

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**Αποτελεσματικότητα φυτικών και θαλάσσιων ουσιών για  
την πρόληψη και θεραπεία των παρασιτώσεων από  
Τρηματώδη και βακτήρια στην εκτρεφόμενη τσιπούρα  
(*Sparus aurata* L.)**

**ΚΩΣΤΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΚΑΡΔΙΤΣΑ  
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2023**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κυριότερες παρασιτικές ασθένειες που παρατηρούνται στη μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια οφείλονται σε Μυξοσπορίδια και Αρθρόποδα. Αποτελεσματική αντιπαρασιτική θεραπεία δεν υπάρχει μέχρι στιγμής και οι εκτροφείς περιορίζονται στη χρήση φορμαλδεΰδης η οποία είναι επικίνδυνη για το ζωικό κεφάλαιο, το περιβάλλον και τους χειριστές. Επομένως, είναι ζωτικής σημασίας η εύρεση φιλικών προς το περιβάλλον ουσιών που θα μπορούσαν να χορηγηθούν μέσω της τροφής.

Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της πρόληψης ή/και θεραπείας τριών σοβαρών ασθενειών της τσιπούρας, που προκαλούν θνησιμότητες στην εκτροφή της, με φυσικά εκχυλίσματα χερσαίων και θαλάσσιων ουσιών. Μελετήθηκαν εκχυλίσματα χερσαίων και θαλάσσιων φυτών που δεν έχουν οικολογική επίπτωση, όπως το *Zingiber officinale*, η *Aloe barbadensis*, η πρόπολη, το φυτό *Artemisia annua*, το *Thymus vulgaris*, και ο φύκος (*Fucus vesiculosus*). Τα χερσαία φυτά επιλέχθηκαν με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, τις φαρμακευτικές και ανοσοενισχυτικές τους ιδιότητες, που είναι γνωστές για τα ανώτερα θηλαστικά. Μόνον το φυτό *Artemisia annua* έχει δοκιμαστεί έναντι του παρασίτου *Sparicotyle chrysophrii* στην τσιπούρα σε *in vitro* δοκιμές και στην εκτροφή της με άριστα αποτελέσματα. Το *Fucus vesiculosus* είναι ένα από τα γνωστά καφέ φύκη της Μεσογείου. Είναι ιδιαίτερα θρεπτικό, ενισχύει τον μεταβολισμό και έχει αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες. Αρχικά, έγιναν *in vitro* δοκιμές με ένα μεγάλο εύρος ουσιών από τις οποίες επιλέχθηκαν οι πιο δραστικές για τα παράσιτα. Οι αντιπαρασιτικές ουσίες δοκιμάστηκαν πρώτα σε πειραματικές δεξαμενές με 2-3 δοσολογίες έκαστη. Επίσης, μελετήθηκαν οι θνησιμότητες των ιχθυδίων και η αποτελεσματικότητα των εκχυλισμάτων των ουσιών.

Λέξεις Κλειδιά: *Zingiber officinale*, *Aloe barbadensis*, πρόπολη, *Artemisia annua*, *Thymus vulgaris*, φύκος (*Fucus vesiculosus*), φαρμακευτικές και ανοσοενισχυτικές ιδιότητες, αντιπαρασιτικές ουσίες, φυσικά εκχυλίσματα φυτών

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Φωτεινή Αθανασοπούλου**, Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα

Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας Ιχθυολογίας & Υδατοκαλλιεργειών, Τμήμα  
Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Βασίλειος Μπακόπουλος**, Αναπληρωτής Καθηγητής

Τμήμα Ωκεανογραφίας & Θαλάσσιων Βιοεπιστημών,  
Πανεπιστήμιο Αιγαίου

**Λευκαδίτης Μενέλαος**, Επίκουρος Καθηγητής

Εργαστήριο Παρασιτολογίας - Παρασιτικών Νοσημάτων των Ζώων, Τμήμα  
Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

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

**Effectiveness of terrestrial and marine plant extracts for the prevention and treatment of parasite infections (Trematode and bacteria) in cultured Sea bream (*Sparus aurata* L.)**

**KOSTOU VASILIKI**  
**VETERINARIAN**

**MASTER THESIS**

**KARDITSA**  
**SEPTEMBER 2023**

## ABSTRACT

The main parasite diseases in Mediterranean aquaculture are due to Myxosporea (Mixosporidia) and Arthropoda. Currently there is no efficient antiparasitic treatment and the industry uses formalin which is dangerous for the fish, the environment, and the personnel. Therefore, it is essential to find environmentally friendly substances that can be administrated in food.

The aim of this thesis is the study of the prevention and/or treatment of three major diseases of cultured sea bream, which cause mortalities in its breeding, with natural extracts of terrestrial and marine substances. Extracts of terrestrial and marine plants that have no ecological impact, such as *Zingiber officinale*, *Aloe barbadensis*, *propolis*, *Artemisia annua*, *Thymus vulgaris* and the seaweed *Fucus vesiculosus*. The plants were selected because of their medicinal and pharmacological properties referred to international bibliography. Only the plant *Artemisia annua*, has been tested in seabream infected with *Sparicotyle chrysophrii* in vitro and in the field culture with excellent results. *Fucus vesiculosus* is one of the common brown Mediterranean algae. It is highly nutritious, boosts metabolism and has antibacterial and antifungal properties. Initially, in vitro tests were performed on a wide spectrum of substances and the most active against parasites were selected. Antiparasitic treatments were tested in experimental tanks (2-3 doses each). Moreover, the mortality of fishes and the efficiency of extracts were also studied.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b><u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u></b>                                         | <b>2</b>  |
| <b><u>ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ</u></b>                  | <b>3</b>  |
| <b><u>ABSTRACT</u></b>                                         | <b>5</b>  |
| <b><u>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</u></b>                                      | <b>8</b>  |
| <b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u></b>                             | <b>9</b>  |
| <b><u>1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ</u></b>             | <b>9</b>  |
| <u>1.1.1 Υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα</u>                     | 9         |
| <u>1.1.2 Παθολογικά προβλήματα στις υδατοκαλλιέργειες</u>      | 11        |
| <u>1.1.3 Εξωπαρασιτώσεις στις Ελληνικές υδατοκαλλιέργειες</u>  | 13        |
| <u>1.1.4 Χρήση φυτικών ουσιών σε υδατοκαλλιέργεια</u>          | 14        |
| <b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u></b>                    | <b>16</b> |
| <u>2.1 Σκοπός της έρευνας</u>                                  | 16        |
| <u>2.2 Υλικά και μέθοδοι</u>                                   | 16        |
| <u>2.2.1 Ψάρια</u>                                             | 16        |
| <u>2.2.2 Δειγματοληψίες – Περιοχή δειγματοληψίας</u>           | 17        |
| <u>2.2.3 Φυτικές ουσίες</u>                                    | 17        |
| <u>2.2.4 In vitro πειράματα</u>                                | 19        |
| <u>2.2.5 Παρασιτολογική εξέταση</u>                            | 21        |
| <u>2.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ</u>                              | 21        |
| <u>2.3.1 Δεξαμενές</u>                                         | 21        |
| <u>2.3.2 Εξέταση των ψαριών πριν την έναρξη των πειραμάτων</u> | 22        |
| <u>2.3.3 Πειραματικές μολύνσεις (Μυξοβακτήρια)</u>             | 24        |
| <u>2.3.4 Πειραματική Μόλυνση (Παράσιτα)</u>                    | 24        |
| <b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u></b>                         | <b>26</b> |

|                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <a href="#"><u>3.1 Παθολογική διερεύνηση</u></a> .....                                                   | 26        |
| <a href="#"><u>3.1.1 In vitro</u></a> .....                                                              | 26        |
| <a href="#"><u>3.1.2 Αποτελέσματα πειραματικών μολύνσεων με <i>Tenacibaculum maritimum</i></u></a> ..... | 29        |
| <b><a href="#"><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u></a></b> .....                                  | <b>32</b> |
| <b><a href="#"><u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u></a></b> .....                                                         | <b>34</b> |

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα Καθηγήτρια, κ. Φωτεινή Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η οποία με εμπιστεύτηκε, αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, με καθοδήγησε και με στήριξε σε όλη τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας. Οι σημαντικές παρατηρήσεις της βελτίωσαν τον τρόπο σκέψης μου και με βοήθησαν ουσιαστικά στη συγγραφή της ερευνητικής εργασίας.

Ευχαριστώ το σύζυγό μου Αλέξιο Μπιρπανάγο και τα παιδιά μου Γεώργιο και Αντωνία για τη συμπαράστασή τους, την ενθάρρυνση τους και τη βοήθειά τους όλο αυτό το διάστημα.

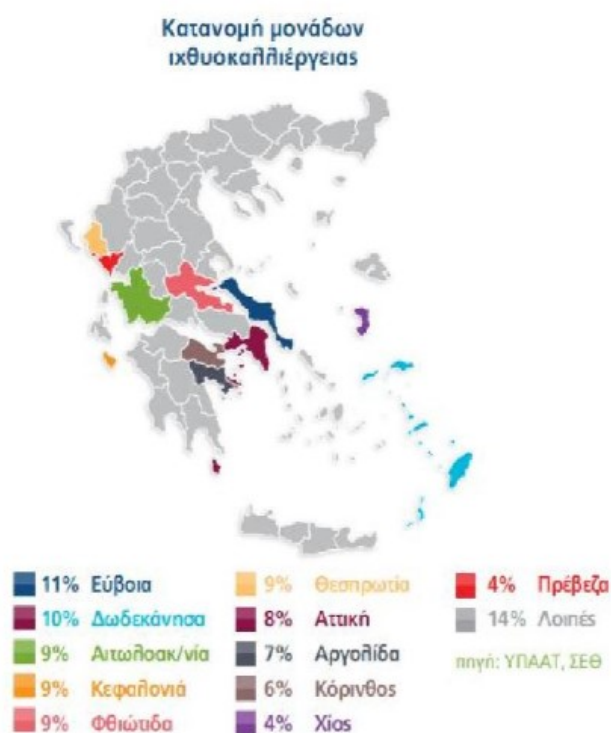
Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Αντώνιο και Ιωάννα για όλα όσα μου πρόσφεραν και μου δίδαξαν αγωνιζόμενοι πάντοτε για την πρόοδο του νου και της ψυχής.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

### 1.1.1 Υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα

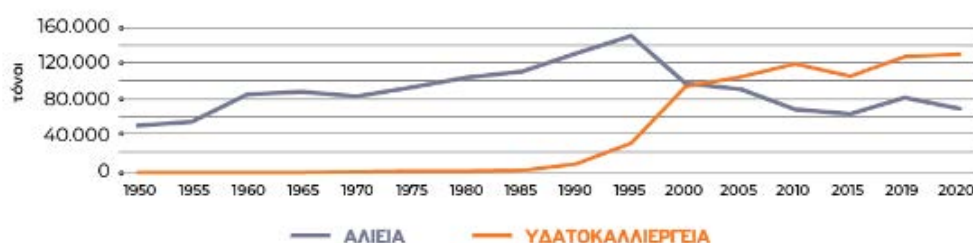
Η Ελλάδα θεωρείται πρωτοπόρος στη θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια. Η εκτεταμένη ιχθυοκαλλιέργεια στην Ελλάδα, ως σημαντικός τομέας της ζωικής παραγωγής, συμβάλλει αυξητικά στο ποσοστό εξαγωγών της παραγόμενης ποσότητας. Πλέον, τα ελληνικά προϊόντα ιχθυοκαλλιέργειας είναι διεθνώς αναγνωρισμένα. Οι υδατοκαλλιέργειες θεωρούνται ως ένας από τους υψηλά αναπτυσσόμενους βιομηχανικούς κλάδους στην Ελλάδα (Γράφημα 1.1). Τα τελευταία σαράντα χρόνια, μία συγκυρία παραμέτρων, όπως οι γεωμορφολογικές και υδροβιολογικές συνθήκες και το κλίμα, οδήγησε στην αλματώδη ανάπτυξη των ιχθυοκαλλιεργειών. Η Ελλάδα καταλαμβάνει την 5<sup>η</sup> θέση στην Ε.Ε. ως προς τον όγκο της συνολικής παραγωγής υδατοκαλλιέργειας. (Stirling report, 2004).



Γράφημα 1.1. Γεωγραφική κατανομή μονάδων υδατοκαλλιέργειας στην Ελλάδα. <http><sup>1</sup>

Όπως προαναφέρθηκε, οι κλιματολογικές και γεωμορφολογικές συνθήκες της χώρας έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του κλάδου στην Ελλάδα, καθώς

ευνοήθηκε η καλλιέργεια ευρύαλων ψαριών και μειώθηκαν οι περιορισμοί, που έχουν επιβληθεί τα τελευταία χρόνια στην αλιεία. Σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία του FAO (2020), το 65% της εγχώριας παραγωγής προέρχεται από την υδατοκαλλιέργεια και το 35% από την αλιεία (Γράφημα 1.2).



