

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος

**«Επίδραση της χρήσης των αιθέριων ελαίων στην
ανάπτυξη της τσιπούρας»**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ANNA ΜΑΡΙΑ και ΤΣΑΚΑ ΓΕΩΡΓΙΑ-ΛΥΔΙΑ



Νέα Ιωνία, Βόλος, 2017

**«Επίδραση της χρήσης των αιθέριων ελαίων στην ανάπτυξη
της τσιπούρας»**

ΔΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΚΟΛΟΜΑΖΟΥ ΕΛΕΝΗ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ), Επίκουρη Καθηγήτρια ,Προστασία - Ευζωία Ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΚΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ (ΜΕΛΟΣ) , Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες , Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.1 Αιθέρια έλαια.....	3
1.2 <i>Origanum vulgare</i> και <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	5
1.2.1 Ρίγανη : <i>Origanum vulgare</i>	5
1.2.2 Κανέλα: <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	6
1.3 Η επίδραση των αιθέριων ελαίων σε σχέση με το στρες στη τσιπούρα <i>Sparus aurata</i>	8
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	10
2.1 Γενικά χαρακτηριστικά τσιπούρας <i>Sparus aurata</i>	10
2.2 Συνθήκες εκτροφής.....	11
2.3 Δειγματοληψία.....	13
2.4 Μέθοδος comet - Ανάλυση κομητών.....	14
2.4.1 Επίστρωση αγαρόζης σε αντικειμενοφόρο πλάκα.....	14
2.4.2 Ηλεκτροφόρηση και μέτρηση των κομητών.....	15
2.5 Στατιστική Ανάλυση.....	15
3. Αποτελέσματα.....	16
3.1 Βάρος ιχθύων σε συνάρτηση με τον χρόνο.....	16
3.2 Κατακερματισμός DNA σε συνάρτηση με το χρόνο.....	17
4. Συζήτηση.....	18
4.1 Επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης και κανέλας στην ανάπτυξη των ατόμων τσιπούρας.....	18
4.2 Μέθοδος ανάλυσης κομητών ή comet στα κύτταρα εντέρου της τσιπούρας.....	19
5. Συμπεράσματα.....	20
6. Βιβλιογραφία.....	21

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αιθέρια έλαια, προέρχονται από αρωματικά φυτά. Λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων τους, η ζήτησή τους έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Οι πιο σημαντικές ιδιότητες που κατέχουν είναι η αντιοξειδωτική και η αντιμικροβιακή τους δράση. Τα αιθέρια έλαια έχουν την ικανότητα να δρουν αποτελεσματικά έναντι των μυκήτων, των ιών, των βακτηρίων και των παρασίτων, αναστέλλοντας έτσι την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους. Στη παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η επίδραση των αιθέριων ελαίων της ρίγανης και της κανέλας σε σχέση με την αύξηση της τσιπούρας. Πιο ειδικά μελετήθηκε η επίδραση αυτών των αιθέριων ελαίων ως ιχθυοτροφή τόσο σε σχέση με το βάρος της εκτρεφόμενης τσιπούρας όσο και σε σχέση με τον κερματισμό του DNA τους. Οι μεταχειρήσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1% ρίγανη, 2% ρίγανη, 1% κανέλα, 2% κανέλα και συμβατή ιχθυοτροφή που λειτούργησε ως μάρτυρας. Το πείραμα διήρκησε 3 μήνες και πραγματοποιήθηκαν 2 δειγματοληψίες, σε έντερο τσιπούρας και εφαρμόστηκε η μέθοδος comet ή ανάλυσης κομητών. Σε ότι αφορά την αύξηση του βάρους των τσιπούρων σε σχέση με τον χρόνο του πειράματος, εμφανίστηκε αύξηση του βάρους σε όλες τις μεταχειρήσεις.

ABSTRACT

The essential oils, are derived from aromatic plants. Because of their beneficial properties, their demand has increased significantly in recent years. The most important properties they possess are their antioxidant and antimicrobial action. Essential oils have the ability to function effectively against fungi, viruses, bacteria and parasites, thus inhibiting their growth and survival. In the present study, the effect of essential oils of oregano and cinnamon on the growth of *Sparus aurata* was examined. More specifically, the effect of these essential oils as growth and welfare promoters, was studied. The treatments used were 1% oregano, 2% oregano, 1% cinnamon, 2% cinnamon and compatible fish feed for the control group. The experiment lasted for 3 months and 2 sampling, where performed regarding the DNA fragmentation of intestine cells in experimental fish using comet assay. The weight of the *Sparus aurata* appeared increase during the experimentation.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται ως πτητικές,φυσικές και πολύπλοκες ενώσεις οι οποίες έχουν ευχάριστη οσμή και γεύση καθώς προέρχονται από αρωματικά φυτά (Bakkali et al., 2008). Είναι υγρά,πτητικά,σπάνια χρωματισμένα ,υδρόφοβα και διαλυτά στα λιπίδια αλλά και σε οργανικούς διαλύτες,έχοντας χαμηλότερη πυκνότητα απ΄αυτή του νερού (Bakkali et al., 2008). Εξάγονται από διάφορα φυτά,που εντοπίζονται σε εύκρατες και ζεστές χώρες όπως οι Μεσογειακές και οι τροπικές. Η σύνθεσή τους πραγματοποιείται απ΄ όλα τα φυτικά όργανα, όπως μπουμπούκια, λουλούδια, μίσχους, κλαδιά, σπόρους, καρπούς, ρίζες, ξύλο ή φλοιό κ.α.

Τα τελευταία χρόνια η ζήτηση των αρωματικών φυτών και των εκχυλισμάτων τους ολοένα και αυξάνεται. Οι περισσότερες από τις ευεργετικές ιδιότητές τους, οφείλονται στα αιθέρια έλαια και στα δευτερογενή συστατικά του φυτού. Οι πιο σημαντικές από αυτές ,είναι η αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική τους δράση λόγω των φυσικοχημικών τους παραγόντων. Τα αιθέρια έλαια έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά και απέναντι στους ιούς, στους μύκητες, στα βακτήρια και στα παράσιτα, αναστέλλοντας την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους.

Πολλές μελέτες έχουν αποδώσει την αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων, στην ικανότητά τους να διεισδύουν μέσω των βακτηριακών μεμβρανών στο εσωτερικό του κυττάρου ,εμφανίζοντας έτσι ανασταλτική δραστικότητα στις λειτουργικές και λιπόφιλες ιδιότητες του κυττάρου (Bajraí et al., 2012). Η αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται σε φαινολικές ενώσεις,τις οποίες και εμπεριέχουν. Οι φαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών και παράγονται σε συγκεκριμένα στάδια της ανάπτυξής τους. Οι μηχανισμοί δράσης των αιθέριων ελαίων μπορεί να σχετίζονται με την ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να μεταβάλλουν τη διαπερατότητα των μικροβιακών κυττάρων καθώς επίσης και να διαταράσσουν τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες (Bajraí et al., 2012) . Επομένως η αλληλεπίδραση των αιθέριων ελαίων με τις μικροβιακές κυτταρικές μεμβράνες έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή ανάπτυξης ορισμένων βακτηριδίων.

