ελαίου ρίγανης που το καθιστά ελκυστικό για τα ψαριά (Abdel-Latif & Khalil, 2014). Ωστόσο, όπως αναφέρεται παραπάνω, αυτή η χαρακτηριστική έντονη μυρωδιά της ρίγανης σε μεγαλύτερη συγκέντρωση μπορεί να καθιστά την τροφή μη γευστική (Dinardo et al., 2020).

Οι διαφορές που παρατηρούνται στις παραμέτρους ανάπτυξης μετά από χορήγηση ρίγανης, μεταξύ των διάφορων μελετών, μπορούν να αποδοθούν σε διάφορους παράγοντες όπως το είδος των ψαριών, η ηλικία, το μέγεθος, οι ανοσολογικές αποκρίσεις, η μορφή χορήγησης και το είδος της ρίγανης, όπως και οι πειραματικές συνθήκες (χορηγούμενες δόσεις, περίοδος σίτισης, η ιχθυοπυκνότητα κ.ά. (Abdel-Latif et al., 2020; Dinardo et al., 2020; García Beltrán et al., 2020; Yilmaz et al., 2015). Συμπερασματικά, το αιθέριο έλαιο ρίγανης, σε ποσοστό προσθήκης 1%, αξιοποιείται μεταβολικά σε πολύ μεγάλο βαθμό για την αύξηση του σωματικού βάρους της τσιπούρας. Αντίθετα στο μεγαλύτερο ποσοστό προσθήκης της τάξης του 2%, το αιθέριο έλαιο ρίγανης δεν αξιοποιήθηκε μεταβολικά σε μεγάλο βαθμό για την αύξηση του σωματικού βάρους.

Ο συντελεστής LR βρέθηκε να παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερη τιμή στην ομάδα OR2% από την ομάδα ελέγχου, ενώ η ομάδα OR1% δεν παρουσίασε στατιστικές διαφορές. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η μειωμένη κατανάλωση της τροφής OR2% οδήγησε σε μειωμένη εισροή μεταβολικής ενέργειας και διαιτητικού λίπους στο σώμα των ψαριών. Επίσης, πιθανότατα να οφείλεται στη μειωμένη πεπτικότητα και εναπόθεση λίπους στο σώμα. Ο ηπατοσωματικός δείκτης δεν παρουσίασε στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων OR1%, OR2% και της ομάδας ελέγχου, αποδεικνύοντας ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης δεν προκάλεσε μορφολογικές αλλαγές στο ήπαρ της τσιπούρας. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται από διάφορες μελέτες στην τσιπούρα (Pérez-Sánchez et al., 2015), στο λαβράκι (Volpatti et al., 2013) και στο είδος *I. punctatus* (Zheng et al., 2009) μετά από τροφοληψία με καρβακρόλη και/ή θυμόλη. Επίσης, προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης στη διατροφή του είδους *Rhamdia* sp., δεν έδειξε σημαντικές διαφορές στο HSI (Cararo et al., 2017), ενώ μελέτη στο είδος *I. punctatus* έδειξε μειωμένο, άλλα όχι σημαντικά διαφορετικό HSI μετά από διατροφή με το είδος *Origanum heracleoticum* (σκεύασμα Orego-Stim® που περιέχει αιθέριο έλαιο ρίγανης) (Zheng et al., 2009). Αντίθετα, άλλες αντίστοιχες μελέτες έδειξαν αύξηση του HSI μετά από προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης (*O. vulgare*) στο σιτηρέσιο του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) (Dinardo et al., 2020).

Τέλος, ο δείκτης ευρωστίας δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων και του μάρτυρα, που οφείλεται στο γεγονός ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης στην τροφή δεν διαφοροποιεί την ισομετρική ανάπτυξη της τσιπούρας. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με τους García Beltrán et al. (2020), οι οποίοι δεν βρήκαν στατιστικές διαφορές στο δείκτη ευρωστίας, μετά από προσθήκη σκόνης από αποξηραμένα φύλλα ρίγανης στο σιτηρέσιο της τσιπούρας. Ομοίως, έχει παρατηρηθεί μετά από προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης στη διατροφή λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) (Dinardo et al., 2020). Τροφοληψία του είδους *I. punctatus* με

καρβακρόλη και/ή θυμόλη δεν έδειξε στατιστικές διαφορές στον δείκτη ευρωστίας, ενώ η προσθήκη διατροφή με *Origanum heracleoticum* (σκεύασμα Orego-Stim® που περιέχει αιθέριο έλαιο ρίγανης) παρουσίασε υψηλότερο Κ από τον μάρτυρα (Zheng et al., 2009).

Η κατανάλωση της τροφής και η ανάπτυξη ήταν σημαντικά χαμηλότερες στην ομάδα CIN2% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και ο δείκτης FCR παρουσίασε σημαντικά υψηλότερη τιμή στην ομάδα CIN2%. Το γεγονός αυτό δείχνει πως το υψηλό ποσοστό προσθήκης αιθέριου ελαίου κανέλας, της τάξης του 2%, οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό της τροφής. Αντίθετα, οι αντίστοιχες τιμές της ομάδας CIN1% δεν ήταν σημαντικά διαφορετικές. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου κανέλας σε ποσοστό 1%, δεν προκαλεί μείωση στο ρυθμό ανάπτυξης της τσιπούρας. Η μειωμένη κατανάλωση της τροφής στην ομάδα CIN2% σε σχέση με την ομάδα CIN1% και την ομάδα ελέγχου πιθανότατα να οφείλεται στο γεγονός ότι υψηλές ποσότητες κανέλας προκαλούν μία πικρία και στυφότητα στην τροφή (Bennick, 2002), που πιθανόν οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα σε βιοενεργά συστατικά όπως η ευγενόλη (Michiels, 2008). Επίσης, μπορεί να οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις λόγω του μικρού μεγέθους των ψαριών (αρχικό βάρος 4,90gr) με αποτέλεσμα την αναστολή απορρόφησης θρεπτικών συστατικών λόγω της περιορισμένης ικανότητας των πεπτικών ενζύμων (Setiawati et al., 2016). Μελέτες αναφέρουν ότι η προσθήκη κανέλας στο σιτηρέσιο (Abdel-Tawwab et al., 2018; Ahmad et al., 2011; Amer et al., 2018; Rahmawati & Ubaidillah, 2018; Amer et al., 2018; Rahmawati & Ubaidillah, 2018), το γατόψαρο (*Pangasianodon hypophthalmus*) (Dairun et al., 2018; Setiawati et al., 2016), ο κυπρίνος (*C. carpio*) (Stoyanova et al., 2018) και η πέστροφα (Jasim et al., 2022) είχε θετική επίδραση στην ανάπτυξη και αξιοποίηση της τροφής. Αξιοσημείωτα είναι τα αποτελέσματα της μελέτης των Ravardshiri et al. (2021), οι οποίοι παρατήρησαν μεγαλύτερη αύξηση βάρους (weight gain) στην πέστροφα μετά από προσθήκη κανέλας στο σιτηρέσιο σε ποσότητα 30gr και 50gr. Αυτή η διαφοροποίηση μεταξύ των αποτελεσμάτων πιθανόν να οφείλεται στη διαφορετική μορφή χορήγησης της κανέλας και στα διαφορετικά είδη ψαριών.

Γενικά, στις μελέτες αναφέρεται ότι η κινναμαλδεύδη, η οποία βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό στο αιθέριο έλαιο της κανέλας, έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί τον ινσουλινοδραστικό αυξητικό παράγοντα (insulin-like growth factor IGF-1) (Takasao et al., 2012), ενισχύοντας τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών και την εναπόθεση τους στο σώμα του ψαριού (Abdel-Tawwab et al., 2018; Al-Shakarchi, 2021; Tartila et al., 2021), όπως και την αύξηση έκκρισης πεπτικών ενζύμων (αμυλάση, λιπάση και πρωτεάση) (Abdel-Tawwab et al., 2018). Τα έλαια που προκύπτουν από τα μέρη του φυτού της κανέλας έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, καθένα από τα οποία έχει διαφορετική αξία. Στην παρούσα μελέτη φάνηκε ότι τα ψάρια που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο κανέλας σε ποσοστό 20gr είχαν σημαντικά μικρότερη ανάπτυξη και μεγαλύτερο δείκτη FCR, ενώ η ποσότητα των 10gr ήταν αποτελεσματικότερη χωρίς στατιστικές διαφορές από την ομάδα ελέγχου. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε μελέτη στο λαβράκι όπου η προσθήκη σκόνης κανέλας σε

ποσοστό 10gr προκάλεσε τη μεγαλύτερη ανάπτυξη και το μικρότερο FCR σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και την ποσότητα των 20gr (Habiba et al., 2021). Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να προσδιοριστεί η κατάλληλη ποσότητα αιθέριου ελαίου κανέλας στη διατροφή της τσιπούρας και η επίδραση του στην ανάπτυξη.

Ο συντελεστής LR ήταν σημαντικά μικρότερος στην ομάδα CIN2% από την ομάδα ελέγχου, ενώ η ομάδα CIN1% δεν παρουσίασε στατιστικές διαφορές. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο μικρότερο ποσοστό λίπους της τροφής αλλά και στη μειωμένη κατανάλωση τροφής που οδήγησε στη μειωμένη εισροή διαιτητικού λίπους και στην έλλειψη διαθέσιμης ενέργειας. Μπορεί επίσης να οφείλεται στη μειωμένη πεπτικότητα και εναπόθεση λίπους στο σώμα των ψαριών. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται στο γατόψαρο (*Pangasianodon hypophthalmus*), όπου η τροφοληψία με φύλλα από το είδος *Cinnamomum burmannii* σε ποσοστό 1% δεν προκάλεσε στατιστικές διαφορές στο LR (Dairun et al., 2018). Στην παρούσα μελέτη οι δείκτες HSI και K δεν παρουσίασαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων CIN1%, CIN2% και της ομάδας ελέγχου, δείχνοντας ότι δεν υπήρχε ποσοτική μεταβολή στο ήπαρ το ψαριών και ότι το αιθέριο έλαιο κανέλας δεν επηρεάζει την ισομετρική ανάπτυξη της τσιπούρας.

4.1.2. Θρεπτική σύσταση

Η χημική σύσταση είναι καθοριστικής σημασίας καθώς υπάρχει καταναλωτική προτίμηση για λιπαρά ψάρια με υψηλά επίπεδα ω-3 λιπαρών οξέων, αλλά και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (Ravardshiri et al., 2021). Επηρεάζει, επίσης, την όρεξη, την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή, την υγεία και επιβίωση των ψαριών και τέλος έχει μεγάλη οικονομική σημασία (Karapanagiotidis et al., 2017). Η τροφή αποτελεί τον κύριο παράγοντα που επηρεάζει τη χημική σύσταση του ψαριού (Shearer, 1994).

Η περιεκτικότητα σε υγρασία, πρωτεΐνες, λίπος και ενέργεια στο σώμα της τσιπούρας διατρεφόμενη με έλαιο σπόρων βιομηχανικής κάνναβης δεν παρουσίασε στατιστικές διαφορές με την ομάδα ελέγχου, υποδεικνύοντας ότι το ποσοστό προσθήκης 1% και 2% στη διατροφή της τσιπούρας δεν προκαλεί μεταβολές στη θρεπτική σύσταση. Όσον αφορά στην περιεκτικότητα σε τέφρα, οι τιμές ήταν χαμηλότερες και στις δύο ομάδες, με την ομάδα CAN2% να έχει σημαντικά μικρότερη τιμή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην μεγαλύτερη ανάπτυξη της μυϊκής μάζας σε σχέση με την ανάπτυξη των οστών, όπως έχει υποστηριχτεί σε διατροφικές μελέτες (Oliveira-Júnior et al., 2021). Ο λόγος που η προσθήκη ελαίου κάνναβης σε ποσοστό 2% οδήγησε σε αυτό δεν μπορεί να ερμηνευτεί προς το παρόν.

Η περιεκτικότητα σε υγρασία στις ομάδες που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης OR1% και OR2% και την ομάδα ελέγχου δεν ήταν σημαντικά διαφορετικές. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες στην ομάδα OR2% ήταν σημαντικά υψηλότερη, ενώ η

περιεκτικότητα σε λίπος στο σώμα των ψαριών στην ομάδα OR2% ήταν σημαντικά χαμηλότερη. Μελέτες σε άλλα είδη που τρέφονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης (de Moraes França Ferreira et al., 2014) έδειξαν επίσης, υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και χαμηλότερη σε λίπη, πιθανότατα λόγω μειωμένου καταβολισμού των πρωτεϊνών που εξηγούσε την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στο σώμα των ψαριών ή λόγω αυξημένης δραστηριότητας των πεπτικών ενζύμων, που μπορούσε να βελτιώσει την πεπτικότητα της τροφής και να αυξήσει την ποσότητα της εναπόθεσης θρεπτικών ουσιών στο σώμα. Ωστόσο, αυτό δεν θα μπορούσε να εξηγήσει τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καθώς παρατηρήθηκε μειωμένη σωματική ανάπτυξη στα ψάρια της ομάδας OR2% συγκριτικά με εκείνα του μάρτυρα. Η σημαντικά χαμηλή περιεκτικότητα λίπους που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η υψηλή δόση προσθήκης αιθέριου ελαίου ρίγανης, της τάξης του 2%, οδήγησε σε μειωμένη εισροή διαιτητικού λίπους και σε έλλειψη διαθέσιμης ενέργειας, λόγω της μειωμένης κατανάλωσης αλλά και στη μειωμένη πεπτικότητα και εναπόθεση λίπους στο σώμα. Επίσης, τα χαμηλά ποσοστά λίπους πιθανόν να προκλήθηκαν από την αναστολή ενζύμων που σχετίζονται με τη σύνθεση λιπαρών οξέων και την ενεργοποίηση ενζύμων που σχετίζονται με την οξείδωση των λιπαρών οξέων, κάτι το οποίο παρατηρήθηκε από τους (Kim et al., 2013) στο συκώτι ποντικών που τρέφονταν με διατροφή πλούσια σε λιπαρά συμπληρωμένη με καρβακρόλη. Αντίθετα, σε άλλες μελέτες δεν παρατηρήθηκε επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης ή των βιοενεργών συστατικών της (καρβακρόλη και θυμόλη) στην εναπόθεση λίπους στο σώμα (Abdel-Latif & Khalil, 2014; Alagawany et al., 2020; Amer et al., 2018; Cararo et al., 2017; Yilmaz et al., 2015; Zheng et al., 2009), ενώ οι (Ahmadifar et al., 2011) παρατήρησαν υψηλότερη περιεκτικότητα λίπους στο ολικό σώμα της πέστροφας. Τέλος, το ποσοστό της τέφρας στην ομάδα OR1% ήταν σημαντικά χαμηλότερο, ενώ στην ομάδα OR2% δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στη χορηγούμενη δόση. Σε μελέτη στην τιλάπια (*O. niloticus*) διατρεφόμενη με θυμόλη, παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε τέφρα στο ολικό σώμα των ψαριών, υποστηρίζοντας ότι μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα αυτού του βιοενεργού συστατικού να διεγείρει την εναπόθεση ανόργανων στοιχείων στο ψάρι (Amer et al., 2018). Αντίθετα, σε μελέτες στην πέστροφα (Ahmadifar et al., 2011) και στο είδος *H. huso* (Ahmadifar et al., 2014) βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές τέφρας στο ολικό σώμα των ψαριών, ενώ σε άλλα είδη δεν παρατηρήθηκαν στατιστικές διαφορές (Abdel-Latif et al., 2020; Abdel-Latif & Khalil, 2014; Cararo et al., 2017; de Moraes França Ferreira et al., 2014; Yilmaz et al., 2015; Zheng et al., 2009).

Οι ομάδες που σιτίζονταν με αιθέριο έλαιο κανέλας σε ποσοστό προσθήκης 1% δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές με την ομάδα ελέγχου, αντίθετα, οι ομάδες με ποσοστό προσθήκης 2% είχαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό πρωτεϊνών και σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό λίπους. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη μειωμένη πεπτικότητα του λίπους και στη μειωμένη εισροή μεταβολικής ενέργειας στο σώμα των ψαριών. Επίσης, μπορεί να οφείλεται στο μικρότερο ποσοστό λίπους στις πελλέτες αλλά και στη μειωμένη κατανάλωση τροφής. Τέλος, στην ομάδα που

διατρέφονταν με υψηλό ποσοστό αιθέριου ελαίου κανέλας, της τάξης του 2%, παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό τέφρας. Σε μελέτη στην τιλάπια (*O. niloticus*) διατρεφόμενη με κινναμαλδεύδη, παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε τέφρα στο ολικό σώμα των ψαριών, υποστηρίζοντας ότι μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα αυτού του βιοενεργού συστατικού να διεγείρει την εναπόθεση ανόργανων στοιχείων στο ψάρι (Amer et al., 2018).

4.1.3. Προφίλ λιπαρών οξέων

Με τη συνεχή αναζήτηση εναλλακτικών πρόσθετων διατροφής, όπως τα φυτοφαρμακευτικά, είναι σημαντική η διερεύνηση της λιπιδικής σύστασης του σώματος των εκτρεφόμενων ψαριών, έτσι ώστε να ικανοποιούνται οι διαιτητικές απαιτήσεις σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι απαραίτητα για την υγεία και κατ' επέκταση ευζωία του ζωικού οργανισμού. Την τελευταία δεκαετία τα φυτογενή πρόσθετα έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον για την ικανότητα τους να προάγουν την ανάπτυξη μέσω της θετικής επίδρασης στο μεταβολισμό των λιπιδίων και άλλων ευεργετικών ιδιοτήτων (Botsoglou et al., 2002).

Έχουν γίνει αρκετές μελέτες με σκοπό την αξιολόγηση της διατροφικής ποιότητας αυτών των εναλλακτικών πηγών λιπιδίων στη διατροφή των ψαριών (Turchini et al., 2009, 2011) και την καλύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο ρυθμίζουν *in vivo* τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων (Teoh & Ng, 2016). Ανάμεσα σε αυτά είναι το λινέλαιο (linseed oil) λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε n-3 PUFA, το ηλιέλαιο (sunflower oil), το αραβοσιτέλαιο (corn oil), και το σογιέλαιο (soybean oil) λόγω του υψηλού επιπέδου n-6 PUFA, το κραμβέλαιο (canola oil) και ελαιόλαδο (olive oil) (υψηλό επίπεδο MUFA) και το φοινικέλαιο (palm oil) και έλαιο καρύδας (coconut oil) (υψηλό επίπεδο SFA). Η χρήση των αιθέριων ελαίων στη διατροφή των ψαριών γίνεται τις περισσότερες φορές με την εφαρμογή τους ως μείγμα με κάποιο έλαιο μεταφοράς (carrier oil) ή σε συνδυασμό με κάποιο άλλο έλαιο (π.χ. ιχθυέλαιο, σογιέλαιο κ.ά.) (de Moraes França Ferreira et al., 2014; Hassaan & Soltan, 2016; Suttili et al., 2016; Volpatti et al., 2013). Στην παρούσα μελέτη, σε όλες τις ομάδες που διατρέφονταν με φυτοφαρμακευτικά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα n-3 και n-3 LC PUFA. Ο λόγος n-3/n-6 βρέθηκε, επίσης, αυξημένος σε όλες τις ομάδες. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι γνωστό ότι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις αντιδράσεις οξειδωσης. Η ρίγανη και η κανέλα αποτελούν ισχυρά φυσικά αντιοξειδωτικά λόγω των βιοενεργών συστατικών όπως η καρβακρόλη/θυμόλη και η ευγενόλη, αντίστοιχα (Abdel-Tawwab et al., 2018; Mohammadi et al., 2020). Τα φυτοχημικά αυτά ανήκουν στις φαινολικές ενώσεις, οι οποίες είναι ικανές να εμποδίσουν την οξείδωση των PUFA (Maqsood et al., 2014). Η φαρμακευτική κάνναβη έχει, επίσης, ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Farinon et al., 2020). Συνεπώς, τα επίπεδα n-3 και n-6 είναι πιθανόν να διατηρήθηκαν λόγω της παρεμπόδισης της οξείδωσης.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στην παρούσα διατριβή έγινε προσθήκη των φαρμακευτικών φυτών στην τροφή με την ποσότητα του ιχθυελαίου να μένει σταθερή σε όλες τις διατροφικές ομάδες, έτσι ώστε να καλύπτονται οι διατροφικές απαιτήσεις του είδους σε απαραίτητα λιπαρά οξέα. Το έλαιο από σπόρους του είδους *C. sativa* περιέχει πάνω από 90% ακόρεστα λίπη και είναι πηγή υψηλού επιπέδου λινολεϊκού (18:2n-6) και α-λινολενικού οξέος (18:3n-3) (Callaway, 2004). Ωστόσο, τα ψάρια θαλασσινού νερού, όπως η τσιπούρα, στερούνται της ικανότητας μετατροπής αυτών των λιπαρών οξέων σε ARA, EPA και DHA, με αποτέλεσμα η χρήση των φυτικών ελαίων στη διατροφή να είναι περιορισμένη (Izquierdo et al., 2005). Το έλαιο σπόρων κάνναβης, το οποίο θεωρείται από τις πιο πλήρεις πηγές τροφής για τον ανθρώπινο οργανισμό λόγω της υψηλής διατροφικής του αξίας, φάνηκε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως πρόσθετο διατροφής σε ποσοστό 1% και 2%, χωρίς αρνητική επίδραση στο προφίλ λιπαρών οξέων. Επίσης, η θετική επίδραση του ελαίου φάνηκε για την ομάδα CAN1% από τον σημαντικά υψηλότερο λόγο n-3/n-6 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μελέτη για την επίδραση των σπόρων κάνναβης στα ζώα είναι πολύ περιορισμένη. Η θετική επίδραση του στο προφίλ λιπαρών οξέων έχει μελετηθεί κυρίως στις χοιρομητέρες (Vodolazska & Lauridsen, 2020) και στις όρνιθες (Raza et al., 2016). Οι μελέτες σχετικά τα φυτικά ελαία στη διατροφή των ψαριών εστιάζουν περισσότερο στο ποσοστό επιτυχούς αντικατάστασης του ιχθυελαίου. Για παράδειγμα, φυτικά έλαια όπως το έλαιο ελαιοκράμβης, το λινέλαιο και το σογιέλαιο, που έχουν μελετηθεί σε άτομα τσιπούρας έδειξαν ότι το ιχθυέλαιο μπορεί να αντικατασταθεί επιτυχώς από αυτά σε κάποιο ποσοστό χωρίς να επηρεάσει την ανάπτυξη και την ποιότητα του φιλέτου (Fountoulaki et al., 2009; Izquierdo et al., 2005).

Δεν έχει δημοσιευθεί προηγούμενη έρευνα σχετικά με την περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα σε ψάρια που έχουν διατραφεί με αιθέριο έλαιο ρίγανης και κανέλας. Ωστόσο, η επίδραση της ρίγανης στο προφίλ λιπαρών οξέων έχει μελετηθεί σε χοίρους (Cheng et al., 2017), όρνιθες (Forte et al., 2018) και αγελάδες γαλακτοπαραγωγής (Benchaaar, 2020; Kolling et al., 2018) με τα αποτελέσματα να δείχνουν ότι η ρίγανη βελτίωσε το επίπεδο n-3 PUFA σε κάποιες περιπτώσεις. Στα ψάρια πολλά εκχυλίσματα φαρμακευτικών φυτών όπως τα είδη *Leucaena leucocephala* (Benjakul et al., 2013) και *Rosmarinus officinalis* (Roomiani et al., 2019) έχουν μελετηθεί ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες με σκοπό την αποφυγή της οξείδωσης των PUFA και τη διατήρηση της ποιότητας. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα του προφίλ λιπαρών οξέων της παρούσας μελέτης αφορούσαν το ολικό σώμα των ιχθύων. Σε περίπτωση εξέτασης του μυϊκού ιστού και του ήπατος ίσως να υπάρχουν διαφοροποιήσεις.

4.1.4. Αιματολογικές παράμετροι

Η παρουσία, ο αριθμός και η αναλογία των αιμοκυττάρων αντικατοπτρίζουν τη φυσιολογική κατάσταση του ζώου και είναι σημαντικά εργαλεία για την αξιολόγηση της υγείας τους (Sado et al., 2014) και της κατάστασης των ψαριών κατά τη διάρκεια περιβαλλοντικών και διατροφικών αλλαγών (Fazio, 2019). Στην παρούσα μελέτη στην οποία δοκιμάστηκε η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης, κανέλας και ελαίου σπόρων κάνναβης στη διατροφή της τσιπούρας σε ποσοστό 1% και 2% της τροφής δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στις αιματολογικές παραμέτρους (Ht, RBC, WBC, DLC), υποδηλώνοντας την καταλληλότητα των διατροφικών παρεμβάσεων κατά την πειραματική περίοδο. Η διατήρηση αυτών των παραμέτρων εντός φυσιολογικών ορίων υποδηλώνει την έλλειψη στρεσογόνων παραγόντων που μπορούσαν να επηρεάσουν τα ψάρια και επαρκή διατροφική κατάσταση.

Παρόμοια αποτελέσματα με την παρούσα μελέτη παρατηρήθηκαν σε μελέτη των Saoud et al. (2018) σύμφωνα με την οποία η προσθήκη ελαίου από σπόρους κάνναβης στη διατροφή της τιλάπιας (*O. niloticus*) (21,3g/Kg) δεν προκάλεσε σημαντικές διαφορές σε όλες τις αιματολογικές παραμέτρους που εξετάστηκαν.

Σε μελέτες με προσθήκη μικρότερης ποσότητας αιθέριου ελαίου ρίγανης δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις αιματολογικές παραμέτρους στο είδος *Rhamdia* sp. (Cararo et al., 2017) και στην πέστροφα (Haghighi, 2015; Yilmaz et al., 2015). Ο αιματοκρίτης στην τιλάπια (*O. niloticus*) μετά από τροφοληψία με σκόνη από φύλλα ρίγανης δεν παρουσίασε, επίσης, σημαντικές διαφορές (Espirito Santo et al., 2020). Επίσης, δεν παρατήρησαν διαφορές στον αριθμό των RBC, WBC και Ht, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των λεμφοκυττάρων στο αίμα της πέστροφας και του είδους *H. huso* μετά από τροφοληψία με καρβακρόλη και θυμόλη (Ahmadifar et al., 2011, 2014). Τα λεμφοκύτταρα μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την ανοσοαπόκριση των ψαριών παράγοντας αντισώματα και αυξάνοντας τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα των μακροφάγων (Jalali et al., 2009). Αντίθετα με τις προηγούμενες μελέτες οι Mohammadi et al. (2020) παρατήρησαν αυξημένες τιμές σε όλες τις αιματολογικές παραμέτρους μετά από τροφοληψία της τιλάπιας (*O. niloticus*) με σκόνη από φύλλα ρίγανης (0.5 %). Επίσης, σε μελέτη στον κυπρίνο μετά από διατροφή με σκόνη από φύλλα του είδους *Origanum majorana* παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού RBC, WBC και Ht (Yousefi, Ghafarifarsani, et al., 2021). Τέλος, αύξηση σε όλες τις αιματολογικές παραμέτρους παρατηρήθηκε και στην *Tilapia zillii* μετά από τροφοληψία με αιθέριο έλαιο ρίγανης (Mabrok & Wahdan, 2018) και στον κυπρίνο μετά από χορήγηση μίγματος φαρμακευτικών φυτών *Malvae sylvestris*, *Origanum vulgare* και *Allium hirtifolium* boiss (Ghafarifarsani et al., 2021). Οι τιμές των RBC και WBC σχετίζονται άμεσα, σύμφωνα με πολλούς συγγραφείς, με την ανοσολογική απόκριση στα ψάρια, καθώς η αύξησή τους αναφέρεται συνήθως σε μελέτες που αξιολογούν φυσικούς ανοσοδιεγερτικούς παράγοντες (Dorucu et al., 2009; Rashidian et al., 2020). Μία αύξηση του αιματοκρίτη μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη διαθεσιμότητα της βιταμίνης C, της καροτίνης, του ασβεστίου και του

σιδήρου στο κυκλοφορικό σύστημα (Redžić et al., 2005) ενώ η αύξηση του αιματοκρίτη και των RBC διευκολύνει την οξυγόνωση των ιστών και την αποβολή του διοξειδίου του άνθρακα, γεγονός που μπορεί να συμβάλλει στην καλύτερη απόδοση της ανάπτυξης των ψαριών (Hoseini et al., 2020; Yousefi, Ghafarifarsani, et al., 2021; Yousefi, Naderi Farsani, et al., 2021).

Όσον αφορά στην επίδραση της κανέλας στο αιματολογικό προφίλ των εκτρεφόμενων ψαριών, σε μελέτη στην τιλάπια (*O. niloticus*) παρατηρήθηκε υψηλότερος αριθμός RBC (Ahmad et al., 2011). Παρόμοια, στο λαβράκι παρατηρήθηκε μεγαλύτερος αριθμός RBC, WBC και Ht. (Habiba et al., 2021). Ωστόσο, η προσθήκη κανέλας στο σιτηρέσιο της πέστροφας δεν επέφερε αλλαγές σε αυτές τις παραμέτρους (Ravardshiri et al., 2021).

4.1.5. Κορτιζόλη

Τα επίπεδα κορτιζόλης στο αίμα αποτελούν βασικό βιοδείκτη του stress στα ψάρια (Hedayati et al., 2019, Hedayati et al., 2021). Η δυσλειτουργία του ήπατος, η απώλεια ενδογενών πρωτεϊνών, η ανοσοκαταστολή και οι ασθένειες θα μπορούσαν να είναι πιθανά αποτελέσματα των συνεχώς υψηλών επιπέδων κορτιζόλης στα ψάρια (Hajirezaee et al., 2020). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων αλλά ούτε με την ομάδα ελέγχου. Καθώς σε κάποιες διατροφικές ομάδες παρατηρήθηκαν χαμηλότερες τιμές, αν όχι στατιστικά σημαντικές, ίσως σε πείραμα μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας να υπήρχαν σημαντικές διαφοροποιήσεις. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν οι Rafiepour et al. (2020) όπου δεν παρατήρησαν διαφοροποιήσεις στα επίπεδα κορτιζόλης μετά από χορήγηση εκχυλίσματος *O. vulgare* στην πέστροφα *O. mykiss* σε ποσότητες 2 έως 14 gr. Χαμηλότερα επίπεδα κορτιζόλης μετά από χορήγηση ρίγανης παρατήρησαν οι Mohammadi et al. (2020) στην τιλάπια (*O. niloticus*), ενώ χαμηλότερη κορτιζόλη παρατήρησαν οι Ghafarifarsani et al. (2021) και οι (Rudiansyah et al., 2022) στον κυπρίνο μετά από τροφοληψία με μείγμα φαρμακευτικών φυτών που περιείχε ρίγανη. Έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι η επίδραση των φαρμακευτικών φυτών στη μείωση της κορτιζόλης μπορεί να σχετίζεται με την παρεμπόδιση αισθητηριακών πληροφοριών στον υποθάλαμο, αναστέλλοντας έτσι μία σειρά ορμονικών αλλαγών που χαρακτηρίζουν το stress (Iversen et al., 2003). Η χορήγηση φαρμακευτικών φυτών όπως έχει αποδειχτεί μπορεί να μειώσει την κορτιζόλη και άλλες παραμέτρους όπως χοληστερόλη, γλυκόζη και τριγλυκερίδια μέσω της ενίσχυσης της αξιοποίησης της τροφής, της αντιοξειδωτικής ικανότητας, των ανοσολογικών αποκρίσεων και της υγείας και λειτουργίας του ήπατος, αυξάνοντας έτσι την αντοχή των ψαριών σε συνθήκες stress (Rudiansyah et al., 2022).

4.1.6. Βλάβη του DNA

Τα φυτικά προϊόντα που προέρχονται από φαρμακευτικά φυτά θεωρούνταν ότι δεν έχουν δυσμενή και τοξική δράση (Jafarpour et al., 2018). Όπως όμως έχει αναφερθεί ορισμένα φυτά μπορεί να περιέχουν τοξικά συστατικά, προκαλώντας βλάβη στα κύτταρα και το γονιδίωμα (Kamdem et al., 2013). Τα φαρμακευτικά εκχυλίσματα φυτών μπορούν να αποτελέσουν τα ίδια στρεσογόνο παράγοντα για τους ιχθύες, αν οι συγκεντρώσεις τους δεν είναι κατάλληλες (Suttili et al., 2018). Επίσης, φαρμακευτικά φυτά που είναι τοξικά για τα ψάρια μπορούν μέσω της τροφικής αλυσίδας να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό καθιστώντας τα μη ασφαλή για κατανάλωση (Singh et al., 2014). Για αυτό το σκοπό, κρίνεται απαραίτητος ο προσδιορισμός της γενοτοξικής δράσης των εξεταζόμενων ελαίων.

Στην παρούσα μελέτη μόνο οι ομάδες CAN2%, OR1% και CIN1% είχαν σημαντικά υψηλότερη γενοτοξικότητα από την ομάδα ελέγχου, με την ομάδα OR1% να παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερη βλάβη στο DNA στο ήπαρ από όλες τις υπόλοιπες διατροφικές ομάδες. Μελέτες σε εκτρεφόμενα ψάρια έχουν αποδείξει τις τοξικές επιδράσεις των φαρμακευτικών φυτών. Οι Singh et al. (2014) έδειξαν ότι όταν το εκχύλισμα φύλλων του *Jatropha gossypifolia* εφαρμόζεται σε υψηλές δόσεις παρουσιάζει γενοτοξική δράση. Έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση εκχυλίσματος *Melissa officinalis* σε υψηλό ποσοστό είχε σημαντική γενοτοξική δράση στα ερυθροκύτταρα της πέστροφας (*O. mykiss*) (Jafarpour et al., 2018). Επίσης, η από του στόματος χορήγηση του εκχυλίσματος από το φυτό *M. officinalis* σε υψηλές δόσεις προκάλεσε παθολογικές αλλαγές στο ήπαρ και στους νεφρούς ποντικών (Namjoo et al., 2013). Στην περίπτωση της ομάδας CAN2% παρατηρήθηκε ηπατική στεάτωση και κενотоπίωση του κυτταροπλάσματος λόγω συσσώρευσης λίπους σε μορφή μικρών σταγονιδίων στα ηπατοκύτταρα. Στις άλλες ομάδες δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση του υψηλού ποσοστού χορήγησης στη βλάβη του DNA των ηπατοκυττάρων, παρά το γεγονός ότι η ομάδα CIN2% είχε την ίδια ιστολογική εικόνα με την ομάδα CAN2%. Στα κύτταρα του εντέρου, του νεφρού και του σπλήνα οι ομάδες της κάνναβης και της κανέλας δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές. Αντίθετα, η ομάδα OR1% είχε σημαντικά υψηλότερη βλάβη του DNA στα κύτταρα του ήπατος και του εντέρου. Είναι γνωστό ότι τα αιθέρια έλαια μπορούν να προκαλέσουν λειτουργικές βλάβες σε όργανα όπως το ήπαρ στα ζώα (Ngahang Kamte et al., 2018).

4.1.7. Ιστολογικές αλλοιώσεις

Η ιστολογική ανάλυση του πεπτικού συστήματος θεωρείται ένας καλός δείκτης για την κατανόηση της διατροφικής κατάστασης των ψαριών (Green & McCormick, 1999; Hall & Bellwood, 1995). Οι ιστολογικές μεταβολές μπορούν να δώσουν μια αρκετά ξεκάθαρη εικόνα της επίδρασης της τροφής στην εσωτερική μορφολογία των ιστών και οργάνων των ψαριών (Yigit et al., 2017). Η νέκρωση, η κυτταροπλασματική κενотоπίωση και η λιπώδης εκφύλιση του ήπατος είναι μη φυσιολογικές ιστολογικές μεταβολές στο ήπαρ που σχετίζονται, μεταξύ άλλων, με τη χρήση φαρμακευτικών φυτών και εκχυλισμάτων ως πρόσθετα ζωοτροφών (Caballero et al., 2004; Wassef et al., 2007; Yigit et al., 2017). Η λιπώδης διήθηση του ήπατος μπορεί να είναι αποτέλεσμα του υψηλού ποσοστού λιπιδίων στη διατροφή και της αύξησης των ελεύθερων ριζών και του οξειδωτικού stress στα ηπατοκύτταρα (Zengin, 2021).

Στην παρούσα μελέτη, στα δείγματα ήπατος που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικές αλλοιώσεις, ενώ στα δείγματα ήπατος των ομάδων που διατρέφονταν με έλαιο σπόρων κάνναβης και αιθέριο έλαιο κανέλας σε ποσοστό 2%, παρατηρήθηκε ηπατική στεάτωση (hepatic steatosis). Επιπλέον, κενотоπίωση του κυτταροπλάσματος (hepatocellular vacuolation) παρατηρήθηκε λόγω συσσώρευσης λίπους σε μορφή μικρών σταγονιδίων στα ηπατοκύτταρα. Νέκρωση και φλεγμονώδης διήθηση δεν παρατηρήθηκαν, ενώ το ήπαρ σε όλες τις διατροφικές μεταχειρίσεις παρουσίασε φυσιολογική ιστολογική εικόνα. Στα δείγματα του πρόσθιου εντέρου όλων των διατροφικών μεταχειρίσεων δεν βρέθηκαν ιστομορφολογικές αλλοιώσεις και παθολογικά ευρήματα.

Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται σε μελέτη όπου το ήπαρ και το έντερο του κυπρίνου μετά από διατροφή με αιθέριο έλαιο ρίγανης παρουσίασε φυσιολογική ιστομορφολογική δομή χωρίς παθολογικά ευρήματα (Abdel-Latif et al., 2020; Khafaga et al., 2020). Επίσης, στα δείγματα ήπατος και/ή εντέρου στην τσιπούρα (Pérez-Sánchez et al., 2015), του Yellow Tail Tetra (*Astyanax altiparanae*) (Ferreira et al., 2016), της πέστροφας (Bababaalian Amiri et al., 2020), της τιλάπιας (*O. niloticus*) (Magouz et al., 2022) και του Black Sea salmon (*Salmo labrax*) (Özel et al., 2022) δεν φάνηκε αλλοιωμένη εμφάνιση των μελετημένων ιστών αλλά βελτίωση της ιστολογικής εικόνας. Αντίθετα, νέκρωση των ηπατοκυττάρων και κυτταροπλασματική κενотоπίωση (cytoplasmic vacuolation) παρατηρήθηκαν στα δείγματα ήπατος της πέστροφας μετά από τροφοληψία με αιθέριο έλαιο του είδους *O. onites* (Yigit et al., 2017). Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για τη διερεύνηση της επίδρασης της ρίγανης στην ιστολογική εμφάνιση των ιστών και οργάνων της τσιπούρας αλλά διαφαίνεται ότι το αιθέριο ελαίου ρίγανης θα μπορούσε να χρησιμοποιείται ως πρόσθετο διατροφής με ηπατοπροστατευτική δράση και με ευεργετικές ικανότητες για τη βελτίωση της κατάστασης της υγείας των ψαριών.

Η προσθήκη κανέλας στο σιτηρέσιο του striped catfish (*P. hypophthalmus*) (Tartila et al., 2021) και της πέστροφας (Khani et al., 2017) φαίνεται να βελτίωσε επίσης, την ιστολογική εικόνα του ήπατος, μειώνοντας τη συσσώρευση του λίπους.

Όσον αφορά στην κάνναβη, δεν υπάρχουν άλλες επιστημονικές μελέτες για την επίδρασή της στην ιστολογική εικόνα των ιστών και οργάνων των ψαριών. Ωστόσο, μελέτες στους αρουραίους έδειξαν την ηπατοπροστατευτική δράση του ελαίου από σπόρους κάνναβης *C.sativa* ενάντια στη λιπώδη ηπατική νόσο λόγω της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης (Kaushal et al., 2020).

Ιστολογικές αλλοιώσεις στη δομή του ήπατος της τσιπούρας έχουν αναφερθεί και για άλλα φαρμακευτικά φυτά (Caballero et al., 2004; Wassef et al., 2007). Η λιπώδης εκφύλιση του ήπατος της τσιπούρας χαρακτηρίζεται από διογκωμένα ηπατοκύτταρα με μετατοπισμένο πυρήνα στην περιφέρεια και μεγάλα σταγονίδια λίπους στο κυτταρόπλασμα (Caballero et al., 1999). Οι ιστοπαθολογικές μεταβολές μπορεί να σχετίζονται με τυχόν τοξικά συστατικά, τις χορηγούμενες δόσεις ή αλλεργικές καταστάσεις, αλλά γενικά δεν έχουν επιπτώσεις στην υγεία όταν χρησιμοποιούνται στις κατάλληλες δόσεις και σωστή εφαρμογή (Yigit et al., 2017).

4.1.8. Νευροδιαβιβαστές

Καθώς τα λιπίδια εμπλέκονται στη λειτουργία του νευρικού συστήματος και η έλλειψη PUFA μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ανάπτυξη του νευρικού συστήματος με αρνητικές επιδράσεις στη συμπεριφορά και στην επιβίωση των ψαριών είναι σημαντική η διερεύνηση του προφίλ λιπαρών οξέων των εναλλακτικών πηγών λιπιδίων και η πιθανή επίδραση τους στη δραστηριότητα του ΚΝΣ. Οι λόγοι 18:1n-9/n-3 LC PUFA και SFA/n-3 LC PUFA έχουν βρεθεί να είναι σημαντικοί παράγοντες πρόβλεψης της συγκέντρωσης των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου και έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στο μεταβολισμό της σεροτονίνης, της ντοπαμίνης και της απόδοσης της ανάπτυξης (Τσοπελάκος, 2021).

Η σεροτονινεργική δραστηριότητα του πρόσθιου εγκεφάλου θεωρείται ένας αξιόπιστος δείκτης stress στα ψάρια αλλά και σε άλλα σπονδυλωτά (Gesto et al., 2013; Winberg & Nilsson, 1993) ενώ γενικά οι νευροδιαβιβαστές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες διατροφικού stress (Τσοπελάκος, 2021). Ωστόσο, η μελέτη των νευροδιαβιβαστών σε εκτρεφόμενα ψάρια μετά από χορήγηση φυτοφαρμακευτικών είναι εξαιρετικά ανεπαρκής.

Τα αιθέρια έλαια, λόγω των λιπόφιλων ιδιοτήτων και της λιποδιαλυτότητας τους, συμβάλλουν στην ταχεία διασπορά μέσω των βιολογικών μεμβρανών συμπεριλαμβανομένου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στο ΚΝΣ, ρυθμίζοντας την εγκεφαλική λειτουργία (Manayi et al., 2016). Συγκεκριμένα, μελέτες στον άνθρωπο έχουν δείξει ότι τα αιθέρια έλαια μπορούν να επηρεάσουν τον άξονα HPA και την

παραγωγή γλυκοκορτικοστεροειδών (Hongratanaworakit, 2009; Okano et al., 2019), τη μείωση της έκφρασης προ-φλεγμονωδών παραγόντων, όπως ο NF-κΒ (Chen et al., 2016) ή την αύξηση των επιπέδων σεροτονίνης (Zhang et al., 2016, 2018). Γενικά, η εμφάνιση συμπτωμάτων stress, έχει συνδεθεί με τη χαμηλή συγκέντρωση σεροτονίνης και την υψηλή σεροτονινεργική και ντοπαμινεργική δραστηριότητα, χωρίς να είναι πλήρης η κατανόηση του μηχανισμού δράσης της σεροτονίνης στα ψάρια (Τσοπελάκος, 2021).

Με βάση του λόγους πρόβλεψης των νευροδιαβιβαστών 18:1n-9/n-3 LC PUFA και SFA/n-3 LC PUFA στο ολικό σώμα των ψαριών δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην DA και 5-HT στις ομάδες που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης και κανέλας, παρά το γεγονός ότι οι ομάδες OR2% και CIN2% είχαν χαμηλή κατανάλωση τροφής και χαμηλή ανάπτυξη και πιθανότητα είχαν υποστεί χρόνιο διατροφικό stress. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στα χημικά συστατικά των αιθέρων ελαίων όπως η καρβακρόλη, η οποία είναι η κύρια βιοδραστική ένωση του αιθέριου ελαίου ρίγανης και έχει αποδειχτεί ότι έχει αγχολυτική και αντικαταθλιπτική δράση στα ποντίκια (Melo et al., 2010). Η καρβακρόλη έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τη διάθεση και τις γνωστικές λειτουργίες επηρεάζοντας το ΚΝΣ και ρυθμίζοντας τους νευροδιαβιβαστές (Zotti et al., 2013). Ωστόσο, ο μηχανισμός μέσω του οποίου η καρβακρόλη επηρεάζει την DA και 5-HT, παραμένει ακόμη υπό διερεύνηση (Zotti et al., 2013). Υψηλότερος αλλά όχι σημαντικά διαφορετικός βρέθηκε ο λόγος DOPAC/DA στο ρομβοειδή εγκέφαλο στην περίπτωση της ομάδας CIN2%. Σε προηγούμενες μελέτες η αύξηση του DOPAC έχει συνδεθεί με καταστάσεις stress (Karakatsouli et al., 2007; Papoutsoglou et al., 2008).

Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην DA του τελικού εγκεφάλου αλλά παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη τιμή στην 5-HT στο μέσο εγκέφαλο στην ομάδα CAN2% σε σχέση με την ομάδα CAN1%. Πιθανότατα αυτό να οφείλεται στο σημαντικά μεγαλύτερο επίπεδο n-3 που είχε η ομάδα CAN2%. Στα χερσαία είδη, έχει μελετηθεί η σχέση αυξημένων επιπέδων ωμέγα-3 λιπαρών οξέων με την αύξηση των συγκεντρώσεων των 5-HT και DA του εγκεφάλου (Chalon et al., 1998). Τα εκχυλίσματα του φυτού *Cannabis sativa* L. περιέχουν ενώσεις όπως η κανναβιδιόλη (CBD), οι οποίες είναι γνωστές για την αντικαταθλιπτική και αγχολυτική δράση τους και έχουν μελετηθεί για την ικανότητα τους να προκαλούν κυτταρικές και μοριακές αλλαγές στις περιοχές του εγκεφάλου (Schier et al., 2014; Silote et al., 2019).

Τα εκχυλίσματα φαρμακευτικών φυτών αποτελούν μία εναλλακτική λύση στη διατροφή των εκτρεφόμενων ψαριών με πολλά οφέλη, ωστόσο μπορούν να αποτελέσουν λόγο πρόκλησης stress στους οργανισμούς εξαιτίας της σύστασής τους. Εφόσον, οι νευροδιαβιβαστές του εγκεφάλου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες διατροφικού stress, ακόμη και σε αρχικό στάδιο της μεταβολικής διαταραχής (Τσοπελάκος, 2021) είναι σημαντικό να μελετώνται όταν δοκιμάζεται η προσθήκη κάποιου φυτοφαρμακευτικού στη διατροφή των ψαριών. Η επίδραση του ελαίου από

σπόρους κάνναβης και των αιθέριων ελαίων ρίγανης και κανέλας στους νευροδιαβιβαστές χρήζει περαιτέρω διερεύνησης με πειράματα μεγαλύτερης διάρκειας και συχνές δειγματοληψίες.

4.1.9. Συμπεριφορά

Η διατροφική συμπεριφορά των ψαριών είναι πολύπλοκη (Lall & Tibbetts, 2009). Τα ψάρια έχουν χημειοϋποδοχείς που είναι υπεύθυνοι για τις αισθήσεις της γεύσης (gustation) και της όσφρησης (olfaction), οι οποίες αποτελούν τα κύρια χημικά αισθητήρια συστήματα (Hara, 1994). Η προσθήκη φυτοφαρμακευτικών και βοτάνων στη δίαιτα των ζώων επηρεάζει αρχικά την τροφοληψία και τη διατροφική συμπεριφορά λόγω της ιδιαίτερης γεύσης που προσδίδουν στην τροφή και στη συνέχεια επηρεάζει το διατροφικό μοτίβο, την κατανάλωση της τροφής κ.ά. (Lee & Gao, 2012) αλλά και την ευζωία (Symeon et al., 2010). Η νεοφοβία, δηλαδή ο φόβος για καινούρια ή άγνωστα ερεθίσματα (Greenberg & Mettke-hofmann, 1977) έχει παρατηρηθεί σε διάφορα είδη (Schaffer et al., 2021) και έχει μελετηθεί αρκετά στην περίπτωση της εισαγωγής μίας νέας τροφής στη δίαιτα του ζώων (Champneys et al., 2018; Symeon et al., 2010). Ο φόβος αυτός θα μπορούσε να προκαλέσει μείωση της ευζωίας και της απόδοσης (Marples & Roper, 1996). Για τα μηρυκαστικά έχει αναφερθεί ότι η προσθήκη αιθέριων ελαίων στην τροφή κατά τα πρώτα στάδια ζωής μπορεί να προκαλέσει τροφική νεοφοβία, παρατηρούμενη ως μείωση κατανάλωσης της καινούριας τροφής (Bowman & Sowell, 2018).

Είναι σημαντικό λοιπόν, όταν γίνεται προσθήκη φυτοφαρμακευτικών και εκχυλισμάτων στη διατροφή των ζώων να γίνεται αξιολόγηση της διατροφικής συμπεριφοράς, καθώς παρά τα οφέλη που μπορεί να έχουν στην αύξηση της παραγωγής μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση στην ευζωία (Symeon et al., 2010). Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν τυχόν διαφοροποιήσεις στη συμπεριφορά των ψαριών που μπορεί να προκλήθηκαν μετά από χορήγηση τροφής με προσθήκη ελαίου σπόρων κάνναβης και αιθέριων ελαίων ρίγανης και κανέλας. Το ποσοστό των ψαριών στη ζώνη επιφάνειας τα πρώτα 5 δευτερόλεπτα πριν πέσει η τροφή στο νερό χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης της “προσμονής” της τροφής, έτσι ώστε να παρατηρηθούν διαφορές από την πρώτη μέρα όπου η τροφή ήταν γευστικά καινούρια και την ημέρα 74 όπου ήταν το τέλος της τροφοληψίας. Ο χρόνος τροφοληψίας στην πάνω και κάτω ζώνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης για να διερευνηθεί κατά πόσο τα ψάρια καταναλώνουν τις βυθιζόμενες πελλέτες γρήγορα πριν φτάσουν στον πυθμένα της δεξαμενής.

Από το ποσοστό των ψαριών που διατρέφονταν με έλαιο από σπόρους κάνναβης σε ποσοστό 1% και 2% στη ζώνη επιφάνειας φαίνεται ότι υπήρχαν σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό ψαριών των ομάδων CAN1% και CAN2% στη ζώνη επιφάνειας πριν πέσει η τροφή στο νερό την ημέρα 74, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα ψάρια αυτών των

διατροφικών ομάδων “περίμεναν” περισσότερο την τροφή γιατί πιθανότατα είχε πιο ελκυστική γεύση. Ο χρόνος τροφοληψίας στην κάτω ζώνη ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από την πάνω ζώνη, μία παρατήρηση αναμενόμενη λόγω των βυθιζόμενων πελλετών, εφόσον ο χρόνος τροφοληψίας στην πάνω και κάτω ζώνη την ημέρα 74 δεν ήταν σημαντικά διαφορετικός από τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου.

Το σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό ψαριών στη ζώνη επιφάνειας που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης 1% και 2% σε σχέση με τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου υποδηλώνει ότι από την ημέρα 1 τα ψάρια δεν ανέβαιναν στην επιφάνεια να διατραφούν που πιθανόν οφείλονταν στην έντονη μυρωδιά της ρίγανης. Από το χρόνο τροφοληψίας στην πάνω και κάτω ζώνη φαίνεται ότι τα ψάρια επέλεξαν να διατραφούν από τον πυθμένα της δεξαμενής και τις δύο ημέρες, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο μέρες. Αυτό πιθανότατα σημαίνει ότι η τροφή δεν ήταν αρκετά ελκυστική και τα ψάρια δεν επιθυμούσαν να την καταναλώσουν απευθείας ενώ οι μη σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών υποδηλώνουν ότι αυτό δεν άλλαξε έως και την τελευταία ημέρα τροφοληψίας. Μεγαλύτερος χρόνος τροφοληψίας στην κάτω ζώνη και μικρότερος χρόνος τροφοληψίας στην πάνω ζώνη και για τις δύο μέρες παρατηρήθηκε και σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου, χωρίς να είναι όλες οι περιπτώσεις σημαντικά διαφορετικές. Συνδυαστικά με την κατανάλωση τροφής, στην ομάδα OR1% ενώ το ποσοστό στη ζώνη επιφάνειας ήταν σημαντικά μικρότερο, ο χρόνος τροφοληψίας στην κάτω ζώνη δεν είχε σημαντικές διαφορές από την ομάδα ελέγχου, και ταυτόχρονα δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην κατανάλωση τροφής στη συγκεκριμένη διατροφική ομάδα. Αντίθετα, στην ομάδα OR2% ενώ το ποσοστό στη ζώνη επιφάνειας ήταν σημαντικά μικρότερο ο ο χρόνος τροφοληψίας στην κάτω ζώνη ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από την ομάδα ελέγχου και ταυτόχρονα παρατηρήθηκε σημαντικά μικρότερη κατανάλωση τροφής. Συνεπώς, οι χορηγούμενες δόσεις αιθέριου ελαίου ρίγανης στην τροφή προκάλεσαν διαφοροποιήσεις στη διατροφική συμπεριφορά της τσιπούρας. Το ποσοστό προσθήκης 2% πιθανότατα κατέστησε την τροφή μη γευστική, το οποίο παρατηρήθηκε και από την μειωμένη κατανάλωση τροφής, ενώ η επίδραση της προσθήκης αιθέριου ελαίου ρίγανης σε ποσοστό 1% χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Το ποσοστό των ψαριών στη ζώνη επιφάνειας δεν είχε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ημέρες στην περίπτωση της προσθήκης αιθέριου ελαίου κανέλας σε ποσοστό 2% στην τροφή, αλλά και οι δύο ημέρες είχαν σημαντικές διαφορές με τις αντίστοιχες ημέρες της ομάδα ελέγχου. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην έντονη μυρωδιά της κανέλας από την πρώτη μέρα παρατήρησης. Αντίθετα, οι ομάδες που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο κανέλας σε ποσοστό 1% παρουσίασαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δυο ημέρες, το οποίο σημαίνει ότι ενώ στην αρχή (DAY 1) τα ψάρια “περίμεναν” την τροφή (πιθανώς γιατί η μυρωδιά της κανέλας δεν ήταν τόσο έντονη), μετά από 74 ημέρες τροφοληψίας το ποσοστό των ψαριών στη ζώνη επιφάνειας μειώθηκε χωρίς όμως να διαφέρει σημαντικά από την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου. Ο

σημαντικά μεγαλύτερος χρόνος τροφοληψίας στην κάτω ζώνη δείχνει ότι τα ψάρια επέλεξαν να διατραφούν από τον πυθμένα της δεξαμενής και τις δύο ημέρες, ενώ σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο μέρες παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση της ομάδας CIN1%. Η επιλογή τροφοληψίας στην κάτω ζώνη δείχνει ότι η τροφή δεν ήταν τόσο ελκυστική ώστε τα ψάρια να την καταναλώνουν γρήγορα πριν φτάσει στον πυθμένα. Επίσης, αυτό φάνηκε και από τις σημαντικές διαφορές την ημέρα 74 σε σχέση με τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου.

Η συμπεριφορά των ζώων κατά την τροφοληψία με αιθέρια έλαια έχει μελετηθεί στα πρόβατα (Simitzis et al., 2005) και στα βοοειδή (Tager & Krause, 2011) αλλά και στα ψάρια (Hassaan & Soltan, 2016). Σε μελέτη στην τιλάπια (*O. niloticus*), παρατηρήθηκε θετική επίδραση του αιθέριου ελαίου σκόρδου (*Allium sativum*) και αιθέριου ελαίου μάραθου (*Foeniculum vulgare*) στη διατροφική συμπεριφορά των ψαριών (Hassaan & Soltan, 2016). Επίσης, μετά από προσθήκη αιθέριων ελαίων του είδους *Citrus sinensis* και *Citrus limon* στη διατροφή της τιλάπιας (*O. niloticus*) δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη διατροφική συμπεριφορά, η οποία προσδιορίστηκε από την καθυστέρηση έναρξης της σίτισης (χρόνος μεταξύ της παροχής τροφής στο νερό του ενυδρείου και του πρώτου ψαριού που άρχισε να τρώει) και τη διάρκεια της σίτισης (Mohamed, 2021). Οι διαφορές αυτές μεταξύ των αποτελεσμάτων των διάφορων μελετών, συμπεριλαμβανομένης της παρούσας μελέτης, πιθανώς οφείλονται στο είδος των χορηγούμενων φυτοφαρμακευτικών αλλά και στο εξεταζόμενο είδος.

4.2. ΠΕΙΡΑΜΑ 2 - Επίδραση οξείας καταπόνησης, προκληθείσας μέσω έντονων χειρισμών απόχης στην απόκριση καταπόνησης της τσιπούρας μετά από διατροφή με φαρμακευτικά φυτά

4.2.1. Αιματολογικές παράμετροι

Οι διαχειριστικές πρακτικές που εφαρμόζονται στην ιχθυοκαλλιέργεια, επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και την ευζωία (Eslamlou & Falahatkar, 2014). Η απόκριση στο stress είναι γνωστό ότι περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, μεταβολές στις αιματολογικές παραμέτρους (Eslamlou & Falahatkar, 2014). Μελέτες σε εκτρεφόμενα ψάρια έχουν δείξει σημαντικές διαφορές στο αιματολογικό προφίλ μετά από υποβολή σε οξύ stress (Fazio et al., 2015; Olsen, 2008; Suski et al., 2007). Η αύξηση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων, του αιματοκρίτη και της αιμογλοβίνης αποδίδεται κυρίως στη συστολή της σπλήνας, η οποία είναι η κύρια αποθήκη των αιμοκυττάρων και είναι γνωστό ότι συστέλλεται στην περίπτωση των τελεόστεων ιχθύων μετά από την επίδραση κάποιου οξέος στρεσογόνου παράγοντα (Ruane et al., 2000). Η αύξηση του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων δείχνει, επίσης, την ύπαρξη στρεσογόνου παράγοντα (Gabriel et al., 2011). Η απόκριση των

λευκοκυττάρων είναι σχετικά αργή κατά τη σύλληψη και τους χειρισμούς (Davis et al., 2008).

Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στον Ht, RBC και WBC στο αίμα της τσιπούρας. Ωστόσο, σημαντικά υψηλότερο ποσοστό λεμφοκυττάρων και χαμηλότερο ποσοστό κοκκιοκυττάρων παρατηρήθηκε στο αίμα των ψαριών που διατρέφονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης.

Όπως αναφέρουν οι Ahmadifar et al. (2014), αν και δεν υπάρχει μία σαφής εξήγηση για το ρόλο της θυμόλης και της καρβακρόλης στην αναλογία λεμφοκυττάρων, μια μεγαλύτερη αναλογία λεμφοκυττάρων μπορεί να σχετίζεται με την ενίσχυση του αμυντικού μηχανισμού του οργανισμού.

Σε παρόμοια μελέτη στην τιλάπια (*O. niloticus*), οι τιμές του αιματοκρίτη παρέμειναν σταθερές μετά την τροφοληψία με κανέλα και την υποβολή των ψαριών σε υποξικό stress για 3 λεπτά, το οποίο όπως εξηγούν οι συγγραφείς μπορεί να οφείλονταν εκτός από τη διάρκεια του στρεσογόνου παράγοντα, στην ανθεκτικότητα (hardiness) του συγκεκριμένου είδους (dos Santos et al., 2016).

4.2.2. Κορτιζόλη

Διάφοροι στρεσογόνοι παράγοντες είναι αναπόφευκτοι στην εντατική εκτροφή ιχθύων και μπορούν να επηρεάσουν την απόκριση στο stress (Ashley, 2007). Τα τελευταία χρόνια, τα φυτογενή πρόσθετα έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητα τους στη μείωση του stress κατά των στρεσογόνων πρακτικών που εφαρμόζονται στις υδατοκαλλιέργειες, συμπεριλαμβανομένων των έντονων χειρισμών (de Oliveira Hashimoto et al., 2016; Fogliarini et al., 2017; Hoseini et al., 2018).

Είναι γνωστό ότι η έκθεση σε υποξία οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης στα ψάρια (De Mercado et al., 2018; Morales-Lange et al., 2022; Samaras et al., 2023). Στην παρούσα μελέτη καταγράφηκαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα κορτιζόλης στα ψάρια που σιτίζονταν με έλαιο σπόρων κάνναβης (1%) και αιθέριο έλαιο κανέλας, γεγονός που υποδεικνύει ότι αυτά τα φυτογενή πρόσθετα ήταν ικανά να περιορίσουν τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης προκαλούμενα από έντονο χειρισμό. Η επίδραση των εντόνων χειρισμών στην απόκριση της κορτιζόλης και σε άλλες αιματολογικές παραμέτρους έχουν μελετηθεί σε προηγούμενες έρευνες στην τσιπούρα (Arends et al., 1999; Fazio et al., 2015; Malandrakis et al., 2016; Sunyer et al., 1995). Τα φυτοβιοτικά περιορίζουν την απόκριση κορτιζόλης, καθώς έχει παρατηρηθεί μείωση των επιπέδων της στην περίπτωση διατροφής με προσθήκη κανέλας, υπό συνθήκες stress προκαλούμενο από υποξία (dos Santos et al., 2016). Χαμηλότερο επίπεδο κορτιζόλης έχει βρεθεί και στο πλάσμα της τιλάπιας (*O. niloticus*) μετά την υποβολή των ψαριών σε οξύ stress μετά από τη χρήση του φυτού Λουΐζα (*Aloysia triphylla*) ως αναισθητική ουσία (Teixeira et al., 2017). Αντίθετα, τα ψάρια που σιτίζονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερες

τιμές κορτιζόλης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με την αδυναμία παρεμπόδισης της απόκρισης της κορτιζόλης, όπως έχει μελετηθεί στο λαβράκι και τη χορήγηση αιθέριου ελαίου ρίγανης ως αναισθητικό (Bodur et al., 2018).

4.2.3. Βλάβη του DNA

Στην παρούσα μελέτη, η ομάδα που διατρέφονταν με έλαιο κάνναβης σε ποσοστό 1% μείωσε τη βλάβη του DNA στα ηπατοκύτταρα, η οποία προκλήθηκε από έντονους χειρισμούς. Ωστόσο, οι υπόλοιπες διατροφικές ομάδες όπου έγινε προσθήκη ελαίων αύξησαν τη γενεοτοξικότητα στα ηπατοκύτταρα. Από την άλλη πλευρά, αυξημένη γενεοτοξικότητα στα ερυθροκύτταρα προκλήθηκε μόνο στην περίπτωση της ομάδας CIN2%, ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις δεν καταγράφηκαν διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων και της ομάδας ελέγχου. Η γενεοτοξικότητα των φυτικών προϊόντων και των αιθέριων ελαίων έχει ήδη μελετηθεί στα θηλαστικά, καθώς παρά τα οφέλη τους για την υγεία μπορεί να προκαλέσουν τοξικές επιδράσεις και οξειδωτικό stress (Mossa et al., 2018). Οι παράγοντες που προκαλούν οξύ stress επηρεάζουν τη βλάβη του DNA και την απόπτωση σε υδρόβιους οργανισμούς (C. H. Cheng et al., 2018; Malandrakis et al., 2016), ενώ έχει αποδειχθεί ότι οι έντονες κινήσεις προκαλούν οξειδωτικό stress και αποικοδόμηση του DNA στα ψάρια (Aniagu, 2006). Η περιορισμένη αποτελεσματικότητα των φυτογενών πρόσθετων για τον μετριασμό της γενεοτοξικότητας μπορεί να οφείλεται στις διαδικασίες χειρισμού που σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με την υποξία που προκαλείται από την έλλειψη επαρκούς οξυγόνου λόγω της έκθεσης στον αέρα, η οποία είναι μια πολύ στρεσογόνο κατάσταση και θα πρέπει να διατηρείται σε ελάχιστο επίπεδο (Ni et al., 2014). Η έκθεση σε υποξία έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία, διαταράσσοντας την ομοιόσταση (Samaras et al., 2023). Οι προσαρμοστικές αποκρίσεις μέσω φυσιολογικών και βιοχημικών μεταβολών ενεργοποιούνται από τα ψάρια, προς την επίτευξη ομοιόστασης και την επιβίωση (Farrell & Richards, 2009). Είναι γνωστό ότι η φυσιολογία του ήπατος έχει βρεθεί να ανταποκρίνεται στην υποξία (Beemelmans et al., 2021), δείχνοντας μια ισχυρή συσχέτιση της ηπατικής αντίδρασης με τη βλάβη στα βράγχια και την απόκριση στο stress (Emam et al., 2022). Η προσαρμογή στην υποξία έχει περιγραφεί στα ερυθροκύτταρα του αίματος, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά οξυγόνου. Σε συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας οξυγόνου καταγράφεται συνήθως αύξηση του αριθμού των ερυθροκυττάρων και του αιματοκρίτη (Aboagye & Allen, 2018; Silkin & Silkina, 2005), λόγω της δράσης των κατεχολαμινών και της συστολής του σπλήνα (Wendelaar Bonga, 1997), ωστόσο, αυτό δεν είναι αποκλειστικό (Araújo-Luna et al., 2018). Οι διαφορές στους μηχανισμούς προσαρμογής στην υποξία ενδέχεται να σχετίζονται με τις διαφορετικές αποκρίσεις των εξεταζόμενων ιστών όσον αφορά την γενεοτοξικότητα. Οι διαφορές αυτές έχουν συζητηθεί παραπάνω και μπορούν επίσης να εξηγηθούν από τη

διαφορετική γονιδιακή έκφραση και ρύθμιση διαφορετικών κυττάρων σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό (Lee & Steinert, 2003).

4.3. ΠΕΙΡΑΜΑ 3 - Η επίδραση της ασιτίας στην απόκριση καταπόνησης της τσιπούρας μετά από τροφοληψία με φαρμακευτικά φυτά

4.3.1. Αιματολογικές παράμετροι

Οι μελέτες σχετικά με την επίδραση των φυτοφαρμακευτικών στις αιματολογικές παραμέτρους μετά από περίοδο ασιτίας, ως χρόνιος στρεσογόνος παράγοντας, είναι πολύ περιορισμένη. Στην παρούσα μελέτη, ανάμεσα στις ομάδες που διατρέφονταν καθ' όλη τη διάρκεια και τις ομάδες που υποβλήθηκαν σε ασιτία για 14 ημέρες παρατηρήθηκε μία τάση μείωσης του αριθμού RBC και WBC, με σημαντικές διαφορές στις ομάδες της κάνναβης και της κανέλας, αλλά χωρίς σημαντικές διαφορές από την ομάδα ελέγχου που σιτίζονταν κανονικά, υποδηλώνοντας ότι τα συγκεκριμένα φυτοφαρμακευτικά έχουν την ικανότητα να μετριάζουν τη μείωση των WBC στο αίμα. Οι ομάδες που σιτίζονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης σε ποσοστό προσθήκης 1% (OR1%) καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος άλλα και αυτές που υποβλήθηκαν σε ασιτία είχαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό WBC από τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου. Το αιθέριο έλαιο του είδους *O.vulgare* έχει αποδειχτεί ότι βελτιώνει τις αιματολογικές παραμέτρους (Mohammadi et al., 2020) και κατ' επέκταση την υγεία των ψαριών. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στα εκτρεφόμενα ψάρια με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης των φυτών και των βιοενεργών συστατικών τους έχει δείξει την ικανότητα τους στην αύξηση του αριθμού των WBC (Hoseini, Hoseinifar, et al., 2018). Σε μελέτη στην τιλάπια (*O. niloticus*), το είδος *Moringa oleifera* αύξησε σημαντικά τον αριθμό RBC και WBC, όπως και άλλες αιματολογικές παραμέτρους, πριν και μετά την υποβολή των ψαριών σε ασιτία, εξηγώντας ότι το συγκεκριμένο φαρμακευτικό φυτό ενίσχυσε την υγεία των ψαριών (Elabd et al., 2019).

4.3.2. Κορτιζόλη

Στην εντατική εκτροφή ιχθύων, η ασιτία θεωρείται μία ορθή διαχειριστική πρακτική πριν τη μεταφορά και εξαλίευση των ψαριών. Ωστόσο, η στέρηση τροφής αποτελεί στρεσογόνο παράγοντα που μπορεί να προκαλέσει φυσιολογικές αλλαγές όπως η αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης (Jia et al., 2018). Η κορτιζόλη μετά από μία περίοδο ασιτίας μπορεί να αυξηθεί (Jia et al., 2018), να παραμείνει σταθερή (Davis & Gaylord, 2011) ή να μειωθεί (Small, 2005). Επιπλέον, η απόκριση της κορτιζόλης μπορεί να καταστέλλεται σε ψάρια υπό συνθήκες ασιτίας, καθώς η στέρηση τροφής αναστέλλει τον μηχανισμό έκκρισης (Poursaeid & Falahatkar, 2022).

Η μείωση της κορτιζόλης στις περισσότερες ομάδες που διατρέφονταν με τα πειραματικά σιτηρέσια, υποδεικνύουν την ικανότητα των εξεταζόμενων φυτοφαρμακευτικών να μειώνουν το stress (παράγοντες anti-stress) μετά την υποβολή των ψαριών σε ασιτία δύο εβδομάδων. Μεταξύ των δύο χορηγούμενων δόσεων η προσθήκη ελαίου κάνναβης και αιθέριου ελαίου κανέλας σε ποσοστό 1% της τροφής αποδείχτηκε πιο αποτελεσματική από την προσθήκη σε ποσοστό 2% της τροφής. Προηγούμενες μελέτες σχετικά με την προσθήκη φυτογενών πρόσθετων στη διατροφή εκτρεφόμενων ψαριών έδειξαν μείωση του επιπέδου κορτιζόλης στην τιλάπια (*O. niloticus*) μετά από περίοδο ασιτίας και τροφοληψία με το είδος *Moringa oleifera* (Elabd et al., 2019). Η μείωση της κορτιζόλης στην παρούσα μελέτη πιθανώς να οφείλεται στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του είδους *C. sativa* (Farinon et al., 2020), *O. vulgare* (Mohammadi et al., 2020) και *C. zeylanicum* (Abdel-Tawwab et al., 2018).

Η κορτιζόλη είναι η κύρια κορτικοστεροειδής ορμόνη που εμπλέκεται στην απόκριση του stress στις εντατικές συνθήκες ιχθυοκαλλιέργειας και έχει σημαντικό ρόλο στην κινητοποίηση της ενέργειας (Faught & Vijayan, 2016). Η δραστηριότητα των κύριων αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η υπεροξειδική δισμουτάση επηρεάζεται από τα γλυκοκορτικοειδή, όπως η κορτιζόλη (Goncharova et al., 2006). Η μείωση της κορτιζόλης μπορεί να οφείλεται σε παρεμπόδιση της μετάδοσης των αισθητηριακών πληροφοριών στον υποθάλαμο (Iversen et al., 2003) ή στη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης, την κύρια πρόδρομη ουσία της κορτιζόλης, στα ψάρια που υποβλήθηκαν σε ασιτία. Η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης στη διατροφή έχει αποδειχτεί ότι μειώνει τα επίπεδα χοληστερόλης στο λαβράκι (Dinardo et al., 2020, 2021; Ghafarifarsani et al., 2021), ενώ η ρίγανη σε μείγμα με άλλα φυτογενή πρόσθετα έχει αποδειχτεί ότι μειώνει την χοληστερόλη στον κυπρίνο (Ghafarifarsani et al., 2021). Αυτή η μείωση μπορεί να οφείλεται στην καταστολή του 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA) το οποίο είναι ένα ρυθμιστικό ένζυμο για τη de novo βιοσύνθεση της χοληστερόλης (Lee et al., 2004). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί με την προσθήκη *C. zeylanicum* και *C. sativa* στο σιτηρέσιο της τιλάπιας (*O. niloticus*) και του κυπρίνου αντίστοιχα (Audu et al., 2015; Hamed et al., 2022) αποδεικνύοντας την ευεργετική δράση τους στη μείωση της χοληστερόλης. Η μείωση της χοληστερόλης μετά της χορήγησης κανέλας μπορεί να εξηγηθεί από την ενίσχυση της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων στην παρεμπόδιση του ενζύμου HMG-CoA reductase και στην αποφυγή της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων (Lee et al., 2003). Η ευεργετική δράση του ελαίου από σπόρους κάνναβης στην μείωση της υπερχοληστερολαιμίας έχει μελετηθεί και μπορεί να οφείλεται στην β-σιτοστερόλη, μία φυτοστερόλη η οποία εμποδίζει την απορρόφηση χοληστερόλης μέσω κρυσταλλοποίησης και συγκαταβύθισης (Mattson & Crouse, 1982).

4.3.3. Βλάβη του DNA

Παρά το γεγονός ότι η ασιτία για μεγάλο χρονικό διάστημα αποτελεί μία συχνή φυσική διαδικασία για πολλά είδη ψαριών στο φυσικό περιβάλλον, έχει μελετηθεί ότι η στέρηση τροφής μπορεί να οδηγήσει σε δυσμενείς επιπτώσεις, οι οποίες αποδίδονται κυρίως στην αύξηση των ROS που οδηγούν σε οξειδωτικό stress (Morales et al., 2004). Οι ROS μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στα ζωντανά κύτταρα (Bowden, 2008), στο DNA, στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια (Martínez-Álvarez et al., 2005) οδηγώντας, τελικά, σε κυτταρικό θάνατο (Regoli & Giuliani, 2014). Είναι γνωστό ότι η παραγωγή των ROS προκαλεί βλάβη στο DNA της πρώτης εβδομάδες ασιτίας, ενώ οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί δρουν τις επόμενες εβδομάδες (Robinson et al., 1997). Επίσης, εναλλασσόμενες περίοδοι στέρησης τροφής και επανασίτισης αποτελούν μία οικονομική μέθοδο που οδηγεί σε καλύτερη ανάπτυξη και αξιοποίηση της τροφής (Gaylord & Gatlin, 2001). Στην παρούσα μελέτη, επιβεβαιώθηκε η αρνητική επίδραση της ασιτίας ως χρόνιου στρεσογόνου παράγοντα ανάμεσα στις ομάδες ελέγχου που διατρέφονταν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και τις αντίστοιχες ομάδες ασιτίας. Ο προσδιορισμός της βλάβης του DNA κατά την στέρηση τροφής στην τσιπούρα έχει μελετηθεί σε προηγούμενες έρευνες μετά από περίοδο 7, 14 και 21 ημερών (Malandrakis et al., 2016).

