



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«Υδατοκαλλιέργειες» -
«Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδρόβιων Οργανισμών»

ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ ΜΕ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ-ΑΛΙΕΙΑΣ ΤΟΥ Τ.Ε.Ι. ΗΠΕΙΡΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

“Μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων του περιφερικού αίματος τσιπούρας (*Sparus aurata*)”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ

Ευτυχία Τζιρώνη

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Γιώργος Χριστοδουλόπουλος

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2010



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

POSTGRADUATE STUDIES PROGRAM

“Aquaculture” – “Aquatic Animal Health”

***IN COLLABORATION WITH
THE DEPARTMENT OF AQUACULTURE & FISHERIES, TEI OF EPIRUS***

Thesis:

**“Study on the morphology of peripheral blood cells of sea bream
(*Sparus aurata*)”**

POSTGRADUATE STUDENT

Eftychia Tzironi

SUPERVISOR

George Cristodoulopoulos

KARDITSA 2010

Στην οικογένειά μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποσκοπεί στη μελέτη και την περιγραφή των κυττάρων του περιφερικού αίματος εκτρεφόμενης τσιπούρας (*Sparus aurata*) εμπορεύσιμου μεγέθους. Η γνώση της φυσιολογικής μορφολογίας των κυττάρων του αίματος αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εκτίμηση της φυσιολογικής κατάστασης και της υγείας των ψαριών. Συνεπώς, η αιματολογία θα μπορούσε να συμβάλει στην εκτίμηση της κατάστασης της υγείας ενός ψαριού και κατ' επέκταση, στη διάγνωση μιας νόσου. Η διπλωματική εργασία απαρτίζεται από τέσσερα τμήματα: Εισαγωγή, Υλικά και Μέθοδοι, Αποτελέσματα και Συζήτηση. Στην Εισαγωγή, γίνεται ανασκόπηση της εξέλιξη των υδατοκαλλιεργειών, αναφορά στην εκτροφή της τσιπούρας και στην σπουδαιότητα της αιματολογίας. Στην ενότητα “Υλικά και Μέθοδοι” περιγράφεται το πειραματικό πρωτόκολλο, που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν για τη μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων του αίματος και τον προσδιορισμό ορισμένων αιματολογικών παραμέτρων. Στα “Αποτελέσματα” περιγράφονται τα έμμορφα συστατικά του αίματος που εντοπίστηκαν στο περιφερικό αίμα τσιπούρας, καθώς και η ποσοτική ανάλυση αυτών. Στην ενότητα “Συζήτηση” αναπτύσσονται τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τη μελέτη, σε συνδυασμό με παρόμοιες μελέτες, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με το εκτρεφόμενο είδος της τσιπούρας, προκειμένου να προωθηθεί η έγκαιρη διάγνωση της νόσου και η κατανόηση της φυσιολογίας του οργανισμού. Τα κύτταρα του περιφερικού αίματος της τσιπούρας μελετήθηκαν με μικροσκοπική παρατήρηση επιχρισμάτων αίματος σε οπτικό μικροσκόπιο. Το αίμα της τσιπούρας χαρακτηρίζεται από ώριμα και ανώριμα ερυθροκύτταρα, θρομβοκύτταρα, ουδετερόφιλα και εωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, πλασμοκύτταρα και μονοκύτταρα-μακροφάγα, σε αναλογίες, που είναι σύμφωνες με εκείνες άλλων σπονδυλωτών.

ABSTRACT

The present master thesis concerns the study and description of the cell types of the peripheral blood of farmed sea bream *Sparus aurata* (market size). The knowledge of normal morphology of blood cells represents an essential specification in order to assess the physiological status and health of the fish. Therefore, the haematology could help in assessing their health status as well as diagnosing a certain disease at an early stage. This master thesis consists of four sections: Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. The first section, "Introduction", involves a review of the development of aquaculture, while the rearing of sea bream and the importance of hematology are also remarkably pointed out. "Materials and Methods" section describes the experimental protocol that was used, as well as the techniques applied in order to study the morphology of blood cells and define certain haematological parameters. "Results" section describes the blood cells that were found in the peripheral blood of sea bream along with their quantitative analysis. In "Discussion" section, the outcomes of this study are elaborated in combination with similar studies, providing information concerning the farmed specie of sea bream in order to promote early and timely diagnosis of a certain disease and to advance the understanding of their physiology. The cells of the peripheral blood of sea bream *Sparus aurata* were examined by observing blood smears in light microscope. The peripheral blood of *Sparus aurata* consists of mature and immature erythrocytes, thrombocytes, granulocytes, lymphocytes, plasma cells, and monocyte-macrophages, in haematological patterns assumed in other vertebrates.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Παθολογικά προβλήματα εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών» του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά την περίοδο 2008-2010.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν στην υλοποίηση αυτής της εργασίας, ο κάθε ένας με τον τρόπο του και από τη θέση του.