Τα αιθέρια έλαια είναι περίπλοκα φυσικά μείγματα, καθώς η χημική τους σύνθεση, αποτελείται από 20-60 συστατικά σε διάφορες συγκεντρώσεις. Χαρακτηρίζονται από 2-3 κύρια συστατικά ,τα οποία βρίσκονται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (20 – 70 %), σε σύγκριση με τα υπόλοιπα που είναι ιχνοστοιχεία (Bakkali et al.,2008). Αυτά τα κύρια συστατικά,

καθορίζουν τις βιολογικές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων και διακρίνονται σε δύο ομάδες διαφορετικής βιοσύνθεσης (Croteau et al., 2000). Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τερπένια και τερπενοειδή και η δεύτερη από αρωματικές και αλειφατικές ενώσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται από πολύ μικρό μοριακό βάρος. Πιο ειδικά αποτελούνται από αλκοόλες, οξέα, εστέρες, εποξειδία, αλδεΐδες, κετόνες, αμίνες και σουλφίδια. Τα τερπένια και τα τερπενοειδή χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για τις αρωματικές τους ιδιότητες και έχουν σημαντικό θεραπευτικό ρόλο. Τέλος, λόγω του πλήθους των συστατικών που εμπεριέχονται στα αιθέρια έλαια, δεν μπορούμε να αποδώσουμε τις ευεργετικές τους ιδιότητες με βάση τη δράση μιας και μόνο ένωσης (Bajrai et al., 2012).

Παράγοντες όπως η ενεργότητα του νερού, το PH, η περιεκτικότητα σε λιπαρά, πρωτεΐνες και ένζυμα, μπορούν να μειώσουν δυνητικά την αποτελεσματικότητα της δράσης των αιθέριων ελαίων. Το χαμηλό PH έχει ως συνέπεια την αύξηση της διαλυτότητας και της σταθερότητάς τους, ενισχύοντας έτσι την αντιμικροβιακή τους δράση (Burt, 2004). Επιπλέον μέθοδοι για την ενίσχυση της δραστηριότητας των αιθέριων ελαίων αποτελούν η υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι (NaCl) αλλά και η χαμηλή θερμοκρασία (Juliany Rivera Calo et al.). Ανάλογα με την συγκέντρωση στην οποία βρίσκονται τα αιθέρια έλαια, είναι σε θέση να εμφανίσουν κυτταροτοξικές επιδράσεις στα ζωντανά κύτταρα, αλλά συνήθως είναι μη τοξικά (Bakkali et al., 2008).

Όσον αφορά τη χημική πλευρά των προϊόντων των αιθέριων ελαίων, αξίζει να τονίσουμε ότι διαφέρει όχι μόνο ως προς τον αριθμό των μορίων τους, αλλά και στους στερεοχημικούς τύπους των εκχυλισθέντων μορίων, οι οποίοι σχετίζονται και με τον τρόπο εκχύλισης. Ο τρόπος αυτός, επιλέγεται ανάλογα με τον σκοπό της χρήσης. Κάποιες από τις τεχνικές εκχύλισης είναι η χρήση υγρού διοξειδίου του άνθρακα, κυρίως απόσταξη με χαμηλή ή υψηλή πίεση, με χρήση βραστού νερού ή ζεστού ατμού.

Τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται ευρέως ως βακτηριοκτόνα, ιοκτόνα, μυκητοκτόνα, αντιπαρασιτικά, εντομοκτόνα καθώς και σε σκευάσματα καλλυντικών, σε φαρμακευτικές και γεωργικές βιομηχανίες (Bakkali et al., 2008). Χρησιμοποιούνται επίσης σε βιομηχανίες τροφίμων, στην κονσερβοποίηση και στη συντήρηση των τροφίμων. Ακόμη, τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται ως αναλγητικά, αντιφλεγμονώδη, σπασμολυτικά και τοπικά αναισθητικά.

Η παρούσα εργασία, έχει ως στόχο την μελέτη της επίδρασης των αιθέριων ελαίων της ρίγανης και της κανέλας σε τσιπούρες, χορηγούμενα μέσω της τροφής.

1.2 *Origanum vulgare* και *Cinnamomum zeylanicum*:

Τα αιθέρια έλαια από *O.vulgare* και *C.zeylanicum* μπορούν να χαρακτηριστούν ως φυσικοί παράγοντες που περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, φαρμακευτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως τοπικά αναισθητικά, αναλγητικά και αντιφλεγμονώδη προϊόντα. Μαζί με τα συστατικά και τις ενώσεις που περιλαμβάνει το κάθε ένα αντίστοιχα , έχουν την ικανότητα να αναστείλουν νευρολογικές διαταραχές και καρδιαγγειακά νοσήματα. Σύμφωνα με τις παραπάνω ιδιότητες τους, μπορούν να βοηθήσουν και στην ανάπτυξη του οργανισμού. Σήμερα, οι χρήσεις τους σχετίζονται κυρίως με βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών αλλά και στη παραγωγή υδατοκαλλιεργειών, με σκοπό την καλύτερη ανάπτυξη των ιχθύων και τον έλεγχο των ασθενειών.

1.2.1 Ρίγανη: *Origanum vulgare*

Η ρίγανη ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae, στο γένος *Origanum* και στο είδος *Origanum vulgare*. Πρόκειται για ένα βότανο, το οποίο διανέμεται στην Ευρώπη, στην Βόρεια Αφρική, στην Αμερική και την Ασία (Kintzios, 2002). Τα αιθέρια έλαια της ρίγανης χαρακτηρίζονται από τις αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντιμυκητιακές τους δράσεις, όπως επίσης και για τις ανασταλτικές τους ιδιότητες έναντι της ακετυλοχολινεστεράσης, της βουτυρυλοχολινεστεράσης, της τυροσίνης, της β-αμυλάσης και β-γλυκοσιδάσης (Cengiz Sarikurkcu et al., 2015). Τα κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων της ρίγανης είναι η καρβακρόλη, η θυμόλη και η λιναλοόλη (Cengiz Sarikurkcu et al., 2015).

Τα αιθέρια έλαια από *O.vulgare* παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δραστηριότητα λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των επιμέρους φαινολικών ενώσεών τους, ιδίως από το συνδυασμό θυμόλης και καρβακρόλης (Z.L. Zheng et al., 2009) . Η περιεκτικότητα της λιναλοόλης στο αιθέριο έλαιο, βοηθά στην σημαντική αντιμυκητιακή του δραστηριότητα (Hristova et al., 2013). Οι φαινολικές ενώσεις συμπεριλαμβανομένου των φλαβονοειδών και των φαινολικών οξέων, τα οποία είναι άφθονα στο *O.vulgare* , αυξάνουν την αντιοξειδωτική του

δράση (Chou et al., 2010). Η σύνθεση των αιθέριων ελαίων του *O.vulgare* αποτελείται από ενώσεις θυμόλης, καρβακρόλης, π- κυμένιο, γ-τερπινένιο (Cengiz Sarikurkcu et al., 2015).

Τα αιθέρια έλαια ρίγανης χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο είτε σε φάρμακα, τρόφιμα αλλά και σε καλλυντικά. Ευρεία είναι η χρήση τους και ως πρόσθετα σε ζωοτροφές, στην παγκόσμια κτηνοτροφία. Χρησιμοποιούνται επίσης στην παραγωγή υδατοκαλλιεργειών, κυρίως λόγω της ικανότητάς τους να βοηθούν στην ανάπτυξη των ιχθύων , για τον καλύτερο έλεγχο των ασθενειών, καθώς και για την αντικατάσταση των αντιβιοτικών. Το καταναλωτικό ενδιαφέρον για αυτά τα προϊόντα είναι μεγάλο, εξαιτίας των βιολογικών ιδιοτήτων τους, που βοηθούν στην προστασία της ανθρώπινης υγείας (Al-Kalaldehy et al., 2010). Τα αιθέρια έλαια του *O.vulgare* βοηθούν στην πρόληψη ασθενειών όπως ο διαβήτης, το Alzheimer το οποίο σχετίζεται με νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Cengiz Sarikurkcu et al., 2015) και ανταποκρίνονται θετικά σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες. Το *O. vulgare* μπορεί να είναι επίσης χρήσιμο για την διαχείριση της οξείδωσης των λιπιδίων στη βιομηχανία τροφίμων. Εκτός αυτού, τα αιθέρια έλαια του *O. vulgare* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σημαντικοί φυσικοί παράγοντες στην ανάπτυξη νέων λειτουργικών τροφών αλλά και φαρμακοτεχνικών μορφών.