Η γενοπροστατευτική δράση των φυτοφαρμακευτικών που χρησιμοποιήθηκαν αποδείχτηκε στις περισσότερες ομάδες που υποβλήθηκαν σε ασιτία, καθώς η βλάβη του DNA στα κύτταρα του ήπατος ήταν σημαντικά μικρότερη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, αξιοσημείωτο είναι ότι η γενοτοξικότητα στα ηπατοκύτταρα της ομάδας ελέγχου που σιτίζονταν καθ' όλη τη διάρκεια ήταν παρόμοια με αυτήν των διατροφικών ομάδων που σιτίζονταν με τα φυτογενή πρόσθετα. Αυτό υποδεικνύει ότι η γενοπροστατευτική δράση των φυτογενών πρόσθετων ήταν πιο δραστική κατά την πρόκληση ασιτίας.

Η ομάδα που σιτίζονταν με αιθέριο έλαιο ρίγανης σε ποσοστό 1% είχε σημαντικά υψηλότερη γενοπροστατευτική δράση σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες. Η γενοπροστατευτική δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης επιβεβαιώνεται από προηγούμενες μελέτες (Arami et al., 2013; Habibi et al., 2015; Khafaga et al., 2020). Μεταξύ των ομάδων που σιτίζονταν καθ' όλη τη διάρκεια και των ομάδων που υποβλήθηκαν σε ασιτία της ίδιας διατροφικής ομάδας δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές υποδεικνύοντας την προστατευτική δράση των φαρμακευτικών φυτών σε περίοδο στέρησης τροφής.

Η χαμηλότερη δόση (1%) αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική, καθώς παρουσίασε χαμηλότερη τιμή στη βλάβη του DNA σε σύγκριση με την υψηλή δόση (2%). Αυτό έχει αποδειχτεί και σε προηγούμενη μελέτη στον κυπρίνο όπου η βλάβη του DNA ήταν ανάλογη της χορηγούμενης δόσης αιθέριου ελαίου ρίγανης (Khafaga et al., 2020).

Αντίθετα, η γενοπροστατευτική δράση των φυτογενών πρόσθετων σε περίοδο ασιτίας δεν επιβεβαιώθηκε στην περίπτωση των ερυθροκυττάρων, όπου η βλάβη του DNA ήταν παρόμοια σε όλες της ομάδας ασιτίας. Η βλάβη του DNA στα ερυθροκύτταρα συχνά αξιολογείται με τη μέθοδο του κομήτη (Belpaeme et al., 1996, 1998; Mitchelmore & Chipman, 1998; Sumathi et al., 2001), λόγω της ευκολίας συλλογής και επεξεργασίας του ιστού. Ωστόσο, στα ψάρια οι ROS παράγονται κατά τη διάρκεια της ασιτίας και βιοσυσσωρεύονται στο ήπαρ (Pascual et al., 2003), γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με τη διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ιστών. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της ασιτίας, τα θρεπτικά συστατικά αποθηκεύονται στο ήπαρ για τη διατήρηση της ομοιόστασης (Davis & Gaylord, 2011), ενώ έχουν αναφερθεί δομικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης του μεγέθους των ηπατοκυττάρων και των λιπιδικών κενών που επηρεάζουν τη μεταβολική δραστηριότητα (Li et al., 2018). Από την άλλη πλευρά, έχει αναφερθεί αύξηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων που αποδίδεται στις αλλαγές στην περιεκτικότητα σε νερό σε ολόκληρο το σώμα κατά τη διάρκεια της ασιτίας (McCue, 2010). Επομένως, οι διαφορετικές αντιδράσεις γενοτοξικότητας μπορεί να σχετίζονται με τις διαφορετικές επιδράσεις της ασιτίας στους ιστούς-στόχους. Επίσης, αυτές οι διαφορές μεταξύ ηπατοκυττάρων και ερυθροκυττάρων μπορεί να σχετίζονται με διαφορές στη θραύση της μονής αλυσίδας του DNA μεταξύ των δύο τύπων κυττάρων, καθώς εμπλέκονται ο μηχανισμός επιδιόρθωσης και η μεταβολική δραστηριότητα (Lee & Steinert, 2003).

4.4. ΠΕΙΡΑΜΑ 4 - Επίδραση χρόνιας καταπόνησης στην τσιπούρα, προκληθείσας λόγω υψηλής πυκνότητας εκτροφής, μετά από χορήγηση σιτηρεσίων εμπλουτισμένα με φαρμακευτικά φυτά

4.4.1. Αιματολογικές παράμετροι

Στην παρούσα μελέτη η αύξηση της ιχθυοπυκνότητας δεν επηρέασε σημαντικά το αιματολογικό προφίλ των ψαριών στις ομάδες ελέγχου. Ομοίως, σε μελέτη σε άτομα τσιπούρας 150-190gr η εξεταζόμενη ιχθυοπυκνότητα στα 22Kg/m³ δεν επηρέασε τις αιματολογικές παραμέτρους (Tort et al., 1996). Ωστόσο, το χρόνιο stress, όπως η αυξημένη ιχθυοπυκνότητα (Shourbela et al., 2021), μπορεί να προκαλέσει μείωση του αριθμού των WBC ως ένδειξη εξασθενημένης άμυνας του οργανισμού (Fazio et al., 2013). Στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ενώ παρατηρήθηκε μία τάση μείωσης των WBC στις ομάδες σε υψηλή ιχθυοπυκνότητα δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές με την ομάδα ελέγχου σε χαμηλή ιχθυοπυκνότητα. Πιθανότατα, το αιθέριο έλαιο ρίγανης, κανέλας και το έλαιο από σπόρους κάνναβης να μπόρεσαν να μετριάσουν τη μείωση των WBC στο αίμα της τσιπούρας μετά από υποβολή των ψαριών σε αυξημένη ιχθυοπυκνότητα για δύο μήνες. Μελέτες σχετικά με την επίδραση διάφορων φυτών και των βιοενεργών συστατικών τους στα ψάρια έχει δείξει την ικανότητα τους στη διατήρηση και/ή αύξηση του αριθμού των WBC (Hoseini et al., 2018).

Σε παρόμοια μελέτη, παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές RBC και WBC στο αίμα της τιλάπιας (*O. niloticus*) στη χαμηλή και μεσαία εξεταζόμενη ιχθυοπυκνότητα σε σχέση με την υψηλή και υψηλότερες τιμές στις ομάδες που είχαν διατραφεί με αιθέριο έλαιο ρίγανης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Shourbela et al., 2021). Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα ερευνών που δείχνουν την ικανότητα του αιθέριου ελαίου ρίγανης να βελτιώνει τις αιματολογικές παραμέτρους (Mohammadi et al., 2020) φαίνεται ότι αυτά τα ψάρια είναι πιο υγιή, με ισχυρότερο ανοσοποιητικό σύστημα και είναι απαλλαγμένα από χαρακτηριστικά αναμίας (Shourbela et al., 2021).

4.4.2. Κορτιζόλη

Η υψηλή πυκνότητα εκτροφής είναι μία κοινή πρακτική στις υδατοκαλλιέργειες, η οποία μπορεί να επηρεάσει τη φυσιολογία και συνεπώς την ευζωία των ψαριών (Costas et al., 2013; Gonçalves et al., 2019). Η διατήρηση των ψαριών σε υψηλή ιχθυοπυκνότητα προκαλεί χρόνιο stress στα ψάρια (Barcellos et al., 1999) και αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης (Wendelaar Bonga, 1997).

Η προσθήκη φυτογενών πρόσθετων στη διατροφή της τσιπούρας σε υψηλές δόσεις έδειξε μία τάση μείωσης ή μετριασμού των επιπέδων κορτιζόλης και στις δύο εξεταζόμενες πυκνότητες εκτροφής, καθώς παρουσιάστηκαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές σε σύγκριση με τις χαμηλές δόσεις. Είναι ήδη γνωστό ότι η υψηλή πυκνότητα εκτροφής αυξάνει τα επίπεδα κορτιζόλης (Abreu et al., 2009). Στην παρούσα μελέτη, οι υψηλές δόσεις όλων των φυτογενών πρόσθετων που εφαρμόστηκαν αποδείχθηκε ότι μείωσαν την έκκριση κορτιζόλης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου σε συνθήκες υψηλής πυκνότητας εκτροφής. Πολλά φαρμακευτικά φυτά έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητά τους στη μείωση των επιπέδων κορτιζόλης στο πλάσμα μετά από έκθεση σε υψηλές πυκνότητες εκτροφής (Fazelan et al., 2020; Yousefi et al., 2019). Ο προστατευτικός ρόλος της κανέλας υπό χρόνιους περιβαλλοντικούς παράγοντες stress διερευνήθηκε επίσης στην τιλάπια (*O. niloticus*), δείχνοντας την επίδρασή της στον μετριασμό των επιπέδων κορτιζόλης (Hamed et al., 2022). Η ικανότητα των αιθέριων ελαίων να εμποδίζουν ή να μετριάσουν την απόκριση κορτιζόλης στα ψάρια σε υψηλές ιχθυοπυκνότητες έχει μελετηθεί και στην περίπτωση του είδους *Lippia alba* στην διατροφή του είδους *Rhamdia quelen*, και του είδους *Myrcia sylvatica* στη διατροφή της τσιπούρας (Saccol et al., 2018; de F. Souza et al., 2015). Επιπλέον, έχει αναφερθεί η ευεργετική δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης ως διατροφικού πρόσθετου σε διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής στην τιλάπια (*O. niloticus*) (El-Hawarry et al., 2018; Shourbela et al., 2021) και σε διαφορετικούς χρόνιους περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες (Dinardo et al., 2021; Rafieepour et al., 2019, 2020). Στη χαμηλή ιχθυοπυκνότητα παρουσιάστηκε σημαντικά υψηλότερο επίπεδο κορτιζόλης στις ομάδες CAN1%, OR1% και CIN1% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η έκκριση κορτιζόλης επηρεάζεται από τα διαιτητικά έλαια, καθώς μπορεί να αυξηθεί μετά από τον συνωστισμό της τσιπούρας

(Ganga, 2011; Pérez-Sánchez et al., 2013). Ωστόσο, η επίδραση των αιθέριων ελαίων στην έκκριση κορτιζόλης και ο ακριβής μηχανισμός παραμένει άγνωστος (Saccol et al., 2018a). Τα είδη ψαριών, αλλά και παράγοντες όπως ο τύπος, η ένταση και η διάρκεια του στρεσογόνου παράγοντα μπορούν να επηρεάσουν την απόκριση στο stress (Barton, 2002), η οποία αντιμετωπίζεται μέσω διαφορετικών μονοπατιών στην τσιπούρα (Martos-Sitcha et al., 2014).

4.4.3. Βλάβη του DNA

Στην παρούσα μελέτη, παρά το γεγονός ότι η πυκνότητα που εφαρμόστηκε δεν ήταν τόσο υψηλή όσο αυτή που εφαρμόζεται στις ιχθυοκαλλιέργειες, οι παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των δύο εφαρμοζόμενων πυκνοτήτων παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες, υπογραμμίζοντας ότι οι συνθήκες που συναντώνται σε μεγάλου μεγέθους μονάδες εκτροφόμενων ψαριών δεν μπορούν να αναπαραχθούν πλήρως σε εργαστηριακές συνθήκες. Ο γενοπροστατευτικός ρόλος των φυτογενών πρόσθετων αποδείχθηκε πιο ξεκάθαρος στις συνθήκες υψηλής πυκνότητας σε σύγκριση με τις χαμηλότερες, τόσο στα ηπατοκύτταρα όσο και στα ερυθροκύτταρα, καθώς οι τιμές της βλάβης στο DNA ήταν σημαντικά μικρότερες στις ομάδες HFD σε σύγκριση με τις ομάδες LFD. Έχει αποδειχτεί ότι η υψηλή πυκνότητα εκτροφής προκαλεί χρόνιο stress στα ψάρια (Ni et al., 2014) αυξάνοντας την παραγωγή ROS, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια (Morel & Barouki, 1999). Η υψηλή πυκνότητα εκτροφής σε συνθήκες εκτροφής μεταβάλλει την αντιοξειδωτική κατάσταση στα υδρόβια ζώα προκαλώντας συνθήκες οξειδωτικού stress (Campa-Córdova et al., 2022; Dorothy et al., 2021). Τα φυτογενή πρόσθετα είναι κοινώς αποδεκτά ως αντιοξειδωτικά που μπορούν να ενεργοποιήσουν το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα επηρεάζοντας τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων σε υψηλή ιχθυοπυκνότητα. Ο γενοπροστατευτικός ρόλος των φυτογενών πρόσθετων σε συνθήκες υψηλής πυκνότητας επιβεβαιώθηκε στην περίπτωση των ομάδων OR1% και CAN1% στα ηπατοκύτταρα, ενώ το ίδιο μοτίβο δεν ήταν εμφανές στην περίπτωση των ερυθροκυττάρων. Οι χαμηλότερες δόσεις αποδείχθηκαν επαρκείς τόσο στα ηπατοκύτταρα όσο και στα ερυθροκύτταρα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ομάδες CAN2%, OR2% και CIN1% αύξησαν τη γενοτοξικότητα που προκλήθηκε στα ηπατοκύτταρα, ενώ και οι δύο ομάδες της κάνναβης αύξησαν τη γενοτοξικότητα που προκλήθηκε στα ερυθροκύτταρα. Όσον αφορά στη γενοτοξικότητα, δεν υπάρχει ένα σαφές μοτίβο, καθώς οι αντιοξειδωτικές παράμετροι που σχετίζονται με την υψηλή πυκνότητα εκτροφής μπορεί να αυξάνονται ή να αναστέλλονται, υποδεικνύοντας είτε ότι το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα μπορεί να ενεργοποιείται για να αντιμετωπίσει τη δυσμενή κατάσταση (Choi et al., 2019; Dorothy et al., 2021) είτε ότι μπορεί να καταστείλει τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Οι διαφορές στη γενοτοξικότητα που

προκαλείται μεταξύ των εξεταζόμενων ιστών συζητήθηκαν παραπάνω και μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στους μηχανισμούς βλάβης και επιδιόρθωσης του DNA (Lee & Steinert, 2003). Επιπλέον, όσον αφορά τα ηπατοκύτταρα, η υψηλή πυκνότητα εκτροφής στα ψάρια αυξάνει τη μηλονδιαλδεΐδη ως τελικό παράγωγο της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (Jia et al., 2016; Wang et al., 2019). Ο γενοπροστατευτικός ρόλος ορισμένων φυτογενών πρόσθετων αναστέλλει τις λειτουργικές ανωμαλίες του ήπατος και την υπεροξειδωσής των λιπιδίων που προκαλείται από την ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων (Yin et al., 2011). Η υπεροξειδωσής των λιπιδίων και τα προϊόντα της ενεργοποιούν τη νέκρωση των κυττάρων μέσω της αποπτωτικής οδού Fas-ligand, η οποία είναι σημαντική για την ομοιοστάση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Koek et al., 2011), ενώ αυτός ο τρόπος θανάτωσης των κυττάρων σχετίζεται με παράγοντες που βλάπτουν το DNA και προκαλούν βλάβες που ρυθμίζουν τον υποδοχέα Fas. Επιπλέον, έχει επιβεβαιωθεί ότι η υψηλή πυκνότητα εκτροφής ως στρεσογόνο παράγοντας προκαλεί αλλαγές στον μεταβολισμό των αμινοξέων, των υδατανθράκων και των τριγλυκεριδίων και ανώμαλο μεταβολισμό των λιπιδίων στο σκώτι των ψαριών (Dong et al., 2022; Oyarzún et al., 2020). Η υψηλή αξιοποίηση των λιπιδίων από τον οργανισμό για την αντιμετώπιση του stress μπορεί να μειώσει την περιεκτικότητα σε λιπίδια στο ήπαρ της τσιπούρας σε συνθήκες υψηλής πυκνότητας εκτροφής (Montero et al., 2001), ενώ η multi-omics ανάλυση έχει αποκαλύψει ανώμαλο μεταβολισμό λιπιδίων στα ψάρια (He et al., 2021; Liu et al., 2019).

4.5. ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΤΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΚΑΙ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΥΖΩΙΑΣ

Προϋποθέσεις και κριτήρια ευζωίας κατά την παραγωγική διαδικασία της τσιπούρας (Sparus aurata L.)

Στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας, διαχειριστικές πρακτικές και εργασίες επηρεάζουν την ευζωία των ψαριών και οι υπεύθυνοι και εργαζόμενοι στη μονάδα παραγωγής πρέπει να μεριμνούν καθημερινά για τη διασφάλιση της καλής διαβίωσης των ψαριών. Ο τομέας της ευζωίας κερδίζει το ερευνητικό ενδιαφέρον ολοένα και περισσότερο με αποτελέσματα οι γνώσεις μας για το πως να βελτιώσουμε τη ζωή των ψαριών καθ' όλη την παραγωγική διαδικασία συνεχώς εμπλουτίζονται.

4.5.1. Τεχνικές διαχείρισης

4.5.1.1. Ποιότητα νερού

Η ποιότητα του νερού εκτροφής αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα ευζωίας. Κάθε είδος έχει τα δικά του όρια ανοχής και οι απότομες αλλαγές ακόμα και εντός αυτού του εύρους καλό να αποφεύγονται. Στις χερσαίες εγκαταστάσεις και στους κλωβούς στη θάλασσα, θα πρέπει να υπάρχει ένα σχέδιο έκτακτης ανάγκης επαναφοράς των σωστών παραμέτρων ποιότητας νερού όταν αυτές αποκλίνουν από

τις τιμές αναφοράς και η θερμοκρασία θα πρέπει να ελέγχεται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Όσον αφορά το ρυθμό ροής του νερού, στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς, η ταχύτητα ανακύκλωσης πρέπει να είναι ανάλογη της ιχθυοπυκνότητας της δεξαμενής (όσο μεγαλύτερη η ταχύτητα ροής τόσο μεγαλύτερο αριθμό μπορεί να φιλοξενήσει η δεξαμενή) και η ταχύτητα και κατεύθυνση ροής πρέπει να ρυθμίζεται, έτσι ώστε όλος ο όγκος νερού να ανακυκλώνεται τακτικά αποφεύγοντας τη δημιουργία νεκρών ζωνών με μειωμένη περιεκτικότητα σε οξυγόνο και/ή αυξημένα επίπεδα αμμωνίας.

Κριτήρια/προϋποθέσεις ευζωίας που αφορούν την ποιότητα νερού στις χερσαίες εγκαταστάσεις και στους θαλάσσιους κλωβούς:

- Σχέδιο έκτακτης ανάγκης επαναφοράς των σωστών παραμέτρων ποιότητας νερού όταν αυτές αποκλίνουν από τις τιμές αναφοράς
- Θερμοκρασία εντός του εύρους για κάθε στάδιο ανάπτυξης
- Ταχύτητα ανακύκλωσης του νερού ανάλογη της ιχθυοπυκνότητας της δεξαμενής στις χερσαίες εγκαταστάσεις
- Ταχύτητα και κατεύθυνση ροής ρυθμισμένη έτσι ώστε όλος ο όγκος νερού να ανακυκλώνεται τακτικά αποφεύγοντας τη δημιουργία “νεκρών” ζωνών στις δεξαμενές .

4.5.1.2. Περιβάλλον εκτροφής

Η διαμόρφωση του περιβάλλοντος εκτροφής και η τήρηση κάποιων σημαντικών κριτηρίων μπορούν να έχουν θετική επίδραση στην καλή διαβίωση των εκτρεφόμενων ιχθύων. Οι μονάδες παραγωγής πρέπει να είναι διαμορφωμένες έτσι ώστε να μην υπάρχουν αιχμηρές προεξοχές στις οποίες μπορεί να τραυματιστούν οι προνύμφες και τα νεαρά ιχθύδια στις δεξαμενές αλλά και τα ψάρια στις μονάδες πάχυνσης (δέρμα, πτερύγια κτλ). Επίσης, οι δεξαμενές, τα δίχτυα και γενικά ο εξοπλισμός πρέπει να ελέγχονται τακτικά για τυχόν βλάβες (πχ. τρύπες). Ένας εύκολος και αποτελεσματικός τρόπος απομάκρυνσης των ακαθαρσιών στις δεξαμενές θα οδηγούσε στην αποφυγή ενόχλησης των ψαριών. Γενικά, οι δεξαμενές και οι κλωβοί είναι καλό να είναι τοποθετημένα όσο γίνεται μακριά από θόρυβο. Ο θόρυβος από τα μηχανήματα (πχ. αντλίες) αλλά και θόρυβος που μπορεί να προκληθεί από τους ανθρώπους (επισκέπτες και μη) μπορεί να προκαλέσει, επίσης, ενόχληση στα ψάρια. Ο σχεδιασμός και η τοποθέτηση των κλωβών πρέπει να επιτρέπει την επιθεώρηση των ψαριών και του εξοπλισμού από δύτες, κάμερες κτλ. Οι κλωβοί πρέπει να έχουν επαρκές βάθος ώστε να προστατεύονται τα ζώα από την υπεριώδη ακτινοβολία ή να παρέχεται σκίαση, εφόσον κρίνεται σκόπιμο. Επιπλέον, στις χερσαίες εγκαταστάσεις είναι σημαντικό να υπάρχουν λειτουργικές εφεδρικές γεννήτριες σε περίπτωση διακοπής ρεύματος. Οι γεννήτριες πρέπει να ελέγχονται και να συντηρούνται εβδομαδιαίως. Στο περιβάλλον εκτροφής, η βέλτιστη φωτοπερίοδος συμβάλλει στην διατήρηση της ευζωίας των ψαριών. Στις δεξαμενές μπορεί να

υπάρχει πρόσθετος φωτισμός είτε σταθερός είτε φορητός, αλλά να χρησιμοποιείται μόνο για τυχόν εξέταση των ζώων και του εξοπλισμού όταν είναι απαραίτητο. Ο καθορισμός της βέλτιστης έντασης, ποιότητας (φάσμα) και φωτοπεριόδου γίνεται χρησιμοποιώντας την πρακτική εμπειρία, την έρευνα και τη συμβουλή ειδικού σε θέματα ευζωίας. Στις χερσαίες εγκαταστάσεις οι χημικές ουσίες και σχετικός εξοπλισμός πρέπει να διατηρούνται σε ασφαλή τοποθεσία, χωρίς να υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης του νερού ή τυχαία πρόσβαση σε αυτά από οργανισμούς που δεν αποτελούν στόχο. Κριτήρια/προϋποθέσεις ευζωίας που αφορούν το περιβάλλον εκτροφής στις χερσαίες εγκαταστάσεις και στους θαλάσσιους κλωβούς:

- Μη ύπαρξη αιχμηρών προεξοχών στις οποίες μπορεί να τραυματιστούν τα ψάρια (σε όλη την παραγωγική διαδικασία)
- Έλεγχος εξοπλισμού και συντήρηση ανά τακτά χρονικά διαστήματα
- Εύκολος και αποτελεσματικός τρόπος απομάκρυνσης των ακαθαρσιών στις δεξαμενές
- Δεξαμενές και κλωβοί τοποθετημένα όσο γίνεται μακριά από θόρυβο
- Σχεδιασμός και τοποθέτηση των κλωβών σε θέση που να επιτρέπει την επιθεώρηση των ψαριών και του εξοπλισμού (δύτες, κάμερες κτλ.)
- Επαρκές βάθος στους κλωβούς ώστε να προστατεύονται τα ζώα από την υπερϊώδη ακτινοβολία ή να παρέχεται σκίαση, εφόσον κρίνεται σκόπιμο
- Λειτουργικές εφεδρικές γεννήτριες σε περίπτωση διακοπής ρεύματος στις χερσαίες εγκαταστάσεις. Οι γεννήτριες πρέπει να ελέγχονται και να συντηρούνται εβδομαδιαίως
- Καθορισμός βέλτιστης έντασης, ποιότητας (φάσμα) και φωτοπεριόδου χρησιμοποιώντας την πρακτική εμπειρία, την έρευνα και τη συμβουλή ειδικού σε θέματα ευζωίας
- Πρόσθετος φωτισμός στις χερσαίες εγκαταστάσεις, είτε σταθερός είτε φορητός διαθέσιμος, για τυχόν εξέταση των ζώων και του εξοπλισμού
- Διατήρηση χημικών ουσιών και σχετικού εξοπλισμού σε ασφαλή τοποθεσία μακριά από τις δεξαμενές

4.5.1.3. Ιχθυοπυκνότητα

Η ιχθυοπυκνότητα αποτελεί έναν σύνθετο παράγοντα εκτροφής, καθώς περιλαμβάνει πολλές αλληλένδετους παραμέτρους, όπως την ποιότητα νερού, τις κοινωνικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων και την διαθεσιμότητα της τροφής και κατ' επέκταση την ανάπτυξη. Η ιδανική πυκνότητα εκτροφής είναι διαφορετική για κάθε είδος και εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης αλλά και από τεχνικές παραμέτρους όπως η ταχύτητα ανακύκλωσης του νερού. Στις δεξαμενές και στους κλωβούς το μέσο βάρος και η συνολική βιομάζα πρέπει να παρακολουθούνται εβδομαδιαία. Η πυκνότητα εκτροφής πρέπει να παρακολουθείται σε σχέση με τους δείκτες υγείας και συμπεριφοράς των ψαριών. Είναι σημαντικό να γίνεται να

καθημερινός έλεγχος των θνησιμοτήτων και άμεση απομάκρυνση των νεκρών ψαριών. Επίσης, πρέπει να διατηρείται αρχείο και αν οι θνησιμότητες υπερβαίνουν ένα κρίσιμο όριο να γίνεται αποστολή δειγμάτων από τον κτηνίατρο προς εξέταση.

Κριτήρια/προϋποθέσεις ευζωίας που αφορούν την πυκνότητα εκτροφής στις χερσαίες εγκαταστάσεις και στους θαλάσσιους κλωβούς:

- Τακτικές δειγματοληψίες μέτρησης βάρους για τη διόρθωση βιομάζας
- Διατήρηση αρχείου για τον αριθμό των ψαριών, το μέσο βάρος και τη συνολική βιομάζα οι οποίες πρέπει να παρακολουθούνται εβδομαδιαίως
- Παρακολούθηση της πυκνότητας εκτροφής σε σχέση με τους δείκτες υγείας και συμπεριφοράς των ψαριών
- Καθημερινός έλεγχος θνησιμοτήτων. Απομάκρυνση νεκρών ψαριών. (Σχετικά έγγραφα που αφορούν τις θνησιμότητες και τα αίτια πρέπει να είναι πάντα διαθέσιμα)
- Αποστολή δειγμάτων για ανάλυση από τον κτηνίατρο όταν οι ανεξήγητες θνησιμότητες υπερβαίνουν ένα κρίσιμο όριο

4.5.2. Τροφοληψία

Η διατροφή των ιχθύων και ειδικότερα η ποιοτική σύσταση και η διαχείριση της παροχής τροφής αποτελούν σημαντικούς παράγοντες ευζωίας για τα εκτρεφόμενα ψάρια. Η σύνθεση της τροφής πρέπει να καλύπτει όλες τις διατροφικές ανάγκες του ψαριού. Στο σιτηρέσιο των ψαριών μπορούν να προστεθούν πρόσθετα διατροφής (π.χ. φυτοφαρμακευτικά) με ποικίλες ευεργετικές ιδιότητες, σε ποσότητες βασισμένες στα αποτελέσματα ερευνών. Η διαχείριση της παροχής τροφής, δηλαδή η ποσότητα και συχνότητα ταΐσματος παίζουν, επίσης, πολύ σημαντικό ρόλο στη καλή διαβίωση των ιχθύων. Η μη επαρκής ποσότητα τροφής μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη επιθετικότητα μεταξύ των ατόμων, ενώ η μη ορθή χωρική κατανομή μπορεί να οδηγήσει σε υπερσιτισμό/ υποσιτισμό. Η συχνότητα ταΐσματος πρέπει να βασίζεται σε διάφορους παράγοντες όπως η συμπεριφορά σίτισης του συγκεκριμένου είδους και ο ρυθμός πέψης. Τυχόν προσαρμογές θα πρέπει να βασίζονται στη συμπεριφορά, στην όρεξη, στην αναμενόμενη βιομάζα και στην ελαχιστοποίηση της απώλειας και σπατάλης τροφής. Καθώς η όρεξη για θρέψη επηρεάζεται έντονα από τον κορεσμό σε οξυγόνο, τη θερμοκρασία και την ιχθυοπυκνότητα, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη σημασία σε αυτούς τους παράγοντες με σκοπό την σωστή και αποτελεσματικότερη παροχή της τροφής. Τέλος, κρίνεται απαραίτητο η μονάδα παραγωγής να εφαρμόζει κατάλληλο σύστημα εφοδιασμού (logistics) που θα περιλαμβάνει την αποθήκευση, μεταφορά, διανομή, ιχνηλασιμότητα, καθώς και σχέδιο έκτακτης ανάγκης.

Κριτήρια/προϋποθέσεις ευζωίας που αφορούν την τροφοληψία στις χερσαίες εγκαταστάσεις και στους θαλάσσιους κλωβούς:

- Κατάλληλο σύστημα εφοδιασμού (logistics) (αποθήκευση, μεταφορά, διανομή, ιχνηλασιμότητα, σχέδιο έκτακτης ανάγκης)

- Κατάλληλο καθεστώς διατροφής (ποσότητα και συχνότητα σίτισης) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, την εμπειρία του προσωπικού και τη συμπεριφορά σίτισης των ψαριών
- Παρακολούθηση κορεσμού οξυγόνου, θερμοκρασίας και δεδομένων ιχθυοπυκνότητας με σκοπό την αποτελεσματικότερη παροχή τροφής
- Ορθή χωρική κατανομή σε όλη την επιφάνεια έτσι ώστε να αποφεύγεται ο υπερσιτισμός/ υποσιτισμός και ο ανταγωνισμός για τροφή
- Παρατήρηση και καταγραφή της όρεξης για θρέψη και διατροφικής συμπεριφοράς των ψαριών τουλάχιστον μία φορά την ημέρα
- Προσθήκη πρόσθετων διατροφής (π.χ.φυτοφαρμακευτικά) με βάση τα ερευνητικά αποτελέσματα για την τσιπούρα

4.5.3. Διαχειριστικές πρακτικές

4.5.3.1. Handling

Οι χειρισμοί σε μία μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας είναι αναπόφευκτοι στρεσογόνοι παράγοντες και πρέπει να εφαρμόζονται μόνο όταν είναι απολύτως απαραίτητο. Η ευαισθησία των ψαριών κατά τους χειρισμούς εξαρτάται ιδιαίτερα από τη θερμοκρασία. Σε ακραίες θερμοκρασίες τα ψάρια είναι πιο ευαίσθητα και οι χειρισμοί θα πρέπει να αποφεύγονται. Στις μονάδες παραγωγής θα πρέπει να εφαρμόζεται ο γενικός κανόνας ότι τα ψάρια πρέπει να προστατεύονται ανά πάσα στιγμή από τραυματισμούς, πόνο και stress. Η εκτέλεση εργασιών καθαρισμού και συντήρησης (π.χ. βάψιμο δεξαμενών, συντήρηση διχτύων στους πλωτούς κλωβούς) πρέπει να γίνεται με την ελάχιστη δυνατή επίδραση στην υγεία και ευζωία των ιχθύων. Μετά τις εργασίες/πρακτικές είναι σημαντική η ατομική παρατήρηση των ψαριών για τυχόν μη φυσιολογικές συμπεριφορές, όπως μείωση ή απώλεια της όρεξης για θρέψη, μη φυσιολογική κολυμβητική συμπεριφορά, τραυματισμούς ή ύπαρξη λεπιών/αίματος στο νερό, αυξημένος ρυθμός αναπνοής). Η αφαίρεση των ψαριών από το νερό αποτελεί μία εξαιρετικά στρεσογόνα κατάσταση και ως μέγιστος χρόνος εκτός νερού (χωρίς αναισθησία) ορίζονται τα 15 δευτερόλεπτα. Κατά τις εργασίες/πρακτικές πρέπει να ελέγχεται ο κορεσμός οξυγόνου και όπου κρίνεται απαραίτητο να δίνεται παροχή αέρα και οξυγόνου. Επίσης, είναι πολύ σημαντική η επαρκής στήριξη στο σώμα κατά τον χειρισμό των ψαριών. Ένα ζωντανό ψάρι δεν θα πρέπει να κρατείται από τα βράγχια, την ουρά και/ή να είναι πεταμένο. Τέλος, μεγάλη σημασία θα πρέπει να δίνεται στον ειδικό σχεδιασμό και στη διατήρηση της καλής κατάστασης του εξοπλισμού.

Κριτήρια/προϋποθέσεις ευζωίας που αφορούν τους χειρισμούς στις χερσαίες εγκαταστάσεις και στους θαλάσσιους κλωβούς:

- Προστασία των ψαριών ανά πάσα στιγμή από τραυματισμούς, πόνο και stress
- Ατομική μακροσκοπική παρατήρηση των ψαριών για τυχόν τραυματισμούς ή ύπαρξη λεπιών/ αίματος στο νερό. Σε περίπτωση τραυματισμών παρακολούθηση του πληθυσμού για πιθανή εμφάνιση λοιμώξεων

- Παρατήρηση και καταγραφή συμπεριφοράς μετά από κάθε χειρισμό (πχ. μείωση ή απώλεια της όρεξης για θρέψη, κολυμβητική συμπεριφορά «πανικού», αυξημένος ρυθμός αναπνοής)
- Έλεγχος του κορεσμού του οξυγόνου κατά τις εργασίες/ πρακτικές και όποτε κρίνεται απαραίτητο, παροχή αέρα ή οξυγόνου
- Εκτέλεση εργασιών καθαρισμού και συντήρησης με την ελάχιστη δυνατή επίδραση στην υγεία και ευζωία των ιχθύων. Οι εργασίες συντήρησης στις συγκεκριμένες υποδομές θα πρέπει να γίνονται, όσο είναι αυτό δυνατό, σε περιόδους που δεν εκτρέφονται ψάρια
- Αφαίρεση των ζωντανών ψαριών από το νερό μόνο όταν είναι απολύτως απαραίτητο. (Μέγιστος χρόνος χωρίς αναισθησία < 15 δευτερόλεπτα)
- Επαρκής στήριξη στο σώμα κατά τον χειρισμό των ψαριών
- Κατάλληλο μέγεθος διχτύων που χρησιμοποιούνται κατά τους χειρισμούς (Ιδανικά χωρίς κόμπους). Διατήρηση καθαρών διχτύων, απολύμανση μετά από κάθε χρήση και αντικατάσταση όταν παρουσιάσουν φθορές. Ειδική σχεδίαση προς αποφυγή τραυματισμού των ψαριών

4.5.3.2. Μεταφορά των ζωντανών οργανισμών (Transport)

Η μεταφορά αποτελεί μία εξαιρετικά στρεσογόνα κατάσταση για τα ψάρια και περιλαμβάνει το συγχρωτισμό, τη σύλληψη, τη φόρτωση, τη μεταφορά και τέλος την εκφόρτωσή τους. Η διαδικασία της μεταφοράς πρέπει να προγραμματίζεται με τρόπο έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα δυσμενών επιπτώσεων στην ευζωία των ψαριών. Η περίοδος ασιτίας που εφαρμόζεται πριν την μεταφορά θα πρέπει να είναι τόση ώστε να επιτυγχάνεται καθαρισμός του εντέρου. Κατά τη φόρτωση και εκφόρτωση πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην προκληθούν τραυματισμοί. Η ενδεδειγμένη μέγιστη χρονική διάρκεια μεταφοράς στην ξηρά είναι οι 8 ώρες. Η βιοασφάλεια και η ευζωία των ψαριών πρέπει να λαμβάνονται υπόψη πριν από τη μεταφορά τους. Κατά η μεταφορά μπορεί να υπάρξει υποβάθμιση της ποιότητας του νερού γι' αυτό οι παράμετροι του νερού όπως οξυγόνο, επίπεδα αμμωνίας, pH και θερμοκρασία πρέπει να παρακολουθούνται καθ' όλη τη διάρκεια και να αντιστοιχούν στις παραμέτρους των δεξαμενών κατά την άφιξη. Οι υπέρμετρες και απότομες αλλαγές στη θερμοκρασία και το pH του νερού πρέπει να αποφεύγονται κατά τη μεταφορά εκτός αν συντρέχουν σοβαροί λόγοι υγείας και ευζωίας των ψαριών. Ένα επιφανειακό skimmer πρέπει να υπάρχει σε όλες τις δεξαμενές μεταφοράς. Ο εξοπλισμός στον οποίο βασίζεται η επιβίωση των ψαριών κατά τη μεταφορά τους πρέπει να παρακολουθείται συνεχώς και η παροχή οξυγόνου πρέπει να είναι επαρκής για το 50% επιπλέον του αναμενόμενου χρόνου μεταφοράς. Τα νεκρά ψάρια πρέπει να απομακρύνονται το συντομότερο δυνατό μετά την άφιξη και η αιτία θανάτου πρέπει να προσδιορίζεται από κάποιο αρμόδιο άτομο. Είναι σημαντικό να γίνεται καταγραφή των θνησιμοτήτων και τραυματισμών. Τέλος, κρίνεται απαραίτητο να υπάρχει σχέδιο έκτακτης ανάγκης για όλα τα πιθανά προβλήματα που μπορεί να προκύψουν κατά τη μεταφορά.