Γράφημα 1.2 Προσφορά αλιευτικών προϊόντων στην Ελλάδα. <http><sup>2</sup>

Στις μέρες μας, ο τομέας καλύπτει εξ'ολοκλήρου τις ανάγκες της ελληνικής αγοράς και το μεγαλύτερο μέρος της παραγόμενης ποσότητας (80%) εξάγεται στις αγορές του εξωτερικού, με μηνιαίες εξαγωγές από 6.500 – 9.500 τόνους. Όπως καταγράφηκε το 2022, έγιναν εξαγωγές σε 40 χώρες, με κυριότερες αγορές την Ιταλία, Ισπανία και Γαλλία, που απορροφούν πάνω από τη μισή Ελληνική παραγωγή. Σε αυτές τις χώρες πωλήθηκαν το 2022 72.800 τόνοι, δηλαδή το 58% της ελληνικής παραγωγής. Τα ψάρια, κυρίως το λαβράκι και η τσιπούρα αποτελούν τον τρίτο μεγαλύτερο αγροτικό τομέα εξαγωγών, μετά το ελαιόλαδο και τον καπνό και αντιμετωπίζεται ως στρατηγικό προϊόν από την ελληνική κυβέρνηση.

Η Ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια ευρύαλων ψαριών ηγείται στη Μεσόγειο, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 65% της Ευρωπαϊκής και της Μεσογειακής παραγωγής. Οι φυσικές συνθήκες της χώρας: ήπιο κλίμα, καθαρά νερά, περίπου 3.000 νησιά και μακριά ακτογραμμή ευνοούν τις υδατοκαλλιέργειες. Τα σημαντικότερα εμπορικά είδη ιχθύων που εκτρέφονται σήμερα, με ευρεία απήχηση και αποδοχή στην ελληνική και παγκόσμια αγορά είναι η τσιπούρα, το λαβράκι και σε μικρότερες ποσότητες η πέστροφα, το ευρωπαϊκό χέλι και ο κυπρίνος (Stirling report, 2004).

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και η τσιπούρα (*Sparus aurata*) αποτελούν το 95% περίπου της συνολικής παραγωγής στην Ελλάδα, ενώ τα υπόλοιπα είδη: λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*), φαγκρί (*Pagrus pagrus*), μυλοκόπι (*Umbrina Cirrosa*), μυτάκι (*Puntazzo puntazzo*) και σικιός (*Sciaena umbra*) παράγονται σε μικρότερες

ποσότητες. Υπάρχει επίσης μια σημαντική παραγωγή των οστρακοειδών και δίθυρων μαλάκιων, κυρίως μύδια, μικρότερης όμως οικονομικής αξίας.

Μια εκτίμηση της παραγωγής της τσιπούρας και του λαβρακιού της Ελλάδας ανέρχονταν στους 125.550 τόνους το 2022 με 52.500 τόνοι λαβράκι και 73.050 τόνοι τσιπούρα. Συγκριτικά με το 2021, παρατηρήθηκε αύξηση 7,5% ως προς τον όγκο παραγωγής και 10% ως προς την αξία πωλήσεων. Η θέση της Ελλάδας στην παραγωγή τσιπούρας ήταν ισχυρότερη, όπου συγκέντρωσε και το 54% περίπου της διεθνούς παραγωγής. Επιπλέον, για το 2023 εκτιμάται ότι η παραγωγή αυτών των δύο ειδών θα αυξηθεί κατά 2% και θα ξεπεράσει τους 127.000 τόνους (<http><sup>2</sup>).

Οι ιχθυοκαλλιέργειες αποτελούν πλέον ένα από τους δυναμικότερους παραγωγικούς κλάδους της χώρας μας, ο οποίος ενσωματώνει την υψηλή τεχνογνωσία, συμβάλλει στη μείωση της υπεραλίευσης, στη μείωση των εισαγωγών ιχθύων, βελτιώνοντας το εμπορικό ισοζύγιο σε επίπεδο εθνικό αλλά και της Ευρωπαϊκής Ένωσης. (Stirling report, 2004).



Εικόνα 1.3. Ιχθυοκαλλιέργειες. <http><sup>3</sup>

### 1.1.2 Παθολογικά προβλήματα στις υδατοκαλλιέργειες

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που αντιμετωπίζουν σήμερα οι ιχθυοκαλλιέργειες σε παγκόσμιο επίπεδο είναι τα νοσήματα και η παθολογία των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών, καθώς επηρεάζουν την ανάπτυξη των ψαριών, προκαλούν μείωση της παραγωγής, αύξηση του κόστους και προβλήματα στην ευζωία των ψαριών. Η εντατική εκτροφική δραστηριότητα ψαριών έχει αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης μολυσματικών νοσημάτων παγκοσμίως. Τα παθολογικά περιστατικά που εμφανίζονται στις εκτροφές έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην

παραγωγή, όχι μόνο εξαιτίας των μεγάλων απωλειών που επιφέρουν και των υψηλών θεραπευτικών δαπανών, αλλά και εξαιτίας της υποβάθμισης της ποιότητας του τελικού προϊόντος (Ράγιας & Αθανασοπούλου, 2005). Τα νοσήματα αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους περιοριστικούς παράγοντες της οικονομικής σταθερότητας και ανάπτυξης των υδατοκαλλιεργειών, ενώ κάποιοι παθογόνοι μικροοργανισμοί των ψαριών αποτελούν κίνδυνο και για τη δημόσια υγεία. Τα περισσότερα νοσήματα των εκτρεφόμενων ψαριών έχουν προέλθει από τους άγριους πληθυσμούς, καθώς η στενή επαφή μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων ψαριών οδηγεί στην ανταλλαγή παθογόνων.

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

Η εκδήλωση των νοσημάτων είναι συνήθως το αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης παθογόνων παραγόντων, ψαριών και συνθηκών περιβάλλοντος. Τα ψάρια στις εντατικές καλλιέργειες επηρεάζονται συνεχώς από περιβαλλοντικές αλλαγές και πρακτικές διαχείρισης, όπως χειρισμοί, συνωστισμός, μεταφορά, κακή διατροφή, μεταβολές θερμοκρασίας, και κακή ποιότητα νερού. Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν στρες και να επηρεάσουν τους μηχανισμούς ομοιόστασης των ψαριών, ευαισθητοποιώντας τα ψάρια σε ένα πλήθος παθογόνων ([http<sup>4</sup>](http://)).

Οι απαραίτητες προϋποθέσεις για την εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων στα ψάρια είναι:

1. Η παρουσία του παθογόνου παράγοντα (ιδιαίτερα σε υψηλές θερμοκρασίες νερού και σε συνθήκες μεγάλης ιχθυοπυκνότητας).
2. Η έλλειψη κατάλληλων συνθηκών διαβίωσης των ψαριών, όπως η υπερβολική ποσότητα τροφής, η έλλειψη τακτικής αλλαγής διχτυών, κλπ.
3. Η ευαισθησία του κάθε ψαριού που επηρεάζεται από παράγοντες στρες και ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης και το είδος του ψαριού (Αθανασοπούλου, 2006).

Τα βασικά παθογόνα αίτια των μεταδοτικών ασθενειών, που προσδιορίζουν και τις βασικές ομάδες αυτών των ασθενειών, είναι: ιοί, βακτήρια, παράσιτα, μύκητες.

### 1.1.3 Εξωπαρασιτώσεις στις Ελληνικές υδατοκαλλιέργειες

Οι πιο σοβαρές παρασιτικές ασθένειες στη μεσογειακή θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια οφείλονται σε κωπήποδα, μυξοσπορίδια, μονογενή και μυξοβακτήρια των γενών *Flavobacterium*, βακτήρια του γένους *Listonella* και το *Photobacterium* (*Pasteurella piscicida*). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί αυξήθηκαν λόγω της ανάπτυξης των υδατοκαλλιεργειών και της εντατικής εκτροφικής δραστηριότητας.

Σύμφωνα με τα δεδομένα έως τώρα, αντιπαρασιτική θεραπεία δεν υπάρχει και οι εκτροφείς χρησιμοποιούν φορμαλδεΰδη, η οποία εμφανίζει αυξημένη επικινδυνότητα για το ζωικό κεφάλαιο και τους χειριστές και δυσκολεύει την εφαρμογή. Η αντιβιοτική θεραπεία των Μυξοβακτηρίων αποτελεί, επίσης, πρόβλημα καθόσον τα είδη αυτά χρειάζονται ειδικά υποστρώματα ανάπτυξης με αποτέλεσμα να μην γίνονται αντιβιογράμματα και η θεραπεία στηρίζεται στην εκκρίζωση της μυξοβακτηριδίδωσης από το εκτροφικό απόθεμα των ιχθυδίων μετά την εκκόλαψη και των νεαρών ιχθυδίων και την αντικατάστασή του με νέο απόθεμα, σε περίπτωση υψηλών απωλειών ιχθυδίων. Η φυτοθεραπεία χρησιμοποιείται ευρέως στον άνθρωπο αλλά η χρήση της στις υδατοκαλλιέργειες είναι περιορισμένη (Athanasopoulou et al., 2004a,b, Karagouni et al., 2005a,b, Golomazou et al., 2006a).

Η προσβολή της εκτρεφόμενης τσιπούρας (*Sparus aurata*) από μονογενή και ειδικά το *Sparicotyle* (*Microcotyle*) *chrysophrii* (Antonelli et al., 2010, 2012) αλλά και του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) από Ισόποδα και κωπήποδα, αποτελεί ένα συχνό πρόβλημα στη Μεσόγειο (Papapanagiotou & Trilles, 2001; Athanasopoulou et al., 2004a, 2009; Ragias et al., 2004, 2005a, b; Vagianou et al., 2009a,b).

Τα είδη ψαριών ελεύθερης διαβίωσης, που προσβάλλονται από ισόποδα παράσιτα, είναι οι κέφαλοι (*Mugil* sp, *Lisa* sp) (Ragias et al., 2005a), οι γόπες (*Boops boops*), οι σάλπες (*Sarpa salpa*), οι μурμουρές (*Lithognathus mormyrus*) και οι σαργοί (*Diplodus sargus*) (Golomazou et al., 2006b). Συνήθως, αυτά τα είδη ψαριών βρίσκονται γύρω από τους κλωβούς εκτροφής, τρέφονται από την περίσσεια τροφής των εκτρεφόμενων ψαριών και αποτελούν παθητικούς φορείς για τη μεταβίβαση των παρασίτων στα εκτρεφόμενα είδη (Vagianou et al, 2009b). Σύμφωνα με έρευνα που διεξήχθει στο Παν/μιο Θεσσαλίας, με την αυξανόμενη παραγωγή και άλλα είδη παρασίτων όπως τα κωπήποδα προκαλούν προβλήματα σε εκτρεφόμενα ψάρια

(Ragias et al., 2004). Αυτό αποτέλεσε το έναυσμα προκαταρκτικών μελετών για την εύρεση θεραπείας (Athanassopoulou et al., 2001a, Athanassopoulou et al 2001b, 2004d).

Επιπλέον κανένα από τα συνήθη αντιπαρασιτικά που χρησιμοποιούνται στις θαλάσσιες εκτροφές, δεν είναι εγκεκριμένα για τα Μεσογειακά είδη και δεν υπάρχουν νομοθετημένα MRL. Η δοσολογία αντιγράφεται από τα Salmonidae, το οποίο είναι επικίνδυνο λόγω της διαφορετικότητας των περιβαλλοντικών και βιολογικών συνθηκών των Μεσογειακών ειδών. Παρά το μεγάλο αριθμό αντιμικροβιακών ουσιών που παράγονται και εγκρίνονται για χρήση στην ζωική παραγωγή μόνο ελάχιστες τελικά εγκρίνονται για τα ψάρια των ιχθυοκαλλιεργειών. Για το λόγο αυτό και σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της EMEA επιβάλλεται η μελέτη των φαρμάκων και στα είδη ψαριών των θερμότερων-νότιων περιοχών, όπως η Ελλάδα.