Η θυμόλη, η οποία βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στο *O.vulgare* αλλά και σε άλλα φυτά, έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη δράση της οξείδωσης του λινολειακού οξέος. Η αντιμικροβιακή δράση της ρίγανης βασίζεται κυρίως στη παρουσία σημαντικού ποσοστού καρβακρόλης και θυμόλης ως φαινολικά συστατικά, τα οποία συμβάλλουν επίσης στο άρωμα και στη γεύση του φυτού. Συμπερασματικά, ο συνδυασμός της καρβακρόλης και θυμόλης στο *O.vulgare* αποτελεί αυξητικό παράγοντα με υψηλό επίπεδο αντιοξειδωτικής δράσης και ανθετικότητα έναντι σε παθογόνους μικροοργανισμούς.

1.2.2 Κανέλα: *Cinnamomum zeylanicum*

Η κανέλα ανήκει στην οικογένεια Lauraceae, στο γένος *Cinnamomum* και στο είδος *Cinnamomum zeylanicum*. Το *C. zeylanicum* είναι ο εσωτερικός φλοιός, ενός μικρού αειθαλούς δέντρου, το οποίο χρησιμοποιούνταν ακόμα και στα αρχαία χρόνια ως βάλσαμο. Πρόκειται για ένα από τα πιά σημαντικά καρυκεύματα και χρησιμοποιείται ευρέως σε όλο τον κόσμο, καθώς έχει πολυάριθμες ευεργετικές και φαρμακευτικές ιδότητες. Ενδείκνυται για ποικιλία παθήσεων

λόγω των αντιοξειδωτικών, των αντιφλεγμονώδων, των αντιδιαβητικών, των αντικαρκινικών αλλά και των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του. Επίσης φέρει δραστικότητα και έναντι νευρολογικών διαταραχών καθώς και σε καρδιαγγειακά νοσήματα.

Το *C. zeylanicum* αποτελείται από ζωτικά έλαια και άλλα παράγωγα όπως κινναμαλδεΐδη, το κινναμικό οξύ και κινναμωμικό. Τα πιο σημαντικά συστατικά του είναι η κινναμαλδεΐδη και η trans- κινναμαλδεΐδη (Cin) (H.-F. Yeh et al., 2013). Στα αιθέρια έλαια από *C. zeylanicum* υπάρχουν αυτά τα συστατικά, συμβάλλοντας έτσι όχι μόνο στο άρωμα τους αλλά και στις βιολογικές τους δραστηριότητες. Σύμφωνα με B. Marongiu et al., 2007 ένα από τα κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων που εξάγονται από *C. zeylanicum*, είναι η (E) – κινναμαλδεΐδη και έχει δραστικότητα έναντι της τυροσίνης (S.-T. Chou et al., 2013).

Στον φλοιό της κανέλας εμπεριέχονται προκυανιδίνες και κατεχίνες (G.-I. Nonaka et al., 1983). Οι προκυανιδίνες περιέχουν προκυανιδίνες τύπου A, όσο και τύπου B. Οι προκυανιδίνες και οι κατεχίνες περιλαμβάνονται στα φλαβονοειδή (R. A. Anderson et al., 2004). Οι προκυανιδίνες μπορούν να εξαχθούν τόσο από την κανέλα αλλά και από τα μούρα, διαθέτοντας αντιοξειδωτικές ικανότητες (X. Peng et al., 2008). Όσον αφορά το χημικό περιεχόμενο της *C. zeylanicum* , αποτελείται από μια ποικιλία από ρητινώδεις ενώσεις, όπως είναι η κινναμαλδεΐδη, το κινναμικό οξύ και πλήθος άλλων αιθέριων ελαίων (U. M. Senanayake et al., 1978), όπως η trans- κινναμαλδεΐδη (Cin), οξικός κινναμυλεστέρας, ευγενόλη, L- βορνεόλη, οξειδίο καρυοφυλλενίου, β – καρυοφυλλένιο, α- τερπινεόλη, οξικό L- βορνύλιο, E- νερολιδόλη και τερπινόλη (Y.-T. Tung et al., 2008).

Τα πτητικά έλαια από το *Cinnamomum zeylanicum* περιλαμβάνουν σημαντικές βιολογικές δραστηριότητες. Διάφορα εκχύλισματα κανέλας όπως αιθέρας, υδατικά αλλά και μεθανολικά φέρουν αντιοξειδωτικές ικανότητες (J.Mancini-Filho et al., 1998). Το υδατικό και αλκοολικό εκχύλισμα, με συγκέντρωση (1: 1) της κανέλας, έχει την δυνατότητα της αναστολής της οξείδωσης των λιπαρών οξέων και την υπεροξείδωση των λιπιδίων (S. Shobana et al., 2000). Η κανέλα παρουσιάζει περισσότερες αντιοξειδωτικές ικανότητες σε σύγκριση με άλλα είδη καρυκευμάτων (M. A.Murcia et al., 2004). Σύμφωνα με μια συγκριτική μελέτη του B. Shan et al., 2005 το *C. zeylanicum* ενδείκνυται για εφαρμογή σε τρόφιμα ως αντιοξειδωτικό, καθώς παρουσίασε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση ανάμεσα σε 26 παρόμοια είδη. Επίσης μπορεί να εφαρμοστεί σε προϊόντα διατροφής όχι μόνο ως αντιοξειδωτικός παράγοντας αλλά και ως συντηρητικό.

Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του *C. zeylanicum* και των αιθέριων ελαίων της, οφείλονται στις φλαβονοειδείς ενώσεις που περιλαμβάνουν. Όσον αφορά τις επιδράσεις της κανέλας σε σχέση με τις νευρολογικές διαταραχές, να τονίσουμε την κινναμοφιλίνη, που εμπεριέχεται στο

C. zeylanicum και μειώνει σημαντικά την νευρωτική βλάβη, η οποία μπορεί να προκληθεί από την στέρωση της γλυκόζης, στο αίμα του οργανισμού. Οι προκυανιδίνες τύπου Α, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω βρίσκονται στο εκχύλισμα κανέλας, έχουν την ικανότητα να μειώνουν τη διόγκωση των κυττάρων, ελέγχοντας την κίνηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου (K. S. Panickar et al.,2012). Επίσης το βενζοϊκό νάτριο, ένας από τους μεταβολίτες της κανέλας, ρυθμίζει σημαντικά τους νευροτροπικούς παράγοντες που προέρχονται από τον εγκέφαλο του οργανισμού (A. Jana et al., 2013).