Κριτήρια/προϋποθέσεις ευζωίας που αφορούν την μεταφορά των ψαριών στις χερσαίες εγκαταστάσεις και στους θαλάσσιους κλωβούς:

- Η μεταφορά πρέπει να προγραμματίζεται με τρόπο έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα δυσμενών επιπτώσεων στην ευζωία των ψαριών. Μέγιστη χρονική διάρκεια μεταφοράς στην ξηρά: 8 ώρες
- Η χρονική διάρκεια της ασιτίας θα πρέπει να είναι τόση ώστε να επιτευχθεί καθαρισμός του εντέρου
- Οι παράμετροι του νερού (οξυγόνο, επίπεδα αμμωνίας, pH, θερμοκρασία) πρέπει να παρακολουθούνται καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς και να αντιστοιχούν στις παραμέτρους των δεξαμένων κατά την άφιξη. Ένα επιφανειακό skimmer πρέπει να υπάρχει σε όλες τις δεξαμενές μεταφοράς
- Η βιοασφάλεια και η ευζωία των ψαριών πρέπει να λαμβάνονται υπόψη πριν από τη μεταφορά τους
- Ο εξοπλισμός στον οποίο βασίζεται η επιβίωση των ψαριών κατά τη μεταφορά τους πρέπει να παρακολουθείται συνεχώς
- Η παροχή οξυγόνου πρέπει να είναι επαρκής για το 50% επιπλέον του αναμενόμενου χρόνου μεταφοράς
- Υπέρμετρες και απότομες αλλαγές στη θερμοκρασία και το pH του νερού πρέπει να αποφεύγονται κατά τη μεταφορά εκτός αν συντρέχουν σοβαροί λόγοι υγείας και ευζωίας των ψαριών
- Τα νεκρά ψάρια πρέπει να απομακρύνονται το συντομότερο δυνατό μετά την άφιξη. Η αιτία θανάτου πρέπει να προσδιορίζεται από αρμόδιο άτομο
- Οι θάνατοι και οι τραυματισμοί κατά τη μεταφορά πρέπει να καταγράφονται
- Πρέπει να υπάρχει σχέδιο έκτακτης ανάγκης για όλα τα πιθανά προβλήματα που μπορεί να προκύψουν κατά τη μεταφορά

4.5.3.3. Ασιτία/Νηστεία (Starvation)

Η ασιτία των ιχθύων στις ιχθυοκαλλιέργειες θεωρείται μία ορθή πρακτική πριν τη μεταφορά και εξαλίευση. Οι επιπτώσεις που μπορεί να έχουν τα διαστήματα ασιτίας εξαρτώνται από τη διάρκεια της νηστείας, τη φυσιολογική κατάσταση των ψαριών και περιβαλλοντικές παραμέτρους, όπως η θερμοκρασία. Γενικά, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη σημασία κατά τις περιόδους νηστείας στην τσιπούρα, οι οποίες θα πρέπει να είναι απόλυτα αιτιολογημένες. Η περίοδος νηστείας θα πρέπει να βασίζεται στην έρευνα και στις οδηγίες του υπεύθυνου σε θέματα ευζωίας.

Κριτήρια/προϋποθέσεις ευζωίας που αφορούν την ασιτία των ψαριών στις χερσαίες εγκαταστάσεις και στους θαλάσσιους κλωβούς:

- Οι περίοδοι ασιτίας που εφαρμόζονται θα πρέπει να είναι απόλυτα αιτιολογημένες
- Η περίοδος νηστείας θα πρέπει να βασίζεται στην έρευνα και στις οδηγίες του ειδικού κτηνιάτρου και του υπεύθυνου σε θέματα ευζωίας

4.5.3.4. Κτηνιατρικές θεραπείες

Οι κτηνιατρικές θεραπείες περιλαμβάνουν τους εμβολιασμούς των ψαριών σε συγκεκριμένα στάδια του κύκλου παραγωγής και θεραπείες που δεν εφαρμόζονται κάθε φορά αλλά όταν είναι αναγκαίο (χορήγηση αντιβίωσης ή αποπαρασιτικών φαρμάκων). Οι κτηνιατρικές θεραπείες έχουν ως στόχο την προφύλαξη της υγείας, αλλά μπορεί η ίδια η χορήγηση ουσιών/φαρμάκων να προκαλέσει καταπόνηση και μείωση της ευζωίας. Διάφοροι χειρισμοί που απαιτούνται για την εφαρμογή των κτηνιατρικών θεραπειών όπως συγχρωτισμός, σύλληψη, και αναισθησία ή τοποθέτηση των ψαριών σε δεξαμενή με νερό με κάποιο αντιβιοτικό ή κάποια ουσία για αποπαρασίτωση πρέπει διεξάγονται με προσοχή και με την ελάχιστη δυνατή πρόκληση δυσφορίας. Η χορήγηση εμβολίων θα πρέπει να βασίζεται περισσότερο στην πρόληψη ασθενειών παρά στη θεραπεία. Σε μερικές περιπτώσεις ίσως είναι ορθότερη η θανάτωση του ζώου παρά μία επώδυνη θεραπεία που μπορεί να καταστεί ανεπιτυχής. Πριν τους εμβολιασμούς τα ψάρια πρέπει να αναισθητοποιούνται εκτός αν υπάρχει θέμα υγείας και ευζωίας που να μην το επιτρέπει και τα εμβόλια και οι αναισθητικές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, εκτός αν υπάρχουν διαφορετικές οδηγίες από τον κτηνίατρο. Στην περίπτωση πιθανής υποβάθμισης της ποιότητας του νερού λόγω συγχρωτισμού σε δεξαμενές μικρού όγκου για την εφαρμογή κτηνιατρικών θεραπειών θα πρέπει να ελέγχονται οι παράμετροι του νερού και ο κορεσμός οξυγόνου και να γίνονται οι ανάλογες διορθωτικές ενέργειες. Η αξιολόγηση της κτηνιατρικής θεραπείας με την εφαρμογή και ολοκλήρωση της σε έναν αριθμό ψαριών (π.χ. μία δεξαμενή ή έναν κλωβό) θα ήταν πολύ αποτελεσματική έτσι ώστε να φανούν σύντομα τυχόν παρενέργειες πριν εφαρμοστεί σε όλο τον πληθυσμό. Είναι σημαντικό να υπάρχει ένα εφεδρικό σύστημα και σχέδιο έκτακτης ανάγκης σε περίπτωση δυσλειτουργίας και βλάβης του συστήματος εμβολιασμού έτσι ώστε να διασφαλίζεται η ευζωία των ψαριών. Τέλος, η καταγραφή όλων των κτηνιατρικών θεραπειών που εφαρμόζονται, καθώς και τυχόν παρενεργειών/ επιπτώσεων είναι απαραίτητη για τυχόν ανάγκη αξιολόγησής τους.

Κριτήρια/προϋποθέσεις ευζωίας που αφορούν τις κτηνιατρικές θεραπείες στις χερσαίες εγκαταστάσεις και στους θαλάσσιους κλωβούς:

- Η χορήγηση εμβολίων θα πρέπει να βασίζεται περισσότερο στην πρόληψη ασθενειών παρά στη θεραπεία
- Όλες οι διαδικασίες εμβολιασμού πρέπει να διεξάγονται με προσοχή και με την ελάχιστη δυνατή πρόκληση δυσφορίας
- Τα ψάρια πρέπει να αναισθητοποιούνται πριν τον εμβολιασμό, εκτός αν υπάρχει θέμα υγείας και ευζωίας που να μην το επιτρέπει
- Τα εμβόλια και οι αναισθητικές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, εκτός αν υπάρχουν διαφορετικές οδηγίες από τον κτηνίατρο. Οι εμβολιασμοί πρέπει να καταγράφονται

- Έλεγχος παραμέτρων νερού και κορεσμού οξυγόνου στην περίπτωση συγχρωτισμού σε δεξαμενές μικρού όγκου για την εφαρμογή κτηνιατρικών θεραπειών
- Αξιολόγηση της κτηνιατρικής θεραπείας με την εφαρμογή και ολοκλήρωση της σε έναν αριθμό ψαριών (π.χ. μία δεξαμενή ή έναν κλωβό)
- Πρέπει να υπάρχει εφεδρικό σύστημα και σχέδιο έκτακτης ανάγκης σε περίπτωση δυσλειτουργίας και βλάβης του συστήματος εμβολιασμού έτσι ώστε να διασφαλίζεται η ευζωία των ψαριών
- Καταγραφή όλων των κτηνιατρικών θεραπειών που εφαρμόζονται, καθώς και τυχόν παρενεργειών/ επιπτώσεων

4.5.3.5. Διαλογή μεγεθών (Grading)

Η διαλογή μεγεθών στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας είναι μία ορθή πρακτική σε πολλά στάδια του κύκλου παραγωγής, με σκοπό την ομοιομορφία του πληθυσμού. Η διαλογή μεγεθών περιλαμβάνει διάφορους χειρισμούς, όπως ο συγχρωτισμός, η σύλληψη, η έκθεση στον αέρα και η μεταφορά. Γενικά, πρέπει να εφαρμόζεται στο ελάχιστο δυνατό και να πραγματοποιείται όταν είναι απολύτως απαραίτητο (π.χ. κατά την προπάχυνση, πριν τον εμβολιασμό για τη μείωση της πιθανότητας καρνιβαλισμού, πριν την εξαλίευση και θανάτωση). Η χρονική διάρκεια του συγχρωτισμού έχει μεγάλη σημασία και δεν πρέπει να ξεπερνάει τη 1.5 ώρα. Όσον αφορά τον εξοπλισμό πρέπει να είναι ειδικά σχεδιασμένος και να συντηρείται για την αποφυγή τραυματισμού και πρόκλησης stress στα ψάρια. Πρέπει πάντα να υπάρχει ένα καταγεγραμμένο πρωτόκολλο για τη διαδικασία της διαλογής μεγεθών στο χώρο και να εφαρμόζεται κάθε φορά. Η διαδικασία της διαλογής μεγεθών πρέπει να παρακολουθείται καθ' όλη τη διάρκεια για τον εντοπισμό θεμάτων ευζωίας. Στα θέματα ευζωίας περιλαμβάνεται ο έλεγχος του κορεσμού οξυγόνου, η θερμοκρασία και η αυξημένη ιχθυοπυκνότητα που δημιουργείται λόγω συγχρωτισμού πριν την διαλογή ώστε να μην εκτίθενται τμήματα των ψαριών εκτός νερού ή να μειώνεται σε μεγάλο βαθμό η κολυμβητική συμπεριφορά τους. Επιπλέον, είναι σημαντική η καταγραφή θνησιμοτήτων κατά τη διάρκεια της διαλογής μεγεθών. Η παρακολούθηση της συμπεριφοράς (π.χ. κολυμβητική συμπεριφορά) πρέπει να εφαρμόζεται ώστε να γίνεται αξιολόγηση της ευζωίας, όπως και η παρακολούθηση της ύπαρξης τραυματισμών (ύπαρξη λεπιών, αίματος στο νερό ή στον διαλογέα). Επίσης, όπου κρίνεται απαραίτητο μπορεί να γίνεται ατομική μακροσκοπική εξέταση των ψαριών και γενικότερα παρακολούθηση του πληθυσμού και μετά τη διαδικασία της διαλογής για την πιθανότητα ύπαρξης λοιμώξεων. Η καταγραφή του χρόνου μέχρι την επανέναρξη της τροφοληψίας μετά το τέλος της διαδικασίας είναι επίσης πολύ σημαντική.

Κριτήρια/προϋποθέσεις ευζωίας που αφορούν τη διαλογή μεγεθών στις χερσαίες εγκαταστάσεις και στους θαλάσσιους κλωβούς:

- Εφαρμογή της διαλογής μεγεθών στο ελάχιστο δυνατό και μόνο όταν είναι απολύτως απαραίτητο
- Χρονική διάρκεια του συγχρωτισμού κατά τη διαλογή μεγεθών μικρότερη από 1.5 ώρα
- Ειδικά σχεδιασμένος εξοπλισμός για την διαλογή μεγεθών. Συντήρηση του εξοπλισμού για την αποφυγή τραυματισμού και πρόκλησης stress στα ψάρια
- Καταγεγραμμένο πρωτόκολλο για τη διαδικασία της διαλογής μεγεθών στο χώρο
- Παρακολούθηση της διαδικασίας διαλογής για τον εντοπισμό θεμάτων ευζωίας και λήψη μέτρων σε περίπτωση που κριθεί απαραίτητο
- Έλεγχος κορεσμού οξυγόνου, θερμοκρασίας και ιχθυοπυκνότητας κατά τον συγχρωτισμό
- Καταγραφή θνησιμοτήτων
- Παρακολούθηση συμπεριφοράς τόσο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αλλά και για διάστημα κάποιων ημερών μετά τη διαδικασία. Καταγραφή του χρόνου μέχρι την επανέναρξη της τροφοληψίας
- Παρακολούθηση για τυχόν τραυματισμούς μετά το πέρας της διαδικασίας (π.χ. ύπαρξη λεπιών, αίματος στο νερό ή στον διαλογέα). Μακροσκοπική ατομική εξέταση των ψαριών όταν κρίνεται απαραίτητο και παρακολούθηση πληθυσμού για τυχόν λοιμώξεις μετά το πέρας της διαδικασίας

4.5.3.6. Δειγματοληψίες

Στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας συχνά διεξάγονται δειγματοληψίες για την αξιολόγηση της υγείας των οργανισμών. Όπως και στη διαλογή μεγεθών, στις δειγματοληψίες περιλαμβάνονται πρακτικές όπως ο συγχρωτισμός, η σύλληψη, η έκθεση στον αέρα και η αναισθησία (σε ορισμένες περιπτώσεις). Η δοσολογία κατά την αναισθησία πρέπει να είναι κατάλληλη για το αναπτυξιακό στάδιο και το σωματικό βάρος των ψαριών και να μην διαρκεί παραπάνω από το ενδεδειγμένο. Στους παράγοντες ευζωίας που πρέπει να παρακολουθούνται περιλαμβάνεται ο έλεγχος του κορεσμού οξυγόνου και η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της αναισθησίας. Συγκεκριμένα, η ανάνηψη είναι πιο δύσκολη όταν δεν υπάρχει επάρκεια οξυγόνου και η θερμοκρασία είναι δυνατόν να μεταβληθεί επιφέροντας αλλαγές και στον κορεσμό του οξυγόνου. Μετά από κάποιες ημέρες ή κατά τη διάρκεια της διαλογής μεγεθών πρέπει να καταγράφονται τυχόν θνησιμότητες. Είναι σημαντική η παρακολούθηση της συμπεριφοράς (π.χ. κολυμβητική συμπεριφορά), ώστε να γίνεται αξιολόγηση της ευζωίας, όπως και η παρακολούθηση της ύπαρξης τραυματισμών (ύπαρξη λεπιών, βλέννας, αίματος στο νερό ή με ατομική μακροσκοπική εξέταση των ψαριών), καθώς και η

παρακολούθηση του ρυθμού αναπνοής. Η καταγραφή του χρόνου μέχρι την επανέναρξη της τροφοληψίας μετά το τέλος της διαδικασίας είναι επίσης πολύ σημαντική.

Κριτήρια/προϋποθέσεις ευζωίας που αφορούν τις δειγματοληψίες στις χερσαίες εγκαταστάσεις και στους θαλάσσιους κλωβούς:

- Ορθή δοσολογία κατά την αναισθησία ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο και το σωματικό βάρος των ψαριών. Τήρηση ενδεδειγμένης χρονικής διάρκειας της αναισθησίας
- Έλεγχος κορεσμού οξυγόνου και θερμοκρασίας κατά τον συγχρωτισμό τόσο στις δεξαμενές αναισθησίας όσο και ανάνηψης
- Καταγραφή θνησιμοτήτων τόσο κατά τη διάρκεια όσο και για διάστημα κάποιων ημερών μετά τη διαδικασία
- Παρακολούθηση συμπεριφοράς τόσο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αλλά και για διάστημα κάποιων ημερών μετά τη διαδικασία. Καταγραφή του χρόνου μέχρι την επανέναρξη της τροφοληψίας
- Παρακολούθηση για τυχόν τραυματισμού μετά το πέρας της διαδικασίας (π.χ. ύπαρξη λεπιών, βλέννας ή αίματος στο νερό). Μακροσκοπική ατομική εξέταση των ψαριών όταν κρίνεται απαραίτητο
- Παρακολούθηση αναπνευστικού ρυθμού (απαιτείται αρχικά η εκτίμηση του ρυθμού αναπνοής προ της έναρξης της διαδικασίας)

4.5.3.7. Συγχρωτισμός (Crowding)

Ο συγχρωτισμός είναι μία συνήθης πρακτική και εφαρμόζεται κατά η μεταφορά, τη διαλογή, τον εμβολιασμό και τη θανάτωση. Ο συγχρωτισμός αναφέρεται στην ουσία στο συνωστισμό πολλών ψαριών στον ίδιο χώρο δηλαδή στην απότομη αύξηση της ιχθυοπυκνότητας. Από το συγχρωτισμό προκύπτουν πολλές ανεπιθύμητες προκλήσεις όπως η μείωση του διαθέσιμου οξυγόνου, η μη φυσιολογική συμπεριφορά λόγω περιορισμένου χώρου και η αύξηση του stress. Η διαδικασία συγχρωτισμού των ψαριών πρέπει να είναι καταγεγραμμένη και να έχει εξεταστεί από άτομο ειδικό σε θέματα ευζωίας. Καθώς ο συγχρωτισμός αποτελεί μία στρεσογόνα κατάσταση για τα ψάρια πρέπει να είναι απόλυτα αιτιολογημένος και η συχνότητα και διάρκεια του πρέπει να διατηρούνται στο ελάχιστο. Η χρονική διάρκεια του συνωστισμού δεν πρέπει να ξεπερνάει τη 1.5 ώρα για τη διαλογή μεγεθών και τις 2 ώρες για την εξαλίευση. Στις περιπτώσεις που είναι εφικτό, ο συγχρωτισμός καλό είναι να γίνεται μόνο σε ένα τμήμα του πληθυσμού. Οι χειριστές θα πρέπει να είναι εκπαιδευμένοι στις διαδικασίες συνωστισμού των ψαριών, να παρακολουθούν τη συμπεριφορά των ψαριών κατά τη διάρκεια και να λαμβάνουν μέτρα αν τα ψάρια δείξουν σημάδια stress και τραυματισμών. Επίσης, πρέπει να παρακολουθούνται διαρκώς τα επίπεδα οξυγόνου και θερμοκρασίας και να γίνονται διορθωτικές ενέργειες αν τα επίπεδα οξυγόνου πέσουν κάτω από ένα κρίσιμο σημείο. Θα πρέπει να γίνεται καταγραφή

θνησιμοτήτων τόσο κατά τη διάρκεια όσο και για ένα διάστημα μερικών ημερών (τουλάχιστον 3 ημέρες) μετά τη διαδικασία του συγχρωτισμού.

Κριτήρια/προϋποθέσεις ευζωίας που αφορούν το συγχρωτισμό στις χερσαίες εγκαταστάσεις και στους θαλάσσιους κλωβούς:

- Η διαδικασία συγχρωτισμού των ψαριών πρέπει να είναι καταγεγραμμένη και να έχει εξεταστεί από άτομο ειδικό σε θέματα ευζωίας
- Εφαρμογή συγχρωτισμού μόνο ενός τμήματος του πληθυσμού, αν είναι εφικτό
- Οι χειριστές θα πρέπει να είναι εκπαιδευμένοι στις διαδικασίες συνωστισμού των ψαριών
- Η συχνότητα και διάρκεια του συνωστισμού πρέπει να διατηρείται στο ελάχιστο και να είναι απόλυτα αιτιολογημένη. Η χρονική διάρκεια του συνωστισμού δεν πρέπει να ξεπερνάει τη 1.5 ώρα για τη ταξινόμηση μεγεθών και τις 2 ώρες για την εξαλίευση
- Οι χειριστές θα πρέπει να παρακολουθούν τη συμπεριφορά των ψαριών κατά τη διάρκεια του συνωστισμού και να λαμβάνουν μέτρα αν τα ψάρια δείξουν σημάδια stress και τραυματισμών
- Τα επίπεδα οξυγόνου και θερμοκρασίας πρέπει να παρακολουθούνται διαρκώς κατά τη διάρκεια του συνωστισμού και διορθωτικές ενέργειες πρέπει να γίνονται αν τα επίπεδα οξυγόνου πέσουν κάτω από ένα κρίσιμο σημείο
- Καταγραφή θνησιμοτήτων τόσο κατά τη διάρκεια όσο και για ένα διάστημα μερικών ημερών (τουλάχιστον 3 ημέρες) μετά τη διαδικασία του συγχρωτισμού

4.5.3.8. Culling

Με βάση τα πρότυπα ευζωίας τα ψάρια που είναι σοβαρά άρρωστα ή τραυματισμένα ή τα ψάρια που φαίνεται πως δεν αναρρώνουν πρέπει να απομακρύνονται και να θανατώνονται με ανθρωπιστικό τρόπο χωρίς καθυστέρηση. Ο ενδεδειγμένος τρόπος θανάτωσης αυτών των ψαριών είναι η υπερβολική δόση αναισθητικής ουσίας. Η θανάτωση αυτών των ψαριών θα πρέπει να γίνεται από εξειδικευμένο άτομο.

Κριτήρια/προϋποθέσεις ευζωίας που αφορούν το διαχωρισμό ή απομάκρυνση ατόμων στις χερσαίες εγκαταστάσεις και στους θαλάσσιους κλωβούς:

- Ψάρια σοβαρά άρρωστα ή τραυματισμένα ή ψάρια που φαίνεται πως δεν αναρρώνουν πρέπει να απομακρύνονται και να θανατώνονται με ανθρωπιστικό τρόπο χωρίς καθυστέρηση
- Τα ψάρια θα πρέπει να θανατώνονται χρησιμοποιώντας υπερβολική δόση αναισθητικού
- Η θανάτωση οποιουδήποτε ψαριού πρέπει να γίνεται μόνο από κατάλληλα εκπαιδευμένα και ικανά άτομα

4.5.4. Εξαλίευση και θανάτωση

Στόχος της ευζωίας κατά την εξαλίευση και θανάτωση είναι η μείωση κατά το ελάχιστο δυνατό του πόνου και άγχους που προκαλείται τόσο από τον τρόπο θανάτωσης όσο και από τη διαδικασία συλλογής των ψαριών πριν την θανάτωση. Η χρονική διάρκεια του συνωστισμού δεν θα πρέπει να ξεπερνάει τις 2 ώρες για την εξαλίευση. Στην παραγωγή τσιπούρας όπως και λαβρακιού συνηθίζεται η εμβάπτιση σε πάγο ή παγόνερο ως μέθοδος θανάτωσης. Ωστόσο, η πρακτική αυτή δεν συνάδει με τα πρότυπα ευζωίας. Στις πλέον επιτρεπόμενες μεθόδους θανάτωσης ανήκει η αναισθητοποίηση με κρουστικό πλήγμα, η ηλεκτραναισθησία η οποία ακολουθείται πάντα από αφαίμαξη, ασφυξία, εμβάπτιση σε παγόνερο ή κάποια άλλη μέθοδο θανάτωσης όσο τα ψάρια είναι αναισθητα και η ηλεκτροπληξία. Η αναισθητοποίηση με κρουστικό πλήγμα είναι στην ουσία ένα δυνατό και ακριβές χτύπημα στο κρανίο το οποίο γίνεται με αυτοματοποιημένη μέθοδο. Ωστόσο, πρέπει πάντα να υπάρχει εφεδρικό σύστημα σε περίπτωση κάποιας δυσλειτουργίας. Εφεδρικό σύστημα είναι το χειροκίνητο χτύπημα στο κρανίο με ένα ξύλινο ή πλαστικό εργαλείο (π.χ. priest). Στα μειονεκτήματα ανήκει ο περιορισμένος αριθμός ψαριών που μπορεί να θανατωθεί με αυτό τον τρόπο λόγω κούρασης του ατόμου που την εφαρμόζει, καθώς και η απαίτηση ικανότητας και εμπειρίας του συγκεκριμένου ατόμου. Επίσης, το ποσοστό επιτυχίας δεν είναι σίγουρο λόγω μη της ελεγχόμενης κίνησης του ψαριού. Όσα ψάρια πέφτουν κάτω κατά της διαδικασία πρέπει να θανατώνονται με τις επιτρεπόμενες μεθόδους και η παρατήρηση τυχόν εξωτερικών μορφολογικών αλλοιώσεων στα λέπια, στα πτερύγια ή τραυματισμοί από δαγκώματα, χειρισμούς ή παράσιτα και δυσμορφίες πρέπει να αναφέρονται κατά τη διαδικασία θανάτωσης ή κατά την άφιξη στο χώρο επεξεργασίας. Το προσωπικό που εμπλέκεται στο τελικό στάδιο της παραγωγής πρέπει να είναι εκπαιδευμένο και να υπάρχει συγκεκριμένο άτομο υπεύθυνο για την διαδικασία αναισθητοποίησης και θανάτωσης. Τέλος, πρέπει να υπάρχει καταγεγραμμένο πρωτόκολλο όλης της διαδικασίας και να είναι διαθέσιμο ανά πάσα στιγμή.

Κριτήρια/προϋποθέσεις ευζωίας που αφορούν την εξαλίευση και θανάτωση στους θαλάσσιους κλωβούς:

- Μείωση κατά το ελάχιστο δυνατό του πόνου και άγχους που προκαλείται τόσο από τον τρόπο θανάτωσης όσο και από τη διαδικασία συλλογής των ψαριών πριν την θανάτωση
- Η εξαλίευση πρέπει να γίνεται μόνο με τη μέθοδο της άντλησης. Οι διαστάσεις των αντλιών και σωληνώσεων πρέπει να είναι κατάλληλες και να έχουν εγκριθεί από μηχανικό. Μέγιστη ταχύτητα ροής: 3m/s
- Χρονική διάρκεια του συγχρωτισμού μέχρι 2 ώρες πριν την εξαλίευση
- Επιτρεπόμενες μέθοδοι θανάτωσης: i) αναισθητοποίηση με κρουστικό πλήγμα ii) ηλεκτραναισθησία ακολουθούμενη από αφαίμαξη, ασφυξία, εμβάπτιση σε

παγόνερο ή κάποια άλλη μέθοδο θανάτωσης όσο τα ψάρια είναι αναίσθητα και iii) ηλεκτροπληξία

- Εφεδρικό σύστημα σε περίπτωση κάποιας δυσλειτουργίας (π.χ.. χειροκίνητο χτύπημα στο κρανίο με ένα ξύλινο ή πλαστικό εργαλείο, priest)
- Θανάτωση ψαριών που πέφτουν κάτω με τις επιτρεπόμενες μεθόδους
- Παρατήρηση και αναφορά τυχόν εξωτερικών μορφολογικών αλλοιώσεων στα λέπια, στα πτερύγια ή τραυματισμοί από δαγκώματα, χειρισμούς ή παράσιτα και δυσμορφίες κατά τη διαδικασία θανάτωσης ή κατά την άφιξη στο χώρο
- Εκπαιδευμένο προσωπικό που εμπλέκεται στις διαδικασίες αναισθητοποίησης και θανάτωσης. Υπεύθυνο άτομο για τη διαδικασία της εξαλίευσης και θανάτωσης
- Καταγεγραμμένο πρωτόκολλο όλης της διαδικασίας και να είναι διαθέσιμο ανά πάσα στιγμή

6. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή πραγματοποιήθηκε χορήγηση τριών φαρμακευτικών φυτών (έλαιο από σπόρους κάνναβης, αιθέρια έλαια ρίγανης και κανέλας), στην διατροφή της τσιπούρας σε ποσοστό 1% και 2% της τροφής στη θέση του σογιέλαιου.

Στο 1ο πείραμα, διερευνήθηκε η επίδραση των τριών φαρμακευτικών φυτών στην ανάπτυξη, αξιοποίησης της τροφής, θρεπτική σύσταση καθώς και στην απόκριση καταπόνησης και συμπεριφορά κατά την τροφοληψία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

- Η προσθήκη ελαίου από σπόρους κάνναβης σε ποσοστό 1% είχε θετική επίδραση και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη διατροφή της τσιπούρας. Η δόση 2% έδειξε θετικά αποτελέσματα αλλά χρήζει περαιτέρω διερεύνησης λόγω των ευρημάτων στις ιστολογικές αναλύσεις.
- Η δόση χορήγησης 2% των αιθέριων ελαίων ρίγανης και κανέλας, λόγω των υψηλών θνησιμοτήτων αλλά και της συμπεριφοράς τροφοληψίας, η οποία έδειξε ότι η τροφή δεν ήταν ελκυστική για τα ψάρια, την καθιστά μη κατάλληλη ενώ η χαμηλότερη δόση χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Στο 2ο πείραμα, διερευνήθηκε η επίδραση των τριών φαρμακευτικών φυτών στην υγεία και στην απόκριση της καταπόνησης μετά την υποβολή των ψαριών σε οξύ stress. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

- Η προσθήκη ελαίου από σπόρους κάνναβης σε ποσοστό 1% είχε θετική επίδραση, μειώνοντας τα επίπεδα κορτιζόλης χωρίς σημαντικές διαφορές στη βλάβη του DNA από την ομάδα ελέγχου. Η δόση 2% έδειξε επίσης θετικά αποτελέσματα αλλά χρήζει περαιτέρω διερεύνησης λόγω της υψηλότερης βλάβης του DNA στα ηπατοκύτταρα.
- Η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε ποσοστό 1% και 2% ως παράγοντας antistress δεν συστήνεται καθώς αύξησε σημαντικά τα επίπεδα κορτιζόλης και τη βλάβη του DNA στα ηπατοκύτταρα.
- Η προσθήκη αιθέριου ελαίου κανέλας σε ποσοστό 1% και 2% ως παράγοντας antistress χρήζει περαιτέρω διερεύνησης καθώς μείωσε σημαντικά τα επίπεδα κορτιζόλης στο πλάσμα αλλά αύξησε σημαντικά τη βλάβη του DNA στα ηπατοκύτταρα.

Στο 3ο πείραμα, διερευνήθηκε η επίδραση των τριών φαρμακευτικών φυτών στην υγεία και στην απόκριση της καταπόνησης μετά την υποβολή των ψαριών σε αστία διάρκειας δύο εβδομάδων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

- Η προσθήκη ελαίου από σπόρους κάνναβης σε ποσοστό 1% και 2% είχε θετική επίδραση στη μείωση του χρόνιου stress προκαλούμενο από ασιτία μειώνοντας τα επίπεδα κορτιζόλης και τη βλάβη του DNA στα ηπατοκύτταρα με τη δόση 1% να παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερες τιμές από τη δόση 2%.
- Η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε ποσοστό 1% και 2% ως παράγοντας antistress στη χρόνια καταπόνηση λόγω ασιτίας χρήζει περαιτέρω διερεύνησης καθώς φάνηκε ότι ο μηχανισμός δράσης αυτού του εκχυλίσματος στον οργανισμό είναι πολύπλοκος.
- Η προσθήκη αιθέριου ελαίου κανέλας σε ποσοστό 1% και 2% είχε θετική επίδραση στη μείωση του χρόνιου stress προκαλούμενο από ασιτία μειώνοντας τα επίπεδα κορτιζόλης και τη βλάβη του DNA στα ηπατοκύτταρα.