Έως και το στάδιο της προπαχυνόμενης εκτροφής ψαριών (έως 20-25g), σε χειρσαίες δεξαμενές η χρήση αντιπαρασιτικών με λουτρά χρησιμοποιείται κυρίως, όπου ο σταθερός όγκος των δεξαμενών εξασφαλίζει σωστούς υπολογισμούς των δόσεων και διευκολύνει την επέμβαση των χειριστών (Κολυγιάς Μ. 2014)

#### **1.1.4 Χρήση φυτικών ουσιών σε υδατοκαλλιέργεια**

Οι αντιπαρασιτικές ουσίες, που χρησιμοποιούνται συνήθως, είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου, η τεταρτοταγής αμμωνία, η φορμαλίνη και η χλωραμίνη-T. Αυτές οι ενώσεις θεραπεύουν παρασιτικές και μυκητιακές ασθένειες στα εκτρεφόμενα ψάρια. Η έγκριση νέων φαρμάκων απαιτεί υψηλές δαπάνες, καθώς, εμπεριέχει υποχρεωτικά περιβαλλοντικές μελέτες και πειραματικά δεδομένα αποτελεσματικότητας και τοξικότητας στα υδρόβια είδη. Κάθε χρόνο παρουσιάζεται μικρός αριθμός βιβλιογραφικών δεδομένων σχετικά με νέα φάρμακα πιθανώς αποτελεσματικά κατά των παρασιτώσεων των ψαριών, όμως μέχρι στιγμής, μόνο ένα φάρμακο, η βενζοϊκή εμαμεκτίνη, έχει εγκριθεί και είναι αποτελεσματικό μόνο για τα κωπήποδα παράσιτα και όχι για τα μονογενή που, κυρίως, εμφανίζονται στη Μεσόγειο. Πριν από 26 χρόνια, οι Burka et al. (1997) αναφέρθηκαν στην ανησυχητική αύξηση της χρήσης «offlabel» απολυμαντικών, παρασιτοκτόνων και αντιβιοτικών στη θεραπεία ασθενειών που πλήττουν την υδατοκαλλιέργεια. Αυτό εξακολουθεί να είναι μια συνήθης πρακτική και αφορά στη χρήση ουσιών σε μεγαλύτερες δόσεις από αυτές που έχουν εγκριθεί, με μη-εγκεκριμένη χορήγηση, με προϊόντα αμφιβόλου καθαρότητας, προέλευσης και ποιότητας και με εμπειρική

θεραπεία, η οποία κατά προσέγγιση χρησιμοποιείται σε χερσαία είδη ζώων. Λόγω των επιβλαβών επιδράσεων ορισμένων φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην υδατοκαλλιέργεια, η χρήση «offlabel» παρουσιάζει ακόμη μεγαλύτερο κίνδυνο για το περιβάλλον, για τα ζώα και τους ανθρώπους. Αυτό σημαίνει ότι η δόση, ο χρόνος έκθεσης, η περίοδος αναμονής, η τοξικότητα και οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις δεν έχουν τεκμηριωθεί πλήρως για τα περισσότερα. Η Ευρωπαϊκή Ένωση υιοθέτησε μια στρατηγική για την ανάπτυξη της βιοοικονομίας στην Ευρώπη. Η βιοοικονομία βασίζεται στη χρήση καινοτόμων βιώσιμων βιολογικών πόρων για την κάλυψη της αυξανόμενης ζήτησης στον τομέα των τροφίμων, της ενέργειας και της βιομηχανίας. Στο πλαίσιο αυτό, γίνονται προσπάθειες έτσι ώστε να ξεπεραστούν τα εμπόδια στην αντιμετώπιση των ασθενειών των εκτρεφόμενων ζώων, αναπτύσσοντας προγράμματα εξεύρεσης νέων δραστικών θεραπευτικών ουσιών φιλικότερων προς το περιβάλλον, τους χειριστές και το ζωικό κεφάλαιο, με φυσική προέλευση (Κολυγάς Μ., 2014).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Σκοπός της έρευνας

Σκοπός της έρευνας είναι η ανάπτυξη προληπτικών ή/και θεραπευτικών προσεγγίσεων για τρεις σοβαρές ασθένειες της τσιπούρας με υψηλά επίπεδα θνησιμοτήτων, που οφείλονται σε μυξοβακτήρια των γενών *Flavobacterium tenacibaculum*, βακτήρια του γένους *Listonella* και *Photobacterium* (*Pasteurella*) *piscicida*, καθώς και σε *Sparicotyle chrysophrii* (*Monogenea: Polyopisthocotylea*). Οι προτεινόμενες προσεγγίσεις βασίστηκαν στη χρήση σιτηρεσίων, εμπλουτισμένων με εκχυλίσματα χερσαίων και θαλάσσιων ουσιών. Οι προτεινόμενες ουσίες δεν έχουν δοκιμαστεί μέχρι σήμερα έναντι παθογόνων στη Μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια. Μόνον το φυτό *Artemisia annua* έχει δοκιμαστεί έναντι του παρασίτου *Sparicotyle chrysophrii* στη τσιπούρα σε *in vitro* δοκιμές και σε εκτρεφόμενη τσιπούρα με άριστα αποτελέσματα (Ma et al. 2022). Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν τα: *Zingiber officinale*, *Aloe barbadensis*, πρόπολη, *Artemisia annua*, *Thymus vulgaris*, *Fucus vesiculosus*. Έγιναν *in vitro* δοκιμές με ένα μεγάλο εύρος ουσιών από τις οποίες επιλέχθηκαν οι πιο δραστικές. Οι αντιπαρασιτικές ουσίες δοκιμάστηκαν σε πειραματικές δεξαμενές ως προς την αποτελεσματικότητα έναντι συγκεκριμένων πειραματικών μολύνσεων των ψαριών. Όλες οι εργαστηριακές εξετάσεις πραγματοποιήθηκαν στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Ιχθυολογίας – Ιχθυοπαθολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

### 2.2 Υλικά και μέθοδοι

#### 2.2.1 Ψάρια

Τα πειραματικά ψάρια προμηθευτήκαν από την εταιρεία ΣΚΑΛΩΜΑ Α.Ε. μετά από ιχθυοπαθολογική διερεύνηση της τσιπούρας, που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο ώστε να εξασφαλιστεί η παρασίτωση στα πειραματικά ψάρια.

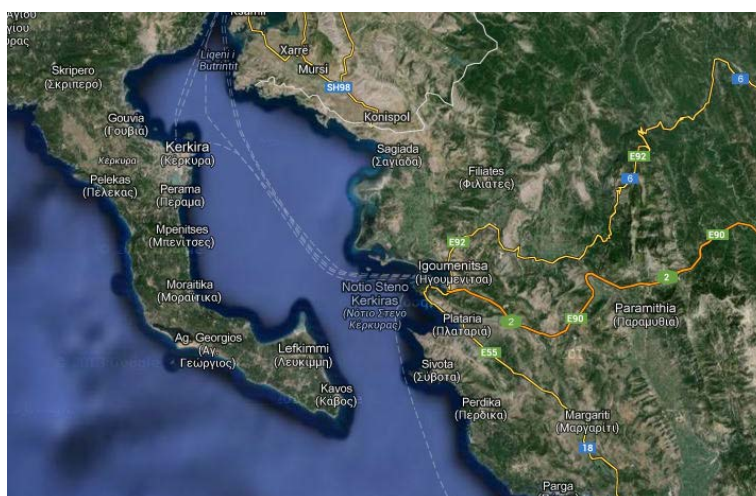
Συνεπώς, από 10 ιχθυοκλωβούς εμπορικής εκτροφής του εταίρου ΣΚΑΛΩΜΑ Α.Ε., ελήφθησαν 25 τυχαία δείγματα πριν την έναρξη της ερευνητικής εργασίας.

Συνολικά διενεργήθηκαν 2 δειγματοληψίες. Τα ψάρια εξετάστηκαν μέσω της διενέργειας μικροβιολογικών και παρασιτολογικών εξετάσεων, προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη παθογόνων παραγόντων. Έγινε ταυτοποίηση των παρασίτων και των βακτηρίων που απομονώθηκαν με βιοχημικές αναλύσεις και τη χρήση κλειδών όσον αφορά στα *Vibrio harveyi*, *Tenacibaculum maritimum*, *Aeromonas veronii veronii* και *Aeromonas veronii sobria*.

### 2.2.2 Δειγματοληψίες – Περιοχή δειγματοληψίας

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στην περιοχή Σαγιάδα (Εικόνα 2.1), του νομού Θεσπρωτίας από τη μονάδα ΣΚΑΛΩΜΑ Α.Ε.(Ιόνιο Πέλαγος).

Η Σαγιάδα βρίσκεται στο άκρο της βορειοδυτικής Ελλάδας, στα βορειοδυτικά του νομού Θεσπρωτίας απέναντι από την πόλη της Κέρκυρας, ανήκει στον δήμο Φιλιατών της Περιφερειακής Ενότητας Θεσπρωτίας. Ο δήμος Σαγιάδας έχει πληθυσμό 2.160 κατοίκους και βρίσκεται σε υψόμετρο 40 μέτρα από την επιφάνεια της θάλασσας (<http><sup>3</sup>).



Εικόνα 2.1. Περιοχή δειγματοληψίας – Σαγιάδα στο Νομό Θεσπρωτίας. <http><sup>3</sup>

### 2.2.3 Φυτικές ουσίες

Το τζίντζερ και τα αιθέρια έλαια του θυμαριού προήλθαν από εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα. Παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα αλόης και *Artemisia annua* στο εργαστήριο.

Τα εκχυλίσματα των φυτών τζίντζερ, αλόης, *Artemisia annua* και θυμαριού παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται παρακάτω:

Τα αποξηραμένα φυτά εκχυλίστηκαν με διαλύτη (απεσταγμένο νερό, απόλυτη αιθανόλη και μεθανόλη) σε αναλογία 100 g φυτού / 500 ml διαλύτη, για 2 ώρες. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό και το διήθημα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού με περιστροφικό εξατμιστή. Το στερεό προϊόν αποθηκεύτηκε στο ψυγείο μέχρι τη χρήση του.

Τα φυτικά εκχυλίσματα θα είναι πιο αποτελεσματικά σε *in vitro* πειράματα, θα ακολουθηθεί η περιγραφείσα μεθοδολογία για παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας εκχυλισμάτων, ούτως ώστε να ενσωματωθούν στη συνέχεια στην τροφή για *in vivo* πειράματα με ψάρια σε δεξαμενές και πειράματα πεδίου σε μεγαλύτερα ψάρια.

Αναλυτικά: Αρτεμισία (*Artemisia annua* L.): σε 200 g αποξηραμένης δρόγης προστέθηκε 1 L απόλυτη αιθανόλη για 4 ώρες. Στη συνέχεια διηθήθηκε υπό κενό, και το στερεό υπόλειμμα ξεπλύθηκε με επιπλέον 0.5 L απόλυτη αιθανόλη. Στη συνέχεια, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση για να δώσει στερεό αιθανολικό εκχύλισμα 11,5 g (5,75% επί της αρχικής ξηράς δρόγης) (Perazzo et al., 2008).

Αλόη (*Aloe barbadensis* Miller): σε 200 g αποξηραμένης δρόγης προστέθηκε 1 L 70% αιθανόλη και διαβρέχτηκε για 12 ώρες. Έπειτα, διηθήθηκε υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα ξεπλύθηκε με 0,5 L 70% αιθανόλη και διηθήθηκε υπό κενό. Το διήθημα εξατμίστηκε σε περιστροφικό εξατμιστή μέχρι ξηρού 10 g στερεού υπολείμματος (5%) (Khanal et al., 2021).

Τζίντζερ (πιπερόριζα) (*Zingiber officinale* Roscoe): σε 200 g αποξηραμένης δρόγης προστέθηκε 1 L απόλυτης αιθανόλης για 72 ώρες. Στη συνέχεια, διηθήθηκε υπό κενό, και το στερεό υπόλειμμα ξεπλύθηκε με επιπλέον 0.5 L απόλυτη αιθανόλη. Μετά, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση για να δώσει στερεό αιθανολικό εκχύλισμα 11 g (5% επί της αρχικής ξηράς δρόγης) (Sinh et al., 2019).

Θυμάρι (*Thymus vulgaris*): σε 200 g αποξηραμένης δρόγης προστέθηκε 1 L 80% αιθανόλη και διαβράχτηκε για 12 ώρες σε θερμοκρασία 40 °C. Η διαβραχθείσα δρόγη διηθήθηκε υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα ξεπλύθηκε με 0,5 L 70% αιθανόλη μετά από συμπίεση. Το διήθημα εξατμίστηκε σε περιστροφικό εξατμιστή μέχρι ξηρού 20 g στερεού υπολείμματος (10%) (Fayad et al., 2013).

Για τα υπόλοιπα φυτά ακολουθήθηκε πανομοιότυπη διαδικασία με διαβροχή για ορισμένο χρόνο, διήθηση υπό κενό, πλύσιμο με τον ίδιο διαλύτη, εξάτμιση του διαλύτη σε περιστροφικό εξατμιστή και η απόδοση σε στερεό υπόλειμμα ήταν περίπου 5%. Συγκεκριμένα: για το γεράνι (*Geranium dissectum* L.), εκχύλιση με 40% αιθανόλη για 72 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (Androutsopoulou et al., 2021).