Τα αιθέρια έλαια κανέλας εκτός των παραπάνω ευεργετικών ιδιοτήτων τους, έχουν και αντιδιαβητική δραστηριότητα. Σύμφωνα με μελέτες του Blevins et al.,2007, τα εκχυλίσματα κανέλας μειώνουν όχι μόνο τη γλυκόζη του αίματος αλλά και τα επίπεδα χοληστερόλης. Επίσης μειώνουν σημαντικά την απορρόφηση της αλανίνης στο έντερο. Η αλανίνη, κατέχει ζωτική σημασία στη γλυκονογένεση, μετατρέποντας το πυροσταφυλικό οξύ στο ήπαρ καθώς χρησιμοποιείται και ως υπόστρωμα για την γλυκονογένεση (S. I.Kreydiyyeh et al., 2000). Συγκεκριμένες δόσεις κανέλας μπορούν να βελτιώσουν το οξειδωτικό στρες και το προφλεγμονώδες περιβάλλον στο πάγκρεας, έτσι ώστε να υπάρξει μεγαλύτερη προστασία των β – παγκρεατικών κυττάρων (S.-C. Lee et al.,2013).

Σημαντικό ρόλο έχουν και οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων του *C. zeylanicum* έναντι βακτηριακών ειδών όπως *Pediococcus halophilus* και *Staphylococcus aureus*, μυκητιακών ειδών όπως *Aspergillus flavus*, *Mucor plumbeus*, *Penicillium roqueforti* και *Eurotium sp.* αλλά και έναντι σε είδη ζυμομυκητών όπως *Candida Lipolytica*, *Pichia membranaefaciens*, *Debaryomyces hansenii* και *Zygosaccharomyces rouxii* (N. Matan et al., 2006). Τα αιθέρια έλαια κανέλας είναι πιο ισχυρά σε σύγκριση με άλλα φυτικά εκχυλίσματα, όπως αυτά της ινδικής πασχαλιάς - *Azadirachta indica* και του γαρίφαλλου - *Syzygium aromaticum* (H. Parthasarathy et al.,2013). Επίσης δρουν και ως αντικαρκινικοί παράγοντες , με τη βοήθεια των προκυανιδίων , έχουν την δυνατότητα να αναστείλλουν την αγγειογένεση που εμπλέκεται με τον καρκίνο (J. Lu.et al., 2010).

1.3 Η επίδραση των αιθέριων ελαίων σε σχέση με το στρες στη τσιπούρα (*Sparus aurata* L.).

Το στρες των ψαριών, πρόκειται για μια κατάσταση που αρχικά μπορεί να προκαλέσει την αναστολή της αναπαραγωγής τους και της ανάπτυξής τους και εν συνεχεία μπορεί να

επιρεάσει άμεσα την ακεραιότητα του DNA (Malandrakis et al., 2016). Η αναισθησία των ιχθύων είναι σημαντική για την εξασφάλιση της σωστής διαβίωσής τους, ειδικά σε συνθήκες εντατικής εκτροφής, και πραγματοποιείται με την εφαρμογή των αιθέριων ελαίων (Golomazou et al., 2016). Τα αιθέρια έλαια είναι πιο αποτελεσματικά ως αναισθητικά σε σχέση με άλλες χημικές ουσίες, με την δυνατότητα να ελατώνουν τις παρενέργειες που προκαλούνται από άλλες συνθετικές ουσίες (Golomazou et al., 2016). Το *C. zeylanicum* έχει χαρακτηριστεί ως ο πιο αποτελεσματικός αναισθητικός παράγοντας, αφού ικανοποιεί όλα τα κριτήρια μιας ιδανικής αναισθησίας (Golomazou et al., 2016). Βέβαια το γεγονός ότι τα αιθέρια έλαια προέρχονται από φυτά, δεν σημαίνει αναγκαία ότι είναι ακίνδυνα, διότι μπορεί να έχουν τοξικές και γονιδιοτοξικές επιπτώσεις στους υδρόβιους οργανισμούς, κυρίως αν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις (Slamenova and Horvathova, 2013).

Τα εκτρεφόμενα ψάρια αλλά και πιο συγκεκριμένα τα ψάρια που βρίσκονται υπό συνθήκες εντατικής εκτροφής, μπορούν να εκτεθούν σε πολλούς παράγοντες που προκαλούν στρες, επηρεάζοντας έτσι την ανάπτυξη, την απόδοση καθώς και την επιβίωσή τους (Barton, 1997, 2000). Τα αιθέρια έλαια, και στη περίπτωση της παρούσας εργασίας, το *Origanum vulgare* και το *Cinnamomum zeylanicum*, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αναισθητικά, μειώνοντας το στρες των ιχθύων, μπορούν να μειώσουν επίσης και την ευημερία τους σε κάποια επίπεδα (Zahl et al., 2010), όπως αυξημένη κορτιζόλη, αυξημένη οξειδωση και αυξημένο οσμωτικό στρες (Palić et al., 2006). Η κορτιζόλη είναι μια ορμόνη που εκκρίνεται από τον ενδογενή ιστό, καταλήγοντας στην κυκλοφορία του αίματος και χρησιμοποιείται ως κοινός βιοδείκτης του στρες (Barton, 2002).

Σύμφωνα με τους Golomazou et al., 2016 υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την ανίχνευση βλάβης του DNA του οργανισμού, καθώς και την ταυτοποίηση ουσιών που προκαλούν γονιδιοτοξική δράση. Μια από αυτές τις μεθόδους, είναι η μέθοδος comet ή ανάλυση κομητών, η οποία είναι καλύτερη σε σύγκριση με άλλες, διότι δίνει μια σωστή προσέγγιση για την αξιολόγηση της βλάβης του DNA. Η ανάλυση κομητών είναι μια τεχνική ανίχνευσης του κερματισμένου DNA σε απομονωμένα κύτταρα. Επίσης σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, απαιτεί μικρό αριθμό κυττάρων ανά δείγμα, χαμηλό κόστος και ευκολία στην εφαρμογή της (Tice et al., 2000).

Επομένως τα αιθέρια έλαια βοηθούν στην ανάπτυξη των ιχθύων, αφού έχουν την ικανότητα να δρουν ως αναισθητικά και με αυτόν τον τρόπο να επιτυγχάνουν την μείωση του στρες και κατ'επέκταση την βλάβη του DNA των κυττάρων τους. Χρησιμοποιούνται ευρέως για την εξασφάλιση της μείωσης του στρες των ιχθύων, καθώς και την αποφυγή του πόνου κατά το χειρισμό και τις παρεμβάσεις στον τομέα της υγείας (Neiffer and Stamper, 2009). Τα αιθέρια

έλαια που προέρχονται από φαρμακευτικά φυτά, αποτελούν πλέον μια εναλλακτική λύση για την αναισθησία των ψαριών διότι πρόκειται για φυσικά και όχι χημικά προϊόντα. Το κόστος τους είναι σχετικά χαμηλό, είναι αποτελεσματικά και δεν προκαλούν αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον. Εν κατακλείδι, σημαντική θα είναι η χρήση τους ως πρόσθετα σε ιχθυοτροφές, για την καλύτερη ανάπτυξη των ιχθύων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικά χαρακτηριστικά τσιπούρας *Sparus aurata*

Η τσιπούρα *Sparus aurata* είναι βενθοπελαγικό είδος της υποτροπικής ζώνης, προτιμά παράκτιες περιοχές με αμμώδεις πυθμένες και ανάλογα με την ηλικία του φτάνει σε βάθη από 30 μέχρι 150 m. Δεν είναι μεταναστευτικό είδος και ζει είτε μοναχικά, είτε σχηματίζοντας μικρά κοπάδια. Η τσιπούρα ανήκει στα σαρκοφάγα είδη και τρέφεται κυρίως με μαλάκια, μύδια, οστρακοειδή και μικρά ψάρια. Η αναπαραγωγή του είδους λαμβάνει χώρα από τον Οκτώβριο μέχρι τον Δεκέμβριο. Είναι ερμαφρόδιτο με πρωτανδρική εμφάνιση και μετά το 2^ο έτος της ηλικίας του γίνεται η αλλαγή του φύλου.