Ευχαριστώ τον κ. Γιώργο Χριστοδουλόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ο οποίος ανέλαβε την επίβλεψη της διπλωματικής μου εργασίας, υποστηρίζοντας και καθοδηγώντας με καθ' όλη τη διάρκειά της.

Ευχαριστώ, επίσης, την κ. Φωτεινή Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η οποία συνέβαλε καθοριστικά στην επιλογή του θέματος της παρούσας διπλωματικής εργασίας, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές της καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου.

Ακόμη, ευχαριστώ τον κ. Παναγιώτη Πανταζή, Λέκτορα του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συμβουλευτική του υποστήριξη κατά τη διάρκεια της συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστίες επίσης απευθύνω:

Στην Κ. Μπιτχαβά, διδάκτορα και φίλη για τις συμβουλές της και την πολύτιμη βοήθειά της κατά την πραγματοποίηση των αιμοληψιών.

Στον κ. Γιώργο και τον κ. Γιάννη για τη φιλοξενία και τη βοήθειά τους στη μονάδα κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Στη Λ. Αθανασίου για την ανεκτίμητη προσφορά της.

Στο Μ. Χατζή για τη συμβολή και την πολύτιμη βοήθειά του.

Στους φίλους μου, που ήταν δίπλα μου και με στήριξαν όταν τους χρειαζόμουν.

Στις αδερφές μου, Μαρία και Κωνσταντίνα, για την ενθάρρυνση και τη συμπαράσταση στις δύσκολες στιγμές και, ιδιαίτερα στη Μαρία, που ως φιλόλογος, επιμελήθηκε του κειμένου.

Τέλος, στους γονείς μου ένα μεγάλο ευχαριστώ για τη μέχρι τώρα προσφορά τους, αλλά και για τη δύναμη και το κουράγιο που μου έδωσαν για να ολοκληρώσω αυτή τη διπλωματική εργασία.

...Το ταξίδι το γεμίζει η χαρά του δρόμου, οι άνθρωποι που νοιώθουμε
την μυρωδιά τους. Η αίσθηση ότι υπάρχει επόμενος σταθμός.
Το αδειάζουν τα νεκρά τοπία. Οι άνθρωποι που φεύγουν ή χάνονται.
Οι μυρωδιές που μας άγγιξαν αλλά δεν νοιώθουμε...

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
A. ΠΕΡΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ.....	10
A.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	10
A.2. Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ.....	12
A.3. Η ΠΑΡΟΥΣΑ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ.....	15
A.4. ΜΟΡΦΕΣ-ΤΥΠΟΙ ΕΚΤΡΟΦΗΣ ΙΧΘΥΩΝ.....	18
A.5. Η ΕΝΤΑΤΙΚΗ ΘΑΛΑΣΣΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	19
B. Η ΤΣΙΠΟΥΡΑ	21
B.1. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ	21
B.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	21
B.3. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ.....	22
B.4. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ	23
B.5. ΕΚΤΡΟΦΗ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ	23
I. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ.....	23
II. ΠΡΟΠΑΧΥΝΣΗ.....	26
III. ΠΑΧΥΝΣΗ	26
Γ. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ	28
Γ.1. ΤΟ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	28
Γ.2. ΤΟ ΑΙΜΑ	29
Γ.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΙΜΟΛΗΨΙΑΣ	36
Δ. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	39
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41
A. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	42
B. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	43
Γ. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	44
1. Παρασκευή επιχρισμάτων αίματος	44
2. Χρώση Giemsa και Diff-Quick	45
3. Ανάλυση αίματος.....	47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
A. ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΒΑΡΟΥΣ ΚΑΙ ΟΛΙΚΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΣΩΜΑΤΟΣ	49
B. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ	52
Γ. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ.....	55
1. Ερυθροκύτταρα	56
2. Θρομβοκύτταρα.....	56
3. Κοκκιοκύτταρα.....	57
4. Λεμφοκύτταρα.....	58
5. Πλασμοκύτταρα.....	59
6. Μονοκύτταρα μακροφάγα	59
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	60
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	73

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. ΠΕΡΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

A.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η υδατοκαλλιέργεια είναι το σύνολο των δραστηριοτήτων που αποβλέπει στην εκτροφή υδρόβιων ζωικών και φυτικών οργανισμών και περιλαμβάνει την εκτροφή θαλάσσιων ψαριών και ψαριών του γλυκού νερού, μαλάκιων και μαλακόστρακων και υδρόβιων φυτών.