Στο 4ο πείραμα, διερευνήθηκε η επίδραση των τριών φαρμακευτικών φυτών στην υγεία και στην απόκριση της καταπόνησης μετά την υποβολή των ψαριών σε υψηλή ιχθυοπυκνότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

- Η προσθήκη των τριών φαρμακευτικών φυτών στη διατροφή της τσιπούρας χρήζει περαιτέρω διερεύνησης με περισσότερους δείκτες καθώς δεν ήταν ξεκάθαρη η επίδραση τους ως παράγοντες anti-stress στην υψηλή πυκνότητα εκτροφής.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abasali, H., & Mohamad, S. (2010). Immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulant diets. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(13), 1839-1847.
- Abd El-Naby, A. S., Al-Sagheer, A. A., Negm, S. S., & Naiel, M. A. E. (2020). Dietary combination of chitosan nanoparticle and thymol affects feed utilization, digestive enzymes, antioxidant status, and intestinal morphology of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 515, 734577. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734577>
- Abd-Elhakim, Y. M., & Mohamed, W. A. M. (2016). Assessment of the role of thymol in combating chromium (VI)-induced oxidative stress in isolated rat erythrocytes in vitro. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 98(10), 1227–1240. <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1121490>
- Abdel-Latif, H. M. R., & Khalil, R. H. (2014). Evaluation of two phytobiotics, *Spirulina platensis* and *Origanum vulgare* extract on growth, serum antioxidant activities and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to pathogenic *Vibrio alginolyticus*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 250(5), 250–255.
- Abdel-Latif, H. M. R., Abdel-Tawwab, M., Khafaga, A. F., & Dawood, M. A. O. (2020). Dietary oregano essential oil improved the growth performance via enhancing the intestinal morphometry and hepato-renal functions of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. *Aquaculture*, 526(April), 735432. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735432>
- Abdel-Tawwab, M., Samir, F., Abd El-Naby, A. S., & Monier, M. N. (2018). Antioxidative and immunostimulatory effect of dietary cinnamon nanoparticles on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) and its susceptibility to hypoxia stress and *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 74(2018), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.033>
- Aboagye, D. L., & Allen, P. J. (2018). Effects of acute and chronic hypoxia on acid–base regulation, hematology, ion, and osmoregulation of juvenile American paddlefish. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 188(1), 77–88. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1104-7>
- Abreu, J. S., Takahashi, L. S., Hoshiba, M. A., & Urbinati, E. C. (2009). Biological indicators of stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after capture. *Brazilian Journal of Biology*, 69(2), 415–421. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842009000200026>
- Acerete, L., Balasch, J. C., Espinosa, E., Josa, A., & Tort, L. (2004). Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport

- and handling. *Aquaculture*, 237(1–4), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.03.018>
- Adabiardakani, A., Hakimi, M., & Kargar, H. (2012). Cinnamaldehyde Schiff Base Derivatives: A Short Review. *World Applied Programming*, 211, 472–476.
- Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1998). Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1739–1745. <https://doi.org/10.1021/jf9708296>
- Adams, I. B., & Martin, B. R. (1996). Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*, 91(11), 1585–1614. <https://doi.org/10.1046/j.1360-0443.1996.911115852.x>
- Ahmad, M. H., Mesallamy, A. M. D. E. L., Samir, F., & Zahran, F. (2011). Effect of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) on Growth Performance, Feed Utilization, Whole-Body Composition, and Resistance to *Aeromonas hydrophila* in Nile Tilapia. 289–298. <https://doi.org/10.1080/10454438.2011.626350>
- Ahmadifar, E., Falahatkar, B., & Akrami, R. (2011). Effects of dietary thymol-carvacrol on growth performance, hematological parameters and tissue composition of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(4), 1057–1060. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01763.x>
- Ahmadifar, E., Razeghi Mansour, M., Keramat Amirkolaie, A., & Fadaei Rayeni, M. (2014). Growth efficiency, survival and haematological changes in great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juveniles fed diets supplemented with different levels of thymol-carvacrol. *Animal Feed Science and Technology*, 198, 304–308. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.08.012>
- Ajikumar, P. K., Tyo, K., Carlsen, S., Mucha, O., Phon, T. H., & Stephanopoulos, G. (2008). Terpenoids: Opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Molecular Pharmaceutics*, 5(2), 167–190. <https://doi.org/10.1021/mp700151b>
- Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Farag, M. R., Shaheen, H. M., Abdel-Latif, M. A., Noreldin, A. E., & Khafaga, A. F. (2020). The Applications of *Origanum Vulgare* and Its Derivatives in Human, Ruminant and Fish Nutrition-A Review. *Annals of Animal Science*, 20(2), 389–407. <https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0004>
- Alonso-Esteban, J. I., González-Fernández, M. J., Fabrikov, D., Torija-Isasa, E., Sánchez-Mata, M. de C., & Guil-Guerrero, J. L. (2020). Hemp (*Cannabis sativa* L.) Varieties: Fatty Acid Profiles and Upgrading of γ -Linolenic Acid-Containing Hemp Seed Oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 122(7), 1–21. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900445>

- Al-Shakarchi, H. H., & Mohammad, M. A. (2021). Effects of different levels of cinnamon and coriander powders on growth performance, feed utilization, survival rate and body chemical composition of common carp *Cyprinus carpio* L. *Plant Archives*, 21(1), 46-54.
- Alsoodeeri, F. N., Alqabbani, H. M., & Aldossari, N. M. (2020). Effects of Cinnamon (*Cinnamomum cassia*) Consumption on Serum Lipid Profiles in Albino Rats. *Journal of Lipids*, 2020, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2020/8469830>
- Alves, F. L., Barbosa Júnior, A., & Hoffmann, A. (2013). Antinociception in piauçu fish induced by exposure to the conspecific alarm substance. *Physiology & Behavior*, 110–111, 58–62. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2012.12.003>
- Ambrosio, C. M. S., de Alencar, S. M., de Sousa, R. L. M., Moreno, A. M., & Da Gloria, E. M. (2017). Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. *Industrial Crops and Products*, 97, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.045>
- Amer, S. A., Metwally, A. E., & Ahmed, S. A. A. (2018). The influence of dietary supplementation of cinnamaldehyde and thymol on the growth performance, immunity and antioxidant status of monosex Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*). *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(3), 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.07.004>
- Andre, C. M., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2016). *Cannabis sativa*: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>
- Aniagu. (2006). Review Article. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 405(April), 391–405. <https://doi.org/10.1002/em>
- Arami, S., Ahmadi, A., & Haeri, S. A. (2013). The radioprotective effects of *Origanum vulgare* extract against genotoxicity induced by 131I in human blood lymphocyte. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 28(3), 201–206. <https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1284>
- Aranda, A., Sánchez-Vázquez, F. J., & Madrid, J. A. (2001). Effect of short-term fasting on macronutrient self-selection in sea bass. *Physiology & behavior*, 73(1-2), 105-109.
- Araújo-Luna, R., Ribeiro, L., Bergheim, A., & Pousão-Ferreira, P. (2018). The impact of different rearing condition on gilthead seabream welfare: Dissolved oxygen levels and stocking densities. *Aquaculture Research*, 49(12), 3845–3855. <https://doi.org/10.1111/are.13851>
- Arends, R. J., Mancera, J. M., Muñoz, J. L., Wendelaar Bonga, S. E., & Flik, G. (1999). The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology*, 163(1), 149–157. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1630149>

- Ariza-Nieto, C., Bandrick, M., Baidoo, S. K., Anil, L., Molitor, T. W., & Hathaway, M. R. (2011). Effect of dietary supplementation of oregano essential oils to sows on colostrum and milk composition, growth pattern and immune status of suckling pigs. *Journal of Animal Science*, 89(4), 1079–1089. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3514>
- Arlinghaus, R., Cooke, S. J., Schwab, A., & Cowx, I. G. (2007). Fish welfare: A challenge to the feelings-based approach, with implications for recreational fishing. *Fish and Fisheries*, 8(1), 57–71. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2007.00233.x>
- Ashley, P. J. (2007). Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104(3–4), 199–235. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.09.001>
- Ashley, P. J., Sneddon, L. U., & McCrohan, C. R. (2006). Properties of corneal receptors in a teleost fish. *Neuroscience Letters*, 410(3), 165–168. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.08.047>
- Ashley, P. J., Sneddon, L. U., & McCrohan, C. R. (2007). Nociception in fish: stimulus-response properties of receptors on the head of trout *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Research*, 1166(1), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.07.011>
- Atakan, Z. (2012). Cannabis, a complex plant: Different compounds and different effects on individuals. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 2(6), 241–254. <https://doi.org/10.1177/2045125312457586>
- Atarés, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in food science & technology*, 48, 51–62.
- Audu, B. S., Ajima, M. N. O., & Ofojekwu, P. C. (2015). Enzymatic and biochemical changes in common carp, *Cyprinus carpio* (L.) fingerlings exposed to crude leaf extract of *Cannabis sativa* (L.). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(2), 107–115. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60636-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60636-8)
- Awad, E., & Awaad, A. (2017). Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 67, 40–54. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.034>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Bababaalian Amiri, A., Azari Takami, G., Afsharnasab, M., & Zargar, A. (2020). Growth performance, hepatic function parameters, histological changes of Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) and oxidative stability

- index of feed following dietary administration of Mix-Oil. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(4), 2128–2141. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2019.120581>
- Babaei, S., Abedian-Kenari, A., Naseri, M., Yazdani-Sadati, M. A., & Metón, I. (2020). Impact of starvation on digestive enzymes activities and plasma metabolites in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869). *Aquaculture Research*, 51(4), 1689–1699. <https://doi.org/10.1111/are.14515>
- Baker, M. R., Gobush, K. S., & Vynne, C. H. (2013). Review of factors influencing stress hormones in fish and wildlife. *Journal for Nature Conservation*, 21(5), 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2013.03.003>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bandeira Junior, G., Bianchini, A. E., de Freitas Souza, C., Descovi, S. N., da Silva Fernandes, L., de Lima Silva, L., Cargnelutti, J. F., & Baldisserotto, B. (2022). The Use of Cinnamon Essential Oils in Aquaculture: Antibacterial, Anesthetic, Growth-Promoting, and Antioxidant Effects. *Fishes*, 7(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/fishes7030133>
- Bandeira, G., Pês, T. S., Saccol, E. M. H., Sutili, F. J., Rossi, W. R., Murari, A. L., Heinzmann, B. M., Pavanato, M. A., de Vargas, A. C., de L. Silva, L., & Baldisserotto, B. (2017). Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. *Industrial Crops and Products*, 97, 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.040>
- Barcellos, L. J. G., Nicolaiewsky, S., De Souza, S. M. G., & 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00419.x>
- Barnard, C. J. (2004). *Animal behaviour: mechanism, development, function and evolution*.
- Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 517–525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>
- Barton, B. A., Ribas, L., Acerete, L., & Tort, L. (2005). Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. *Aquaculture Research*, 36(2), 172–179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01202.x>
- Barzalona, M., & Casanova, J. (2008). *Chemical variability of the leaf oil of 113 hybrids from. April*, 152–163. <https://doi.org/10.1002/ffj>
- Batzina, A., Dalla, C., Tsopelakos, A., Papadopoulou-Daifoti, Z., & Karakatsouli, N. (2014). Environmental enrichment induces changes in brain monoamine levels in

- gilthead seabream *Sparus aurata*. *Physiology and Behavior*, 130, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.03.023>
- Bavčević, L., Klanjšček, T., Karamarko, V., Aničić, I., & Legović, T. (2010). Compensatory growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) compensates weight, but not length. In *Aquaculture* (Vol. 301, Issues 1–4, pp. 57–63). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.009>
- Beato, M., & Sánchez-Pacheco, A. (1996). Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocrine Reviews*, 17(6), 587–609.
- Beemelmans, A., Zanuzzo, F. S., Xue, X., Sandrelli, R. M., Rise, M. L., & Gamperl, A. K. (2021). The transcriptomic responses of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to high temperature stress alone, and in combination with moderate hypoxia. *BMC Genomics*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07464-x>
- Belpaeme, K., Cooreman, K., & Kirsch-Volders, M. (1998). Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 415(3), 167–184. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00062-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00062-X)
- Belpaeme, K., Delbeke, K., Zhu, L., & Kirsch-Volders, M. (1996). Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 11(5), 485–492. <https://doi.org/10.1093/mutage/11.5.485>
- Benchaar, C. (2020). Feeding oregano oil and its main component carvacrol does not affect ruminal fermentation, nutrient utilization, methane emissions, milk production, or milk fatty acid composition of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 103(2), 1516–1527. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17230>
- Benjakul, S., Kittiphattanabawon, P., Shahidi, F., & Maqsood, S. (2013). Antioxidant activity and inhibitory effects of lead (*Leucaena leucocephala*) seed extracts against lipid oxidation in model systems. *Food Science and Technology International*, 19(4), 365–376. <https://doi.org/10.1177/1082013212455186>
- Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 13(2), 184–196. <https://doi.org/10.1177/154411130201300208>
- Benovit, S. C., Gressler, L. T., de Lima Silva, L., de Oliveira Garcia, L., Okamoto, M. H., dos Santos Pedron, J., Sampaio, L. A., Rodrigues, R. V., Heinzmann, B. M., & Baldisserotto, B. (2012). Anesthesia and Transport of Brazilian Flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with Essential Oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(6), 896–900. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00604.x>
- Bodur, T., Afonso, J. M., Montero, D., & Navarro, A. (2018). Assessment of effective dose of new herbal anesthetics in two marine aquaculture species: *Dicentrarchus*

- labrax* and *Argyrosomus regius*. *Aquaculture*, 482, 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.029>
- Bodur, T., León-Bernabeu, S., Navarro, A., Tort, L., Afonso, J. M., & Montero, D. (2018). Effects of new plant based anesthetics *Origanum* sp. and *Eucalyptus* sp. oils on stress and welfare parameters in *Dicentrarchus labrax* and their comparison with clove oil. *Aquaculture*, 495(October 2017), 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.021>
- Boétius, I., & Boétius, J. (1985). Lipid and protein content in *Anguilla anguilla* during growth and starvation. *Dana*, 4, 1–17.
- Bone, Q., & Moore, R. (2008). *Biology of fishes*.
- Botsoglou, N. A., Florou-Paneri, P., Christaki, E., Fletouris, D. J., & Spais, A. B. (2002). Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. *British Poultry Science*, 43(2), 223–230. <https://doi.org/10.1080/00071660120121436>
- Bowden, T. J. (2008). Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(4), 373–383. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.017>
- Bowman, J. G. P., & Sowell, B. F. (2018). *Delivery Method and Supplement Consumption by Grazing Ruminants : A Review 1 , 2 ABSTRACT : August*, 543–550.
- Braithwaite, V. A., & Huntingford, F. A. (2004). *Fish and welfare: do fish have the capacity for pain perception and suffering?*
- Braun, N., de Lima, R. L., Baldisserotto, B., Dafre, A. L., & de Oliveira Nuñez, A. P. (2010). Growth, biochemical and physiological responses of *Salminus brasiliensis* with different stocking densities and handling. *Aquaculture*, 301(1–4), 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.022>
- Broglio, C., Gómez, A., Durán, E., Ocaña, F. M., Jiménez-Moya, F., Rodríguez, F., & Salas, C. (2005). Hallmarks of a common forebrain vertebrate plan: Specialized pallial areas for spatial, temporal and emotional memory in actinopterygian fish. *Brain Research Bulletin*, 66(4–6), 277–281. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.03.021>
- Broom, D. M. (1986). Indicators of poor welfare. *British Veterinary Journal*, 142(6), 524–526. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(86\)90109-0](https://doi.org/10.1016/0007-1935(86)90109-0)
- Broom, D. M. (2011). A History of Animal Welfare Science. *Acta Biotheoretica*, 59(2), 121–137. <https://doi.org/10.1007/s10441-011-9123-3>
- Bshary, R., & Brown, C. (2014). Fish cognition. *Current Biology*, 24(19), R947–R950. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.043>

- Buchanan, B., Gruissem, W., & Jones R. (2000). Chapter 24 Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, 1250–1318.
- Burgos-Aceves, M. A., Lionetti, L., & Faggio, C. (2019). Multidisciplinary haematology as prognostic device in environmental and xenobiotic stress-induced response in fish. *Science of the Total Environment*, 670, 1170–1183. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.275>
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Caballero, M. J., Izquierdo, M. S., Kjørsvik, E., Fernández, A. J., & Rosenlund, G. (2004). Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases*, 27(9), 531–541. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00572.x>
- Caballero, M. J., López-Calero, G., Socorro, J., Roo, F. J., Izquierdo, M. S., & Fernández, A. J. (1999). Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 179(1–4), 277–290. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00165-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00165-9)
- Callaway, J. C. (2004). Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, 140(1–2), 65–72. <https://doi.org/10.1007/s10681-004-4811-6>
- Campa-Córdova, Á. I., Angulo, C., Zarain-Herzberg, M., Pacheco-Marges, R., Ascencio, F., Guzmán-Murillo, M. A., Sánchez-Ortiz, A. C., & Hernández-Llamas, A. (2022). Stressing stocking density and rearing time effect on whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) reared intensively in floating cages. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 50(2), 158–167. <https://doi.org/10.3856/vol50-issue2-fulltext-2814>
- Campbell, P. M., Pottinger, T. G., & Sumpter, J. P. (1992). Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. *Biology of Reproduction*, 47(6), 1140–1150. <https://doi.org/10.1095/biolreprod47.6.1140>
- Can Baser, K. (2008). Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *Current Pharmaceutical Design*, 14(29), 3106–3119. <https://doi.org/10.2174/138161208786404227>
- Capuzzo, A., Maffei, M. E., & Occhipinti, A. (2013). Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. *Molecules*, 18(6), 7194–7238. <https://doi.org/10.3390/molecules18067194>
- Cararo, L. M., Sado, R. Y., Muelbert, B., & De Borba, M. R. (2017). Evaluation of oregano essential oil as a growth promoter and resistance stimulator against *Ichthyophthirius multifiliis* (Protozoa, Ciliophora) in silver catfish juveniles,

- Rhamdia* sp. (Siluriformes, Heptapteridae). *Semina: Ciencias Agrarias*, 38(6), 3871–3885. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n6p3871>
- Carbonara, P., Alfonso, S., Zupa, W., Manfrin, A., Fiocchi, E., Pretto, T., Spedicato, M. T., & Lembo, G. (2019). Behavioral and physiological responses to stocking density in sea bream (*Sparus aurata*): Do coping styles matter? *Physiology and Behavior*, 212, 112698. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112698>
- Caruso, G., Denaro, M. G., Caruso, R., Mancari, F., Genovese, L., & Maricchiolo, G. (2011). Response to short term starvation of growth, haematological, biochemical and non-specific immune parameters in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). *Marine Environmental Research*, 72(1–2), 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.04.005>
- Chakraborty, S. B., Horn, P., & Hancz, C. (2014). Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. *Reviews in Aquaculture*, 6(1), 1–19. <https://doi.org/10.1111/raq.12021>
- Chalon, S., Delion-Vancassel, S., Belzung, C., Guilloteau, D., Leguisquet, A. M., Besnard, J. C., & Durand, G. (1998). Dietary fish oil affects monoaminergic neurotransmission and behavior in rats. *Journal of Nutrition*, 128(12), 2512–2519. <https://doi.org/10.1093/jn/128.12.2512>
- Champneys, T., Castaldo, G., Consuegra, S., & Leaniz, C. G. De. (2018). *Density-dependent changes in neophobia and stress-coping styles in the world's oldest farmed fish*.
- Chandra, S., Lata, H., & ElSohly, M. A. (2017). *Cannabis sativa* L. - botany and biotechnology. *Cannabis sativa* L. - Botany and Biotechnology. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6>
- Chandroo, K. P., Duncan, I. J. H., & Moccia, R. D. (2004). Can fish suffer?: Perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Applied Animal Behaviour Science*, 86(3–4), 225–250. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.004>
- Chatzifotis, S., Papadaki, M., Despoti, S., Roufidou, C., & Antonopoulou, E. (2011). Effect of starvation and re-feeding on reproductive indices, body weight, plasma metabolites and oxidative enzymes of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 316(1–4), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.044>
- Chen, Y. F., Wang, Y. W., Huang, W. S., Lee, M. M., Wood, W. G., Leung, Y. M., & Tsai, H. Y. (2016). Trans-Cinnamaldehyde, An Essential Oil in Cinnamon Powder, Ameliorates Cerebral Ischemia-Induced Brain Injury via Inhibition of Neuroinflammation Through Attenuation of iNOS, COX-2 Expression and NFκ-B Signaling Pathway. *NeuroMolecular Medicine*, 18(3), 322–333. <https://doi.org/10.1007/s12017-016-8395-9>
- Cheng, C. H., Guo, Z. X., Luo, S. W., & Wang, A. L. (2018). Effects of high temperature on biochemical parameters, oxidative stress, DNA damage and

- apoptosis of pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 150(January), 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.045>
- Cheng, C., Liu, Z., Zhou, Y., Wei, H., Zhang, X., Xia, M., Deng, Z., Zou, Y., Jiang, S., & Peng, J. (2017). Effect of oregano essential oil supplementation to a reduced-protein, amino acid-supplemented diet on meat quality, fatty acid composition, and oxidative stability of *Longissimus thoracis* muscle in growing-finishing pigs. *Meat Science*, 133(January), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.06.011>
- Chishti, S., Kaloo, Z. A., & Sultan, P. (2013). Medicinal importance of genus *Origanum*: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 5(10), 170–177. <https://doi.org/10.5897/JPP2013.0285>
- Cho, S. H. (2011). Effects of Putative Growth or Health-Enhancing Dietary Additives on Juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*, Performance. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(1), 90–95. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00447.x>
- Choi, C. Y., Choi, J. Y., Choi, Y. J., Kim, B. S., & Kim, J. W. (2019). Effects of green wavelength light on antioxidant and non-specific immune responses of the olive flounder *Paralichthys olivaceus* maintained at different stocking densities. *Aquacultural Engineering*, 84(November 2018), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.11.004>
- Cleff, M. B., Meinerz, A. R., Xavier, M., Schuch, L. F., Meireles, M. C. A., Rodrigues, M. R. A., & de Mello, J. R. B. (2010). In Vitro activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1), 116–123. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000100018>
- Conte, F. S. (2004). Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 86(3–4), 205–223. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.003>
- Costas, B., Aragão, C., Dias, J., Afonso, A., & Conceição, L. E. C. (2013). Interactive effects of a high-quality protein diet and high stocking density on the stress response and some innate immune parameters of Senegalese sole *Solea senegalensis*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39(5), 1141–1151. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9770-1>
- Cottrell, J. J., Furness, J. B., Wijesiriwardana, U. A., Ringuet, M., Liu, F., Digiacomo, K., Leury, B. J., J.clarke, I., & Dunshea, F. R. (2020). The effect of heat stress on respiratory alkalosis and insulin sensitivity in cinnamon supplemented pigs. *Animals*, 10(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ani10040690>
- da Cunha, M. A., de Barros, F. M. C., de Oliveira Garcia, L., de Lima Veeck, A. P., Heinzmann, B. M., Loro, V. L., Emanuelli, T., & Baldisserotto, B. (2010). Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 306(1–4), 403–406. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.014>

- Dairun, S., Setiawati, M., Suprayudi, M. A., & Utomo, N. B. P. (2018). Utilization of cinnamon *Cinnamomum burmannii* leaves and shrimp head in the feed on growth performance of catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 17(1), 87. <https://doi.org/10.19027/jai.17.1.87-93>
- Davis, A. K., Maney, D. L., & Maerz, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. *Functional Ecology*, 22(5), 760–772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>
- Davis, K. B., & Gaylord, T. G. (2011). Effect of fasting on body composition and responses to stress in sunshine bass. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 158(1), 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.08.019>
- Davis, K. B., & Parker, N. C. (1986). Plasma Corticosteroid Stress Response of Fourteen Species of Warmwater Fish to Transportation. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115(3), 495–499. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1986\)115<495:pcsrof>2.0.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1986)115<495:pcsrof>2.0.co;2)
- Davis, M. (1992). The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual Review of Neuroscience*, 15, 353–375. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.15.030192.002033>
- Dawkins, M. S. (2006). A user's guide to animal welfare science. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(2), 77–82.
- Dawood, M. A. O., Basuini, M. F. El, Yilmaz, S., Abdel-latif, H. M. R., Alagawany, M., Abdul Kari, Z., Khairul Azhar Abdul Razab, M., Khalidah Abdul Hamid, N., Moonmanee, T., & Doan, H. Van. (2021). Exploring the Role of Dietary Herbal Essential Oils as Natural Antioxidative Agents in Aquaculture: A review. *Animals*, 12(823), 1–19.
- Dawood, M. A. O., Koshio, S., & Esteban, M. Á. (2018). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 950–974. <https://doi.org/10.1111/raq.12209>
- De FreitasSouza, C., Baldissera, M. D., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Martos-Sitcha, J. A., & Mancera, J. M. (2019). Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: A review. *Frontiers in Physiology*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00785>
- De Mercado, E., Larrán, A. M., Pinedo, J., & Tomás-Almenar, C. (2018). Skin mucous: A new approach to assess stress in rainbow trout. *Aquaculture*, 484, 90–97. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2017.10.031>
- de Moraes França Ferreira, P., da Silva Nascimento, L., Coelho Dias, D., da Veiga Moreira, D. M., Lúcia Salaro, A., Duca de Freitas, M. B., Souza Carneiro, A. P., & Sampaio Zuanon, J. A. (2014). Essential oregano oil as a growth promoter for the Yellowtail tetra, *Astyanax altiparanae*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(1), 28–34. <https://doi.org/10.1111/jwas.12094>

- de Oliveira, E. G., Pinheiro, A. B., de Oliveira, V. Q., da Silva, A. R. M., de Moraes, M. G., Rocha, Í. R. C. B., de Sousa, R. R., & Costa, F. H. F. (2012). Effects of stocking density on the performance of juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) in cages. *Aquaculture*, 370–371, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.027>
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*, 3(4), 25. <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>
- Diler, O., Gormez, O., Diler, I., & Metin, S. (2017). Effect of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, 23(4), 844–851. <https://doi.org/10.1111/anu.12451>
- Dinardo, F. R., Deflorio, M., Casalino, E., Crescenzo, G., & Centoducati, G. (2020). Effect of feed supplementation with *Origanum vulgare* L. essential oil on sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A preliminary framework on metabolic status and growth performances. *Aquaculture Reports*, 18, 100511. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100511>
- Dinardo, F. R., Maggiolino, A., Centoducati, G., Casalino, E., & Deflorio, M. (2021). A multi-biomarker approach in european sea bass exposed to dynamic temperature changes under dietary supplementation with *Origanum vulgare* essential oil. *Animals*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/ani11040982>
- Dong, Y., Jia, R., Hou, Y., Diao, W., Li, B., & Zhu, J. (2022). Effects of stocking density on the growth performance, mitophagy, endocytosis and metabolism of *Cherax quadricarinatus* in integrated rice–crayfish farming systems. *Frontiers in Physiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1040712>
- Dorothy, M. S., Vungarala, H., Sudhagar, A., Reddy, A. K., & Rani Asanaru Majeedkutty, B. (2021). Growth, body composition and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juveniles reared at different stocking densities in the biofloc system using inland saline groundwater. *Aquaculture Research*, 52(12), 6299–6307. <https://doi.org/10.1111/are.15493>
- Dorucu, M., Ispir, U., Colak, S., Altinterim, B., & Celayir, Y. (2009). The Effect of Black Cumin Seeds, *Nigella sativa*, on the Immune Response of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mediterranean Aquaculture Journal*, 2(1), 27–33. <https://doi.org/10.21608/maj.2009.2667>
- dos Santos, W. M., de Brito, T. S., de A. Prado S., de Oliveira, C. G., de Paula, A. C., de M. Hoyos, D. C., & Ribeiro, P. A. P. (2016). Cinnamon (*Cinnamomum* sp.) inclusion in diets for Nile tilapia submitted to acute hypoxic stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 54, 551–555. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.135>
- Doux fils, J., Deprez, M., Mandiki, S. N. M., Milla, S., Henrotte, E., Mathieu, C., Silvestre, F., Vandecan, M., Rougeot, C., Mélard, C., Dieu, M., Raes, M., &

- Kestemont, P. (2012). Physiological and proteomic responses to single and repeated hypoxia in juvenile Eurasian perch under domestication - Clues to physiological acclimation and humoral immune modulations. *Fish and Shellfish Immunology*, 33(5), 1112–1122. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.013>
- Dunlop, R., & Laming, P. (2005). Mechanoreceptive and nociceptive responses in the central nervous system of goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Pain*, 6(9), 561–568. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2005.02.010>
- Echevarría, G., Martínez-Bebíá, M., & Zamora, S. (1997). Evolution of biometric indices and plasma metabolites during prolonged starvation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology*, 118(1), 111–123. [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(96\)00416-1](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(96)00416-1)
- Eichenbaum, H., Dudchenko, P., Wood, E., Shapiro, M., & Tanila, H. (1999). The Hippocampus, Memory, Review and Place Cells: Is It Spatial Memory or a Memory Space? might occur at different locations. Olton and colleagues Neuron 210 Figure 1. Schematic Overhead Views of Four Different Types of Apparatus and Examples of Location-S. *Neuron*, 23, 209–226.
- Einen, O., Waagan, B., & Thomassen, M. S. (1998). Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 166(1–2), 85–104. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(98\)00279-8](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(98)00279-8)
- Elabd, H., Soror, E., El-Asely, A., El-Gawad, E. A., & Abbass, A. (2019). Dietary supplementation of Moringa leaf meal for Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Effect on growth and stress indices. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 45(3), 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.05.009>
- El-Hawarry, W. N., Mohamed, R. A., & Ibrahim, S. A. (2018). Collaborating effects of rearing density and oregano oil supplementation on growth, behavioral and stress response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(2), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.008>
- Ellis, T., North, B., Scott, A. P., Bromage, N. R., Porter, M., & Gadd, D. (2002). The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 61(3), 493–531. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2002.2057>
- Ellis, T., Yildiz, H. Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M. T., Tort, L., Øverli, Ø., & Martins, C. I. M. (2012). Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 163–188. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9568-y>
- El-Sayed, A. F. M. (2002). Effects of stocking density and feeding levels on growth and feed efficiency of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fry. *Aquaculture Research*, 33(8), 621–626. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00700.x>
- Emam, M., Caballero-Solares, A., Xue, X., Umasuthan, N., Milligan, B., Taylor, R. G., Balder, R., & Rise, M. L. (2022). Gill and Liver Transcript Expression Changes Associated With Gill Damage in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). In

- Encarna  o, P. (2016). Functional feed additives in aquaculture feeds. *Aquafeed Formulation*, 217–237. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800873-7.00005-1>
- Erol-florian, G., Aurel,  ., Molnar, F., & Ben, M. (2011). The Influence of Some Phytoadditives on Growth Performances and Meat Quality in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), 13–18.
- Eslamloo, K., & Falahatkar, B. (2014). Variations of some physiological and immunological parameters in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) subjected to an acute stressor. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 17(1), 29–42.
- Espirito Santo, A. H., Brito, T. S., Brand  o, L. L., Tavares, G. C., Leibowitz, M. P., Prado, S. A., Ferraz, V. P., Hoyos, D. C. M., Turra, E. M., Teixeira, E. A., Figueiredo, H. C. P., Leal, C. A. G., & Ribeiro, P. A. P. (2020). Dietary supplementation of dry oregano leaves increases the innate immunity and resistance of Nile tilapia against *Streptococcus agalactiae* infection. *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(2), 418–436. <https://doi.org/10.1111/jwas.12602>
- Evans, M. D., & Cooke, M. S. (2004). Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays*, 26(5), 533–542. <https://doi.org/10.1002/bies.20027>
- Fagundes, M., & Urbinati, E. C. (2008). Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. *Aquaculture*, 276(1–4), 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.006>
- Faheem, M., Abbas, R. Z., Liaqat, I., Hoseinifar, S. H., Maneepitaksanti, W., & Van Doan, H. (2022). Bio-active components in medicinal plants: A mechanistic review of their effects on fish growth and physiological parameters-A Review. *Annals of Animal Science*, 22(4), 1127–1149. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0030>
- FAO (2022a). The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. In *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- FAO (2022b). Cultured Aquatic Species Information Programme, SPARIDAE Linnaeus 1758. https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/sparus_aurata/en
- Farinon, B., Molinari, R., Costantini, L., & Merendino, N. (2020). The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional quality and potential functionality for human health and nutrition. *Nutrients*, 12(7), 1–60. <https://doi.org/10.3390/nu12071935>

- Farrell, A. P., & Richards, J. G. (2009). Chapter 11 Defining Hypoxia: An Integrative Synthesis of the Responses of Fish to Hypoxia. *Fish Physiology*, 27(C), 487–503. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)00011-3)
- Faught, E., & Vijayan, M. M. (2016). Mechanisms of cortisol action in fish hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 199, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.06.012>
- FAWC, (1979). Press statement. <http://www.fawc.org.uk/pdf/fivefreedoms1979.pdf>
- Fazelan, Z., Vatnikov, Y. A., Kulikov, E. V., Plushikov, V. G., & Yousefi, M. (2020). Effects of dietary ginger (*Zingiber officinale*) administration on growth performance and stress, immunological, and antioxidant responses of common carp (*Cyprinus carpio*) reared under high stocking density. *Aquaculture*, 518, 734833. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734833>
- Fazio, F. (2019). Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. *Aquaculture*, 500, 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.030>
- Fazio, F., Ferrantelli, V., Fortino, G., Arfuso, F., Giangrosso, G., & Faggio, C. (2015). The influence of acute handling stress on some blood parameters in cultured sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Italian Journal of Food Safety*, 4(1), 4–6. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.4174>
- Fazio, F., Filiciotto, F., Marafioti, S., Di Stefano, V., Assenza, A., Placenti, F., Buscaino, G., Piccione, G., & Mazzola, S. (2012). Automatic analysis to assess haematological parameters in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 45(1), 63–73. <https://doi.org/10.1080/10236244.2012.677559>
- Fazio, F., Marafioti, S., Arfuso, F., Piccione, G., & Faggio, C. (2013). Influence of different salinity on haematological and biochemical parameters of the widely cultured mullet, *Mugil cephalus*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 46(4), 211–218. <https://doi.org/10.1080/10236244.2013.817728>
- Fernö, A., Folkedal, O., Nilsson, J., Kristiansen, T. S., Fernö, A., Folkedal, O., Nilsson, J., & Kristiansen, T. S. (2020). *Inside the Fish Brain: Cognition, Learning and Consciousness*. 149–183. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41675-1_7
- Ferrari, S., Rey, S., Høglund, E., Øverli, Ø., Chatain, B., MacKenzie, S., & Bégout, M. L. (2020). Physiological responses during acute stress recovery depend on stress coping style in European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Physiology and Behavior*, 216(December 2019), 112801. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112801>

- Ferreira Pinto, J., Nunes, M. L., & Cardoso, C. (2007). Feeding interruption and quality of cultured gilthead sea bream. *Food Chemistry*, 100(4), 1504–1510. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.041>
- Ferreira, P. M. F., Caldas, D. W., Salaro, A. L., Sartori, S. S. R., Oliveira, J. M., Cardoso, A. J. S., & Zuanon, J. A. S. (2016). Intestinal and liver morphometry of the Yellow Tail Tetra (*Astyanax altiparanae*) fed with oregano oil. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 88(2), 911–922. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150202>
- Fivelstad, S., Hosfeld, C. D., Medhus, R. A., Olsen, A. B., & Kvamme, K. (2018). Growth and nephrocalcinosis for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolt exposed to elevated carbon dioxide partial pressures. *Aquaculture*, 482, 83–89.
- Flik, G., Klaren, P. H. M., Van Den Burg, E. H., Metz, J. R., & Huising, M. O. (2006). CRF and stress in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 146(1), 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.11.005>
- Flos, R., Reig, L., Torres, P., & Tort, L. (1988). Primary and secondary stress responses to grading and hauling in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 71(1–2), 99–106. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90277-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90277-3)
- Fokkema, D. S., & Scheurink, A. J. W. (1987). P. R. Wiepkema et al. (eds.), *Biology of Stress in Farm Animals: An Integrative Approach* © ECSC, EEC, EAEC, Brussels-Luxembourg 1987. 57–70.
- Forte, C., Branciarri, R., Pacetti, D., Miraglia, D., Ranucci, D., Acuti, G., Balzano, M., Frega, N. G., & Trabalza-Marinucci, M. (2018). Dietary oregano (*Origanum vulgare* L.) aqueous extract improves oxidative stability and consumer acceptance of meat enriched with CLA and n-3 PUFA in broilers. *Poultry Science*, 97(5), 1774–1785. <https://doi.org/10.3382/ps/pex452>
- Fountoulaki, E., Vasilaki, A., Hurtado, R., Grigorakis, K., Karacostas, I., Nengas, I., Rigos, G., Kotzamanis, Y., Venou, B., & Alexis, M. N. (2009). Fish oil substitution by vegetable oils in commercial diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.); effects on growth performance, flesh quality and fillet fatty acid profile. Recovery of fatty acid profiles by a fish oil finishing diet under fluctuati. *Aquaculture*, 289(3–4), 317–326. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.01.023>
- Fraser, D. (2009). Assessing animal welfare: different philosophies, different scientific approaches. *Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association*, 28(6), 507–518.
- Frisch, A. J., & Anderson, T. A. (2000). The response of coral trout (*Plectropomus leopardus*) to capture, handling and transport and shallow water stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 23(1), 23–34. <https://doi.org/10.1023/A:1007811302002>

- Froese, R. (2006). Cube law, condition factor and weight-length relationships: History, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22(4), 241–253. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x>
- Gallagher, M., & Chiba, A. A. (1996). The amygdala and emotion. *Current Opinion in Neurobiology*, 6(2), 221–227. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(96\)80076-6](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(96)80076-6)
- Ganga, R. (2011). Effect of feeding gilthead seabream (*Sparus aurata*) with different levels of n-3 and n-6 lipids vegetable oils on fish health and resistance to stress.
- García Beltrán, J. M., Silvera, D. G., Ruiz, C. E., Campo, V., Chupani, L., Faggio, C., & Esteban, M. Á. (2020). Effects of dietary *Origanum vulgare* on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) immune and antioxidant status. *Fish and Shellfish Immunology*, 99(January), 452–461. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.040>
- Gaylord, T. G., & Gatlin, D. M. (2001). Dietary protein and energy modifications to maximize compensatory growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 194(3–4), 337–348. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00523-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00523-8)
- Gesto, M., López-Patño, M. A., Hernández, J., Soengas, J. L., & Míguez, J. M. (2013). The response of brain serotonergic and dopaminergic systems to an acute stressor in rainbow trout: A time course study. *Journal of Experimental Biology*, 216(23), 4435–4442. <https://doi.org/10.1242/jeb.091751>
- Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S. H., Adorian, T. J., Goulart Ferrigolo, F. R., Raissy, M., & Van Doan, H. (2021). The effects of combined inclusion of *Malvae sylvestris*, *Origanum vulgare*, and *Allium hirtifolium* boiss for common carp (*Cyprinus carpio*) diet: Growth performance, antioxidant defense, and immunological parameters. *Fish and Shellfish Immunology*, 119(October), 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.10.014>
- Ghazi, S., Amjadian, T., & Norouzi, S. (2015). Single and combined effects of vitamin C and oregano essential oil in diet, on growth performance, and blood parameters of broiler chicks reared under heat stress condition. *International Journal of Biometeorology*, 59(8), 1019–1024. <https://doi.org/10.1007/s00484-014-0915-4>
- Giannenas, I. A., Florou-Paneri, P., Botsoglou, N. A., Christaki, E., & Spais, A. B. (2005). Effect of supplementing feed with oregano and/or α -tocopheryl acetate on growth of broiler chickens and oxidative stability of meat. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 14(3), 521–535. <https://doi.org/10.22358/jafs/67120/2005>
- Giannenas, I., Florou-Paneri, P., Papazahariadou, M., Christaki, E., Botsoglou, N. A., & Spais, A. B. (2003). Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Archives of Animal Nutrition*, 57(2), 99–106. <https://doi.org/10.1080/0003942031000107299>

- Goel, B., & Mishra, S. (2020). Medicinal and Nutritional Perspective of Cinnamon: A Mini-review. *European Journal of Medicinal Plants*, March, 10–16. <https://doi.org/10.9734/ejmp/2020/v31i330218>
- Golomazou, E., Malandrakis, E. E., Kavouras, M., Karatzinos, T., Miliou, H., Exadactylos, A., & Panagiotaki, P. (2016). Anaesthetic and genotoxic effect of medicinal plant extracts in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 464, 673–682. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.017>
- Gonçalves, A. T., Núñez-Acuña, G., Détrée, C., & Gallardo-Escárate, C. (2019). Coding/non-coding cross-talk in intestinal epithelium transcriptome gives insights on how fish respond to stocking density. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 29(October 2018), 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2018.10.005>
- Goncharova, N. D., Shmaliy, A. V., Bogatyrenko, T. N., & Koltover, V. K. (2006). Correlation between activity of antioxidant enzymes and circadian rhythms of corticosteroids in *Macaca mulatta* monkeys of different age. *Experimental Gerontology*, 41(8), 778–783. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.04.006>
- Gorissen, M., & Flik, G. (2016). The Endocrinology of the Stress Response in Fish: An Adaptation-Physiological View. In *Fish Physiology* (Vol. 35). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00003-5>
- Green, B. S., & McCormick, M. I. (1999). Influence of larval feeding history on the body condition of *Amphiprion melanopus*. *Journal of Fish Biology*, 55(6), 1273–1289. <https://doi.org/10.1006/jfbi.1999.1125>
- Gressler, L. T., Riffel, A. P. K., Parodi, T. V., Saccol, E. M. H., Koakoski, G., Da Costa, S. T., Pavanato, M. A., Heinzmann, B. M., Caron, B., Schmidt, D., Llesuy, S. F., Barcellos, L. J. G., & Baldisserotto, B. (2014). Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: Effect on stress response and antioxidant status. *Aquaculture Research*, 45(6), 1061–1072. <https://doi.org/10.1111/are.12043>
- Grutter, A. S., & Pankhurst, N. W. (2000). The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*. *Journal of Fish Biology*, 57(2), 391–401. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2000.1312>
- Habiba, M. M., Hussein, E. E., Ashry, A. M., El-Zayat, A. M., Hassan, A. M., El-Shehawi, A. M., Sewilam, H., Van Doan, H., & Dawood, M. A. O. (2021). Dietary cinnamon successfully enhanced the growth performance, growth hormone, antibacterial capacity, and immunity of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Animals*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/ani11072128>
- Habibi, E., Shokrzadeh, M., Chabra, A., Naghshvar, F., Keshavarz-Maleki, R., & Ahmadi, A. (2015). Protective effects of *Origanum vulgare* ethanol extract