Για τον βασιλικό (*Ocimum basilicum*), με 70% αιθανόλη για 72 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (Güez et al., 2017), για το τειϊόδεντρο (*Malaleuca alternifolia*) με απόλυτη αιθανόλη 72 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (Baker et al., 2000), για την κανέλα (*Cinnamomum verum*) με απόλυτη αιθανόλη για 8 ώρες στους 40 °C (Pandey and Chandra, 2015), για το γαρίφαλο (*Syzygium aromaticum* Linn.) με 80% μεθανόλη για 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (Dua et al., 2014), για τη ρίγανη (*Origanum vulgare* L.) σε 50% αιθανόλη για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (Torre et al., 2020), για το πατσουλί (*Pogostemon cablin*) σε 95% αιθανόλη για 72 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (Dechayont et al., 2017), για τη λεβάντα (*Lavandula angustifolia*) σε 50% μεθανόλη για 5 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου (Stanciu et al., 2019), για το λιβάνι (*Boswellia carteri*), με αιθανόλη για 2 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου (Jaafari-Ashkavandi et al., 2017), για τον ευκάλυπτο (*Eucalyptus globules*) σε 50% αιθανόλη για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (Fernández-Agulló et al., 2015) και για την ματζουράνα (*Origanum majorana*) σε απόλυτη αιθανόλη για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (Lahreche et al., 2020).

#### 2.2.4 In vitro πειράματα

Μελετήθηκε η δράση των προτεινόμενων ουσιών σε εργαστηριακές καλλιέργειες μυξοβακτηρίων (*Tenacibaculum maritimum*), που έχουν απομονωθεί από εκτρεφόμενες τσιπούρες της μονάδας. Εκτός από τα μυξοβακτήρια επιλέχθηκαν και 3 βακτήρια (*V.harveyi*, *Aeromonas veronii Sobria*, *Aeromonas veronii veronii*), που έχουν αναφερθεί σε καλλιέργειες τσιπούρας με σημαντικές οικονομικές απώλειες πρόσφατα. Στα παθογόνα αυτά έγινε έλεγχος αποτελεσματικότητας για να εμπλουτιστούν τα αποτελέσματα για μελλοντική χρήση. Συνοπτικά, ο έλεγχος αποτελεσματικότητας έγινε με χρήση των εκχυλισμάτων αφού πρώτα μετατράπηκαν σε γαλακτώματα με χρήση λεκιθίνης, όπου η αναλογία ήταν (1/5, λεκιθίνη/εκχύλισμα).

Επιλέχθηκε ως βασικό υπόστρωμα το Mueller-Hinton Άγαρ, όπως καθορίζεται από την επιτροπή EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), καθώς και από το Ινστιτούτο CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) για δοκιμές αντιμικροβιακής ευαισθησίας μέσω διάχυσης δίσκων (Disk Diffusion Antimicrobial Susceptibility Testing).

Για τον υπολογισμό της ευαισθησίας του εκχυλίσματος έναντι του παθογόνου έγινε μέτρηση του μήκους του κύκλου αναστολής

Επιπλέον, με βάση τις δοκιμασίες αποτελεσματικότητας, σε πρώτη φάση, επιλέχθηκαν 2 ουσίες για ενσωμάτωση σε σιτηρέσια σε προεπιλεγμένη συγκέντρωση, και χορηγήθηκαν για 35 μέρες σε ψάρια, που παρέμειναν σε πειραματικές δεξαμενές του εργαστηρίου με ατομική ανακύκλωση νερού και αερισμό και μολύνθηκαν με μυξοβακτήρια.

Τα βακτήρια, τα οποία απομονώθηκαν κατά τη λήψη δειγμάτων για καλλιέργεια από νοσούσες τσιπούρες ανήκουν στα είδη: *Vibrio harveyi*, *Aeromonas veronii veronii* και *Aeromonas veronii sobria*. Το *Tenacibaculum maritimum* είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας της μυξοβακτηριδίασης στην Μεσόγειο, όπως και στη μονάδα. Το είδος *Vibrio harveyi* ανήκει στην οικογένεια των βακτηρίων *Vibrionaceae*.

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

Για τον έλεγχο του βιοχημικού προφίλ των βακτηρίων και τις βιοχημικές δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά αντιδραστήρια API 20E, API ZYM and API 50CH (biomérieux), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, με κάποιες τροποποιήσεις, που αφορούσαν την θερμοκρασία επώασης και τον διαλύτη του βακτηριακού εναιωρήματος. Αποστειρωμένο θαλασσινό νερό 50% χρησιμοποιήθηκε σαν διαλύτης, ενώ οι ταινίες επώαστηκαν στους 19 °C και 25 °C για 48 ώρες. Πρόκειται για τυποποιημένα συστήματα γρήγορης ταυτοποίησης, για αρνητικά κατά χρώση Gram βακτήρια, τα οποία χρησιμοποιούν έναν αριθμό μικρής κλίμακας βιοχημικών τεστ τα αποτελέσματα των οποίων συγκρίνονται με μια βάση δεδομένων.

Στην περίπτωση του *T. maritimum* η βάση δεδομένων τόσο για το API 20E όσο και για τα υπόλοιπα δεν περιέχει το βακτήριο στις καταχωρήσεις, έτσι τα αποτελέσματα που προέκυψαν, συγκρίθηκαν τόσο μεταξύ τους όσο και βιβλιογραφικά για να επαληθευτεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων (Suzuki et al., 2001; Buller, 2004; Mouriño et al., 2008; Avendaño-Herrera, 2009), με σκοπό την διερεύνηση μιας δυνατής ταξινόμησης των μυξοβακτηριδίων μέσω μοναδικών βιοχημικών χαρακτηριστικών.

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

### **2.2.5 Παρασιτολογική εξέταση**

Τα ψάρια υποβλήθηκαν επίσης σε παρασιτολογική εξέταση. Κατά την παρασιτολογική εξέταση, εξετάστηκαν για παρασιτικούς οργανισμούς τα βράγχια, το δέρμα και ορισμένα εσωτερικά όργανα (εντερικός σωλήνας & χοληδόχος κύστη). Η παρασιτολογική εξέταση των ιχθύων πραγματοποιήθηκε σε νωπά και μονιμοποιημένα παρασκευάσματα σύμφωνα με τις μεθόδους, που έχουν περιγράψει οι Roberts (2001) και Athanassopoulou (1990). Η ταυτοποίηση των παρασίτων έγινε αμέσως μετά την ανεύρεσή τους, με την μικροσκοπική παρατήρηση των νωπών παρασκευασμάτων και σε συνδυασμό με τα μονιμοποιηθέντα παρασκευάσματα με βάση τις κλείδες των Yamaguti (1963), Athanassopoulou (1990).

## **2.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ**

### **2.3.1 Δεξαμενές**

Κάθε ομάδα, διατηρήθηκε σε κυκλικά ενυδρεία των 250 L νερού, αρχικής πυκνότητας  $2 \text{ kg m}^{-3}$ , και αλατότητας 33 ‰, με σύστημα ανακύκλωσης του νερού και βιολογικά φίλτρα (Εικόνα 2.2). Η θερμοκρασία του νερού ήταν  $22 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Η διάρκεια παρακολούθησης των ψαριών ήταν 35 μέρες.



**Εικόνα 2.2.** Φωτογραφίες των δεξαμενών, όπου διατηρήθηκαν τα ενυδρεία.

### **2.3.2 Εξέταση των ψαριών πριν την έναρξη των πειραμάτων**

Για τον σκοπό αυτό, μεταφέρθηκαν και προσαρμόστηκαν υγιή ιχθύδια τσιπούρας (10.3 g βάρος και 9 mm μήκος) στα ενυδρεία του εργαστηρίου Ιχθυοπαθολογίας. Όλα τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες των πειραμάτων, μεταφέρθηκαν στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου της Κτηνιατρικής Σχολής στην Καρδίτσα από την μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας και αρχικά εγκλιματίστηκαν για 10 ημέρες. 10 τυχαίως επιλεγμένα ιχθύδια υποβλήθηκαν σε πλήρη ιχθυοπαθολογικό έλεγχο. Πριν την έναρξη των πειραμάτων

πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογική (δέρμα, βράγχια, νεφρός) και παρασιτολογική εξέταση (Roberts, 2001), όπου και διαπιστώθηκε ότι τα ψάρια είναι υγιή και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις πειραματικές διαδικασίες. Πριν τη μεταφορά των ιχθυδίων στις πειραματικές δεξαμενές, τα ιχθύδια έλαβαν πέντε διατροφικά πειραματικά πακέτα. Το ένα διατροφικό πακέτο (control) δεν περιείχε πρόσθετα. Τα άλλα τέσσερα διατροφικά πακέτα ήταν εμπλουτισμένα με συμπληρώματα διατροφής με θυμάρι 0,5%, θυμάρι 0,25%, Αρτεμισία 0,5% και Αρτεμισία 0,25%. Τα ψάρια εγκλιματίστηκαν γρήγορα και δέχθηκαν την ξηρά τροφή. Όλες οι ομάδες των πειραμάτων ακολούθησαν το ίδιο διατροφικό πρωτόκολλο, ταΐζονταν καθημερινά σε ποσότητα, 1.5% του σωματικού τους βάρους.

Η μόλυνση με παράσιτα έγινε με συγχρωτισμό με μολυσμένα άτομα (Golomazou.2006a,b, Sitza-Bobadilla et al. 2009).

Δεξαμενές με αντίστοιχο αριθμό ψαριών διατράφηκαν με εμπορικά διαθέσιμη τροφή και επιμολύνθηκαν με τον ίδιο τρόπο και αποτέλεσαν συγκριτικούς μάρτυρες. Επιπλέον, δεξαμενές με ψάρια που διατράφηκαν για 35 μέρες με εμπορική τροφή ή σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με τις προτεινόμενες ουσίες και δεν επιμολύνθηκαν αποτέλεσαν τους αρνητικούς μάρτυρες.



**Εικόνα 2.3. Πειραματικές διατάξεις στο εργαστήριο.**

Σε καθημερινή βάση μετά τη μόλυνση γινόταν καταγραφή των θνησιμοτήτων. Τα νεκρά ψάρια αναλύονταν ως προς το παρασιτικό φορτίο. Παράλληλα, κάθε 15 ημέρες λαμβάνονταν δείγματα από κάθε πειραματική δεξαμενή προκειμένου να μελετηθεί το ποσοστό και η ένταση της μόλυνσης, και να γίνει ιστολογική εξέταση όλων των οργάνων. Ο προσδιορισμός των μονογενών, ισόποδων και κωπήποδων παρασίτων έγινε σύμφωνα με τους Lom & Dykova (1991) και Roberts (2001). Ο

υπολογισμός της παρουσίας έγινε σύμφωνα με τους Margolis et al.,(1982). Ως παρουσία ορίστηκε ο αριθμός των ψαριών που έφεραν έστω ένα από το υπό διερεύνηση παράσιτο, προς τον συνολικό αριθμό των εξετασθέντων ψαριών.

### 2.3.3 Πειραματικές μολύνσεις (Μυξοβακτήρια)

450 ιχθύδια τσιπούρας, βάρους 10,3 g και μήκους 9 mm, παραλήφθηκαν στο εργαστήριο και εγκλιματίστηκαν για 10 μέρες. Έπειτα, επιλέχθηκαν 10 ψάρια τυχαίως, εξετάστηκαν ιχθυοπαθολογικά και βρέθηκαν όλα υγιή. Μετά, χωρίστηκαν τυχαία σε 15 δεξαμενές, από 30 ψάρια σε κάθε κυκλική δεξαμενή. Κάθε ομάδα διατηρήθηκε σε ενυδρεία των 250 L νερού με σύστημα ανακύκλωσης νερού και βιολογικά φίλτρα. Η θερμοκρασία του νερού ήταν  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Μετά τον εγκλιματισμό των ψαριών, ξεκίνησαν οι εμπλουτισμένες τροφές με τις παρακάτω ουσίες ανά δεξαμενή: μία δεξαμενή μάρτυρα με λεκιθίνη, δύο δεξαμενές με θυμάρι 0,50%, δύο δεξαμενές με θυμάρι 0,25%, δύο δεξαμενές με *Artemisia* 0,50% και δύο δεξαμενές με *Artemisia* 0,25%.