Γεωγραφικά εκτείνεται στη Μεσόγειο θάλασσα και σπάνια στη Μαύρη θάλασσα, καθώς και στον Ατλαντικό μέχρι τα Κανάρια νησιά (Νεοφύτου X., 2015). Επίσης είναι ευρύαλο και ευρύθερμο είδος, αντέχει δηλαδή σε μεγάλες μεταβολές αλατότητας και θερμοκρασίας του νερού. Ως ευρύθερμο είδος, η τσιπούρα απαντάται το χειμώνα σε θερμοκρασίες 5 °C – 6 °C και το καλοκαίρι σε θερμοκρασίες έως 25°C - 27°C. Μέγιστη θερμοκρασία επιβίωσης είναι οι 34°C ενώ η ελάχιστη οι 5°C. Ως ευρύαλο είδος η τσιπούρα, απαντάται σε νερά με αλατότητα 7 psu έως και 42 psu. Οι ιδανικές συνθήκες είναι μεταξύ 25 psu και 42 psu. Όσον αφορά το διαλυμένο οξυγόνο, το ιδανικό επίπεδο κορεσμού του νερού σε διαλυμένο οξυγόνο σε συνάρτηση με την θερμοκρασία είναι το 90%.

Η τσιπούρα *Sparus aurata* αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εμπορικό είδος στην Ευρώπη και η εντατική εκτροφή της, έχει αυξηθεί κατά πολύ τα τελευταία χρόνια.

Η συστηματική κατάταξη της *Sparus aurata* είναι η εξής:

Συνομοταξία: χορδωτά

Υποσυνομοταξία: σπονδυλωτά

Ομοταξία: οστειχθύες

Τάξη: PERCIFORMES

Οικογένεια: SPARIDAE

Γένος: *Sparus*

Είδος: *Sparus aurata*

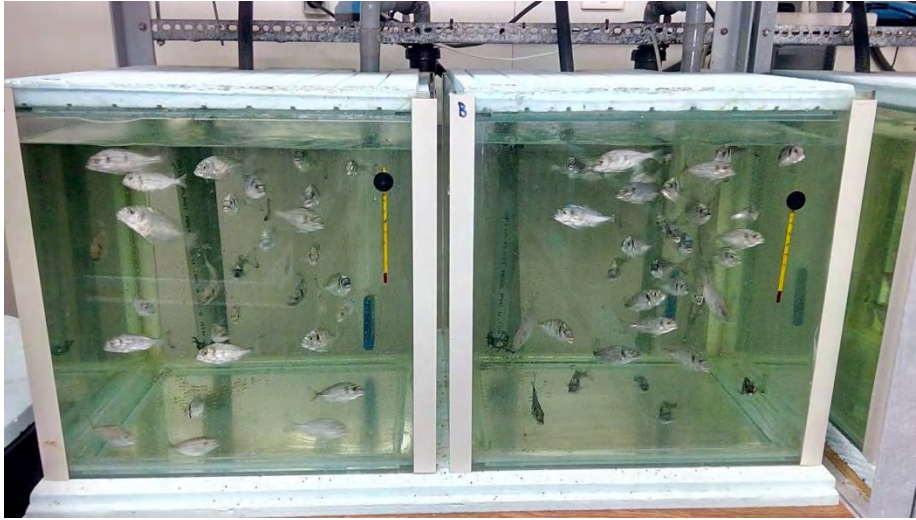


ΕΙΚΟΝΑ 1: ΤΣΙΠΟΥΡΑ (*Sparus aurata*)

2.2 Συνθήκες εκτροφής

Τα ενυδρεία που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα ήταν μεσαίου μεγέθους (Εικόνα 2) , τα οποία περιλάμβαναν βιολογικά (Εικόνα 3) και μηχανικά (Εικόνα 4) φίλτρα. Καθημερινά

μετά το τσίγμα των ιχθύων, πραγματοποιούνταν καθαρισμός των ενυδρείων με σιφωνισμό και συμπλήρωση του νερού που χάθηκε.



Εικόνα 2: Ενυδρεία που χρησιμοποιήθηκαν



Εικόνα 3: Βιολογικό φίλτρο



Εικόνα 4: Μηχανικό φίλτρο

Στο παρόν πείραμα, ταΐστηκαν τσιπούρες που διατηρούνταν σε συνολικά 5 ενυδρεία για 3 μήνες. Οι μεταχειρήσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1% ρίγανη, 1% κανέλα, 2% ρίγανη, 2% κανέλα και το υπόλοιπο 2% ήταν συμβατή ιχθυοτροφή που λειτουργούσε ως μάρτυρας. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες από ημέρα 0 έως ημέρα 90, δηλαδή έγιναν δύο δειγματοληψίες συνολικά, όπου ελήφθησε το έντερο των πειραματικών ψαριών.

2.3 Δειγματοληψία

Για κάθε μεταχείριση, συλλέχθηκαν τσιπούρες τυχαία και μεταφέρθηκαν σε δοχείο που περιείχε διαλυμένη ποσότητα αναισθητικού για την θανάτωσή τους. Αμέσως μετά την θανάτωσή τους, τα ατομά τσιπούρας μετρήθηκαν, ζυγίστηκαν και έγινε αφαίρεση του εντέρου τους. Έπειτα τα έντερα των τσιπύρων μεταφέρθηκαν σε διάλυμα HBSS και τοποθετήθηκαν πάνω σε πάγο. Το διάλυμα HBSS είναι ελεύθερο ασβεστίου και μαγνησίου. Το μαγνήσιο αναστέλλει τη δράση της κολλαγονάσης και το ασβέστιο δρα ανασταλτικά στο διαχωρισμό των κυττάρων του ιστού (Baksi and Frazier, 1990).

Για την απομόνωση των κυττάρων του εντέρου, αρχικά έγινε καθαρισμός του ιστού με πλύσεις με το διάλυμα HBSS και έπειτα έγινε αφομοίωση του εντέρου. Αφού τελείωσε το στάδιο του καθαρισμού των ιστών, πραγματοποιήθηκαν ενέσεις κολλαγονάσης συγκέντρωσης

0,04 % (κολλαγονάση σε διάλυμα HBSS). Εν συνεχεία, το έντερο μεταφέρθηκε σε δισκίο “petri” και τεμαχίστηκε σε πολύ μικρά τμήματα. Η διαδικασία αυτή έγινε πάνω σε τριμμένο πάγο. Το έντερο που ήδη έχει τεμαχιστεί μαζί με διάλυμα HBSS , μεταφέρθηκε σε δοχείο ζέσεως, τοποθετήθηκε σε μηχανήμα ανάδευσης και ακολούθησε η διαδικασία της φυγοκέντρησης των κυττάρων.