- against cyclophosphamide-induced liver toxicity in mice. *Pharmaceutical Biology*, 53(1), 10–15. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.908399>
- Haghighi, M. (2015). Effect of *Origanum vulgare* Extract on Immune Responses and Hematological Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Oceanography & Fisheries Open Access Journal*, 6(3). <https://doi.org/10.19080/foaj.2018.06.555687>
- Hall & Bellwood. (1995). Histological effects of cyanide, stress and starvation on the intestinal mucosa of *Pomacentrus coelestis*, a marine aquarium fish species. *Journal of Fish Biology*, 47, 438–454.
- Hamed, H. S., Ismal, S. M., & Abdel-Tawwab, M. (2022). Modulatory effects of dietary cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) against waterborne lead toxicity in Nile tilapia fingerlings: Growth performance, haemato-biochemical, innate immunity, and hepatic antioxidant indices. *Aquaculture Reports*, 25, 101190. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101190>
- Hara, T. J. (1994). Olfaction and gustation in fish: an overview. *Acta Physiologica Scandinavica*, 152(2), 207–217. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1994.tb09800.x>
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., & Heo, M. S. (2011). Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317(1–4), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.039>
- Hassaan, M. S., & Soltan, M. A. (2016). Evaluation of essential oil of fennel and garlic separately or combined with *Bacillus licheniformis* on the growth, feeding behaviour, hemato-biochemical indices of *Oreochromis niloticus* (L.) fry. *J. Aquac. Res. Dev*, 7, 422–429.
- Hastein. (2005). *Science-based assessment of welfare : aquatic*. July 2014.
- He, Y., Yu, H., Zhao, H., Zhu, H., Zhang, Q., Wang, A., Shen, Y., Xu, X., & Li, J. (2021). Transcriptomic analysis to elucidate the effects of high stocking density on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *BMC Genomics*, 22(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07924-4>
- Hengsawat, K., Ward, F. J., & Jaruratjamorn, P. (1997). The effect of stocking density on yield, growth and mortality of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) cultured in cages. *Aquaculture*, 152(1–4), 67–76. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00008-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00008-2)
- Henry, J. (1993). Biological Basis of the Stress Response. *Physiology*, 8(2), 69–73. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.1993.8.2.69>
- Hinkle. (1987). Section C Stress and Disease : *New York*, 25(6), 561–566.
- Hohlenwerger, J. C., Eduardo Copatti, C., Cedraz Sena, A., David Couto, R., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Caron, B. O., & Schmidt, D. (2016). Could the essential oil of *Lippia alba* provide a readily available and cost-effective

- anaesthetic for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)? *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 49(2), 119–126.
<https://doi.org/10.1080/10236244.2015.1123869>
- Hongratanaworakit, T. (2009). Relaxing effect of rose oil on humans. *Natural Product Communications*, 4(2), 291–296.
<https://doi.org/10.1177/1934578x0900400226>
- Hoseini, S. M., Hoseinifar, S. H., & Doan, H. Van. (2018). Effect of dietary eucalyptol on stress markers, enzyme activities and immune indicators in serum and haematological characteristics of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to toxic concentration of ambient copper. *Aquaculture Research*, 49(9), 3045–3054.
<https://doi.org/10.1111/are.13765>
- Hoseini, S. M., Mirghaed, A. T., & Yousefi, M. (2018). Application of herbal anaesthetics in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*.
<https://doi.org/10.1111/raq.12245>
- Hoseini, S. M., Taheri Mirghaed, A., Paray, B. A., Hoseinifar, S. H., & Van Doan, H. (2020). Effects of dietary menthol on growth performance and antioxidant, immunological and biochemical responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 524(February), 735260.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735260>
- Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V. A., Kadri, S., Pottinger, T. G., Sandøe, P., & Turnbull, J. F. (2006). Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology*, 68(2), 332–372. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2006.001046.x>
- Huo, H., Yin, S., Jia, R., Huang, B., Lei, J., & Liu, B. (2017). Effect of crowding stress on the immune response in turbot (*Scophthalmus maximus*) vaccinated with attenuated *Edwardsiella tarda*. *Fish and Shellfish Immunology*, 67, 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.067>
- Hussain, M. A., Sumon, T. A., Mazumder, S. K., Ali, M. M., Jang, W. J., Abualreesh, M. H., ... & Hasan, M. T. (2021). Essential oils and chitosan as alternatives to chemical preservatives for fish and fisheries products: A review. *Food Control*, 129, 108244.
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R. S., & Eliassen, R. A. (2003). The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-STM and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*, 221(1–4), 549–566. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00111-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00111-X)
- Iwama, G. K., Afonso, L. O. B., Todgham, A., Ackerman, P., & Nakano, K. (2004). Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? *Journal of Experimental Biology*, 207(1), 15–19. <https://doi.org/10.1242/jeb.00707>
- Izquierdo, M. S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., Rosenlund, G., & Ginés, R. (2005). Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of

- fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture*, 250(1–2), 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.001>
- Jacela, J. Y., DeRouchey, J. M., Tokach, M. D., Goodband, R. D., Nelssen, J. L., Renter, D. G., & Dritz, S. S. (2010). Feed additives for swine: Fact sheets—prebiotics and probiotics, and phytochemicals. *Journal of Swine Health and Production*, 18(3), 132–136.
- Jafarpour, M., Amniat-Talab, A., & Nekuie-Fard, A. (2018). Genotoxicity and Histopathology Effects of *Melissa officinalis* Aqueous Extract on the Blood and Vital Tissues of *Oncorhynchus mykiss* Fish. *Iranian Journal of Toxicology*, 12(6), 13–18. <https://doi.org/10.32598/ijt.12.6.564.1>
- Jalali, M. A., Ahmadifar, E., Sudagar, M., & Takami, G. A. (2009). Growth efficiency, body composition, survival and haematological changes in great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juveniles fed diets supplemented with different levels of Ergosan. *Aquaculture Research*, 40(7), 804–809. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02166.x>
- Jang, E., Kim, H., Jang, S., Lee, J., Baek, S., In, S., Kim, E., Kim, Y. ung, & Han, E. (2020). Concentrations of THC, CBD, and CBN in commercial hemp seeds and hempseed oil sold in Korea. *Forensic Science International*, 306(November), 110064. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.110064>
- Jasim, S. A., Hafsani, H., Saleem, H. D., Kandeel, M., Khudhair, F., Yasin, G., Iswanto, A. H., Mohammed, H. T., Izzat, S. E., & Dadras, M. (2022). The synergistic effects of the probiotic (*Lactobacillus fermentum*) and cinnamon, *Cinnamomum* sp. powder on growth performance, intestinal microbiota, immunity, antioxidant defence and resistance to *Yersinia ruckeri* infection in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under high rearing density. *Aquaculture Research*, 53(17), 5957–5970. <https://doi.org/10.1111/are.16064>
- Javahery, S., Nekoubin, H., & Moradlu, A. H. (2012). Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(6), 1545–1552. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9682-5>
- Jayaprakash, G. K., & Rao, L. J. M. (2011). Chemistry, biogenesis, and biological activities of *Cinnamomum zeylanicum*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(6), 547–562. <https://doi.org/10.1080/10408391003699550>
- Jeffery, K. J., Anderson, M. I., Hayman, R., & Chakraborty, S. (2004). A proposed architecture for the neural representation of spatial context. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(2), 201–218. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.12.002>
- Jia, R., Liu, B. L., Han, C., Huang, B., & Lei, J. L. (2016). Influence of Stocking Density on Growth Performance, Antioxidant Status, and Physiological Response of Juvenile Turbot, *Scophthalmus maximus*, Reared in Land-based Recirculating Aquaculture System. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(4), 587–599. <https://doi.org/10.1111/jwas.12295>

- Jia, Y., Gao, Y., Chen, X., & Huang, B. (2018). Determination of optimal fasting time before blood sampling to get baseline data on serum biochemical characteristics in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 487(106), 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.009>
- Jobling, M., Covès, D., Damsgård, B., Kristiansen, H. R., Koskela, J., Petursdottir, T. E., ... & Gudmundsson, O. (2001). Techniques for measuring feed intake. *Food intake in fish*, 827, 49-87.
- Kalembe, D., & Kunicka, A. (2005). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813–829. <https://doi.org/10.2174/0929867033457719>
- Kamatou, G. P., Vermaak, I., & Viljoen, A. M. (2012). Eugenol - From the remote Maluku Islands to the international market place: A review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules*, 17(6), 6953–6981. <https://doi.org/10.3390/molecules17066953>
- Kamdem, J. P., Adeniran, A., Boligon, A. A., Klimaczewski, C. V., Elekofehinti, O. O., Hassan, W., Ibrahim, M., Waczuk, E. P., Meinerz, D. F., & Athayde, M. L. (2013). Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. *Industrial Crops and Products*, 51, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.056>
- Karakatsouli, N., Papoutsoglou, S. E., Pizzonia, G., Tsatsos, G., Tsopelakos, A., Chadio, S., Kalogiannis, D., Dalla, C., Polissidis, A., & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2007). Effects of light spectrum on growth and physiological status of gilthead seabream *Sparus aurata* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reared under recirculating system conditions. *Aquacultural Engineering*, 36(3), 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2007.01.005>
- Karapanagiotidis, I. T. (2017). Nutrient profiles of tilapia. *Tilapia in intensive co-culture*, 261-305.
- Kaushal, N., Gupta, M., & Kulshreshtha, E. (2020). Hempseed (*Cannabis sativa*) lipid fractions alleviate high-fat diet-induced fatty liver disease through regulation of inflammation and oxidative stress. *Heliyon*, 6(7), e04422. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04422>
- Key, B. (2016). Why fish do not feel pain. *Animal Sentience*, 1(3), 1. <https://doi.org/10.51291/2377-7478.1011>
- Khafaga, A. F., Naiel, M. A. E., Dawood, M. A. O., & Abdel-Latif, H. M. R. (2020). Dietary *Origanum vulgare* essential oil attenuates cypermethrin-induced biochemical changes, oxidative stress, histopathological alterations, apoptosis, and reduces DNA damage in Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*, 228(August), 105624. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105624>

- Khani, S., Sarvi Moghanlou, K., Imani, A., Agh, N., & Razi, M. (2017). The Protective Effect of Dietary Cinnamon Essential Oil (*Cinnamomum verum*) Supplementation in Reducing the Toxicity of Aflatoxin B1 to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fingerlings. *Journal of Fisheries*, 69(4), 481-495.
- Kim, E., Choi, Y., Jang, J., & Park, T. (2013). Carvacrol protects against hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet by enhancing SIRT1-AMPK signaling. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/290104>
- Kleinhenz, M. D., Magnin, G., Ensley, S. M., Griffin, J. J., Goeser, J., Lynch, E., & Coetzee, J. F. (2020). Nutrient concentrations, digestibility, and cannabinoid concentrations of industrial hemp plant components. *Applied Animal Science*, 36(4), 489–494. <https://doi.org/10.15232/aas.2020-02018>
- Knight, J. A. (2000). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 30(2), 145–158.
- Koek, G. H., Liedorp, P. R., & Bast, A. (2011). The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clinica Chimica Acta*, 412(15–16), 1297–1305. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2011.04.013>
- Kolling, G. J., Stivanin, S. C. B., Gabbi, A. M., Machado, F. S., Ferreira, A. L., Campos, M. M., Tomich, T. R., Cunha, C. S., Dill, S. W., Pereira, L. G. R., & Fischer, V. (2018). Performance and methane emissions in dairy cows fed oregano and green tea extracts as feed additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4221–4234. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13841>
- Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van Der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., Hopster, H., De Jong, I. C., Ruis, M. A. W., & Blokhuis, H. J. (1999). Coping styles in animals: Current status in behavior and stress- physiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23(7), 925–935. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00026-3](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00026-3)
- Korte, S. M., Olivier, B., & Koolhaas, J. M. (2007). A new animal welfare concept based on allostasis. *Physiology and Behavior*, 92(3), 422–428. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.10.018>
- Kvamme, B. O., Gadan, K., Finne-Fridell, F., Niklasson, L., Sundh, H., Sundell, K., Taranger, G. L., & Evensen, Ø. (2013). Modulation of innate immune responses in Atlantic salmon by chronic hypoxia-induced stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(1), 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.006>
- Lall, S. P., & Tibbetts, S. M. (2009). Nutrition, Feeding, and Behavior of Fish. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 12(2), 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2009.01.005>
- Lee, J. S., Jeon, S. M., Park, E. M., Huh, T. L., Kwon, O. S., Lee, M. K., & Choi, M. S. (2003). Cinnamate Supplementation Enhances Hepatic Lipid Metabolism and

- Antioxidant Defense Systems in High Cholesterol-Fed Rats. *Journal of Medicinal Food*, 6(3), 183–191. <https://doi.org/10.1089/10966200360716599>
- Lee, J. Y., & Gao, Y. (2012). Review of the Application of Garlic, *Allium sativum*, in Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(4), 447–458. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00581.x>
- Lee, K. W., Everts, H., & Beynen, A. C. (2004). Essential oils in broiler nutrition. *International Journal of Poultry Science*, 3(12), 738–752. <https://doi.org/10.3923/ijps.2004.738.752>
- Lee, R. F., & Steinert, S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 544(1), 43–64. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00017-6)
- Li, H., Xu, W., Jin, J., Yang, Y., Zhu, X., Han, D., Liu, H., & Xie, S. (2018). Effects of starvation on glucose and lipid metabolism in gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). *Aquaculture*, 496, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.015>
- Lillesaar, C. (2011). The serotonergic system in fish. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 41(4), 294–308. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.05.009>
- Lines, J. A., & Spence, J. (2012). Safeguarding the welfare of farmed fish at harvest. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 153–162. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9561-5>
- Liu, B., Fei, F., Li, X., Wang, X., & Huang, B. (2019). Effects of stocking density on stress response, innate immune parameters, and welfare of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture International*, 27(6), 1599–1612. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00413-2>
- Lynn, B. (1994). The fibre composition of cutaneous nerves and the classification and response properties of cutaneous afferents, with particular reference to nociception. *Pain Rev*, 1, 172–183.
- Mabrok, M. A. E., & Wahdan, A. (2018). The immune modulatory effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil on *Tilapia zillii* following intraperitoneal infection with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture International*, 26(4), 1147–1160. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0274-y>
- Magouz, F. I., Amer, A. A., Faisal, A., Sewilam, H., Aboelenin, S. M., & Dawood, M. A. O. (2022). The effects of dietary oregano essential oil on the growth performance, intestinal health, immune, and antioxidative responses of Nile tilapia under acute heat stress. *Aquaculture*, 548(P1), 737632. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737632>
- Malandrakis, E. E., Dadali, O., Golomazou, E., Kavouras, M., Dailianis, S., Chadio, S., Exadactylos, A., & Panagiotaki, P. (2016). DNA damage and differential gene expression associated with physical stress in gilthead seabream (*Sparus*

- aurata*). *General and Comparative Endocrinology*, 236, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.07.009>
- Manayi, A., Nabavi, S. M., Daglia, M., & Jafari, S. (2016). Natural terpenoids as a promising source for modulation of GABAergic system and treatment of neurological diseases. *Pharmacological Reports*, 68(4), 671–679. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.03.014>
- Maqsood, S., Benjakul, S., Abushelaibi, A., & Alam, A. (2014). Phenolic Compounds and Plant Phenolic Extracts as Natural Antioxidants in Prevention of Lipid Oxidation in Seafood: A Detailed Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1125–1140. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12106>
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., Gortzi, O., Izadi, M., & Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402–414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>
- Marples, N. M., & Roper, T. J. (1996). Effects of novel colour and smell on the response of naive chicks towards food and water. *Rothschild*, 1961, 1417–1424.
- Martín, Á., Varona, S., Navarrete, A., & Cocero, M. J. (2010). Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils. *The Open Chemical Engineering Journal*, 4(1).
- Martínez-Álvarez, R. M., Morales, A. E., & Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15(1–2), 75–88. <https://doi.org/10.1007/s11160-005-7846-4>
- Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L. R., & Ramos-Enriquez, R. (2009). Cortisol and glucose: Reliable indicators of fish stress? | ¿Cortisol y glucosa: Fiables indicadores de estrés de los peces? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(2).
- Martins, C. I. M., Galhardo, L., Noble, C., Damsgård, B., Spedicato, M. T., Zupa, W., Beauchaud, M., Kulczykowska, E., Massabuau, J. C., Carter, T., Planellas, S. R., & Kristiansen, T. (2012). Behavioural indicators of welfare in farmed fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 17–41. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9518-8>
- Martos-Sitcha, J. A., Wunderink, Y. S., Straatjes, J., Skrzynska, A. K., Mancera, J. M., & Martínez-Rodríguez, G. (2014). Different stressors induce differential responses of the CRH-stress system in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 177, 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.07.021>
- Mattson, H., & Crouse, R. (1982). Optimizing cholesterol the effect absorption of plant sterols in man13 on. *SciencesNew York*, 35(4), 697–700.

- Mazeaud, M. M., Mazeaud, F., & Donaldson, E. M. (1977). Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106(3), 201-212.
- McCue, M. D. (2010). Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 156(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.01.002>
- Melo, F. H. C., Venâncio, E. T., De Sousa, D. P., De França Fonteles, M. M., De Vasconcelos, S. M. M., Viana, G. S. B., & De Sousa, F. C. F. (2010). Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: Involvement with GABAergic transmission. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 24(4), 437–443. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00788.x>
- Metón, I., Fernández, F., & Baanante, I. V. (2003). Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 225(1–4), 99–107. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00281-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00281-3)
- Mettam, J. J., McCrohan, C. R., & Sneddon, L. U. (2012). Characterisation of chemosensory trigeminal receptors in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Responses to chemical irritants and carbon dioxide. *Journal of Experimental Biology*, 215(4), 685–693. <https://doi.org/10.1242/jeb.060350>
- Michiels, J., Missotten, J., Dierick, N., Fremaut, D., Maene, P., & De Smet, S. (2008). In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(13), 2371-2381.
- Mitchelmore, C. L., & Chipman, J. K. (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399(2), 135–147. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00252-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00252-2)
- Mohamed, R. A., Yousef, Y. M., El-Tras, W. F., & Khalafallaa, M. M. (2021). Dietary essential oil extract from sweet orange (*Citrus sinensis*) and bitter lemon (*Citrus limon*) peels improved Nile tilapia performance and health status. *Aquaculture Research*, 52(4), 1463-1479.
- Mohammadi, G., Rafiee, G., El Basuini, M. F., Van Doan, H., Ahmed, H. A., Dawood, M. A. O., & Abdel-Latif, H. M. R. (2020). Oregano (*Origanum vulgare*), St John's-wort (*Hypericum perforatum*), and lemon balm (*Melissa officinalis*) extracts improved the growth rate, antioxidative, and immunological responses in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Aeromonas hydrophil*. *Aquaculture Reports*, 18, 100445. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100445>

- Mohiti-Asli, M., & Ghanaatparast-Rashti, M. (2015). Dietary oregano essential oil alleviates experimentally induced coccidiosis in broilers. *Preventive Veterinary Medicine*, 120(2), 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.03.014>
- Molinero, A., Gomez, E., Balasch, J., & Tort, L. (1997). Stress by Fish Removal in the Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata*: A Time Course Study on the Remaining Fish in the Same Tank. *Journal of Applied Aquaculture*, 7(2), 1–12. https://doi.org/10.1300/J028v07n02_01
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., & Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9(3), 211–268. <https://doi.org/10.1023/A:1008924418720>
- Montero, D., Robaina, L. E., Socorro, J., Vergara, J. M., Tort, L., & Izquierdo, M. S. (2001). Alteration of liver and muscle fatty acid composition in gilthead seabream “*Sparus aurata*” juveniles held at high stocking density and fed an essential fatty acid deficient diet. *Fish Physiology and Biochemistry*, 24(1), 63–72. <https://doi.org/10.1023/A:1011145426543>
- Morales, A. E., Pérez-Jiménez, A., Carmen Hidalgo, M., Abellán, E., & Cardenete, G. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 139(1–3), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.10.008>
- Morales-Lange, B., Djordjevic, B., Gaudhaman, A., Press, C. M. L., Olson, J., Mydland, L. T., Mercado, L., Imarai, M., Castex, M., & Øverland, M. (2022). Dietary Inclusion of Hydrolyzed *Debaryomyces hansenii* Yeasts Modulates Physiological Responses in Plasma and Immune Organs of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Parr Exposed to Acute Hypoxia Stress. *Frontiers in Physiology*, 13(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.836810>
- Moreira, P. S. A., Pulman, K. G. T., & Pottinger, T. G. (2004). Extinction of a conditioned response in rainbow trout selected for high or low responsiveness to stress. *Hormones and Behavior*, 46(4), 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.05.003>
- Morel, Y., & Barouki, R. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochemical Journal*, 342(3), 481–496. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3420481>
- Moscariello, C., Matassa, S., Esposito, G., & Papirio, S. (2021). From residue to resource: The multifaceted environmental and bioeconomy potential of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Resources, Conservation and Recycling*, 175(August), 105864. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.105864>
- Mossa, A. T. H., Mohafrash, S. M., & Chandrasekaran, N. (2018). Safety of natural insecticides: toxic effects on experimental animals. *BioMed research international*, 2018.

- Muhammad, D. R. A., & Dewettinck, K. (2017). Cinnamon and its derivatives as potential ingredient in functional food—A review. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 2237–2263. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1369102>
- Munck, A., Guyre, P. M., & Holbrook, N. J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine reviews*, 5(1), 25–44.
- Namdeo, A. G. (2018). Cultivation of Medicinal and Aromatic Plants. In *Natural Products and Drug Discovery: an Integrated Approach*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102081-4.00020-4>
- Namjoo, A., Mirvakili, M., Shirzad, H., & Faghani, M. (2013). Biochemical, liver and renal toxicities of *Melissa officinalis* hydroalcoholic extract on balb/C mice. *Journal of HerbMed Pharmacology Journal Homepage: J HerbMed Pharmacol*, 2(2), 35–40.
- Nardocci, G., Navarro, C., Cortés, P. P., Imarai, M., Montoya, M., Valenzuela, B., Jara, P., Acuña-Castillo, C., & Fernández, R. (2014). Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 40(2), 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.001>
- Navarro, I., & Gutiérrez, J. (1995). Fasting and starvation. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 4(C), 393–434. [https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(06\)80020-2](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(06)80020-2)
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Ngahang Kamte, S. L., Ranjbarian, F., Cianfaglione, K., Sut, S., Dall’Acqua, S., Bruno, M., Afshar, F. H., Iannarelli, R., Benelli, G., Cappellacci, L., Hofer, A., Maggi, F., & Petrelli, R. (2018). Identification of highly effective antitrypanosomal compounds in essential oils from the Apiaceae family. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 154–165. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.032>
- Ni, M., Wen, H., Li, J., Chi, M., Bu, Y., Ren, Y., Zhang, M., Song, Z., & Ding, H. (2014). The physiological performance and immune responses of juvenile Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) to stocking density and hypoxia stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 36(2), 325–335. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.002>
- Nilsson, J., Kristiansen, T. S., Fosseidengen, J. E., Stien, L. H., Fernö, A., & van den Bos, R. (2010). Learning and anticipatory behaviour in a “sit-and-wait” predator: The Atlantic halibut. *Behavioural Processes*, 83(3), 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2009.12.008>
- Noble, C., Gismervik, K., Iversen, M. H., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L. H., & Turnbull, J. F. (2020). Welfare Indicators for farmed rainbow trout: tools for assessing fish welfare.

- Nordgreen, J., Horsberg, T. E., Ranheim, B., & Chen, A. C. N. (2007). Somatosensory evoked potentials in the telencephalon of Atlantic salmon (*Salmo salar*) following galvanic stimulation of the tail. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 193(12), 1235–1242. <https://doi.org/10.1007/S00359-007-0283-1/FIGURES/4>
- North, B. P., Turnbull, J. F., Ellis, T., Porter, M. J., Migaud, H., Bron, J., & Bromage, N. R. (2006). The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 255(1–4), 466–479. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.01.004>
- Ocaña-Fuentes, A., Arranz-Gutiérrez, E., Señorans, F. J., & Reglero, G. (2010). Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essential oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1568–1575. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.026>
- Okano, S., Honda, Y., Kodama, T., & Kimura, M. (2019). The effects of frankincense essential oil on stress in rats. *Journal of Oleo Science*, 68(10), 1003–1009. <https://doi.org/10.5650/jos.ess19114>
- Olesen, I., Myhr, A. I., & Rosendal, G. K. (2011). Sustainable aquaculture: are we getting there? Ethical perspectives on salmon farming. *Journal of agricultural and environmental ethics*, 24, 381–408.
- Oliva-Teles, A. (2012). Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases*, 35(2), 83–108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x>
- Oliveira-Júnior, J. C. de, Aguiar, G. A. C. C. de, Carneiro, C. L. da S., Ladeira, A. L. F., Campelo, D. A. V., Furuya, W. M., Dos Santos, F. A. C., Zuanon, J. A. S., Luz, R. K., & Salaro, A. L. (2021). Effects of different ratios of crude protein and non-fibrous carbohydrates on growth, metabolism, physiology, nutrient utilization and muscle cellularity of *Lophiosilurus alexandri*, a carnivorous freshwater fish. *Aquaculture*, 540(March). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736685>
- Olsen, R. L., & Hasan, M. R. (2012). A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*, 27(2), 120–128.
- Olsen. (2008). The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod, *Gadus morhua* L. 280, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.05.006>
- Oniga, I., Pus, C., Silaghi-Dumitrescu, R., Olah, N. K., Sevastre, B., Marica, R., Marcus, I., Sevastre-Berghian, A. C., Benedec, D., Pop, C. E., & Hanganu, D. (2018). *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*: Chemical composition and biological studies. *Molecules*, 23(8). <https://doi.org/10.3390/molecules23082077>

- Oomah, B. D., Busson, M., Godfrey, D. V., & Drover, J. C. G. (2002). Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 76(1), 33–43. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00245-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00245-X)
- Ortuño, J., Esteban, M. A., & Meseguer, J. (2002). Effects of phenoxyethanol on the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) exposed to crowding stress. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 89(1–2), 29–36. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00183-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00183-6)
- Oussalah, M., Caillet, S., & Lacroix, M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69(5), 1046–1055. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.5.1046>
- Øverli, Ø., Sørensen, C., Kiessling, A., Pottinger, T. G., & Gjøs, H. M. (2006). Selection for improved stress tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leads to reduced feed waste. *Aquaculture*, 261(2), 776–781. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.049>
- Øverli, Ø., Sørensen, C., Pulman, K. G. T., Pottinger, T. G., Korzan, W., Summers, C. H., & Nilsson, G. E. (2007). Evolutionary background for stress-coping styles: Relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31(3), 396–412. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.10.006>
- Øverli, Ø., Winberg, S., & Pottinger, T. G. (2005). Behavioral and neuroendocrine correlates of selection for stress responsiveness in rainbow trout - A review. *Integrative and Comparative Biology*, 45(3), 463–474. <https://doi.org/10.1093/icb/45.3.463>
- Oyarzún, R., Paredes, R., Saravia, J., Morera, F. J., Muñoz, J. L. P., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J. M., & Vargas-Chacoff, L. (2020). Stocking density affects the growth performance, intermediary metabolism, osmoregulation, and response to stress in Patagonian blennie *Eleginops maclovinus*. *Aquaculture*, 515, 734565. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734565>
- Özel, O. T., Çakmak, E., Gürkan, S. E., Coskun, İ., & Türe, M. (2022). Evaluation of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil supplementation on growth performance, digestive enzymes, intestinal histomorphology and gut microbiota of Black Sea salmon, *Salmo labrax*. *Annals of Animal Science*, 22(2), 763–772. <https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0068>
- Pandelides, Z., Thornton, C., Faruque, A. S., Whitehead, A. P., Willett, K. L., & Ashpole, N. M. (2020). Developmental exposure to cannabidiol (CBD) alters longevity and health span of zebrafish (*Danio rerio*). *GeroScience*, 42(2), 785–800. <https://doi.org/10.1007/s11357-020-00182-4>
- Papoutsoglou, S. E., Karakatsouli, N., Batzina, A., Papoutsoglou, E. S., & Tsopelakos, A. (2008). Effect of music stimulus on gilthead seabream *Sparus*

- aurata* physiology under different light intensity in a re-circulating water system. *Journal of Fish Biology*, 73(4), 980–1004. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02001.x>
- Pascual, P., Pedrajas, J. R., Toribio, F., López-Barea, J., & Peinado, J. (2003). Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chemico-Biological Interactions*, 145(2), 191–199. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(03\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(03)00002-4)
- Paul, E. S., Harding, E. J., & Mendl, M. (2005). Measuring emotional processes in animals: The utility of a cognitive approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(3), 469–491. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.01.002>
- Pavlidis, M. A., & Mylonas, C. C. (Eds.). (2011). *Sparidae: Biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species*. John Wiley & Sons.
- Peres, H., Santos, S., & Oliva-Teles, A. (2011). Lack of compensatory growth response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles following starvation and subsequent refeeding. *Aquaculture*, 318(3–4), 384–388. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.010>
- Pérez-Sánchez, J., Benedito-Palos, L., Estensoro, I., Petropoulos, Y., Caldach-Giner, J. A., Browdy, C. L., & Sitjà-Bobadilla, A. (2015). Effects of dietary NEXT ENHANCE®150 on growth performance and expression of immune and intestinal integrity related genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 44(1), 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.039>
- Pérez-Sánchez, J., Borrel, M., Bermejo-Nogales, A., Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Caldach-Giner, J. A., & Kaushik, S. (2013). Dietary oils mediate cortisol kinetics and the hepatic mRNA expression profile of stress-responsive genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to crowding stress. Implications on energy homeostasis and stress susceptibility. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 8(2), 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2013.02.001>
- Perry, S. F., Jonz, M. G., & Gilmour, K. M. (2009). Chapter 5 Oxygen Sensing And The Hypoxic Ventilatory Response. In *Fish Physiology* (1st ed., Vol. 27, Issue C). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)00005-8](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)00005-8)
- Petrolli, T. G., Albino, L. F. T., Rostagno, H. S., Gomes, P. C., Tavernari, F. de C., & Balbino, E. M. (2012). Herbal extracts in diets for broilers. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(7), 1683–1690. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000700018>
- Phillips, C., Cassia, M., Atlanta, G., & Mancera, K. F. (n.d.). *Animal Welfare Volume 20 Series Editor*.

- Pickering, A. D., & Pottinger, T. G. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7(1–6), 253–258. <https://doi.org/10.1007/BF00004714>
- Pottinger, T. G. (2010). A multivariate comparison of the stress response in three salmonid and three cyprinid species: Evidence for inter-family differences. *Journal of Fish Biology*, 76(3), 601–621. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02516.x>
- Pottinger, T. G., & Carrick, T. R. (2001a). ACTH does not mediate divergent stress responsiveness in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 129(2–3), 399–404. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(00\)00357-3](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00357-3)
- Pottinger, T. G., & Carrick, T. R. (2001b). Stress responsiveness affects dominant-subordinate relationships in rainbow trout. *Hormones and Behavior*, 40(3), 419–427. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1707>
- Poursaeid, S., & Falahatkar, B. (2022). Starvation alters growth, stress metabolites and physiological responses in juvenile great sturgeon (*Huso huso*). *Animal Feed Science and Technology*, 294, 115429. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2022.115429>
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. *Food Control*, 47, 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.023>
- Radhakrishnan, S., Saravana Bhavan, P., Seenivasan, C., Muralisankar, T., & Shanthi, R. (2015). Effects of native medicinal herbs (*Alternanthera sessilis*, *Eclipta alba* and *Cissus quadrangularis*) on growth performance, digestive enzymes and biochemical constituents of the monsoon river prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. *Aquaculture Nutrition*, 21(4), 496–506. <https://doi.org/10.1111/anu.12180>
- Rafieepour, A., Hajirezaee, S., & Rahimi, R. (2019). Dietary oregano extract (*Origanum vulgare* L.) enhances the antioxidant defence in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* against toxicity induced by organophosphorus pesticide, diazinon. *Toxin Reviews*, 39(4), 397–407. <https://doi.org/10.1080/15569543.2018.1550092>
- Rafieepour, A., Hajirezaee, S., & Rahimi, R. (2020). Moderating effects of dietary oregano extract (*Origanum vulgare*) on the toxicity induced by organophosphate pesticide, diazinon in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Metabolic hormones, histology and growth parameters. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 20(3), 207–219. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v20_3_05
- Rahmawati, F. F., & Ubaidillah, M. F. (2018). The Effect of *Cinnamomum* Leaves (*Cinnamomum burmanni*) Supplementation at Different Dosages on Growth and

- Survival Rate of Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquacultura Indonesiana*, 18(2), 62. <https://doi.org/10.21534/ai.v18i2.111>
- Ranasinghe, P., Pigera, S., Premakumara, G. S., Galappaththy, P., Constantine, G. R., & Katulanda, P. (2013). Medicinal properties of “true” cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): A systematic review. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-275>
- Ranucci, D., Beghelli, D., Trabalza-Marinucci, M., Branciarri, R., Forte, C., Olivieri, O., Badillo Pazmay, G. V., Cavallucci, C., & Acuti, G. (2015). Dietary effects of a mix derived from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil and sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood extract on pig performance, oxidative status and pork quality traits. *Meat Science*, 100, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.09.149>
- Rashidian, G., Kajbaf, K., Prokić, M. D., & Faggio, C. (2020). Extract of common mallow (*Malva sylvestris*) enhances growth, immunity, and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings against *Yersinia ruckeri* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 96, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.018>
- Ravardshiri, M., Bahram, S., Javadian, S. R., & Bahrekazemi, M. (2021). Cinnamon promotes growth performance, digestive enzyme, blood parameters, and antioxidant activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in low-carbohydrate diets. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 21(7), 309–322. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v21_7_01
- Raza, T., Chand, N., Khan, R. U., Shahid, M. S., & Abudabos, A. M. (2016). Improving the fatty acid profile in egg yolk through the use of hempseed (*Cannabis sativa*), ginger (*Zingiber officinale*), and turmeric (*Curcuma longa*) in the diet of Hy-Line White Leghorns. *Archives Animal Breeding*, 59(2), 183–190. <https://doi.org/10.5194/aab-59-183-2016>
- Readman. (2013). Fish-kill method questioned SOFIA irons out technical kinks. *Nature*, 506, 9–10.
- Redžić, S., Hodžić, N., & Tuka, M. (2005). Plant pigments (antioxidants) of medicinal plants *Malva silvestris* L. and *Malva moschata* L. (Malvaceae). *Bosnian journal of basic medical sciences*, 5(2), 53.
- Regoli, F., & Giuliani, M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*, 93, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.006>
- Reyes-Jurado, F., Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Engineering Reviews*, 7(3), 275–297. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9099-2>

- Riella, K. R., Marinho, R. R., Santos, J. S., Pereira-Filho, R. N., Cardoso, J. C., Albuquerque-Junior, R. L. C., & Thomazzi, S. M. (2012). Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 656–663. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.028>
- Robinson, M. K., Rustum, K. R., Chambers, E. A., Rounds, J. D., Wilmore, D. W., & Jacobs, D. O. (1997). Starvation enhances hepatic free radical release following endotoxemia. *Journal of Surgical Research*, 69(2), 325–330. <https://doi.org/10.1006/jsre.1997.5062>
- Roomiani, L., Ghaeni, M., Moarref, M., Fallahi, R., & Lakzaie, F. (2019). The effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil on the quality changes and fatty acids of *Ctenopharyngodon idella*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 18(1), 95–109. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2018.117437>
- Roques, J. A. C., Abbink, W., Geurds, F., van de Vis, H., & Flik, G. (2010). Tailfin clipping, a painful procedure: Studies on Nile tilapia and common carp. *Physiology and Behavior*, 101(4), 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.08.001>
- Rose, J. D. (2002). The Neurobehavioral Nature of Fishes and the Question of Awareness and Pain. *Reviews in Fisheries Science*, 10(1), 1–38. <https://doi.org/10.1080/20026491051668>
- Rose, J. D., Arlinghaus, R., Cooke, S. J., Diggles, B. K., Sawynok, W., Stevens, E. D., & Wynne, C. D. L. (2014). Can fish really feel pain? *Fish and Fisheries*, 15(1), 97–133. <https://doi.org/10.1111/faf.12010>
- Ross, L. G., & Ross, B. (2009). *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. John Wiley & Sons.
- Ruane, N. M., Nolan, D. T., Rotllant, J., Costelloe, J., & Wendelaar Bonga, S. E. (2000). Experimental exposure of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to the infective stages of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) influences the physiological response to an acute stressor. *Fish and Shellfish Immunology*, 10(5), 451–463. <https://doi.org/10.1006/fsim.1999.0260>
- Rudiansyah, M., Abdelbasset, W. K., Jasim, S. A., Mohammadi, G., Dharmarajlu, S. M., Nasirin, C., Turki Jalil, A., Opulencia, M. J. C., Kadhém Abid, M., & Shahbazi Naserabad, S. (2022). Beneficial alterations in growth performance, blood biochemicals, immune responses, and antioxidant capacity of common carp (*Cyprinus carpio*) fed a blend of *Thymus vulgaris*, *Origanum majorana*, and *Satureja hortensis* extracts. *Aquaculture*, 555, 738254. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738254>
- Ruiz-Gomez, M. de L., Huntingford, F. A., Øverli, Ø., Thörnqvist, P. O., & Höglund, E. (2011). Response to environmental change in rainbow trout selected for divergent stress coping styles. *Physiology and Behavior*, 102(3–4), 317–322. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.11.023>