Οι 3 πειραματικές μολύνσεις έγιναν με στελέχη καθαρών μυξοβακτηριδίων, τα οποία υπήρχαν στην τράπεζα του εργαστηρίου μας από ψάρια της ίδιας περιοχής (Σαγιάδα) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο μόλυνσης της βιβλιογραφίας (Γουρζιώτη E., 2014). Ο ακριβής αριθμός των ενοφθαλμισμένων βακτηριδίων έγινε με βάση την διεθνή βιβλιογραφία (Avendano-Herrera et al., 2006). Τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις δοκιμές της λοιμογόνου δύναμης αναπτύχθηκαν από αυτά που προέκυψαν από τα ετοιμοθάνατα ψάρια κλινικών περιστατικών (δίοδοι για την ανάκτηση της παθογένειας). Η μόλυνση έγινε με εμβάπτιση σε προκαθορισμένες συγκεντρώσεις βακτηριδίων,  $1.0 \times 10^6$  *Tenacibaculum maritimum* cells/ml, η δόση ήταν 1ml/δεξαμενή για 18 ώρες. Η θερμοκρασία ήταν  $22^\circ\text{C}$  και υπήρχε παροχή οξυγόνου  $6.25 \text{ mg L}^{-1}$  στη δεξαμενή. Μετά από 18 ώρες, το νερό σταδιακά άλλαξε και εξετάστηκαν οι θνησιμότητες. Η πειραματική διαδικασία είχε διάρκεια 20 μέρες και ελήφθησαν δείγματα ψαριών την ημέρα 5, 10 και 20 μετά την εμβάπτιση.

### 2.3.4 Πειραματική Μόλυνση (Παράσιτα)

500 ιχθύδια τσιπούρας, βάρους 70 g, παραλήφθηκαν στο εργαστήριο. Τα συγκεκριμένα ιχθύδια εγκλιματίστηκαν για 5 μέρες και εμβαπτίστηκαν σε λουτρά φορμόλης για να είναι σίγουρα καθαρά, ώστε να μολυνθούν με Τρηματώδη αργότερα. Επιλέχθηκαν τυχαία και εξετάστηκαν 10 ψάρια και ήταν όλα υγιή. Έπειτα, χωρίστηκαν σε στρογγυλά ενυδρεία των 250 L νερού από 55 ψάρια περίπου σε κάθε ενυδρείο. Κάθε ομάδα διατηρήθηκε σε ενυδρεία νερού με σύστημα ανακύκλωσης νερού και βιολογικά φίλτρα. Η θερμοκρασία του νερού ήταν  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Μετά τον εγκλιματισμό των ψαριών, ξεκίνησαν οι εμπλουτισμένες τροφές με τις παρακάτω ουσίες ανά δεξαμενή: μία δεξαμενή μάρτυρα με λεκιθίνη, μία δεξαμενή με θυμάρι 0,50%, μία δεξαμενή με θυμάρι 0,25%, μία δεξαμενή με *Artemisia* 0,50% και μία δεξαμενή με *Artemisia* 0,25%. Μετά από 20 μέρες τα ψάρια εμφάνισαν έντονη παρασίτωση με Τρηματώδη. Έγιναν δειγματοληψίες ανά δύο, τέσσερις και οκτώ μέρες για την καταγραφή των δεικτών ευρωστίας, παρασιτολογική εξέταση, μικροβίωμα και ιστοπαθολογία.

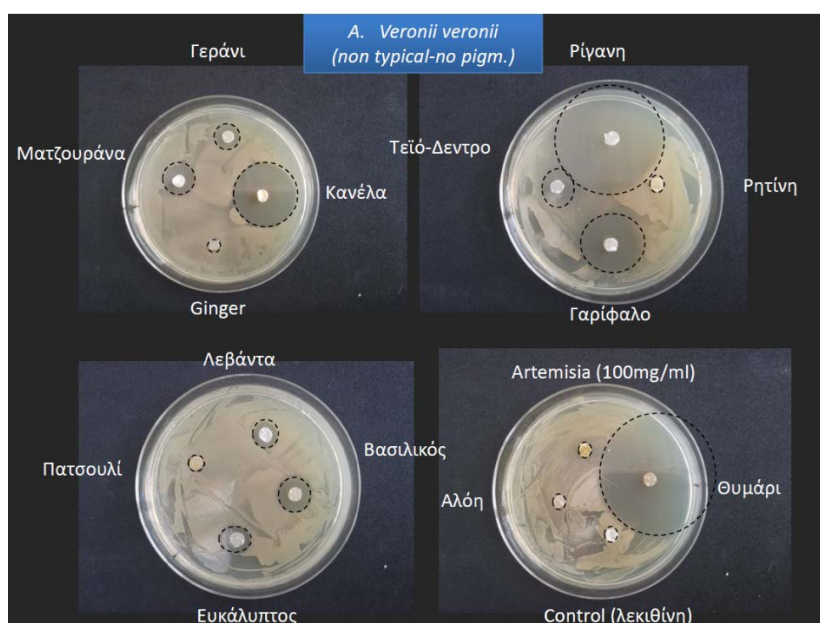
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Παθολογική διερεύνηση

Τα βακτήρια, τα οποία απομονώθηκαν κατά τη λήψη δειγμάτων για καλλιέργεια από νοσούσες τσιπούρες, που ανήκουν στα είδη: *Vibrio harveyi*, *Tenacibaculum maritimum*, *Aeromonas veronii veronii* και *Aeromonas veronii sobria*. Το *Tenacibaculum maritimum* είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας της μυξοβακτηριδίασης στην Μεσόγειο, όπως και στη μονάδα. Το είδος *Vibrio harveyi* ανήκει στην οικογένεια των βακτηρίων *Vibrionaceae*. Σε όλες τις δειγματοληψίες έγινε καταγραφή της παρασίτωσης των ιχθύων από το μονογενές παράσιτο *Microcotyle* spp (*Sparicotyle chrysophrii*), καθώς και των ενδοκυτταρικών παρασίτων, που ανήκουν στην κλάση των *Myxosporea*.

#### 3.1.1 In vitro

Εκ των αποτελεσμάτων για τα μυξοβακτήρια, τα εκχυλίσματα αρτεμισίας και κανέλας εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία έναντι των μυξοβακτηρίων, ακολουθούμενα από εκείνα του θυμαριού και της ρίγανης. Ακολουθούν εικόνες από τον in vitro έλεγχο διαφόρων αιθέριων ελαίων έναντι των *Veronii veronii* και *Veronii sobria* (Εικόνες 3.1 και 3.2).



**Εικόνα 3.1. Εικόνες από τον in vitro έλεγχο αιθέριων ελαίων έναντι του *Aeromonas veronii veronii* παθογόνων ψαριών Μεσογειακής καλλιέργειας.**



**Εικόνα 3.2. Εικόνες από τον in vitro έλεγχο αιθέριων ελαίων έναντι του *Aeromonas veronii sobria* παθογόνων ψαριών Μεσογειακής καλλιέργειας.**

Παρακάτω, παρουσιάζονται τρεις πίνακες (Πίνακας 1, Πίνακας 2 και Πίνακας 3) με τις αναλυτικές μετρήσεις ευαισθησίας των αιθέριων ελαίων για κάθε ένα από τα 3 παθογόνα ψαριών Μεσογειακής καλλιέργειας, καθώς και η μέση τιμή των μετρήσεων ευαισθησίας και η απόκλιση αυτών.

**Πίνακας 1. In vitro έλεγχος αιθέριων ελαίων έναντι του *Vibrio Harveyi* παθογόνων ψαριών Μεσογειακής καλλιέργειας**

| Αιθέρια Έλαια      | <i>Vibrio Harveyi</i> |      |      |     |      |      |      |      |     |      | Average     | St. Dev. |
|--------------------|-----------------------|------|------|-----|------|------|------|------|-----|------|-------------|----------|
| Control (λεκτιίνη) | 0                     | 0    | 0    | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0    | 0           | 0        |
| Γεράνι             | 0,1                   | 0,1  | 0,1  | 0,2 | 0    | 0,1  | 0,1  | 0,1  | 0,2 | 0,05 | 0,105       | 0,059861 |
| Βασιλικός          | 0,5                   | 0,5  | 0,7  | 0,5 | 0,4  | 0,5  | 0,5  | 0,8  | 0,5 | 0,6  | 0,55        | 0,117851 |
| Tea tree           | 0,7                   | 0,6  | 0,8  | 0,5 | 0,6  | 0,8  | 0,5  | 0,6  | 0,5 | 0,4  | 0,6         | 0,133333 |
| <b>Κανέλα</b>      | 1,1                   | 0,4  | 0,6  | 0,9 | 0,9  | 1,4  | 1,2  | 1,2  | 1,1 | 1,4  | <b>1,02</b> | 0,325918 |
| Γαρίφαλο           | 0,1                   | 0,1  | 0,1  | 0,1 | 0    | 0,1  | 0    | 0    | 0,1 | 0    | 0,06        | 0,05164  |
| Θυμάρι 100%        | 0,4                   | 0,7  | 0,4  | 0,4 | 0,8  | 0,7  | 0,6  | 0,7  | 0,7 | 0,5  | 0,59        | 0,152388 |
| Θυμάρι 100mg/ml    | 0                     | 0    | 0    | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0    | 0           | 0        |
| Ginger 100mg/ml    | 0                     | 0    | 0    | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0    | 0           | 0        |
| Artemisia 100mg/ml | 0                     | 0    | 0    | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0    | 0           | 0        |
| Aloe 100mg/ml      | 0                     | 0    | 0    | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0    | 0           | 0        |
| <b>Ρίγανη</b>      | 0,9                   | 1,3  | 0,8  | 1,2 | 0,9  | 1    | 1,2  | 1,1  | 1   | 0,8  | <b>1,02</b> | 0,175119 |
| Πατσουλί           | 0                     | 0    | 0    | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0    | 0           | 0        |
| Λεβάντα            | 0,2                   | 0,4  | 0,2  | 0,6 | 0,6  | 0,2  | 0,6  | 0,3  | 0,2 | 0,2  | 0,35        | 0,184089 |
| Ρητίνη             | 0                     | 0    | 0    | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0    | 0           | 0        |
| Ευκάλυπτος         | 0                     | 0    | 0    | 0   | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   | 0    | 0           | 0        |
| Ματζουράνα         | 0,2                   | 0,25 | 0,22 | 0,2 | 0,28 | 0,25 | 0,22 | 0,22 | 0,2 | 0,25 | 0,229       | 0,027264 |
| Aloe 100%          | 0,1                   | 0,1  | 0,1  | 0,2 | 0,1  | 0,2  | 0,2  | 0,1  | 0,1 | 0,1  | 0,13        | 0,048305 |

|                       |     |     |     |     |     |   |     |     |     |   |             |          |
|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|---|-----|-----|-----|---|-------------|----------|
| <b>Artemisia 100%</b> | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,8 | 1 | 0,9 | 0,8 | 1,1 | 1 | <b>0,92</b> | 0,091894 |
|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|---|-----|-----|-----|---|-------------|----------|

**Πίνακας 2. In vitro έλεγχος αιθέριων ελαίων έναντι του *Vibrio Harveyi* παθογόνων ψαριών Μεσογειακής καλλιέργειας**

| Αιθέρια Έλαια         | <i>A. Veronii veronii</i> (X) non pigmented-non biochemically typical |      |      |      |      |      |      |      |      |      | Average      | St. Dev. |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------------|----------|
| Control (λεκιθίνη)    | 0                                                                     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0            | 0        |
| Γεράνι                | 0,45                                                                  | 0,5  | 0,7  | 0,5  | 0,5  | 0,45 | 0,5  | 0,4  | 0,6  | 0,5  | 0,51         | 0,084327 |
| Βασιλικός             | 0,5                                                                   | 0,45 | 0,5  | 0,55 | 0,5  | 0,5  | 0,45 | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,495        | 0,028382 |
| Tea tree              | 0,3                                                                   | 0,2  | 0,3  | 0,25 | 0,3  | 0,3  | 0,35 | 0,3  | 0,3  | 0,35 | 0,295        | 0,04378  |
| <b>Κανέλα</b>         | 1,35                                                                  | 1    | 1,2  | 1,15 | 1,25 | 1,1  | 1,3  | 1,35 | 1,2  | 1,3  | <b>1,22</b>  | 0,113529 |
| Γαρίφαλο              | 0,7                                                                   | 0,7  | 0,65 | 0,7  | 0,7  | 0,7  | 0,75 | 0,7  | 0,7  | 0,7  | 0,7          | 0,02357  |
| <b>Θυμάρι 100%</b>    | 2,4                                                                   | 2,5  | 2,4  | 2,3  | 2,55 | 2,4  | 2,45 | 2,4  | 2,5  | 2,4  | <b>2,43</b>  | 0,071492 |
| Θυμάρι 100mg/ml       | 0,4                                                                   | 0,3  | 0,4  | 0,3  | 0,35 | 0,35 | 0,3  | 0,4  | 0,4  | 0,3  | 0,35         | 0,04714  |
| Ginger 100mg/ml       | 0,05                                                                  | 0    | 0,05 | 0    | 0    | 0    | 0,05 | 0    | 0    | 0    | 0,015        | 0,024152 |
| Artemisia 100mg/ml    | 0                                                                     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0            | 0        |
| Aloe 100mg/ml         | 0                                                                     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0            | 0        |
| <b>Ρίγανη</b>         | 1,8                                                                   | 1,8  | 1,8  | 1,8  | 1,65 | 1,8  | 1,8  | 1,8  | 1,8  | 1,75 | <b>1,78</b>  | 0,048305 |
| Πατσουλί              | 0,05                                                                  | 0    | 0    | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0    | 0    | 0,05 | 0,05 | 0,03         | 0,02582  |
| Λεβάντα               | 0,3                                                                   | 0,3  | 0,3  | 0,25 | 0,3  | 0,3  | 0,3  | 0,3  | 0,3  | 0,3  | 0,295        | 0,015811 |
| Ρητίνη                | 0                                                                     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0            | 0        |
| Ευκάλυπτος            | 0,4                                                                   | 0,4  | 0,4  | 0,35 | 0,4  | 0,4  | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,4  | 0,38         | 0,02582  |
| Ματζουράνα            | 0,4                                                                   | 0,45 | 0,4  | 0,4  | 0,45 | 0,4  | 0,4  | 0,4  | 0,4  | 0,4  | 0,41         | 0,021082 |
| Aloe 100%             | 0,2                                                                   | 0,1  | 0,1  | 0,1  | 0,1  | 0,1  | 0,15 | 0,1  | 0,15 | 0,15 | 0,125        | 0,035355 |
| <b>Artemisia 100%</b> | 0,8                                                                   | 0,7  | 0,8  | 0,8  | 0,8  | 0,75 | 0,8  | 0,8  | 0,8  | 0,8  | <b>0,785</b> | 0,033747 |