2.4 Μέθοδος comet – Ανάλυση κομητών

Η ανάλυση κομητών είναι μια τεχνική που ανιχνεύει τη βλάβη του DNA σε επίπεδο απομονωμένων κυττάρων. Σε αυτή τη τεχνική , ένας μικρός αριθμός κυττάρων, όπως κύτταρα που απομονώνονται από διάφορους ιστούς, στο παρόν πείραμα από το έντερο, τοποθετείται σε λεπτό στρώμα αγαρόζης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Τα κύτταρα λύνονται από διάλυμα κορεσμένο σε άλας NaCl. Μετά την ηλεκτροφόρηση και την χρώση των κυττάρων με την φθορίζουσα ουσία, βρωμιούχο αιθίδιο, τα κύτταρα με βλάβη στο DNA, εμφανίζουν μετανάστευση του κερματισμένου DNA από τον πυρήνα προς την άνοδο, σχηματίζοντας τη μορφή κομήτη. Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του ποσοστού του κερματισμένου DNA, είναι η εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά του κομήτη, στον πυρήνα, στο μήκος της ουράς, στη διάμετρο του πυρήνα και το συνολικό μήκος του κομήτη.

2.4.1 Επίστρωση αγαρόζης σε αντικειμενοφόρο πλάκα

Η αντικειμενοφόρος πλάκα εμβαιπίστηκε σε καθαρή αλκοόλη και τοποθετήθηκε στους -20 °C για 20 λεπτά. Μετά την απομόνωση των εντερικών κυττάρων, τοποθετήθηκαν σε λεπτή στρώση αγαρόζης πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Σε διάλυμα PBS παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης συγκένρωσης 0,5 %. Το διάλυμα αφού ανακατεύθηκε και ομοιογενοποιήθηκε , τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για μικρό χρονικό διάστημα. Έπειτα η αντικειμενοφόρος πλάκα εμβαιπίστηκε σε ζεστή αγαρόζη , έτσι ώστε να επικαθήσει στην καθαρή επιφάνεια της. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε η αγαρόζη και καθαρίστηκε η κάτω επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας και τοποθετήθηκε σε πάγο για να ζελατινοποιηθεί.

Παρασκευάσθηκε ακόμη ένα διάλυμα αγαρόζης, ίδιας συγκέντρωσης, με τον ίδιο τρόπο και όταν έφτασε σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) , 20 μl κυτταρικού αιωρήματος προστέθηκαν σε 80 μl αγαρόζης και τοποθετήθηκαν στην αντικειμενοφόρο πλάκα που ήταν καλυμμένη με πήκτωμα αγαρόζης και τοποθετήθηκε η καλυπτρίδα. Μετά την ζελατινοποίηση και της δεύτερης στρώσης αγαρόζης, η καλυπτρίδα απομακρύνθηκε προσεκτικά.

2.4.2 Ηλεκτροφόρηση και μέτρηση των κομητών

Σε αυτό το στάδιο γίνεται τοποθέτηση της αντικειμενοφόρου πλάκας σε διάλυμα λύσης, το οποίο περιείχε άλας NaCl. Πρίν την ηλεκτροφόρηση, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εκπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκαν σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, που περιείχε 1,5L βασικό διάλυμα. Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εκπλύθηκαν σε ουδέτερο διάλυμα, έτσι ώστε να δράσει το βρωμιούχο αιθίδιο κατά το στάδιο της χρώσης. Σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα , προστέθηκαν 50μl βρωμιούχο αιθίδιο με συγκέντρωση 20μg/ml. Τα κύτταρα αναλύθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού και η καταγραφή των εικόνων πραγματοποιήθηκε με βιντεοκάμερα υψηλής ανάλυσης και η προβολή τους γινόταν σε οθόνη Η/Υ.

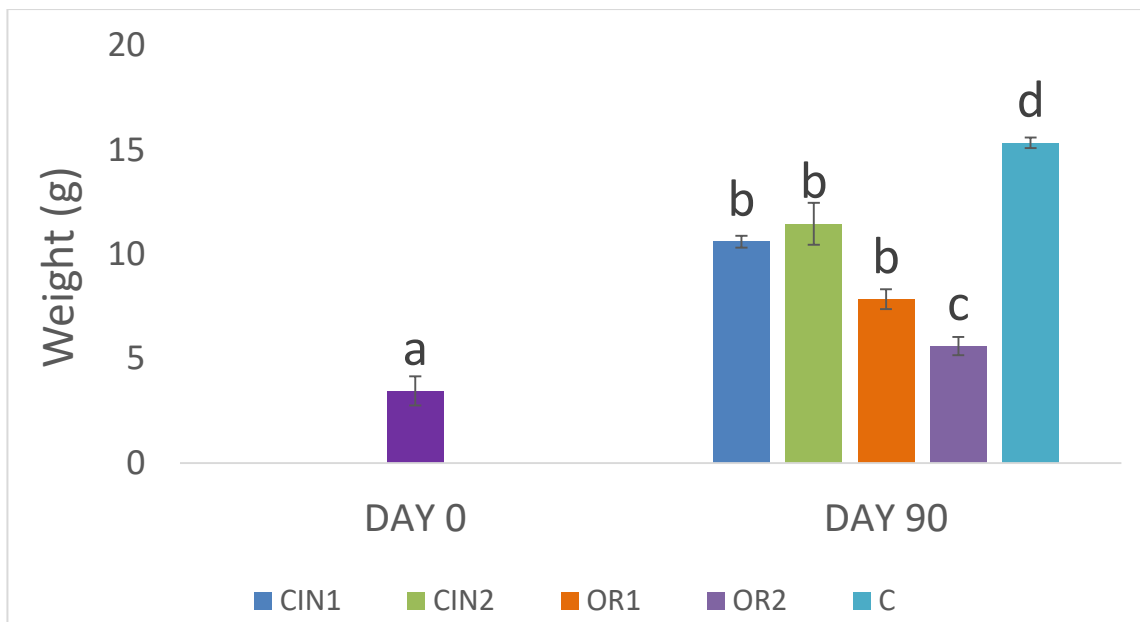
2.5 Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η μονοπαραγοντική μέθοδος SPSS One-Way ANOVA.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Βάρος ιχθύων σε συνάρτηση με τον χρόνο

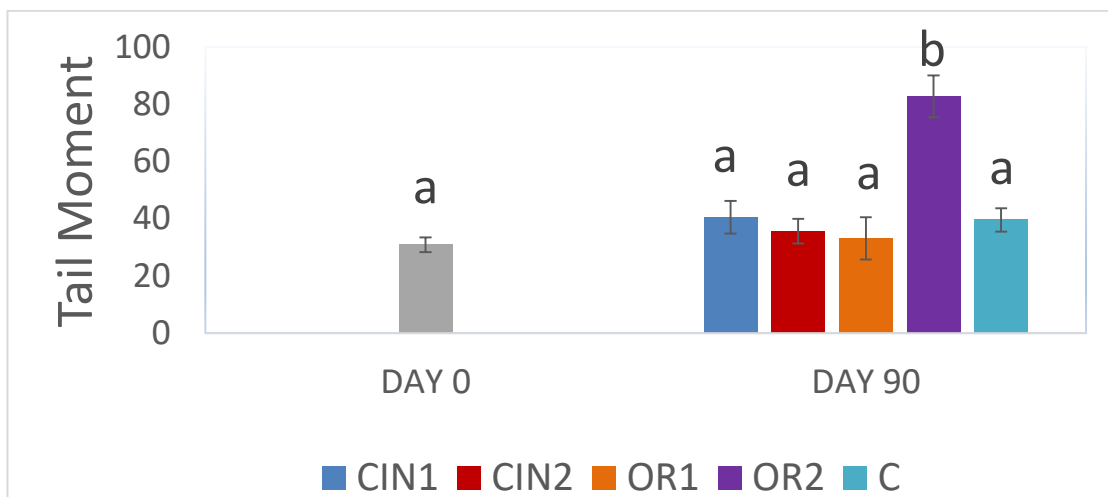
Στο Σχήμα 1. φαίνεται η συνάρτηση του βάρους των ιχθύων με τον χρόνο που διήρκησε το πείραμα, από Day 0 έως Day 90, δηλαδή σε διάστημα 3 μηνών. Οι μεταχειρήσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πέντε, όπου CIN1 είναι η κανέλα με συγκέντρωση 1 % , CIN2 είναι η κανέλα με συγκέντρωση 2% , OR1 είναι η ρίγανη με συγκέντρωση 1 % , OR2 είναι η ρίγανη με συγκέντρωση 2% και C είναι η συμβατή ιχθυοτροφή που λειτούργησε ως μάρτυρας. Σύμφωνα με το Σχήμα 1. , το βάρος των ιχθύων αυξήθηκε σημαντικά σε βάθος χρόνου. Από την στατιστική ανάλυση προέκυψαν 5 ομάδες, η ομάδα a,b,c και d. Η ομάδα a δείχνει το μέσο βάρος των ιχθύων πριν ξεκινήσει το πείραμα, στην ομάδα b ομαδοποιήθηκαν η CIN1, CIN2 και η OR1 καθώς δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, η ομάδα c είναι η OR2 και είναι αυτή που παρουσίασε την μικρότερη αύξηση ενώ η ομάδα d είναι η συμβατή ιχθυοτροφή και είναι αυτή που παρουσίασε την μεγαλύτερη αύξηση βάρους. Η OR2 ήταν αναμενόμενο να ήταν χαμηλή καθώς δεν έγινε πλήρως αποδεκτή από τις τσιπούρες.