- Saad, N. Y., Muller, C. D., & Lobstein, A. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 28(5), 269–279. <https://doi.org/10.1002/ffj.3165>
- Saccol, E. M. H., Jerez-Cepa, I., Ourique, G. M., Pês, T. S., Gressler, L. T., Mourão, R. H. V., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J. M., Baldisserotto, B., Pavanato, M. A., & Martos-Sitcha, J. A. (2018). *Myrcia sylvatica* essential oil mitigates molecular, biochemical and physiological alterations in *Rhamdia quelen* under different stress events associated to transport. *Research in Veterinary Science*, 117, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.12.009>
- Saccol, E. M. H., Parrado-Sanabria, Y. A., Gagliardi, L., Jerez-Cepa, I., Mourão, R. H. V., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B., Pavanato, M. A., Mancera, J. M., & Martos-Sitcha, J. A. (2018). *Myrcia sylvatica* essential oil in the diet of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) attenuates the stress response induced by high stocking density. *Aquaculture Nutrition*, 24(5), 1381–1392. <https://doi.org/10.1111/anu.12675>
- Saccol, E. M. H., Toni, C., Pês, T. S., Ourique, G. M., Gressler, L. T., Silva, L. V. F., Mourão, R. H. V., Oliveira, R. B., Baldisserotto, B., & Pavanato, M. A. (2017). Anaesthetic and antioxidant effects of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils on tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture Research*, 48(5), 2012–2031. <https://doi.org/10.1111/are.13034>
- Sado, R. Y., Bicudo, Á. J. de A., & Cyrino, J. E. P. (2014). Hematology of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed graded levels of mannan oligosaccharides (MOS). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 42(1), 30–39. <https://doi.org/10.3856/vol42-issue1-fulltext-3>
- Saeed, M., Kamboh, A. A., Syed, S. F., Babazadeh, D., Suheryani, I., Shah, Q. A., Umar, M., Kakar, I., Naveed, M., El-Hack, M. E. A., Alagawany, M., & Chao, S. (2018). Phytochemistry and beneficial impacts of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) as a dietary supplement in poultry diets. *World's Poultry Science Journal*, 74(2), 331–345. <https://doi.org/10.1017/S0043933918000235>
- Salas, C., Broglio, C., Durán, E., Gómez, A., Ocaña, F. M., Jiménez-moya, F., & Rodríguez, F. (2006). Vertebrate Brain Evolution. *Zebrafish*, 3(2), 157–171.
- Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D., Planas, J. V., Infante, C., Cañavate, J. P., & Manchado, M. (2010). Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(2), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.006>
- Salena, M. G., Turko, A. J., Singh, A., Pathak, A., Hughes, E., Brown, C., & Balshine, S. (2021). Understanding fish cognition: a review and appraisal of current practices. *Animal Cognition*, 24(3), 395–406. <https://doi.org/10.1007/s10071-021-01488-2>

- Salentijn, E. M. J., Zhang, Q., Amaducci, S., Yang, M., & Trindade, L. M. (2015). New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial Crops and Products*, 68, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.011>
- Samaras, A., Santo, C. E., Papandroulakis, N., Mitrizakis, N., Pavlidis, M., Höglund, E., Pelgrim, T. N. M., Zethof, J., Spanings, F. A. T., Vindas, M. A., Ebbesson, L. O. E., Flik, G., & Gorissen, M. (2018). Allostatic load and stress physiology in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Frontiers in Endocrinology*, 9(AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00451>
- Samaras, A., Tsoukali, P., Katsika, L., Pavlidis, M., & Papadakis, I. E. (2023). Chronic impact of exposure to low dissolved oxygen on the physiology of *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* and its effects on the acute stress response. *Aquaculture*, 562, 738830. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738830>
- Saoud, I. P., Babikian, J., Nasser, N., & Monzer, S. (2018). Effect of cannabis oil on growth performance, haematology and metabolism of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research*, 49(2), 809–815. <https://doi.org/10.1111/are.13512>
- Sapolsky, R. M. (1992). *Stress, the aging brain, and the mechanisms of neuron death*. the MIT Press.
- Sary, C., Carbonera, F., Silva, M. C. da, Oliveira, M., Lewandowski, V., Todesco, H., Visentainer, J. V., Prado, I. N. do, & Ribeiro, R. P. (2019). Effect of clove (*Eugenia caryophyllus*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oils in Nile tilapia diets on performance, antioxidant power and lipid oxidation in fillets. *Aquaculture Research*, 50(2), 673–679. <https://doi.org/10.1111/are.13944>
- Schaffer, A., Caicoya, A. L., Holland, R., Fersen, L. Von, & Widdig, A. (2021). Neophobia in 10 ungulate species—a comparative approach. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. <https://doi.org/10.1007/s00265-021-03041-0>
- Schier, A., Ribeiro, N., Coutinho, D., Machado, S., Arias-Carrion, O., Crippa, J., Zuardi, A., Nardi, A., & Silva, A. (2014). Antidepressant-Like and Anxiolytic-Like Effects of Cannabidiol: A Chemical Compound of *Cannabis sativa*. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 13(6), 953–960. <https://doi.org/10.2174/1871527313666140612114838>
- Schreck, C. B., & Tort, L. (2016). The Concept of Stress in Fish. In *Fish Physiology* (First Edit, Vol. 35). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1>
- Segner, H., Reiser, S., Ruane, N., Rösch, R., Steinhagen, D., & Vehanen, T. (2019). Welfare of fishes in aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1189. Budapest, FAO.
- Selye, H. (1956). *The stress of life*.

- Setiawati, M., Jusadi, D., Laheng, S., Suprayudi, M. A., & Vinasyiam, A. (2016). The enhancement of growth performance and feed efficiency of Asian catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* fed on *Cinnamomum burmannii* leaf powder and extract as nutritional supplementation. *AACL Bioflux*, 9(6), 1301–1309.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2009). Antibacterial and antioxidant effects of five spice and herb extracts as natural preservatives of raw pork. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(11), 1879–1885. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3667>
- Shearer, K. D. (1994). Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture*, 119(1), 63–88. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90444-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90444-8)
- Shimna, K., Krishnamurthy, K. S., & Shamina, A. (2017). Coumarin, essential oil and total phenol levels in bark and leaves of *Cinnamomum* species. *Journal of Plantation Crops*, 45(3), 200–205. <https://doi.org/10.19071/jpc.2017.v45.i3.3345>
- Shourbela, R. M., El-Hawarry, W. N., Elfadadny, M. R., & Dawood, M. A. O. (2021). Oregano essential oil enhanced the growth performance, immunity, and antioxidative status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under intensive systems. *Aquaculture*, 542(October 2020), 736868. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736868>
- Sikkema, J., De Bont, J. A. M., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59(2), 201–222. <https://doi.org/10.1128/mmbr.59.2.201-222.1995>
- Silkin, Y. A., & Silkina, E. N. (2005). Effect of hypoxia on physiological-biochemical blood parameters in some marine fish. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 41(5), 527–532. <https://doi.org/10.1007/s10893-005-0092-5>
- Silote, G. P., Sartim, A., Sales, A., Eskelund, A., Guimarães, F. S., Wegener, G., & Joca, S. (2019). Emerging evidence for the antidepressant effect of cannabidiol and the underlying molecular mechanisms. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 98(December 2018), 104–116. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.04.006>
- Simić, A., Soković, M. D., Ristić, M., Grujić-Jovanović, S., Vukojević, J., & Marin, P. D. (2004). The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research*, 18(9), 713–717. <https://doi.org/10.1002/ptr.1516>
- Simitzis, P. E., Feggeros, K., Bizelis, J. A., & Deligeorgis, S. G. (2005). Behavioral reaction to essential oils dietary supplementation in sheep. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 21(5-6), 97-103.
- Singh, G., Maurya, S., deLampasona, M. P., & Catalan, C. A. N. (2007). A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 45(9), 1650–1661. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.02.031>

- Sirakov, I., & Ivancheva, E. (2008). Influence of stocking density on the growth performance of rainbow trout and brown trout grown in recirculation system. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 14(2), 150–154.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1202–1205. <https://doi.org/10.1021/jf950540t>
- Skrzynska, A. K., Gozdowska, M., Kulczykowska, E., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J. M., & Martos-Sitcha, J. A. (2017). The effect of starvation and re-feeding on vasotocinergic and isotocinergic pathways in immature gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 187(7), 945–958. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1064-y>
- Sluyter, F., Korte, S. M., Bohus, B., & Van Oortmerssen, G. A. (1996). Behavioral stress response of genetically selected aggressive and nonaggressive wild house mice in the shock-probe/defensive burying test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54(1), 113–116. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02164-7](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)02164-7)
- Small, B. C. (2005). Effect of fasting on nycthemeral concentrations of plasma growth hormone (GH), insulin-like growth factor I (IGF-I), and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 142(2), 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.07.008>
- Sneddon, L. U. (2002). Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. *Neuroscience Letters*, 319(3), 167–171. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02584-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02584-8)
- Sneddon, L. U. (2003a). The bold and the shy: Individual differences in rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 62(4), 971–975. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00084.x>
- Sneddon, L. U. (2003b). Trigeminal somatosensory innervation of the head of a teleost fish with particular reference to nociception. *Brain Research*, 972(1–2), 44–52. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02483-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02483-1)
- Sneddon, L. U. (2006). Ethics and welfare: Pain perception in fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 26(1), 6–10.
- Sneddon, L. U., & Sneddon, L. U. (2020). *Can Fish Experience Pain?* 229–249. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41675-1_10
- Sneddon, L. U., Braithwaite, V. A., & Gentle, M. J. (2003). Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1520), 1115–1121. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2349>

- Sopinka, N. M., Donaldson, M. R., O'Connor, C. M., Suski, C. D., & Cooke, S. J. (2016). Stress Indicators in Fish. In *Fish Physiology* (Vol. 35). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00011-4>
- Souza, C. de F., Salbego, J., Gressler, L. T., Golombieski, J. I., Ferst, J. G., Cunha, M. A., Heinzmann, B. M., Caron, B. O., Glanzner, W. G., Gonçalves, P. B. D., & Baldisserotto, B. (2015). *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), submitted to a stressful condition: Effect of dietary addition of the essential oil of *Lippia alba* on metabolism, osmoregulation and endocrinology. *Neotropical Ichthyology*, 13(4), 707–714. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140153>
- Starliper, C. E., Ketola, H. G., Noyes, A. D., Schill, W. B., Henson, F. G., Chalupnicki, M. A., & Dittman, D. E. (2015). An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp. *Journal of Advanced Research*, 6(1), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.12.007>
- Stoyanova, S., Zhelyazkov, G., Sirakov, I., Velichkova, K., & Staykov, Y. (2018). Influence of Dietary *Cinnamomum verum* Extract on the Growth and Economic Efficacy of Common Carp (*Cyprinus Carpio* L.), Reared in a Recirculation System. *Trakia Journal of Sciences*, 16(4), 307–312. <https://doi.org/10.15547/tjs.2018.04.007>
- Sumathi, M., Kalaiselvi, K., Palanivel, M., & Rajaguru, P. (2001). Genotoxicity of Textile Dye Effluent on Fish (*Cyprinus carpio*) Measured Using the Comet Assay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(3), 407–414. <https://doi.org/10.1007/s00128-001-0020-3>
- Sunyer, J. O., Gómez, E., Tort, L., Navarro, V., & Quesada, J. (1995). Physiological responses and depression of humoral components of the immune system in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) following daily acute stress. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(11), 2339–2346. <https://doi.org/10.1139/f95-826>
- Suski, C. D., Cooke, S. J., Danylchuk, A. J., O'Connor, C. M., Gravel, M. A., Redpath, T., Hanson, K. C., Gingerich, A. J., Murchie, K. J., Danylchuk, S. E., Koppelman, J. B., & Goldberg, T. L. (2007). Physiological disturbance and recovery dynamics of bonefish (*Albula vulpes*), a tropical marine fish, in response to variable exercise and exposure to air. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 148(3), 664–673. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.08.018>
- Sutili, F. J., Gatlin, D. M., Heinzmann, B. M., & Baldisserotto, B. (2018). Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 716–726. <https://doi.org/10.1111/raq.12197>
- Sutili, F. J., Velasquez, A., Pinheiro, C. G., Heinzmann, B. M., Gatlin, D. M., & Baldisserotto, B. (2016). Evaluation of *Ocimum americanum* essential oil as an additive in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Fish and Shellfish Immunology*, 56, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.07.008>

- Symeon, G. K., Zintilas, C., Demir, N., Bizelis, I. A., & Deligeorgis, S. G. (2010). Effects of oregano essential oil dietary supplementation on the feeding and drinking behaviour as well as the activity of broilers. *International Journal of Poultry Science*, 9(4), 401-405.
- Tager, L. R., & Krause, K. M. (2011). Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(5), 2455–2464. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3505>
- Takasao, N., Tsuji-Naito, K., Ishikura, S., Tamura, A., & Akagawa, M. (2012). Cinnamon extract promotes type I collagen biosynthesis via activation of IGF-I signaling in human dermal fibroblasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(5), 1193–1200. <https://doi.org/10.1021/jf2043357>
- Tal, Y., Schreier, H. J., Sowers, K. R., Stubblefield, J. D., Place, A. R., & Zohar, Y. (2009). Environmentally sustainable land-based marine aquaculture. *Aquaculture*, 286(1–2), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.043>
- Tartila, S. S. Q., Jusadi, D., Setiawati, M., & Fauzi, I. A. (2021). Evaluation of dietary supplementation with cinnamon products on growth, blood composition, liver structure, and meat quality of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Aquaculture International*, 29(5), 2243–2257. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00746-x>
- Teixeira, R. R., de Souza, R. C., Sena, A. C., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Couto, R. D., & Copatti, C. E. (2017). Essential oil of *Aloysia triphylla* in Nile tilapia: anaesthesia, stress parameters and sensory evaluation of fillets. *Aquaculture Research*, 48(7), 3383–3392. <https://doi.org/10.1111/are.13165>
- Teles, A. M., Rosa, T. D. D. S., Mouchrek, A. N., Abreu-Silva, A. L., Da Silva Calabrese, K., & Almeida-Souza, F. (2019). *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare*, and *Curcuma longa* essential oils: Chemical composition, antimicrobial and antileishmanial activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2421695>
- Teoh, C. Y., & Ng, W. K. (2016). The implications of substituting dietary fish oil with vegetable oils on the growth performance, fillet fatty acid profile and modulation of the fatty acid elongase, desaturase and oxidation activities of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp. *Aquaculture*, 465, 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.023>
- Terashima, S-I., & Liang, Y-F. (1994). C mechanical nociceptive neurons in the crotaline trigeminal ganglia. *Neuroscience letters*, 179(1–2), 33–36.
- Thomas, P., & Robertson, L. (1991). Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. *Aquaculture*, 96(1), 69–86. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90140-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90140-3)

- Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12), 1366–1375. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>
- Tort, L., Puigcerver, M., Crespo, S., & Padrós, F. (2002). Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. *Aquaculture Research*, 33(11), 907–910. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00741.x>
- Tort, L., Sunyer, J. O., Gómez, E., & Molinero, A. (1996). Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 51(1–2), 179–188. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05502-9](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05502-9)
- Trenzado, C. E., Morales, A. E., & de la Higuera, M. (2006). Physiological effects of crowding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness. *Aquaculture*, 258(1–4), 583–593. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.045>
- Trichet, V. V. (2010). Nutrition and immunity: An update. *Aquaculture Research*, 41(3), 356–372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02374.x>
- Turchini, G. M., Francis, D. S., Senadheera, S. P. S. D., Thanuthong, T., & De Silva, S. S. (2011). Fish oil replacement with different vegetable oils in Murray cod: Evidence of an “omega-3 sparing effect” by other dietary fatty acids. *Aquaculture*, 315(3–4), 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.016>
- Turchini, G. M., Torstensen, B. E., & Ng, W. K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 10–57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 40–53. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>
- Vodolazska, D., & Lauridsen, C. (2020). Effects of dietary hemp seed oil to sows on fatty acid profiles, nutritional and immune status of piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11, 1-18.
- Volpatti, D., Chiara, B., Tulli, F., & Marco, G. (2013). Growth parameters, innate immune response and resistance to *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum* of *Dicentrarchus labrax* fed carvacrol supplemented diets. *Aquaculture Research*, 45(1), 31–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03202.x>
- Vonapartis, E., Aubin, M. P., Seguin, P., Mustafa, A. F., & Charron, J. B. (2015). Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.11.004>

- Wang, Y., Xu, P., Nie, Z., Li, Q., Shao, N., & Xu, G. (2019). Growth, digestive enzymes activities, serum biochemical parameters and antioxidant status of juvenile genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at different stocking densities in in-pond raceway recirculating culture system. *Aquaculture Research*, 50(4), 1338–1347. <https://doi.org/10.1111/are.14010>
- Wassef, E. A., Wahby, O. M., & Sakr, E. M. (2007). Effect of dietary vegetable oils on health and liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*) growers. *Aquaculture Research*, 38(8), 852–861. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01738.x>
- Weber, F. J., & De Bont, J. A. M. (1996). Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 1286(3), 225–245. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00010-X)
- Webster, J. (2005). The assessment and implementation of animal welfare: Theory into practice. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 24(2), 723–734. <https://doi.org/10.20506/rst.24.2.1602>
- Wedemeyer, G. A. (1981). Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. *Stress and fish*, 247–275.
- Wendelaar Bonga, W. (1997). *The Stress Response in Fish*. 77(3).
- Wijesekera, R. O. B., & Chichester, C. O. (1978). The chemistry and technology of cinnamon. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 10(1), 1–30. <https://doi.org/10.1080/10408397809527243>
- Winberg, S., & Nilsson, G. E. (1993). Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Comparative*, 106(3), 597–614. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(93\)90216-8](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90216-8)
- Wong, Y. C., Ahmad-Mudzaqqir, M. Y., & Wan-Nurdiyana, W. A. (2014). Extraction of essential oil from cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*). *Oriental Journal of Chemistry*, 30(1), 37–47. <https://doi.org/10.13005/ojc/300105>
- Wood, C. M., Turner, J. D., & Graham, M. S. (1983). Why do fish die after severe exercise?. *Journal of Fish Biology*, 22(2), 189–201.
- Yang, C., Chowdhury, M. A. K., Hou, Y., & Gong, J. (2015). Phytogenic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: Potentials and challenges in application. *Pathogens*, 4(1), 137–156. <https://doi.org/10.3390/pathogens4010137>
- Yigit, N. O., Diler, O., Koca, S. B., & Gormez, O. (2017). Effect on histology and nutrient digestibility of supplemented *Origanum onites* essential oil to rainbow trout diets (*Oncorhynchus mykiss*). *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3), S262–S267. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.3s.26>

- Yilmaz, E., Ergün, S., & İlmaz, S. (2015). Influence of Carvacrol on the Growth Performance, Hematological, Non-Specific Immune and Serum Biochemistry Parameters in Rainbow Trout. *Food and Nutrition Sciences*, 06(05), 523–531. <https://doi.org/10.4236/fns.2015.65054>
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Young, R. F. (1977). Fiber spectrum of the trigeminal sensory root of frog, cat and man determined by electron microscopy. *Pain in the trigeminal region*, 137-160.
- Yousefi, M., Abtahi, B., & Kenari, A. A. (2012). Hematological, serum biochemical parameters, and physiological responses to acute stress of Beluga sturgeon (*Huso huso*, Linnaeus 1785) juveniles fed dietary nucleotide. *Comparative Clinical Pathology*, 21(5), 1043–1048. <https://doi.org/10.1007/s00580-011-1225-4>
- Yousefi, M., Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S. H., Rashidian, G., & Van Doan, H. (2021). Effects of dietary marjoram, *Origanum majorana* extract on growth performance, hematological, antioxidant, humoral and mucosal immune responses, and resistance of common carp, *Cyprinus carpio* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 108, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.11.019>
- Yousefi, M., Hoseini, S. M., Vatnikov, Y. A., Kulikov, E. V., & Drukovsky, S. G. (2019). Rosemary leaf powder improved growth performance, immune and antioxidant parameters, and crowding stress responses in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Aquaculture*, 505, 473–480. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.070>
- Yousefi, M., Naderi Farsani, M., Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S. H., & Van Doan, H. (2021). The effects of dietary supplementation of mistletoe (*Viscum album*) extract on the growth performance, antioxidant, and innate, immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 536, 736385. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736385>
- Zeng, Z., Zhang, S., Wang, H., & Piao, X. (2015). Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0004-5>
- Zengin, H. (2021). The effects of feeding and starvation on antioxidant defence, fatty acid composition and lipid peroxidation in reared *Oncorhynchus mykiss* fry. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96204-y>
- Zeppenfeld, C. C., Toni, C., Becker, A. G., Miron, D. dos S., Parodi, T. V., Heinzmann, B. M., Barcellos, L. J. G., Koakoski, G., Rosa, J. G. S. da, Loro, V. L., Cunha, M. A. da, & Baldisserotto, B. (2014). Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. *Aquaculture*, 418–419, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.013>

- Zhang, N., Zhang, L., Feng, L., & Yao, L. (2016). The anxiolytic effect of essential oil of *Cananga odorata* exposure on mice and determination of its major active constituents. *Phytomedicine*, 23(14), 1727–1734. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.10.017>
- Zhang, N., Zhang, L., Feng, L., & Yao, L. (2018). *Cananga odorata* essential oil reverses the anxiety induced by 1-(3-chlorophenyl) piperazine through regulating the MAPK pathway and serotonin system in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 219(November 2017), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.03.013>
- Zhang, R., Wang, X. W., Liu, L. L., Cao, Y. C., & Zhu, H. (2020). Dietary oregano essential oil improved the immune response, activity of digestive enzymes, and intestinal microbiota of the koi carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 518, 734781. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734781>
- Zheng, Z. L., Tan, J. Y. W., Liu, H. Y., Zhou, X. H., Xiang, X., & Wang, K. Y. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 292(3–4), 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.025>
- Zotti, M., Colaianna, M., Morgese, M. G., Tucci, P., Schiavone, S., Avato, P., & Trabace, L. (2013). Carvacrol: From ancient flavoring to neuromodulatory agent. *Molecules*, 18(6), 6161–6172. <https://doi.org/10.3390/molecules18066161>
- Γαρδέλη, Χ. (2009). *Μελέτη της χημικής σύστασης αιθέριων ελαίων ορισμένων αρωματικών φυτών της ελληνικής χλωρίδας*. (Διδακτορική διατριβή). Διαθέσιμο από: Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.
- ΕΛΟΠΥ, (2019). *Ευζωία Μεσογειακών Ιχθύων*. Fish from Greece
- ΕΛΟΠΥ, (2021). *Ετήσια Έκθεση Υδατοκαλλιέργειας 2021*
- ΕΛΟΠΥ, (2022). *Ετήσια Έκθεση Υδατοκαλλιέργειας 2022*
- Μαλανδράκης, Ε. (2014). *Καταπόνηση και ευζωία εντατικά εκτρεφόμενων ιχθύων* (Διδακτορική διατριβή). Διαθέσιμο από: Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.
- Παπουτσόγλου Σ.Ε. (2008). *Διατροφή ιχθύων*. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- Παπουτσόγλου, Σ. Ε. (1998). *Ενδοκρινολογία ιχθύων*. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- Σαράντης, Κ. (2010). *Αλληλεπίδραση υποδοχέων ντοπαμίνης με ιοντοτρόπους υποδοχείς γλουταμινικού οξέος και γ-αμινοβουτυρικού οξέος στον προμετωπιαίο φλοιό και ιππόκαμπο επίμυος* (Διδακτορική διατριβή). Διαθέσιμο από: Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.
- Τσοπελάκος, Α. (2021). *Επίδραση των λιπαρών οξέων της τροφής στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στην ανάπτυξη και στη σύσταση του σώματος του Ευρωπαϊκού*

λαβρακιού *Dicentrarchus labrax* L. (Διδακτορική διατριβή). Διαθέσιμο από: Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.

Φουντορμίτη, Μ. (2017). *Προσαρμοστικότητα αρωματικών φυτών στις ελληνικές συνθήκες και αντιμικροβιακή δράση των παραγομένων αιθέριων ελαίων* (Διδακτορική διατριβή). Διαθέσιμο από: Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.

8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

8.1. Χημικές αναλύσεις

8.1.1 Προσδιορισμός υγρασίας

Ο προσδιορισμός της υγρασίας στα πειραματικά σιτηρέσια και σε ολόκληρο το σώμα των ψαριών πραγματοποιήθηκε τοποθετώντας 2g δείγματος σε φούρνο αέρα για 24 ώρες σε θερμοκρασία 105°C (Association of Official Analytical Chemists, AOAC 1995). Στη συνέχεια, τα δισκία με το ξηρό δείγμα αφαιρέθηκαν από το φούρνο και τοποθετήθηκαν σε ξηραντήριο για να ψυχθούν.

Η ξηρή ουσία υπολογίστηκε από τους τύπους:

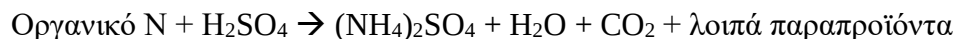
$$W_{\text{ξηρού δείγματος}} (\text{g}) = W_{\text{ξηρού (τελικού) δείγματος \& δισκίου}} (\text{g}) - W_{\text{δισκίου}} (\text{g})$$

$$\text{Ξηρά Ουσία (\%)} = (W_{\text{ξηρού δείγματος}} (\text{g}) \times 100) / W_{\text{αρχικού δείγματος}} (\text{g})$$

8.1.2 Προσδιορισμός αζωτούχων ενώσεων

Ο προσδιορισμός των αζωτούχων ενώσεων (ολικών πρωτεϊνών) των τροφών και του σώματος των ιχθύων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Kjeldahl (AOAC 1990). Αρχικά, ζυγίστηκαν 0,2g δείγματος και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες πέψης (digestion) με δύο ταμπλέτες καταλύτη Kjeltabs (5g Potassium Sulphate (K_2SO_4) και 5g Copper (II) Sulphate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), για να επιταχυνθεί η αντίδραση της πέψης. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 15 ml πυκνού H_2SO_4 σε κάθε σωλήνα και τοποθετήθηκαν στην ειδική συσκευή πέψης (Kjeltec 2000), που ήταν τοποθετημένη σε απαγωγό και τα δείγματα αφέθηκαν να χωνευτούν στους 150 °C (μέγιστη θερμοκρασία) για 85 min.

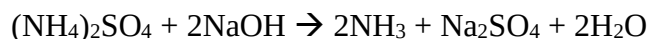
Κατά τη διαδικασία αυτή, πραγματοποιείται βρασμός σε πυκνό θειικό οξύ και διάσπαση όλων των αζωτούχων ουσιών και απελευθέρωση του αζώτου (N). Το αδέσμευτο άζωτο δεσμεύεται με την μορφή θειικού αμμωνίου, σύμφωνα με την παρακάτω χημική αντίδραση:



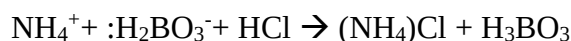
Μετά την πέψη και αφού τα δείγματα αφέθηκαν να κρυώσουν για 15min, ακολούθησε η διαδικασία της απόσταξης (distillation) στην ειδική συσκευή (Behr Labor-Technik, Germany). Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 100 ml απεσταγμένου H_2O , 80 ml NaOH και 50 ml H_3BO_3 . Ο συνολικός χρόνος της απόσταξης κάθε δείγματος ήταν 6min.

Το θειικό αμμώνιο που παράχθηκε κατά τη διαδικασία της πέψης, αντιδρά με το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) με αποτέλεσμα να αποδεσμεύεται αμμωνία (σε αέρια μορφή) και θειικό νάτριο (Na_2SO_4). Η αμμωνία στη συνέχεια αντιδρά με βορικό οξύ

και το άζωτο του δείγματος δεσμεύεται σε μορφή βορικού αμμωνίου, σύμφωνα με τις εξής αντιδράσεις:



Το βορικό αμμώνιο συγκεντρώνονταν σε κωνική φιάλη που περιείχε 4 σταγόνες ενός δείκτη pH (ερυθρού του μεθυλενίου). Το τελικό στάδιο της διαδικασίας αποτελεί η τιτλοδότηση (titration) του διαλύματος βορικού αμμωνίου με αραιό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (0,1N) σύμφωνα με την αντίδραση:



Η συγκέντρωση των ιόντων υδρογόνου που απαιτείται για να καταλύσουν την αντίδραση έως το τελικό σημείο, ισοδυναμεί με τη συγκέντρωση του αζώτου που περιέχει το δείγμα. Η κωνική φιάλη που περιείχε βορικό αμμώνιο τοποθετήθηκε σε θέση συνεχούς ανακίνησης και προσθέτονταν με αργό ρυθμό καταγεγραμμένη ποσότητα δεκατοκανονικού διαλύματος (0,1N) υδροχλωρικού οξέος. Η αλλαγή του χρώματος στο διάλυμα ομολογούσε το τελικό σημείο της αντίδρασης. Η περιεκτικότητα του δείγματος σε άζωτο (N %) υπολογίστηκε από τη σχέση :

$$\text{N}\% = [(\text{ml HCl} - \text{ml blank}) \times 0,8754 / W_{\text{δείγματος}}]$$

Όπου: Blank = η τιτλοδότηση κενής φιάλης (χωρίς δείγμα), η οποία χρησιμοποιείται ως συντελεστής διόρθωσης.

Από την περιεκτικότητα του αζώτου (N) στο δείγμα υπολογίστηκε η περιεχόμενη πρωτεΐνη σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Πρωτεΐνη (\%)} = \text{N (\%)} \times 6,25$$

Κατά μέσο όρο, οι πρωτεΐνες περιέχουν 16% άζωτο, έτσι η περιεκτικότητα σε άζωτο πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή 6,25.

8.1.3 Προσδιορισμός ολικών λιπαρών ενώσεων (μέθοδος Soxhlet)

Ο προσδιορισμός των ολικών λιπιδίων των τροφών και του ολόκληρου σώματος των ιχθύων έγινε με τη μέθοδο εκχύλισης Soxhlet (AOAC 1995). Σε προζυγισμένα γυάλινα δοχεία εκχύλισης τοποθετήθηκε ένα χάρτινο δοχείο ηθμού μέσα στο οποίο προστέθηκε 2 g δείγματος. Σε κάθε δοχείο εκχύλισης προστέθηκε οργανικός διαλύτης (150 ml πετρελαϊκού αιθέρα) και έγινε μεταφορά στην ειδική συσκευή εκχύλισης λιπαρών ουσιών (Soxtherm Multistat/SX PC, Sox-416 Macro, Gerhard, Germany). Κατά τη διαδικασία της εκχύλισης, τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 150 °C υπό την παρουσία του οργανικού διαλύτη, όπου έλαβε χώρα το πρώτο στάδιο της εκχύλισης. Στη συνέχεια, ο οργανικός διαλύτης απορροφήθηκε και εκπλύθηκε στο δείγμα για 1½ h, όπου έλαβε χώρα το δεύτερο στάδιο της εκχύλισης. Ο διαλύτης απορροφήθηκε για 15 min με αποτέλεσμα το ολικό λίπος του δείγματος να παραμείνει στον πάτο του δοχείου εκχύλισης.

Μετά την διαδικασία της εκχύλισης, τα δοχεία με τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε φούρνο στους 60°C για 10min προκειμένου να εξατμιστούν εντελώς τυχόν υπολείμματα του οργανικού διαλύτη ή/και υγρασίας που μπορεί να περιείχαν. Στη συνέχεια, τα δοχεία εκχύλισης μεταφέρθηκαν στον ξηραντήρα για μια ώρα περίπου ώστε να ψυχθούν. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ολικά λιπίδια προσδιορίστηκε με τη βοήθεια της σχέσης:

$$\text{Ολικά λιπίδια (\%)} = (W_{\text{τελικό δοχείο εκχύλισης (g)}} - W_{\text{αρχικό δοχείο εκχύλισης (g)}}) \times 100$$

όπου W= βάρος σε g

8.1.4 Προσδιορισμός λίπους και της σύστασης σε λιπαρά οξέα (μέθοδος Folch και Christie)

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε λίπος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Folch (Folch et al., 1957), με προσαρμογές που αφορούσαν την προσθήκη μεθανόλης (20% του συνολικού όγκου του δείγματος), με σκοπό τη μείωση ειδικού βάρους και τη διευκόλυνση της φυγοκέντρισης. Η επιλογή της φυγοκέντρισης σε σχέση με τη διήθηση έγινε λόγω της παραγωγής καθαρότερου εκχυλίσματος (Folch et al., 1957).

Δείγμα του σώματος ιχθύων 250-300mg τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου falcon. Έπειτα, προστέθηκαν 5ml διαλύματος χλωροφορμίου:μεθανόλης (2:1) και ακολούθησε ομογενοποίηση με συσκευή υπερήχων και προσθήκη 1ml μεθανόλης. Οι σωλήνες πωματίστηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 4300 στροφές/min για 10 min. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο υγρό μεταγγίστηκε σε αντίστοιχα σημασμένους δοκιμαστικούς σωλήνες και συμπληρωματικά, στο στερεό υπόλειμμα προστέθηκε 1ml του διαλύματος χλωροφορμίου:μεθανόλης, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση και προστέθηκαν 0,2ml μεθανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντριση στις 4300 στροφές/min για 10min και το υπερκείμενο υγρό συμπληρώθηκε στους αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες στους οποίους προστέθηκαν 2,4ml χλωροφορμίου και 2,4ml διαλύματος χλωριούχου καλίου 0,1N (8:4:3). Στη συνέχεια, έγινε ανάμειξη στη συσκευή vortex, έτσι ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των δύο φάσεων. Ακολούθησε πωματισμός και φυγοκέντριση, όπως παραπάνω. Τέλος, η απομείνουσα κάτω φάση μεταγγίστηκε σε προζυγισμένους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες και πραγματοποιήθηκε ξήρανση τους 50°C. Μετά την ξήρανση, οι δοκιμαστικοί σωλήνες ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας (Scientech, d=0,0001g) για τον προσδιορισμό της ποσότητας του λίπους.

Αφού συλλέχθηκε το λίπος, εστεροποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Christie (Christie, 1982; Christie, 1993), ώστε να γίνει προσδιορισμός της σύστασης του λίπους σε λιπαρά οξέα. Για κάθε 50mg λίπους, προστέθηκαν 2ml διαλύματος BHT σε μεθανόλη και 2% πυκνού διαλύματος H₂SO₄. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 50°C για περίπου 16h. Στη συνέχεια,

ακολούθησε διήθηση μέσα από φίλτρο GF/A, το οποίο περιείχε ποσότητα θεικού νατρίου Na_2SO_4 και εκπλύθηκε με εξάνιο. Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν για εξάτμιση σε ατμόσφαιρα αζώτου. Πριν την έγχυση σε αέριο χρωματογράφο με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GC/FID, Agilent Technologies 6890N), το εστεροποιημένο δείγμα αραιώθηκε με ποσότητα εξανίου, ανάλογης του αρχικού βάρους του λίπους που εξάχθηκε με τη μέθοδο Folch. Για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων, χρησιμοποιήθηκε στήλη Supelco OMEGAWAX 320 (L:30m, ID:0,32mm, DF:0,25 μm). Το φέρον αέριο ήταν Ήλιο (He) με ροή 2ml/min. Το πρόγραμμα θερμοκρασιών ήταν από τους 50°C έως τους 150°C με ρυθμό 40 °C/min και έπειτα έως τους 225 °C με ρυθμό 2 °C/min. Η αναγνώριση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων έγινε με βάση τα γνωστά δείγματα προτύπων Supelco 37 component FAME mix και Menhaden fish oil καθώς και το πρωτόκολλο AOCS Ce li-07, στο λογισμικό Chemstation (G1701DA Rev.01.02 SP1).

8.1.5 Προσδιορισμός ολικής ανόργανης ουσίας (τέφρας)

Η τέφρα αντιπροσωπεύει τη συνολική ανόργανη ουσία του δείγματος και προσδιορίστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο AOAC (1995) στα πειραματικά σιτηρέσια και σε ολόκληρο το σώμα των ψαριών.