**Πίνακας 3. In vitro έλεγχος αιθέριων ελαίων έναντι του *A. veronii sobria* παθογόνων ψαριών Μεσογειακής καλλιέργειας**

| Αιθέρια Έλαια         | <i>A. Veronii sobria</i> (P) pigmented-biochemically typical |      |      |      |      |      |      |      |      |      | Average      | St. Dev. |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------------|----------|
| Control (λεκιθίνη)    | 0                                                            | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0            | 0        |
| Γεράνι                | 0,1                                                          | 0,1  | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,1  | 0,1  | 0,1  | 0,125        | 0,026352 |
| Βασιλικός             | 0,35                                                         | 0,35 | 0,3  | 0,3  | 0,3  | 0,3  | 0,35 | 0,3  | 0,3  | 0,3  | 0,315        | 0,024152 |
| Tea tree              | 0,4                                                          | 0,4  | 0,4  | 0,4  | 0,4  | 0,3  | 0,4  | 0,4  | 0,4  | 0,4  | 0,39         | 0,031623 |
| <b>Κανέλα</b>         | 1                                                            | 1,1  | 1,1  | 1    | 1,1  | 1,1  | 1,1  | 1,1  | 1,1  | 1    | <b>1,07</b>  | 0,048305 |
| Γαρίφαλο              | 0,9                                                          | 0,6  | 0,7  | 0,6  | 0,6  | 0,5  | 0,6  | 0,5  | 0,5  | 0,6  | 0,61         | 0,119722 |
| <b>Θυμάρι 100%</b>    | 1,8                                                          | 1,8  | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,7  | 1,7  | <b>1,72</b>  | 0,042164 |
| Θυμάρι 100mg/ml       | 0,2                                                          | 0,2  | 0,2  | 0,2  | 0,2  | 0,2  | 0,2  | 0,2  | 0,2  | 0,2  | 0,2          | 2,93E-17 |
| Ginger 100mg/ml       | 0,05                                                         | 0,05 | 0,5  | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,095        | 0,142302 |
| Artemisia 100mg/ml    | 0                                                            | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0            | 0        |
| Aloe 100mg/ml         | 0                                                            | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0            | 0        |
| <b>Ρίγανη</b>         | 1,6                                                          | 1,6  | 1,6  | 1,5  | 1,6  | 1,5  | 1,6  | 1,6  | 1,6  | 1,6  | <b>1,58</b>  | 0,042164 |
| Πατσουλί              | 0                                                            | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0            | 0        |
| Λεβάντα               | 0,15                                                         | 0,1  | 0,1  | 0,1  | 0,1  | 0,1  | 0,1  | 0,15 | 0,15 | 0,1  | 0,115        | 0,024152 |
| Ρητίνη                | 0                                                            | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0            | 0        |
| Ευκάλυπτος            | 0,3                                                          | 0,3  | 0,3  | 0,3  | 0,4  | 0,35 | 0,3  | 0,3  | 0,3  | 0,3  | 0,315        | 0,033747 |
| Ματζουράνα            | 0,3                                                          | 0,3  | 0,4  | 0,3  | 0,35 | 0,3  | 0,3  | 0,3  | 0,3  | 0,3  | 0,315        | 0,033747 |
| Aloe 100%             | 0,3                                                          | 0,2  | 0,15 | 0,2  | 0,2  | 0,25 | 0,2  | 0,2  | 0,25 | 0,2  | 0,215        | 0,041164 |
| <b>Artemisia 100%</b> | 0,65                                                         | 0,7  | 0,7  | 0,75 | 0,6  | 0,7  | 0,65 | 0,7  | 0,7  | 0,7  | <b>0,685</b> | 0,041164 |

Στον Πίνακα 4, παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα με τα αιθέρια έλαια της κανέλας, του θυμαριού, της ρίγανης και της αρτεμισίας, καθώς αυτά εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές ευαισθησίας στα *V. harveyi*, *A. veronii veronii* και *A. Veronii sobria*.

**Πίνακας 4. Συγκεντρωτικός πίνακας αιθέριων ελαίων με την υψηλότερη ευαισθησία σε 3 παθογόνα ψαριών Μεσογειακής καλλιέργειας.**

| Αιθέρια έλαια | <i>V. harveyi</i> | <i>A. veronii veronii</i> | <i>A. veronii sobria</i> |
|---------------|-------------------|---------------------------|--------------------------|
| Κανέλα        | 1,02              | 1,22                      | 1,07                     |
| Θυμάρι        | 0,59              | 2,43                      | 1,72                     |
| Ρίγανη        | 1,02              | 1,78                      | 1,58                     |
| Αρτεμισία     | 0,92              | 0,785                     | 0,68                     |

### 3.1.2 Αποτελέσματα πειραματικών μολύνσεων με *Tenacibaculum maritimum*

Κατά την πρώτη πειραματική μόλυνση με *T. maritimum*, το ποσοστό μόλυνσης και οι θνησιμότητες φαίνονται στον Πίνακα 5. Ο συνολικός αριθμός των ιχθυδίων τσιπούρας σε κάθε δεξαμενή ήταν 30. Παρατηρήθηκε ανορεξία και λήθαργος από την 3 μέρα. Την 4 και 5 μέρα τα ψάρια εμφάνισαν εξωτερικές, αιμορραγικές δερματικές βλάβες. Τις επόμενες μέρες, μεγαλύτερος αριθμός ψαριών παρουσίασε δερματικές βλάβες στο στόμα, στα περύγια και στην ουρά. Μέχρι το τέλος του πειράματος, παρατηρήθηκαν αιμορραγική στοματίτιδα, διάβρωση περυγίων. Η θνησιμότητα ξεκίνησε την 4 μέρα και μέχρι την ημέρα 12, και έφτασε το 18,8% στα ψάρια της δεξαμενής μάρτυρα.

**Πίνακας 5. Συγκεντρωτικός πίνακας με τις τιμές του αριθμού μολύνσεων, ποσοστού μόλυνσης %, αριθμού θνησιμότητας και ποσοστού θνησιμότητας % ανά δεξαμενή κατά την πρώτη πειραματική μόλυνση με *T. Maritimum*.**

| Δεξαμενές           | Αριθμός μολύνσεων | Ποσοστό μόλυνσης % | Αριθμός θνησιμότητας | Ποσοστό θνησιμότητας % |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------|------------------------|
| Μάρτυρα με λεκιθίνη | 4/30              | 13,3               | 5/30                 | 16,6                   |
| Θυμάρι 0,50%        | 1/30              | 3,3                | 2/30                 | 6,6                    |
| Θυμάρι 0,25%        | 0/30              | 0                  | 1/30                 | 3,3                    |
| Αρτεμισία 0,50%     | 1/30              | 3,3                | 1/30                 | 3,3                    |
| Αρτεμισία 0,25%     | 3/30              | 10                 | 3/30                 | 10                     |

Τα μικρότερα ποσοστά μόλυνσης και θνησιμότητας διακρίνονται στις εμπλουτισμένες τροφές με θυμάρι 0,25%.

Κατά τη δεύτερη πειραματική μόλυνση με *T. maritimum*, το ποσοστό μόλυνσης και οι θνησιμότητες φαίνονται στον Πίνακα 6. Ο συνολικός αριθμός των ιχθυδίων σε κάθε δεξαμενή ήταν 30.

**Πίνακας 6.** Συγκεντρωτικός πίνακας με τις τιμές του αριθμού μολύνσεων, ποσοστού μόλυνσης %, αριθμού θνησιμότητας και ποσοστού θνησιμότητας % ανά δεξαμενή κατά τη δεύτερη πειραματική μόλυνση με *T. Maritimum*.

| Δεξαμενές           | Αριθμός μολύνσεων | Ποσοστό μόλυνσης % | Αριθμός θνησιμότητας | Ποσοστό θνησιμότητας % |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------|------------------------|
| Μάρτυρα με λεκιθίνη | 5/30              | 16,6               | 6/30                 | 20                     |
| Θυμάρι 0,50%        | 0/30              | 0                  | 0/30                 | 0                      |
| Θυμάρι 0,25%        | 2/30              | 6,6                | 1/30                 | 3,3                    |
| Αρτεμισία 0,50%     | 1/30              | 3,3                | 2/30                 | 6,6                    |
| Αρτεμισία 0,25%     | 1/30              | 3,3                | 1/30                 | 3,3                    |

Τα ιχθύδια είχαν αλλοιώσεις μόνο στις ουρές, ενώ δεν είχαν άλλες μολύνσεις. Τελικά, τα ψάρια δε μολύνθηκαν περαιτέρω καθώς η τσιπούρα φαίνεται και από τη βιβλιογραφία να είναι ανθεκτική. Τα μικρότερα ποσοστά μόλυνσης και θνησιμότητας διακρίνονται στις εμπλουτισμένες τροφές με θυμάρι 0,50%.

Κατά την τρίτη πειραματική μόλυνση, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Τα ιχθύδια τσιπούρας ανά δεξαμενή ήταν 30.

**Πίνακας 7.** Συγκεντρωτικός πίνακας με τις τιμές του αριθμού μολύνσεων, ποσοστού μόλυνσης %, αριθμού θνησιμότητας και ποσοστού θνησιμότητας % ανά δεξαμενή κατά την τρίτη πειραματική μόλυνση με *T. Maritimum*.

| Δεξαμενές           | Αριθμός μολύνσεων | Ποσοστό μόλυνσης % | Αριθμός θνησιμότητας | Ποσοστό θνησιμότητας % |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------|------------------------|
| Μάρτυρα με λεκιθίνη | 6/30              | 20                 | 6/30                 | 20                     |
| Θυμάρι 0,50%        | 1/30              | 3,3                | 0/30                 | 0                      |
| Θυμάρι 0,25%        | 1/30              | 3,3                | 1/30                 | 3,3                    |
| Αρτεμισία 0,50%     | 2/30              | 6,6                | 1/30                 | 3,3                    |
| Αρτεμισία 0,25%     | 2/30              | 6,6                | 1/30                 | 3,3                    |

Σύμφωνα με τον Πίνακα 7, οι λιγότερες μολύνσεις παρατηρήθηκαν στη δεξαμενή, όπου χορηγήθηκε εμπλουτισμένη τροφή με θυμάρι 0,50% και 0,25%. Χαμηλές τιμές μολύνσεων παρατηρήθηκαν και στις δεξαμενές με αρτεμισία 0,50% αλλά και 0,25%. Τα χαμηλότερα ποσοστά θνησιμότητας εμφανίστηκαν στις

δεξαμενές, όπου χορηγήθηκαν εμπλουτισμένες τροφές με θυμάρι 0,50%. Συγκεκριμένα στη δεξαμενή με θυμάρι 0,50%, το ήπαρ εμφανίστηκε αποχρωματισμένο. Στη δεξαμενή με θυμάρι 0,25% το ήπαρ ήταν ελαφρώς αποχρωματισμένο και τα βράγχια αναιμικά. Επίσης, στις δεξαμενές με αρτεμισία 0,50% και 0,25% το ήπαρ ήταν αποχρωματισμένο.