Σχήμα 1: Βάρος ιχθύων σε συνάρτηση με χρόνο πειράματος

3.2 Κατακερματισμός DNA σε συνάρτηση με τον χρόνο

Στο Σχήμα 2. φαίνεται ο κερματισμός του DNA σε συνάρτηση με τον χρόνο του πειράματος, με τις ίδιες μεταχειρήσεις, δηλαδή CIN1, CIN2 OR1, OR2 και C. Από την στατιστική ανάλυση προέκυψαν δύο ομάδες, η a και η b. Στην ομάδα a ομαδοποιήθηκαν οι μεταχειρήσεις CIN1, CIN2, OR1 και η C , καθώς δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ενώ η μεταχείριση OR2 κατηγοριοποιήθηκε στην ομάδα b, η οποία παρουσίασε τον μεγαλύτερο κατακερματισμό του DNA.



Σχήμα 2: Κατακερματισμός DNA σε συνάρτηση με τον χρόνο

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Επίδραση των αιθέριων ελαίων ρίγανης και κανέλας στην ανάπτυξη των ατόμων τσιπούρας

Τα αιθέρια έλαια τόσο της ρίγανης όσο και της κανέλας μπορούν να χαρακτηριστούν ως αυξητικοί παράγοντες στην καλή ανάπτυξη των ιχθύων. Αυτή τους η δράση οφείλεται στις σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές τους ικανότητες. Τα αιθέρια έλαια της ρίγανης παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δραστηριότητα λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των επιμέρους φαινολικών ενώσεών τους, ιδίως από το συνδυασμό θυμόλης και καρβακρόλης ενώ τα πιο σημαντικά συστατικά των αιθέριων ελαίων της κανέλας είναι η κινναμαλδεΰδη, το κινναμικό οξύ και το κινναμωμικό, τα οποία οφείλονται για τις πολυάριθμες ευεργετικές και φαρμακευτικές του ιδιότητες. Επίσης τα αιθέρια έλαια της ρίγανης, βοηθούν στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με νευροεκφυλιστικές διαταραχές και ανταποκρίνονται θετικά σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες. Ωστόσο και τα αιθέρια έλαια κανέλας δρουν έναντι των νευρολογικών διαταραχών, χάρη στην κινναμοφιλίνη, που εμπεριέχει και μειώνει σημαντικά την νευρωτική βλάβη, η οποία μπορεί να προκληθεί από την στέρηση της γλυκόζης, στο αίμα του οργανισμού.

Τα εκτρεφόμενα ψάρια αλλά και πιο ειδικά τα ψάρια που βρίσκονται υπό συνθήκες εντατικής εκτροφής, μπορούν να εκτεθούν σε πολλούς παράγοντες που προκαλούν στρες, επηρεάζοντας έτσι την ανάπτυξή, την απόδοση καθώς και την επιβίωσή τους. Το στρες των ψαριών μπορεί να προκαλέσει την αναστολή της αναπαραγωγής και της ανάπτυξής τους. Μια από τις σημαντικότερες δράσεις των αιθέριων ελαίων του *O.vulgare* και *Z. zeylanicum* είναι η ικανότητά τους να μειώνουν το στρες των ιχθύων.

Επομένως, είναι χρήσιμη η εφαρμογή τους στην παραγωγή υδατοκαλλιεργειών, κυρίως λόγω της ικανότητάς τους να βοηθούν στην ανάπτυξη των ιχθύων, για τον καλύτερο έλεγχο των ασθενειών, καθώς και για την αντικατάσταση των αντιβιοτικών.

4.2 Μέθοδος ανάλυση κομητών ή comet στα κύτταρα εντέρου

Η μέθοδος ανάλυση κομητών ή αλλιώς comet δίνει τη δυνατότητα της μελέτης των μηχανισμών βλάβης του DNA, της καταγραφής των μεταλλαξιογόνων και καρκινογόνων ουσιών, του ελέγχου της δράσης των αντιοξειδωτικών ουσιών καθώς επίσης και τη δυνατότητα εκτίμησης του στρες στους ζωντανούς οργανισμούς. Η μέθοδος comet είναι καλύτερη σε σύγκριση με άλλες, διότι δίνει μια σωστή προσέγγιση για την αξιολόγηση της βλάβης του DNA και απαιτεί μικρό αριθμό κυττάρων ανά δείγμα, χαμηλό κόστος και ευκολία στην εφαρμογή της. Με άλλα λόγια, η ανάλυση κομητών είναι μια τεχνική ανίχνευσης του κερματισμένου DNA σε απομονωμένα κύτταρα.

Στο παρόν πείραμα η μέθοδος comet, εφαρμόστηκε στα έντερα των τσιπούρων, μιας και αποτελεί σημαντικό όργανο αφού εκεί πραγματοποιείται η τελική χημική επεξεργασία της τροφής και γίνεται απορρόφηση των προϊόντων της πέψης και των ηλεκτρολυτών. Το μήκος του εντέρου καθέ ψαριού σχετίζεται με τις διατροφικές του συνήθειες.