Σε προζυγισμένο πυρίμαχο δοχείο ζυγίστηκε δείγμα ξηρής ουσίας (1-5g) και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε αποτεφρωτήρα (Nabertherm L9/12/C6, Lilienthal, Germany). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στους 600°C για τουλάχιστον 5h. Μετά την αποτέφρωση, τα δισκία τοποθετήθηκαν σε ξηραντήριο. Ο προσδιορισμός της τέφρας των δειγμάτων υπολογίστηκε ως εξής:

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε τέφρα (%) υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$\text{Τέφρα (\%)} = (W_{\text{αποτεφρωμένου δείγματος (g)}} \times 100) / W_{\text{αρχικού δείγματος (g)}}$$

όπου W= βάρος σε g

8.1.6 Προσδιορισμός θερμιδικής αξίας

Ο προσδιορισμός της ολικής ενέργειας στα πειραματικά σιτηρέσια και στο σώμα των ψαριών έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο AOAC (1995) και με τη βοήθεια αδιαβατικού θερμιδομέτρου (C5000; IKA Werke GmbH, Staufen, Germany). Η θερμιδική αξία (ολική ενέργεια) είναι η ποσότητα θερμότητας που εκλύεται από το δείγμα κατά την πλήρη καύση του με τελικά προϊόντα καύσης CO_2 και H_2O . Η καύση γίνεται εντός κλειστού δοχείου (θερμιδομέτρο τύπου οβίδας) και η θερμότητα που εκλύεται θερμαίνει ένα εξωτερικό δοχείο γνωστής θερμοκρασίας. Η αύξηση της θερμοκρασίας στο εξωτερικό δοχείο καταγράφεται με θερμόμετρο και μέσω αυτής υπολογίζεται το θερμιδικό περιεχόμενο του δείγματος που κάηκε. Το δείγμα βάρους 0,4g ζυγίζεται εντός μίας ειδικής κυψελίδας, η οποία με τη σειρά της τοποθετείται στον υποδοχέα της οβίδας. Στη συνέχεια, τοποθετείται μία ίνα βαμβακιού έτσι ώστε να υπάρχει επαφή τόσο με το δείγμα όσο και με τον υποδοχέα. Τέλος, ο υποδοχέας

τοποθετείται εντός της θερμιδομετρικής οβίδας. Το αποτέλεσμα δίνεται ηλεκτρονικά σε Kcal/g.

8.2. Παράμετροι ανάπτυξης και αξιοποίησης της τροφής

Ο υπολογισμός της ανάπτυξης των ιχθύων και της αξιοποίησης της τροφής έγινε σύμφωνα με τους παρακάτω δείκτες (Bahadir-Koca et al., 2009):

Επιβίωση (S-Survival)

$$S (\%) = \text{Τελικός αριθμός ψαριών} \times 100 / \text{Αρχικός αριθμός ψαριών}$$

Συνολική κατανάλωση τροφής

$$\text{Συν. Κατανάλωση (g)} = \text{ολική κατανάλωση τροφής} / \text{αριθμός ψαριών}$$

Αύξηση βάρους (WG-Weight Gain)

$$WG (g) = W_t - W_i$$

όπου, W_t = τελικό βάρος

και W_i = αρχικό βάρος

Ημερήσιος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (Specific Growth Rate)

$$SGR (\%) = [\ln(W_t) - \ln(W_i) / d] \times 100$$

όπου, $\ln(W_t)$ = ο φυσικός λογάριθμος του τελικού ολικού βάρους

$\ln(W_i)$ = ο φυσικός λογάριθμος του αρχικού ολικού βάρους

d = Ημέρες σίτισης

Συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (Food Conversion Ratio)

$$FCR = FI / WG$$

όπου, $FI (g)$ = Τροφή που καταναλώθηκε

$WG (g)$ = Αύξηση βάρους

Συντελεστής διατήρησης λίπους (LER-Lipid efficiency retention)

$$LER (\%) = 100 \times (\text{τελική περιεκτικότητα λίπους, \%} \times W_t) - (\text{αρχική περιεκτικότητα λίπους, \%} \times W_i) / \text{λίπος που καταναλώθηκε (g)}$$

όπου, W_t = Τελικό βάρος (g)

W_i = Αρχικό βάρος (g)

Ηπατοσωματικός δείκτης

$$\text{HIS (\%)} = 100 \times \text{HW/TW}$$

όπου, HW = βάρος ήπατος (g)

TW = ολικό σωματικό βάρος (g).

Δείκτης ευρωστίας (Condition factor)

$$\text{CF} = 100 \times W_t / \text{TL}_t^{-3}$$

όπου, W_t = Τελικό βάρος (g)

TL_t = Τελικό μήκος (cm)

8.3. Αναλύσεις αίματος

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, οι ιχθύες απομακρύνθηκαν από τη δεξαμενή με απόχλη και τοποθετήθηκαν σε αναισθητικό διάλυμα (MS 222). Η λήψη του αίματος πραγματοποιήθηκε από την ουραία φλέβα με κοιλιακή προσέγγιση (γωνία 45°), με τη χρήση σύριγγας με ηπαρισμένη βελόνα 21G (LEO Pharma A/S, Denmark). Η βελόνα πέρασε διαμέσου της σπονδυλικής στήλης έως ότου να υπάρχει η αίσθηση της αντίστασης λόγω επαφής με το σπόνδυλο.

Η αναρρόφηση του αίματος έγινε αργά για την αποφυγή λύσης των αιμοκυττάρων. Η ποσότητα του αίματος τοποθετήθηκε σε erpendorf tube για τον προσδιορισμό του αιματοκρίτη και τη μέτρηση των ερυθρών κυττάρων. Από την ληφθείσα ποσότητα του αίματος 2 μl τοποθετήθηκαν σε erpendorf tube με 1 ml PBS για την ανάλυση της βλάβης του DNA.

8.3.1. Προσδιορισμός ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων

Η μέτρηση των ερυθροκυττάρων και των λευκοκυττάρων διεξήχθη αμέσως μετά την δειγματοληψία. Σε ένα erpendorf tube έγινε ανάμειξη 20 μl αίματος με 4 ml διαλύματος NaCl (0,85% NaCl σε απιονισμένο νερό), επιτυγχάνοντας αραίωση 1:200. Το διάλυμα ανακινούνταν ελαφρώς με σκοπό τον ομοιόμορφο διασκορπισμό των κυττάρων. Στη συνέχεια, ακολούθησε μεταφορά 10 μl κυτταρικού εναιωρήματος στον ειδικό θάλαμο του αιματοκυτταρόμετρου Neubauer (Hausser Scientific, USA) και τοποθέτηση της ειδικής καλυπτρίδας. Το επίπεδο της διαγράμμισης του αιματοκυτταρόμετρου είναι χαμηλότερα απ' ό,τι το επίπεδο της καλυπτρίδας με αποτέλεσμα να δημιουργείται μεταξύ τους μία απόσταση 0,1 mm, στην οποία εισέρχεται το εναιώρημα των κυττάρων.

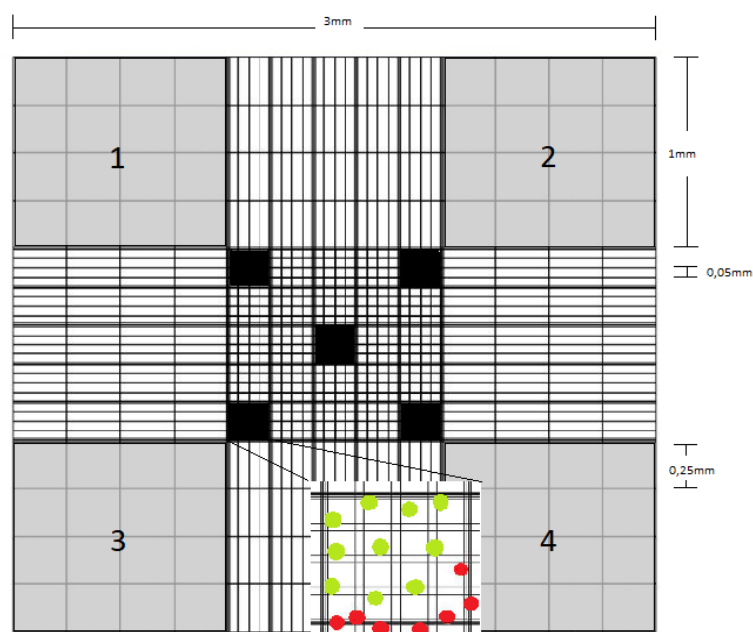
Το πλακίδιο Neubauer ή αιμοκυτταρόμετρο, είναι τροποποιημένη αντικειμενοφόρος με τη δική της καλυπτρίδα που έχει κατασκευαστεί για την καταμέτρηση των στερεών συστατικών του αίματος σε δείγμα γνωστού όγκου. Αποτελείται από δυο

κατάλληλα επεξεργασμένες επιφάνειες που φέρουν τομές και ορίζουν επιφάνειες συγκεκριμένου μεγέθους. Σε κάθε μία από αυτές διακρίνεται μία διαγράμμιση που αποτελείται από 9 μεγάλα τετράγωνα σε μορφή πλέγματος με μήκος πλευράς 1mm (συνεπώς το εμβαδόν του κάθε τετραγώνου είναι 1mm²).

Κάθε ένα από τα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα υποδιαιρούνται σε δεκαέξι μικρότερα τετράγωνα. Το μεγάλο κεντρικό τετράγωνο χωρίζεται σε 25 μικρά τετράγωνα καθένα από τα οποία υποδιαιρείται σε 16 ακόμα μικρότερα τετράγωνα. Το κεντρικό δηλαδή τετράγωνο αποτελείται από 400 πολύ μικρά τετράγωνα κάθε ένα από τα οποία έχει πλευρά μήκους 0,05 mm.

Στα τέσσερα γωνιακά μεγάλα τετράγωνα γίνεται η μέτρηση του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων, ενώ στα πέντε μαύρα τετραγωνίδια του μεγάλου κεντρικού τετραγώνου γίνεται η μέτρηση των ερυθροκυττάρων (Εικ. 7). Από τα κύτταρα που εφάπτονται στη περίμετρο, μετριούνταν μόνο εκείνα που άπτονταν των δυο εκ των τεσσάρων συνεχόμενων πλευρών του τετραγώνου, ενώ των άλλων δύο δεν προσμετρούνταν. Η μέτρηση των αιμοκυττάρων γίνεται στο οπτικό μικροσκόπιο.

Έτσι, γνωρίζοντας τον όγκο του κυτταρικού εναιωρήματος και μετρώντας τα κύτταρα σε κάθε ένα τετράγωνο προσδιορίστηκε ο αριθμός και η συγκέντρωσή τους.



Εικόνα 8. Απεικόνιση του αιματοκυτταρόμετρου και μεγεθυμένο μικρό τετράγωνο

8.3.2. Μέτρηση αιματοκρίτη

Για τη μέτρηση του αιματοκρίτη χρησιμοποιήθηκαν τριχοειδή σωληνάρια μήκους 75 mm. Το τριχοειδές σωληνάριο τοποθετήθηκε οριζόντια μέχρι να γεμίσει με αίμα στο 60-70% του μήκους του αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων αέρα και στη

συνέχεια σφραγίστηκε με πλαστελίνη στο ένα άκρο, έτσι ώστε να αποφευχθεί η διαρροή του αίματος.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν ακτινωτά στη φυγόκεντρο αιματοκρίτη και ακολούθησε φυγοκέντριση για 10 λεπτά, με σκοπό το διαχωρισμό των ερυθροκυττάρων και των λευκοκυττάρων από το πλάσμα του αίματος. Η μέτρηση του αιματοκρίτη, δηλαδή του εκατοστιαίου όγκου των ερυθροκυττάρων σε σχέση με τον όγκο αίματος υπολογίστηκε για το κάθε δείγμα με την βοήθεια του ειδικού χάρακα-πίνακα υπολογισμού αιματοκρίτη. Η φυγοκέντριση των δειγμάτων έγινε αμέσως μετά την αιμοληψία.

8.3.3. Προσδιορισμός λευκών αιμοσφαιρίων

Ο τύπος των λευκών αιμοσφαιρίων προσδιορίστηκε από την μικροσκοπική εξέταση ενός λεπτού επιχρίσματος αίματος πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, αφού πρώτα χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη χρωστική, ώστε να γίνει ορατό το σχήμα των διαφόρων κυττάρων. Με τη μέθοδο του επιχρίσματος προσδιορίζεται ο αριθμός και ο τύπος των λευκοκυττάρων σε ένα δείγμα δεδομένου μεγέθους. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η χρώση May-Grünwald – Giemsa, η οποία περιλαμβάνει ένα μείγμα χρωστικών, όπως μπλε του μεθυλενίου, κυανό (azure) και εωζίνη (ηωσίνη).

Δημιουργήθηκαν δύο διαλύματα αραιώνοντας 25 ml από τη χρώση May-Grünwald σε 25ml απιονισμένο νερό και 5 ml από τη χρώση Giemsa σε 45ml απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, καλύφθηκαν οι αντικειμενοφόρες πλάκες με το διάλυμα της May-Grünwald για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε κάλυψη του παρασκευάσματος με το διάλυμα της Giemsa και παραμονή για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η χρώση May-Grünwald – Giemsa χαρακτηρίζεται ως πανοπτική, καθώς βάφονται όλα τα κυτταρικά συστατικά. Το RNA, το κυτταρόπλασμα και οι πυρηνίσκοι βάφονται μπλε, ενώ το DNA και τα πρωτογενή κοκκία βάφονται κόκκινα και μωβ, και η αιμοσφαιρίνη και τα εωσινοφιλικά κοκκία βάφονται πορτοκαλί-κόκκινα.

Τέλος, έγιναν πολλές εκπλύσεις με απιονισμένο νερό και παρατήρηση στο μικροσκόπιο με καταδυτικό φακό (100x) με μία σταγόνα ελαίου πάνω στο παρασκεύασμα (Dahlin et al 2015). Συνολικά, τα λευκά αιμοσφαίρια κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με τον τύπο τους σε λεμφοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα. Ο λευκοκυτταρικός τύπος υπολογίστηκε ως η εκατοστιαία αναλογία κάθε είδους λευκοκυττάρων.

8.3.4. Κορτιζόλη του αίματος

Για τη λήψη του πλάσματος, τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν στις 5000 rpm για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, το πλάσμα τοποθετήθηκε στους -20°C για την περαιτέρω

επεξεργασία του. Αρχικά, 100 μ l πλάσματος αναμείχθηκαν με 1 ml διαιθυλαιθέρα σε γυάλινο σωληνάριο, το οποίο τοποθετήθηκε στους -80°C για 8 λεπτά μέχρι να δημιουργηθεί υγρή φάση. Μετά το διαχωρισμό, η υγρή φάση μεταφέρθηκε γρήγορα σε καινούριο σωληνάριο και, στη συνέχεια, σε υδατόλουτρο στους 45°C για 45 λεπτά. Τέλος, έγινε ανασύσταση του υπολείμματος με 100 μ l EIA buffer (Cayman Chemical, MI, USA).

Η κορτιζόλη υπολογίστηκε με την ανοσοενζυμική ανταγωνιστική μέθοδο ELISA (Cortisol ELISA kit, product number 500360, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στην ανταγωνιστική ELISA ακινητοποιείται το 1^ο αντισώμα στην ειδική πλάκα. Τα ακινητοποιημένα αντισώματα δέχονται τα αντιγόνα του δείγματος και τα αντιγόνα που είναι επισημασμένα με τον ιχνηθέτη (ένζυμο) και αναμειγνύονται με συγκεκριμένη ποσότητα αντισώματος. Τα μόρια του αντιγόνου του δείγματος ανταγωνίζονται με τα ιχνηθετημένα μόρια, που έχουν προστεθεί στο δείγμα σε προκαθορισμένη ποσότητα, για τον περιορισμένο αριθμό θέσεων δέσμευσης με τα μόρια του αντισώματος. Μετά από πλύσεις της πλάκας, με σκοπό να απομακρυνθούν τα αντιδραστήρια που δεν είναι συνδεδεμένα με δεσμό Ag-Ab, προστίθεται το υπόστρωμα. Το υπόστρωμα οδηγεί στην παραγωγή έγχρωμου διαφανούς διαλύματος, το οποίο μπορεί να απορροφήσει φως συγκεκριμένου μήκους κύματος. Η απορρόφηση του φωτός μετρήθηκε σε ειδικό φωτόμετρο (FLUOstar Omega microplate reader, BMG LABTECH), χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη.

8.4. Βλάβη του DNA (Comet assay)

Η Comet assay ή Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) είναι μία τεχνική εκτίμησης της βλάβης και της επιδιόρθωσης του DNA, *in vivo* και *in vitro*, μεμονωμένων ευκαρυωτικών και κάποιων προκαρυωτικών κυττάρων. Τα πλεονεκτήματα της είναι η ευαισθησία, οι χαμηλές απαιτήσεις για την ποσότητα του υλικού, το γρήγορο πρωτόκολλο λειτουργίας, η σχετική απλότητα και το χαμηλό κόστος. Έχει εφαρμοστεί σε πολλούς τομείς, από την γενετική τοξικολογία και την διατροφή ως την ανθρώπινη επιδημιολογία. Μία από τις κύριες εφαρμογές της μεθόδου είναι η ανίχνευση της βλάβης του DNA για την εκτίμηση του stress σε ζωντανούς οργανισμούς.

Η βλάβη στο DNA σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς έχει συσχετιστεί με μειωμένη και μη φυσιολογική ανάπτυξη, καθώς και μειωμένο επίπεδο επιβίωσης των εμβρύων, προνυμφών και ενήλικων οργανισμών (Lee et., 1999, Shugart et al., 1992, Steinert 1999)

Οι πρώτοι, που ανέπτυξαν την τεχνική ήταν οι σουηδοί ερευνητές Östling και Johanson, το 1984. Ωστόσο, οι ουδέτερες συνθήκες που χρησιμοποίησαν, επέτρεψαν την ανίχνευση μόνο των σπασμάτων δίκλωνου DNA. Αργότερα, η μέθοδος του

κομήτη διαφοροποιήθηκε από τους Singh *et al.* (1988), και προσαρμόστηκε σε αλκαλικές συνθήκες, όπου ήταν δυνατή η ανίχνευση θραυσμάτων μονόκλωνου DNA. Μία άλλη εκδοχή της μεθόδου περιλαμβάνει τη λύση των κυττάρων σε αλκαλικό pH και ηλεκτροφόρηση είτε σε ουδέτερο είτε σε ελαφρώς αλκαλικό περιβάλλον (pH 12,1) για την ανίχνευση δίκλωνου ή μονόκλωνου DNA, η οποία αναπτύχθηκε από τον Olive (1989).

Η εφαρμογή της μεθόδου σε αλκαλικό περιβάλλον είναι πιο ευαίσθητη και το ποσοστό των θραυσμάτων που μεταναστεύουν είναι αντιπροσωπευτικό της βλάβης του DNA. Επίσης, η τεχνική του κομήτη έχει αποδειχτεί ότι είναι πιο ευαίσθητη από την τεχνική των μικροπυρηνών, όταν εφαρμόστηκαν σε διάφορα είδη ψαριών μετά από έκθεση σε γενοτοξικούς παράγοντες (Meier *et al* 2002, Petras *et al*, 1995).

Η τεχνική comet έχει ευρεία δυνατότητα εφαρμογής σε υδρόβιους οργανισμούς, όπως και σε διάφορους τύπους ιστών και κυττάρων (Lee & Steinert, 2003).

Το stress προκαλεί την ενεργοποίηση ενζύμων όπως οι ενδονουκλεάσες και οι τοποϊσομεράσες (μέσω της ενδοκυτταρικής αύξησης του ελεύθερου ασβεστίου), οι οποίες συντελούν στον κερματισμό του DNA. Αιτία της ενεργοποίησης των ενζύμων αυτών, αποτελεί η αύξηση των επιπέδων ενδογενών ενώσεων, όπως τα υπεροξειδία, οι ελεύθερες ρίζες και το μονοξειδίο του αζώτου.

Βλάβη στο DNA προκαλείται είτε από την απευθείας επίδραση των γενοτοξικών παραγόντων, είτε από τις ευαίσθητες σε αλκαλικό περιβάλλον περιοχές του DNA, είτε από την δράση ενδονουκλεασών των μηχανισμών επιδιόρθωσης, εισάγοντας εγκοπές στο μόριο του DNA. Οι αλκαλικές συνθήκες επιτρέπουν την αποπεριέλιξη και μετουσίωση του δίκλωνου DNA αποκαλύπτοντας ενδεχόμενες εγκοπές στο μόριο, προκαλώντας έτσι τη δημιουργία θραυσμάτων.

Στη μέθοδο του κομήτη, κύτταρα που προέρχονται από καλλιέργειες ή κύτταρα που απομονώνονται από διάφορους ιστούς, τοποθετούνται με τη μορφή αιωρήματος σε λεπτό στρώμα αγαρόζης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Ακολουθεί λύση των κυττάρων από διάλυμα κορεσμένο σε NaCl, τόσο για την απομάκρυνση των κυτταρικών πρωτεϊνών, όσο και για την αποδιάταξη της κυτταρικής και πυρηνικής μεμβράνης. Μετά την ηλεκτροφόρηση, όπου πραγματοποιείται η μετανάστευση του αποδιαταγμένου DNA, και την χρώση τους με φθορίζουσα ουσία, τα κύτταρα με βλάβη στο DNA εμφανίζονται με την μορφή του κομήτη.

Προετοιμασία κυτταρικού εναιωρήματος

Το ήπαρ αφαιρέθηκε από τους ιχθύες και τοποθετήθηκε σε σωληνάρια με κρύο διάλυμα Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (ελεύθερο Mg^{++} και Ca^{++}) σε πάγο. Στη συνέχεια, ακολούθησαν ενέσεις κολαγενάσης (CLS Type I) 0,04%. Η κολαγενάση είναι ένα ένζυμο που καταστρέφει τους πεπτιδικούς δεσμούς του κολλαγόνου, το οποίο αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του συνδετικού ιστού στους

ζωικούς οργανισμούς. Ο ιστός μεταφέρθηκε σε τρυβλίο “petri”, όπου και τεμαχίστηκε σε μικρά κομμάτια, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο νυστέρι. Το κυτταρικό εναιώρημα διηθήθηκε μέσω αποστειρωμένης γάζας. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm για 5 λεπτά. Ακολούθως, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο από το ομογενοποιημένο διάλυμα και προστέθηκε νέα ποσότητα HBSS. Η διαδικασία με τις πλύσεις, επαναλήφθηκε δύο φορές και στο τέλος προστέθηκαν 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (phosphate buffered saline) στο σωληνάριο με την πελλέτα των κυττάρων.

Η διαδικασία απομόνωσης των ερυθροκυττάρων πραγματοποιήθηκε με άμεση λήψη αίματος μετά τη θανάτωση του ψαριού. Από την ποσότητα αίματος που αφαιρέθηκε, 2ml αναμείχθηκαν με 1 ml PBS. Καθώς, το 97% του συνόλου των αιμοκυττάρων αποτελείται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια (Theodorakis et al., 1994), δεν πραγματοποιήθηκε κάποια μέθοδος διαχωρισμού. Για την ανίχνευση της βλάβης του DNA στο αίμα, τα αιμοκύτταρα θα αναφέρονται ως ερυθροκύτταρα.

Επικάλυψη αντικειμενοφόρων πλακών με πήκτωμα αγαρόζης

80 μl αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως 0,5% (LMA) (ABT, US) που περιείχαν 20 μl κυτταρικού εναιωρήματος τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα προ-επικαλυμμένη με στρώμα 100 μl αγαρόζης φυσιολογικού σημείου τήξεως (NMA). Η αγαρόζη καλύφθηκε με καλυπτρίδα 22 x 22 mm και διατηρήθηκε στους -20°C για 2-3 λεπτά για να πήξει η αγαρόζη.

Κυτταρική λύση και ηλεκτροφόρηση

Οι καλυπτρίδες αφαιρέθηκαν απαλά και τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν σε ένα πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα λύσης (2,5 M NaCl, 100 mM Na EDTA, 10 mM Tris, με 1% Triton X-100 και 10% DMSO) για τουλάχιστον μία ώρα στους 4°C. Στη συνέχεια, τα πλακίδια απομακρύνθηκαν από το διάλυμα λύσης και έγιναν πλύσεις με απεσταγμένο νερό. Ακολούθως, τοποθετήθηκαν σε μονάδα οριζόντιας ηλεκτροφόρησης γεμάτη με ένα πρόσφατα παρασκευασμένο αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH, pH 13) σε επίπεδο 0,25 cm πάνω από τα πλακίδια. Τα πλακίδια έμειναν στο ρυθμιστικό διάλυμα για 25 λεπτά με σκοπό την αποπεριέλιξη του DNA. Ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση που διήρκεσε 15 λεπτά (αντιπροσωπευτικά στα 30V και 300 mA). Όλη η διαδικασία διεξήχθη στο σκοτάδι για την πρόληψη πρόσθετης βλάβης στο DNA. Τα πλακίδια στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό εξουδετέρωσης (0,4 M Tris ρυθμιστικό, pH 7,5) τρεις φορές.

Μέτρηση κομητών

Σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα συλλέχθηκαν με τυχαία επιλογή 50 κύτταρα και ακολούθησε η ανάλυση σε μικροσκόπιο φθορισμού (Olympus BX43, Tokyo, Japan) σε σκοτεινό δωμάτιο. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το ειδικό λογισμικό Comet Assay IVTM και κάμερα (Perceptive Instruments-Instem, Suffolk, UK). Για την εκτίμηση και ποσοτικοποίηση της βλάβης του DNA χρησιμοποιήθηκε το ποσοστό του DNA που βρίσκεται στην ουρά του κομήτη (Tail DNA damage %).

8.5. Ιστολογικές αναλύσεις

Η ιστολογική εξέταση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα γνωστά πρωτόκολλα (Johnson et al., 2009; Genten et al., 2009). Τα δείγματα ήπατος και πρόσθιου εντέρου μετά τη λήψη τους τοποθετήθηκαν σε κασετίνες μίας χρήσης (4,5 cm x 2,8 cm) και έπειτα σε δοχείο με διάλυμα μονιμοποίησης (φορμαλδεΰδη 10%). Οι κασετίνες με τους ιστούς μετά τη μονιμοποίηση τοποθετήθηκαν στην ιστοκινέτα, όπου πραγματοποιήθηκε αφυδάτωση για την απομάκρυνση του νερού με διαδοχικές εμβαπτίσεις με αλκοόλες αυξανόμενου βαθμού (70% έως 100%). Έπειτα πραγματοποιήθηκε καθαρισμός με απομάκρυνση της αλκοόλης με διαδοχικές πλύσεις με ξυλόλη και τέλος εμποτισμός με παραφίνη. Οι κασετίνες με τους αφυδατωμένους ιστούς τοποθετήθηκαν σε ειδικό δοχείο με υγρή παραφίνη σε μηχανήμα σκλήνωσης. Η έγκλειση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 60°C. Στη συνέχεια έγιναν οι ιστολογικές τομές στη μικροτόμο. Οι τομές παραφίνης τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 40°C, και επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα για να επακολουθήσει χρώση (διάλυμα χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης) και παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Οι απεικονίσεις κάθε παρασκευάσματος μελετήθηκαν για την εύρεση τυχόν ιστολογικών αλλοιώσεων στα ιχθύδια, τα οποία διατρέφονταν με τα πειραματικά σιτηρέσια.

Πίνακας 10. Πρωτόκολλο αφυδάτωσης, διαύγασης και εγκλεισμού σε παραφίνη (Johnson et al., 2009; Genten et al., 2009).

Πρωτόκολλο αφυδάτωσης, διαύγασης και εγκλεισμού σε παραφίνη		
Βήματα	Ουσία	Διάρκεια
1	Αιθανόλη 70%	1h
2	Αιθανόλη 80%	1h
3	Αιθανόλη 95%	1h
4	Αιθανόλη 95%	2h
5	Αιθανόλη 100%	1h
6	Αιθανόλη 100%	1h
7	Αιθανόλη 100%	2h
8	Ξυλόλη	2h
9	Ξυλόλη	2h
10	Παραφίνη	2h
11	Παραφίνη	4h
Πρωτόκολλο αφυδάτωσης και χρώσης		
1	Ξυλόλη Ι	15min
2	Ξυλόλη ΙΙ	15min

3	Αλκοόλη 100%	5min
4	Αλκοόλη 100%	5min
5	Αλκοόλη 95%	5min
6	Αλκοόλη 95%	5min
7	Αλκοόλη 70%	5min
8	H ₂ O (βρύσης)	2min
9	Αιματοξυλίνη	7min
10	H ₂ O (Τρεχούμενο βρύσης)	2min
11	Διάλυμα διαφοροποίησης	2 εμβαπτίσεις
12	H ₂ O (Τρεχούμενο βρύσης)	2min
13	Ηωσίνη	5min
14	H ₂ O (βρύσης)	30'' εμβαπτίσεις
15	Αλκοόλη 70%	1min
16	Αλκοόλη 95%	1min
17	Αλκοόλη 95%	1min
18	Αλκοόλη 100%	1min
19	Αλκοόλη 100%	1min
20	Ξυλόλη	15min

8.6. Νευροδιαβιβαστές εγκεφάλου

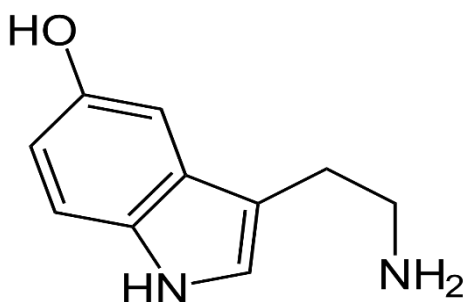
Η επιλογή των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου προς ανάλυση αφορά κυρίως τις κατεχολαμίνες, τη σεροτονίνη και τους μεταβολίτες τους. Αυτό οφείλεται στο ρόλο που έχουν στη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού καθώς και στα πειραματικά δεδομένα που τους συνδέουν με διάφορες ασθένειες και διαταραχές αλλά και στην εμπλοκή τους στη ρύθμιση αισθητηριακών και κινητικών κυκλωμάτων, στις συναισθηματικές αποκρίσεις, στη γνωστική λειτουργία και αντίληψη, στην ανταμοιβή, στην πρόσληψη τροφής, στη συμπεριφορά, και στην επιθετικότητα (Fotowat et al., 2016; Messias et al., 2016; Gasmi et al., 2022).

Ο προσδιορισμός των νευροδιαβιβαστών πραγματοποιήθηκε με βάση τα μοντέλα πρόβλεψης (λόγοι 18:1n-9/n-3 LC PUFA και SFA/n-3 LC PUFA που αναπτύχθηκαν από τον κ. Αριστείδη Γ. Τσοπελάκο στα πλαίσια εκπόνησης της διδακτορικής του διατριβής με τίτλο «Επίδραση των λιπαρών οξέων της τροφής στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στην ανάπτυξη και στη σύσταση του σώματος του Ευρωπαϊκού λαβρακιού *Dicentrarchus labrax L.*» (Τσοπελάκος, 2021).

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν τα επίπεδα της σεροτονίνης (5-HT) στο μέσο εγκέφαλο, ο μεταβολίτης της 5-HIAA στο ρομβοειδή εγκέφαλο καθώς και οι λόγοι 5-HIAA/5-HT στον τελικό και ρομβοειδή εγκέφαλο. Επίσης, μελετήθηκαν τα επίπεδα

της ντοπαμίνης (DA) στον τελικό εγκέφαλο και οι λόγοι DOPAC/DA στο μέσο και ρομβοειδή εγκέφαλο.

Σεροτονίνη (5- hydroxytryptamine, 5-HT)



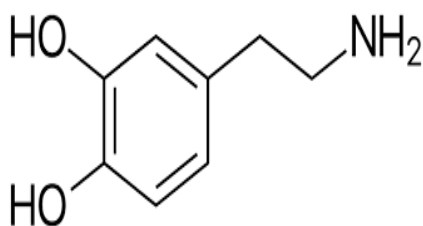
Εικόνα 9. Σεροτονίνη (5-HT)

Η σεροτονίνη είναι αρωματική μονοαμίνη και αποτελεί έναν από τους κύριους νευροδιαβιβαστές του ΚΝΣ (Lillesaar, 2011). Το αμινοξύ τρυπτοφάνη αποτελεί την πρόδρομη ουσία, η οποία υδρολύεται και παράγεται L-υδροξύ-τρυπτοφάνη (5-HTP). Στη συνέχεια, αποκαρβοξυλιώνεται μέσω της αποκαρβοξυλάσης της 5-HTP με αποτέλεσμα της παραγωγή της 5-HT. Η 5-HT μεταβολίζεται από τη μονοαμινοοξειδάση-A (MAO-A) σε 5-υδροξυ-ινδολοξικό οξύ (5-HIAA), ο οποίος αποτελεί το βασικό μεταβολίτη της σεροτονίνης.

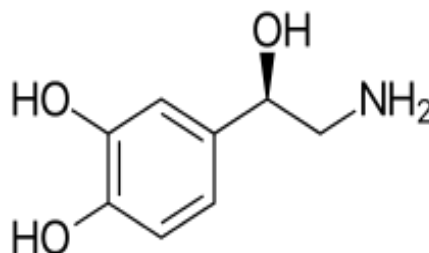
Ο προσδιορισμός της σεροτονίνης, του μεταβολίτη 5-HIAA και της σεροτονινεργικής δραστηριότητας σχετίζεται με τον προσδιορισμό του stress που προκαλείται από τις διαχειριστικές πρακτικές που εφαρμόζονται στις υδατοκαλλιέργειες (Batzina et al., 2014; Ferrari et al., 2020; Papoutsoglou et al., 2008) και γενικά με τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Είναι γνωστό ότι τα επίπεδα σεροτονίνης σχετίζονται με το συναίσθημα, τη συμπεριφορά και γνωστική λειτουργία, την κίνηση και τον φόβο (Lillesaar, 2011; Herr et al., 2017; Roumier et al., 2019). Έχουν παρατηρηθεί μεταβολές, όπως μειωμένα επίπεδα σεροτονίνης, σε περιπτώσεις ανταγωνιστικής συμπεριφοράς (Silva et al., 2013) και αύξηση του μεταβολίτη της 5-HIAA σε απάντηση σε στρεσογόνα ερεθίσματα (Lepage et al., 2003). Τέλος, μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση των επιπέδων σεροτονίνης με τη διατροφική συμπεριφορά (He et al., 2018) και με τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος με ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης των ανοσολογικών μηχανισμών στα ψάρια καθώς και της εξέλιξης του συστήματος της σεροτονίνης στα ζώα (Li, et al. 2022).

Στον άνθρωπο, τα μεταβαλλόμενα επίπεδα 5-HT συμβάλλουν σε ψυχικές διαταραχές όπως κατάθλιψη, σχιζοφρένεια, αυτισμό, ψυχαναγκαστικό σύνδρομο, βουλιμία, αϋπνία, αυτισμό και απώλεια μνήμης (Müller and Jacobs, 2010; Bellino et al., 2021; Marrone and Coccurello, 2019).

Κατεχολαμίνες



Εικόνα 10. Ντοπαμίνη (DA)



Εικόνα 11. Νοραδρελίνη

Το αμινοξύ τυροσίνη αποτελεί το πρόδρομο μόριο για την βιοσύνθεση των κατεχολαμινών, το οποίο μέσω του ενζύμου υδροξυλάση της τυροσίνης, μετατρέπεται σε L-3,4-διϋδροξυ-φαινυλαλανίνη (L-DOPA). Έπειτα, η L-DOPA αποκαρβοξυλιώνεται, μέσω της αποκαρβοξυλάσης της DOPA και σχηματίζεται η DA. Η DA αποτελεί το πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση της νοραδρεναλίνης και της αδρεναλίνης. Με τη βοήθεια του ενζύμου β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης, η ντοπαμίνη μετατρέπεται σε νοραδρεναλίνη, η οποία μέσω του ενζύμου N-μεθύλ-τρανσφεράση δίνει την αδρεναλίνη οποία κινητοποιεί τις πηγές ενέργειας, έτσι ώστε να εκτελεστεί η αντίδραση 'πάλης ή φυγής' μέσω του ΣΝΣ (Lillesaar, 2011).

Ο προσδιορισμός των κατεχολαμινών και της ντοπαμινεργικής δραστηριότητας έχει συνδεθεί με τον προσδιορισμό του επιπέδου stress (Gesto et al., 2015).

Οι κατεχολαμίνες απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος και ρυθμίζουν την καρδιαγγειακή και την αναπνευστική λειτουργία του οργανισμού, με σκοπό τη διατήρηση του οξυγόνου σε αυξημένα επίπεδα και την επαρκή τροφοδότηση των ιστών (Παπουτσόγλου, 1998). Επίσης, υπό την επίδραση στρεσογόνων παραγόντων κινητοποιούν αποθηκευμένη ενέργεια του οργανισμού, ώστε να αντεπεξέλθει στις αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις (Reid et al., 1998).

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα DA σχετίζονται με τη διατροφική συμπεριφορά και συγκεκριμένα της έχει αποδοθεί ανορεκτική δράση σε ψάρια και σε θηλαστικά (Conde-Sieira et al., 2018; He et al., 2018) ενώ η NA έχει δείξει ότι διεγείρει την πρόσληψη τροφής (Hesse et al., 2017).