Όσον αφορά άλλες μολύνσεις, στη δεξαμενή μάρτυρα με λεκιθίνη παρατηρήθηκε μόλυνση με *cryptocaryon* 3/30 ιχθύδια τσιπούρας (ποσοστό 10%) και η ίδια μόλυνση παρατηρήθηκε και στη δεξαμενή με αρτεμισία 0,50%, όπου 1/30 ιχθύδια τσιπούρας ήταν μολυσμένο (ποσοστό 3,3%).

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι το θυμάρι 0,50% και η αρτεμισία 0,50% έχουν καλή δράση, περιορίζουν τη μόλυνση και εμφανίζουν τη χαμηλότερη θνησιμότητα.

**Πίνακας 8.** Συγκεντρωτικός πίνακας με τις τιμές του αριθμού μολύνσεων, ποσοστού μόλυνσης % και έντασης ανά δεξαμενή κατά τις πειραματικές μολύνσεις με *T. Maritimum*.

| Δεξαμενές           | Αριθμός μολύνσεων | Αριθμός θνησιμότητας | Ποσοστό θνησιμότητας % |
|---------------------|-------------------|----------------------|------------------------|
| Μάρτυρα με λεκιθίνη | 15/90             | 17/90                | 18,8%                  |
| Θυμάρι 0,50%        | 2/90              | 2/90                 | 2,2%                   |
| Θυμάρι 0,25%        | 3/90              | 3/90                 | 3,3%                   |
| Αρτεμισία 0,50%     | 4/90              | 4/90                 | 4,4%                   |
| Αρτεμισία 0,25%     | 6/90              | 5/90                 | 5,5%                   |

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρείται ότι τα σιτηρέσια εμπλουτισμένα με θυμάρι 0,50% εμφανίζουν τα καλύτερα αποτελέσματα με τον μικρότερο αριθμό μολύνσεων και το χαμηλότερο ποσοστό θνησιμότητας.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι ενώσεις, που χρησιμοποιούνται κυρίως, για τη θεραπεία παρασιτικών και μυκητιακών ασθενειών στα εκτρεφόμενα ψάρια είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου, η τεταρτοταγής αμμωνία, η φορμαλίνη και η χλωραμίνη-Τ. Η έγκριση νέων φαρμάκων απαιτεί υψηλές δαπάνες, λόγω των περιβαλλοντικών μελετών και ελέγχων αποτελεσματικότητας και τοξικότητας στα υδρόβια είδη.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση ακολουθεί μια στρατηγική ανάπτυξης της βιοοικονομίας στην Ευρώπη. Η βιοοικονομία βασίζεται στη χρήση καινοτόμων βιώσιμων βιολογικών πόρων για την κάλυψη της αυξανόμενης ζήτησης στον τομέα των τροφίμων, της ενέργειας και της βιομηχανίας. Συνεπώς, αναπτύσσονται προγράμματα εξεύρεσης νέων δραστικών θεραπευτικών ουσιών φιλικότερων προς το περιβάλλον, τους χειριστές και το ζωικό κεφάλαιο και τα οποία θα έχουν φυσική προέλευση. Προς αυτή την κατεύθυνση, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Firmino et al., 2020) χρησιμοποιήθηκαν αιθέρια έλαια σκόρδου, καρβακρόλης και θυμόλης για να αντιμετωπιστούν μολύνσεις από *Sparicotyle chrysophrii* σε ιχθύδια τσιπούρας και τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά.

Από τις πειραματικές μολύνσεις με στελέχη *T. maritimum* σε ιχθύδια τσιπούρας, η παρατεταμένη βύθιση σε διάλυμα βακτηρίου *T. maritimum* για 18 ώρες αποδείχθηκε αποτελεσματική μέθοδος πρόκλησης μόλυνσης, διότι προκαλεί παρόμοια κλινικά συμπτώματα και θνησιμότητα, όπως συμβαίνει σε περιπτώσεις φυσικής μόλυνσης (Avendano-Herrera et al., 2006, Γουρζιώτη Ε. 2014). Συμπερασματικά, το μοντέλο πειραματικής μόλυνσης της τσιπούρας με εμβάπτιση σε συγκέντρωση βακτηρίων  $1,0 \times 10^6$  cells/ml έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό και μελλοντικές επιδημιολογικές μελέτες μπορούν να βασιστούν σε αυτό.

Τα πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια τσιπούρας παρουσίασαν παρόμοιες βλάβες με τα φυσικά μολυσμένα ψάρια και η θνησιμότητα έφτασε το 18,8% στη δεξαμενή μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν την παθογένεια των μεμονωμένων στελεχών και την αποτελεσματικότητα της πειραματικής εμβάπτισης στην πρόκληση της νόσου στα πειραματικά μολυσμένα ιχθύδια. Η θνησιμότητα ξεκίνησε την 3<sup>η</sup> μέρα και συνεχίστηκε μέχρι τη 12<sup>η</sup> μέρα. Σε προηγούμενη έρευνα πειραματικής μόλυνσης με εμβάπτιση από τους Avendano-Herrera et al., 2006, που πραγματοποιήθηκε σε *Scophthalmus maximus*, η θνησιμότητα ξεκίνησε την 7<sup>η</sup> μέρα

και έφτασε στο 66,6% στο τέλος των πειραμάτων. Σε μελέτη της Γουρζιώτη Ε., 2014, με πειραματική μόλυνση με εμβάπτιση σε τσιπούρα, η θνησιμότητα ξεκίνησε την 3<sup>η</sup> μέρα και συνεχίστηκε μέχρι την 18<sup>η</sup> μέρα και στο τέλος των πειραμάτων έφτασε στο 35%.

Παλαιότερες έρευνες από τους Handler et al. 1997, απέδειξαν ότι το στρες είναι σημαντικός παράγοντας στην παθογένεια του *T. maritimum*, διότι μπορεί να καταστέλλει το ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων, προκαλώντας αύξηση της κορτιζόλης στο αίμα τους και μειώνοντας την ανοχή τους στις ασθένειες.

Κατά τη νεκροψία, τα μολυσμένα ψάρια εμφάνισαν κοινή συμπτωματολογία με κλινική εικόνα χαρακτηρισμένη από: ανορεξία, λήθαργο, αμορραγική στοματίτιδα, αποχρωματισμό δέρματος, ωχροκίτρινες νενκρωτικές βλάβες στο δέρμα και την ουρά, διάβρωση της ουράς (Chen et al. 1995, Handler et al. 1997, Toranzo et al. 2005, Gourzioti E. et al. 2016, Nowlan et al. 2021).

Σε όλα τα δείγματα δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα και αλλοιώσεις συστηματικής λοίμωξης και βλάβες σε εσωτερικά όργανα, τόσο στα υγιή ιχθύδια, όσο και στα ιχθύδια με εμφανείς βλάβες της νόσου σε εξωτερικά όργανα.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ερευνητική εργασία προσδιορίζουν ότι η διατροφή των ιχθυδίων τσιπούρας με συμπλήρωμα διατροφής με θυμάρι 0,50% μειώνει σημαντικά τη μόλυνση από *T. maritimum*, τη θνησιμότητα και το ποσοστό θνησιμότητας % των μολυσμένων ιχθυδίων με *T. maritimum*.

Επίσης, μελετήθηκαν in vitro διάφορα εκχυλίσματα αιθέριων ελαίων έναντι των *Vibrio Harveyi*, *Veronii veronii* και *Veronii sobria*, τα οποία προήλθαν κατά τη λήψη δειγμάτων για καλλιέργεια από νοσούσες τσιπούρες. Τα αιθέρια έλαια αρτεμισίας και κανέλας εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία έναντι των μυξοβακτηρίων, ακολουθούμενα από εκείνα του θυμαριού και της ρίγανης.

Η εφαρμογή των αποτελεσμάτων της εργασίας θα δώσει τη δυνατότητα σχεδιασμού πρωτοποριακών και δραστικών θεραπειών που θα μειώσουν σημαντικά τις απώλειες και θα βελτιώσουν το τελικό προϊόν. Οι θεραπείες αυτές θα είναι συγκριτικά με τις διαθέσιμες, οικονομικότερες, φιλικές προς το περιβάλλον, ασφαλείς για τον καταναλωτή και εύκολες στην εφαρμογή καθόσον θα δίνονται μέσω της τροφής. Επιπλέον, θα μειωθεί το κόστος παραγωγής εξαιτίας της ελαχιστοποίησης των θνησιμοτήτων, αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των εκτρεφόμενων ψαριών, μείωση του κόστους θεραπειών και βελτίωση των περιβαλλοντικών συνθηκών.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Androutsopoulou Chrysa, Spyridoula D. Christopoulou, Panagiotis Hahalis, Chrysoula Kotsalou, Fotini N. Lamari, Apostolos Vantarakis. (2021). Evaluation of Essential Oils and Extracts of Rose Geranium and Rose Petals as Natural Preservatives in Terms of Toxicity, Antimicrobial, and Antiviral Activity. *Pathogens* 10, 1-16.

Antonelli L., Quilichini Y., Marchand B. (2012). *Lernanthropus kroyeri* (Van Beneden and Hesse 1851) parasitic *Copepoda* (*Siphonostomatoidae*, *Lernanthropidae*) of European cultured sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus 1758) from Corsica: Ecological and morphological study. *Parasitology research*, 110(5), pp. 1959-1968.

Antonelli L., Quilichini Y., Marchand B. (2010). *Sparicotyle chrysophrii* (Van Beneden and Hesse 1863) (*Monogenea: Polyopisthocotylea*) parasite of cultured Gilthead sea bream *Sparus aurata* (Linnaeus 1758) (Pisces: Teleostei) from Corsica: Ecological and morphological study. *Parasitology research*, 107(2), pp. 389-398.

Athanassopoulou F. (1990). A study of the Myxosporean infections of *R. rutilus* L. with special reference to *Myxidium rhodei* Leger, 1905 in the renal tissue. Ph.D. Thesis, University of Stirling, Stirling. pp. 153-186.

Athanassopoulou F., Bouboulis D., Martinsen B. (2001a). In vitro treatments of deltamethrin against the isopod *Ceratothoa oestroides*, a pathogen of seabass *D. labrax* L. The Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 21(1):26-29.

Athanassopoulou F., Ragias V., Tavla J., Christofilloyannis P., Liberis N. (2001b). Preliminary trials on the efficacy of ivermectin against *Lernanthropus kroyeri* (Crustacea) in cultured sea bass *D. labrax* L. *Aquaculture Research*, 32. pp.77-79.

Athanassopoulou F., Karagouni E., Pappas I. (2004a). Antimicrobial and antiparasitic activity induced by *Origanum minutiflorum* and *Angelica sinensis* (*Umbelliferae*) essential oils respectively, in Mediterranean aquaculture. Ανακοινώθηκε στο World Conference on Magic Bullets Celebrating Paul Ehrlich's 150<sup>th</sup> Birthday, Nurnberg, Germany, September 9-11, A10.

Athanassopoulou F., Karagouni E. (2004b). Rickettsia-like organisms (R.L.O.) infections of fin-fish. Review article, *Bulletin of the Hellenic Veterinary Association* 55(2):165-173.

Athanassopoulou F., Roberts, R. J. (2004c). Streptococcal infections of farmed fish. Review, Bulletin of the Hellenic Veterinary Association 55(2):136-144.

Athanassopoulou F., Bouboulis D., Martinsen B. (2004d). Experimental treatments of sea bass *D. labrax* L. infected with the isopod *Ceratothoa oestroides* with diflubenzuron and deltamethrin. Journal of Applied Ichthyology, 20. pp.314-317.

Athanassopoulou F., Pappas I., Bitchava K. (2009). An overview of the treatments for parasitic disease in Mediterranean aquaculture. CIHEAM Journal Options Méditerranéennes. 86. pp. 65-83.

Avendaño-Herrera R, Magariños B, Irgang R, Toranzo AE (2006). Use of hydrogen peroxide against the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* and its effect on infected turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 257:104– 110.

Avendaño-Herrera R. (2009). Identification of *Flexibacter maritimus* or *Tenacibaculum maritimum* from post-larvae of *Litopenaeus vannamei*. Comment on Mouriño et al., (2008). Brazilian Journal of Biology 69(1): 225-226.

Baker G.R., R.F. Lowe, I.A. Southwell. (2000). Comparison of oil recovered from tea tree leaf by ethanol extraction and steam distillation. J. Agric. Food Chem. 48(9):4041–4043.