Η τεχνική της “ανάλυσης κομητών” έχει ευρεία χρήση ανεξάρτητα από τις τροφές που θα χρησιμοποιηθούν στην εκτροφή των ιχθύων και τους τύπους των κυττάρων από τους διάφορους ιστούς που θα εξεταστούν.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι τσιπούρες παρουσίασαν αύξηση του βάρους τους σε όλες τις μεταχειρήσεις. Συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεταχειρήσεις, η συμβατή ιχθυοτροφή παρουσίασε την μεγαλύτερη αύξηση του βάρους ενώ η μεταχείριση ρίγανη με συγκέντρωση 2 % παρουσίασε την μικρότερη αύξηση βάρους, καθώς δεν έγινε πλήρως αποδεκτή από τις τσιπούρες. Επίσης η ρίγανη με συγκέντρωση 2% προκάλεσε τον μεγαλύτερο κατακερματισμό του DNA στα εντερικά κύτταρα των ιχθύων, πιθανών λόγω του χαμηλού βαθμού σίτισης, αφού η τροφή δεν ήταν πλήρως επιθυμητή από τις τσιπούρες.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bajpai, V. K., Baek, K.-H., & Kang, S. C. (2012). Control of Salmonella in foods by using
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foodsea review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223e253.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists essential oils: a review. *Food Research International*, 45, 722e734.
- E.E. Malandrakis , O. Dadali , E. Golomazou , M. Kavouras , S. Dailianis , S. Chadio , A. Exadactylos , P. Panagiotaki, ‘‘ DNA damage and differential gene expression associated with physical stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*)’’ , *General and Comparative Endocrinology*,vol 236,page 98–104,2016.
- Kintzios, S. E. (2002). *Oregano: The genera origanum and lippia (medicinal and aromatic plants-industrial profiles)*. New York: CRC Press.
- Hristova, Y., Gochev, V., Wanner, Z., Jirovetz, L., Schmidt, E., Girova, T., Kuzmanov, A., 2013. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Salvia sclarea* L. from Bulgaria against clinical isolates of *Candida* species. *J. BioSci. Biotech.* 2 (1), 39–44
- Chou, T. H., Ding, H. Y., Lin, R. J., Liang, J. Y., & Liang, C. H. (2010). Inhibition of melanogenesis and oxidation by protocatechuic acid from *Origanum vulgare* (Oregano). *Journal of Natural Products*, 73, 1767–1774.
- Al-Kalaldehy, J.Z., Abu-Dahab, R., Afifi, F.U., 2010. Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. *Nutr. Res.* 30, 271–278.
- B. Marongiu, A. Piras, S. Porcedda et al., ‘‘Supercritical CO₂ extract of *Cinnamomum zeylanicum*: chemical characterization and antityrosinase activity,’’ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 24, pp. 10022–10027, 2007.
- S.-T. Chou,W.-L. Chang, C.-T. Chang, S.-L. Hsu, Y.-C. Lin, and Y. Shih, ‘‘*Cinnamomum cassia* Essential Oil inhibits α -MSHinducedmelanin production and oxidative stress inmurine B16 melanoma cells,’’ *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 9, pp. 19186–19201, 2013.
- G.-I. Nonaka, S. Morimoto, and I. Nishioka, ‘‘Tannins and related compounds. Part 13. Isolation and structures of trimeric, tetrameric, and pentameric proanthocyanidins from cinnamon,’’ *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, pp. 2139–2145, 1983.
- R. A. Anderson, C. L. Broadhurst, M. M. Polansky et al., ‘‘Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity,’’ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 1, pp. 65–70, 2004.

X. Peng, K.-W. Cheng, J. Ma et al., "Cinnamon bark proanthocyanidins as reactive carbonyl scavengers to prevent the formation of advanced glycation endproducts," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 6, pp. 1907–1911, 2008.

H.-F. Yeh, C.-Y. Luo, C.-Y. Lin, S.-S. Cheng, Y.-R. Hsu, and S.- T. Chang, "Methods for thermal stability enhancement of leaf essential oils and their main Constituents from Indigenous Cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, no. 26, pp. 6293–6298, 2013

U. M. Senanayake, T. H. Lee, and R. B. H. Wills, "Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 26, no. 4, pp. 822–824, 1978.

Y.-T. Tung, M.-T. Chua, S.-Y. Wang, and S.-T. Chang, "Antiinflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs," *Bioresource Technology*, vol. 99, no. 9, pp. 3908–3913, 2008.

J. Mancini-Filho, A. van-Koij, D. A. P. Mancini, F. F. Cozzolino, and R. P. Torres, "Antioxidant activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*, breyne) extracts," *Bollettino Chimico Farmaceutico*, vol. 137, no. 11, pp. 443–447, 1998.

S. Shobana and K. Akhilender Naidu, "Antioxidant activity of selected Indian spices," *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 62, no. 2, pp. 107–110, 2000.

B. Shan, Y. Z. Cai, M. Sun, and H. Corke, "Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 20, pp. 7749–7759, 2005.

M. A. Murcia, I. Egea, F. Romojaro, P. Parras, A. M. Jim'enez, and M. Mart'inez-Tom'e, "Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 7, pp. 1872–1881, 2004.

J.-W. Hong, G.-E. Yang, Y. B. Kim, S. H. Eom, J.-H. Lew, and H. Kang, "Anti-inflammatory activity of cinnamon water extract *in vivo* and *in vitro* LPS-induced models," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 12, no. 1, article 237, 2012.

K. S. Panickar, M. M. Polansky, D. J. Graves, J. F. Urban, and R. A. Anderson, "A procyanidin type A trimer from cinnamon extract attenuates glial cell swelling and the reduction in glutamate uptake following ischemia-like injury *in vitro*," *Neuroscience*, vol. 202, pp. 87–98, 2012.

A. Jana, K. K. Modi, A. Roy, J. A. Anderson, R. B. van Breemen, and K. Pahan, "Up-regulation of neurotrophic factors by cinnamon and its metabolite sodium benzoate: therapeutic implications for neurodegenerative disorders," *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, vol. 8, no. 3, pp. 739–755, 2013.

S. M. Blevins, M. J. Leyva, J. Brown, J. Wright, R. H. Scofield, and C. E. Aston, "Effect of cinnamon on glucose and lipid levels in non-insulin-dependent type 2 diabetes," *Diabetes Care*, vol. 30, no. 9, pp. 2236–2237, 2007.

S. I. Kreydiyyeh, J. Usta, and R. Copti, "Effect of cinnamon, clove and some of their constituents on the Na⁺-K⁺-ATPase activity and alanine absorption in the rat jejunum," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 38, no. 9, pp. 755–762, 2000

S.-C. Lee, W.-X. Xu, L.-Y. Lin, J.J. Yang, and C.-T. Liu, "Chemical composition and hypoglycemic and pancreas-protective effect of leaf essential oil from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum* Kanehira)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, no. 20, pp. 4905–4913, 2013.

N. Matan, H. Rimkeeree, A. J. Mawson, P. Chompreeda, V. Haruthaithanasan, and M. Parker, "Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 107, no. 2, pp. 180–185, 2006.

H. Parthasarathy and S. Thombare, "Evaluation of antimicrobial activity of *Azadirachta indica*, *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* against oral microflora," *Asian Journal of Experimental Sciences*, vol. 27, no. 2, pp. 13–16, 2013.

J. Lu, K. Zhang, S. Nam, R. A. Anderson, R. Jove, and W. Wen, "Novel angiogenesis inhibitory activity in cinnamon extract blocks VEGFR2 kinase and downstream signaling," *Carcinogenesis*, vol. 31, no. 3, pp. 481–488, 2010.

Barton, B.A., 1997. Stress in finfish: past, present and future—a historical perspective. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*, Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 1–33.

Barton, B.A., 2000. Stress. In: Stickney, R.R. (Ed.), *Encyclopedia of Aquaculture*. John Wiley and Sons, New York

Zahl, I.H., Kiessling, A., Samuelsen, O.B., Olsen, R.E., 2010. Anaesthesia induces stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiol. Biochem.* 36, 719–730.

Palić, D., Herolt, D.M., Andreasen, C.B., Menzel, B.W., Roth, J.A., 2006. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Aquaculture* 254, 675–685.

Slamenova, D., Horvathova, E., 2013. Cytotoxic, anti-carcinogenic and antioxidant properties of the most frequent plant volatiles. *Neoplasma* 60, 343–354.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–22

Neiffer, D.L., Stamper, M.A., 2009. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. *ILAR J.* 50, 343–360.