Bernardet JF, Campbell AC, Buswell JA (1990). *Flexibacter maritimus* is the agent of 'Black patch necrosis' in Dove sole in Scotland. Diseases of Aquatic Organisms 8:233-237.  
Buller N.B. (2004). Bacteria from fish and other aquatic animals. A practical identification manual. Textbook, CABI Publishing, 875 Massachusetts Avenue. pp. 178-183.

Burka J.F., Hammel K.L. Horsberg T.E., Johnson G.R., Rainnie D.J., Speare D.J. (1997). Drugs in salmonid aquaculture – A review. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 20:333-349.

Chen M.F., Henry-Ford D., Groff J.M. (1995). Isolation and characterization of *Flexibacter maritimus* from marine fishes of California. Journal of Aquatic Animal Health 7(4): 318-326.

Dechayont Bhanuz, Pimnapa Ruamdee, Sukrita Poonnaimuang, Khwanchanok Mokmued, Jitpisute Chunthorng-Orn. (2017). Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. Journal of Botany, Volume 2017, Article ID 8310275, 6 pages, <https://doi.org/10.1155/2017/8310275>

Dua A., Garg G., Nagar S., Mahajan R. (2014). Methanol extract of clove (*Syzygium aromaticum* Linn.) damages cells and inhibits growth of enteropathogens, Journal of Innovative Biology 1(4):200-205.

Fayad N.K., Omar Hamad Shehab AL-Obaidi, Taghreed H. Al-Noor, Mohammed Oday Ezzat. (2013). Water And Alcohol Extraction Of Thyme Plant (*Thymus Vulgaris*) And Activity Study Against Bacteria, Tumors And Used As Anti-Oxidant In Margarine Manufacture. Innovative Systems Design and Engineering, 4, 41-51.

Fernández-Agulló Adela, M. Sonia Freire, Julia González-Álvarez. (2015). Effect of the extraction technique on the recovery of bioactive compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes. Industrial Crops and Products, 64:105-113.

Firmino J.P., Vallejos-Vidal E., Sarasquete C., Ortiz-Delgado J.B., Balasch J.C., Tort L., Estevez A., Reyes-Lopez F.E., Gisbert E. (2020). Unveiling the effect of dietary essential oils supplementation in *Sparus aurata* gills and its efficiency against the infestation by *Sparicotyle chrysophrii*. Scientific Reports, 10:17764.

Golomazou E., Athanassopoulou F., Vagianou S., Sabatakou O., Tsantilas H., Rigos G., Kokokkiris L. (2006a). Diseases of white sea bream (*Diplodus sargus* L.) reared in experimental and commercial conditions in Greece. Turk. J Vet Anim Sci., 30(4):389-396.

Golomazou E., Athanassopoulou F., Karagouni E., Tsagozis P., Tsantilas H., Vagianou S. (2006b). Experimental transmission of *Enteromyxum leei* Diamant, Lom and Dykova, 1994 in sharpsnout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. and the effect on some innate immune parameters. Aquaculture, 260(1-4), pp. 44-53.

Golomazou E., Athanassopoulou F., Karagouni E., Vagianou S., Tsantilas H., Karamanis D. (2006c). Efficacy and toxicity of orally administrated anti-coccidial drug treatment on *Enteromyxum leei* infections in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo* C.). Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, 58(3), pp. 157-169.

Gourzioti E., Kolygas M., Athanassopoulou F., Babili V. (2016). Tenacibaculosis in aquaculture farmed marine fish. *J. Hellenic Vet. Med. Soc.* 67, 21–32.

Güez C. M., R. O. Souza, P. Fischer, M. F. M. Leão, J. A. Duarte, A. A., Boligon, M. L. Athayde, L. Zuravski, L. F. S. Oliveira, M. M. Machado. (2017). Evaluation of basil extract (*Ocimum basilicum* L.) on oxidative, anti-genotoxic and anti-inflammatory effects in human leukocytes cell cultures exposed to challenging agents. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 53(1):e15098, 1-12.

Handler J., Soltani H., Percival V. (1997). The pathology of *Flexibacter maritimus* in aquaculture species of Tasmania, Australia. *Journal of Fish Diseases* 20: 159– 168.

Jaafari-Ashkavandi Zohreh, Azadeh Hamedi, Sepideh Assar, Azin Ebrahimpour. (2017). The Effects of Frankincense on Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line, *Int. J. Cancer Manag.* 10(5):e6416.

Karagouni E., Athanassopoulou F., Tsagozis P., Ralli E., Moustakareas T., Lytra K., Dotsika E. (2005). The impact of a successful anti-myxosporean treatment on the phagocyte functions of juvenile and adult *Sparus Aurata* L. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 18(1):121-132.

Karagouni E., Athanassopoulou F., Lytra A., Komis C., Dotsika E. (2005). Antiparasitic and immunomodulatory effect of innovative treatments against *Myxobolus* sp. infection in *Diplodus puntazzo*. *Veterinary Parasitology*, 134(3-4):215-228.

Khanal Munu, Sirjana Lamichhane, Ajaya Bhattarai, Babita Labh Kayastha, Shyam Narayan Labh. (2021) Extract of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) Enhances the Growth, Protein Contents, and Gastrosomatic Index (GaSI) of Common Carp *Cyprinus carpio*. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 1-14.

Lahreche Talal, Mohamed Lamine Bradaie, Taha Mossadak, Hamdi. (2020). In Vitro Assessment of Antioxidant Activity, Total Phenolic and Flavonoid Contents of Sweet Marjoram (*Origanum majorana* L.) Extract. *International Journal of Horticulture, Agriculture and Food science (IJHAF)*, 4(4), 158-163, 10.22161/ijhaf.4.4.4

Lom & Dykova, (1991). Methods of investigation of protozoan parasites. Institute of Czechoslovak Academy of Sciences.

Ma Q., Tan D., Gong X., Ji H., Wang K., Lei Q., Zhao G. (2022). An Extract of *Artemisia argyi* Leaves Rich in Organic Acids and Flavonoids Promotes Growth in BALB/c Mice by Regulating Intestinal Flora. *Animals*, 12(12):1519.

Margolis L., Esch G., Holmes J. C., Kuris A. M., Schad G. A. (1982). The use of ecological terms in parasitology (report of adhoc committee of America Society of Parasitologists). *J. Parasitol.*, 68, pp.131-133.

Mouriño J.L.P., Vinatea L., Buglione-Neto C., Ramirez C.T., Vieira F.N., Pedrotti F., Martins M.L., Derner R.B., Aguilar M.A., Beltrame E. (2008). Characterization and experimental infection of *Flexibacter maritimus* (Wakabayashi et al., 1986) in hatcheries of post-larvae of *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. *Brazilian Journal of Biology* 68(1):173-177.

Nowlan J. P., Britney S. R., Lumsden J. S., Russell S. (2021). Application of quantitative-PCR to monitor netpen sites in British Columbia (Canada) for *Tenacibaculum* species. *Pathogens* 10, 414.

Ostland V.E., LaTrace C., Morrison D., Ferguson H.W. (1999). *Flexibacter maritimus* associated with bacterial stomatitis in Atlantic salmon smolts reared in net-pens in British Columbia. *Journal of Aquatic Animal Health* 11:35-44.

Pandey Minakshi and D. R. Chandra. (2015). Evaluation of Ethanol and Aqueous extracts of *Cinnamomum verum* Leaf Galls for Potential Antioxidant and Analgesic activity. *Indian J Pharm Sci.*, 77(2): 243–247.

Papanagiotou E.P., Trilles J.P. (2001). Cymothoid parasite *Ceratothoa parallela* inflicts great losses on cultured sea bream *Sparus aurata* in Greece. *Dis. Aquat. Org.*, 45, pp.237-239.

Perazzo, Fabio F., Leonardo M. Lima, Edson Luis Maistro, João E. Carvalho, Vera L. G. Rehder, José C. T. Carvalho. (2008). Effect of *Artemisia annua* L. leaves essential oil and ethanol extract on behavioral assays. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18(Supl.):686-689.

Ragias V., Tontis D., Athanassopoulou F. (2004). Incidence of an intense *Caligus minimus* Otto 1821, *C. pageti* Russel, 1925, *C. mugilis* Brian, 1935 and *C. apodus* Brian, 1924 infection in lagoon cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in Greece. Aquaculture, 242(1-4), pp. 727-733.

Ragias V., Athanassopoulou F., Sinis A. (2005a). Parasites of *Mugilidae spp.* Reared under semi-intensive and intensive conditions in Greece. Bulletin of European Association of Fish Pathologists, 25(3), pp.107-115.

Ragias V., Athanassopoulou F., Di Cave D., Vagianou S., Rigos G., Golomazou E., Georgoulakis J. (2005b). Enlargement of the host range of *Sparicotyle chrysophrii* Van Beneden and Hesse 1863, *Atrispinum seminalis* Euzet and Maillard 1973 and *Polylabris tubicirrus* Paperna and Kohn 1964 (*Monogenea*) under fish farming conditions. Bulletin of European Association of Fish Pathologists, 25(6), pp. 256-261.

Roberts RJ (2001). Fish pathology. 3<sup>rd</sup> Edition. W.B. Saunders publishing. pp 199.

Sinh Truong Nguyen, Phuc Hong Vo, Thao Duy Nguyen, Nghia Minh Do, Bao Huu Le, Duong Thuy Dinh, Kiet Dinh Truong, Phuc Van Pham. (2019). Ethanol extract of *Ginger Zingiber officinale Roscoe* by Soxhlet method induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line. Biomedical Res. Ther., 6(11): 3433-3442.

Sitja-Bobadilla A., Alvarez-Pellitero P. (2009). Experimental transmission of *Sparicotyle chrysophrii* (*Monogenea: Polyopisthocotylea*) to gilthead seabream (*Sparus aurata*) and histopathology of the infection. Folia parasitologica, 56(2), pp. 143-151.

Stanciu Gabriela, Florin Aonofriesei, Simona Lupsor, Antoanela Popescu, Rodica Sirbu. (2019). Study of Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of *Lavandula angustifolia* L. Flowers Macerates, Rev. Chim. (Bucharest), 70(5):1800-1804.

Stirling report, Stirling Institute of Aquaculture (2004). Study of the market for aquaculture produced lubina y dorada species. Report to the European Commission, DG Fisheries.

Suzuki M., Nakagawa Y., Harayama S., Yamamoto S. (2001). Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology 51:1639 – 1652.

Toranzo A.E., Magariños B., Romalde J.L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Journal of Aquaculture 246, 37–61.

Torre María Pilar, Jose Luis Vizmanos, Rita Yolanda Caverro, María Isabel Calvo. (2020). Improvement of antioxidant activity of oregano (*Origanum vulgare* L.) with an oral pharmaceutical form, Biomedicine & Pharmacotherapy 129, 1104242, 1-9.

Vagianou S., Bitchava C., Yagnisi M., Athanassopoulou F. (2009a). Estimation of seasonality and prevalence of the isopod parasite *Ceratothoa oestroides*, Risso, 1836, in Greece. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 60(1), pp.14-25.

Vagianou S., Bitchava C., Yagnisi M., Athanassopoulou F. (2009b). Study of the biological cycle of the isopod *Ceratothoa oestroides*, Risso, 1836 in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax* Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 60(1), pp.26-30.

Yamaguti S. (1963). Systema Helminthum Vol. I-II. Interscience Publishers, New York.

Αθανασοπούλου Φ (2006). Νοσήματα των εκτρεφόμενων ψαριών στην Ελλάδα. Διδακτικές Σημειώσεις του μαθήματος της Ιχθυοπαθολογίας για τους φοιτητές του 7<sup>ου</sup> εξαμήνου. Παν/κές Εκδόσεις Θεσσαλίας.

Γουρζιώτη Ε. (2014). Μελέτη της μυξοβακτηριδίασης σε εντατικές καλλιέργειες υδρόβιων θαλάσσιων ειδών στην Ελλάδα, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Καρδίτσα, 106-109.

Κολυγάς Μ. (2014). Εφαρμογή πρωτότυπων θεραπευτικών αγωγών για την αποτελεσματική καταπολέμηση των εξωπαρασιτώσεων όπως αυτές εμφανίζονται στις εντατικές καλλιέργειες ειδών ψαριών Μεσογειακής καλλιέργειας, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Καρδίτσα, 24-27.

Ράγιας Β., Αθανασοπούλου Φ. (2005). Χαρακτηριστικά εκτροφής και παθολογικά προβλήματα νέων ειδών εκτρεφόμενων ψαριών γλυκού νερού στην Ελλάδα. Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρίας, 56(1):40-45.

http<sup>1</sup>: <https://fishfromgreece.com/wp-content/flipbook/2018new/>

http<sup>2</sup>: <https://fishfromgreece.com/wp-content/flipbook/2022new/>

http<sup>3</sup>: <http://www.sagiada.gr/>

http<sup>4</sup>: <http://www.mass.gov/czm/wpfshlth.htm>