Οι υδατοκαλλιέργειες έχουν πολύ μακρά ιστορία. Για να φτάσουν από την εμβρυική φάση στη σημερινή τους μορφή πέρασαν από πολλά ενδιάμεσα στάδια και πειραματισμούς. Ο άνθρωπος άρχισε να εκτρέφει υδρόβιους οργανισμούς, σύμφωνα με αρχαιολογικά ευρήματα που έχουμε στη διάθεσή μας, από το 4000 π.Χ. στην Κίνα και στην Ινδονησία. Η πρώτη γραπτή αναφορά εκτροφής σημειώθηκε το 500 π.Χ. από τον Κινέζο πολιτικό Fan Li στο βιβλίο του με τίτλο “Yang Yu Ching” ή “Classic of Fish Culture”. Υπάρχουν στοιχεία εκτροφής τιλάπιας στην Αίγυπτο το 2000 π.Χ., ενώ στη Ρώμη τον 1^ο αιώνα π.Χ.. Οι Ρωμαίοι επικεντρώθηκαν στην εκτροφή πέστροφας και κέφαλου σε μικρές λίμνες. Στην Κεντρική Ευρώπη υπάρχει καταγραφή ψαριών λίμνης κατά τη λήξη του 11^{ου} αιώνα. Επίσης, τα ψάρια που εκτρέφονταν σε δεξαμενές αποτελούσαν συνηθισμένη πηγή τροφής κατά τη διάρκεια του Μεσαίωνα στην Ευρώπη, όταν τα ελεύθερα διαβιούντα ψάρια ήταν σπάνια και ακριβά στις περιοχές της ενδοχώρας, μια τάση που συνεχίστηκε μέχρι και τον 19ο αιώνα (Parker, 1995). Αν η Κίνα θεωρείται το λίκνο της υδατοκαλλιέργειας, τότε ίσως η Γαλλία είναι η γενέτειρα της σύγχρονης υδατοκαλλιέργειας με τη δημιουργία του πρώτου εκκολαπτηρίου ιχθύων το 1852 (Parker, 1995). Οι υδατοκαλλιέργειες αναπτύσσονται διεθνώς με γρήγορους ρυθμούς, αξιοποιώντας χερσαίες εκτάσεις, θαλάσσιες περιοχές, τα σύγχρονα αποτελέσματα της βιοτεχνολογίας και την ανάγκη επενδύσεων σε νέους τομείς. Οι μονάδες σταδιακά αυτονομούνται, καθετοποιούν την παραγωγή τους και αποκτούν χαρακτηριστικά βιομηχανικής κλίμακας. Παράλληλα, όμως, πολλές εγκαταστάσεις εκτροφής παραμένουν σε επίπεδα οικογενειακής

παραγωγής, εξειδικεύοντας τα προϊόντα τους ή συνδυάζοντας τις υδατοκαλλιέργειες με άλλες αγροτικές ή κτηνοτροφικές δραστηριότητες. Στην Ευρώπη συναντάμε τη μεγαλύτερη ποικιλία υδατοκαλλιεργειών όσον αφορά στα είδη που εκτρέφονται, αλλά και στους τύπους εκτροφής. Αρχικά, αναπτύχθηκαν οι υδατοκαλλιέργειες στα εσωτερικά νερά και ακολούθησε την τελευταία 20ετία η θεαματική ανάπτυξη των θαλασσοκαλλιεργειών, σε περιορισμένο όμως αριθμό ειδών, με αιχμή κυρίως τον σολομό του ατλαντικού, την τσιπούρα και το λαβράκι (Πάσχος, 2004), όπου οι μεσογειακές χώρες συμβάλουν καθοριστικά σε αυτή την ανάπτυξη (Εικ.1)



Εικ. 1. Οι κυριότερες χώρες παραγωγής τσιπούρας (FAO Fishery Statistics, 2006)

Η εκτροφή ψαριών στην Ελλάδα άρχισε μετά το 1956 με την εκτροφή ιριδίζουσας πέστροφας. Ωστόσο, οι ιδιαίτερες κλιματολογικές συνθήκες, η γεωμορφολογία, η ποικιλία των "πηγών υδροδότησης" (ποτάμια, λίμνες, θάλασσα κ.λ.π.), η οικονομική ενίσχυση από διάφορους φορείς και η γρήγορη και επιτυχημένη,

σε πολλές περιπτώσεις, εισαγωγή τεχνολογίας και τεχνογνωσίας, συνέβαλαν στην ανάπτυξη των ελληνικών υδατοκαλλιεργειών. Τις επόμενες δεκαετίες, η ιχθυοκαλλιεργητική προσπάθεια κινήθηκε προς άλλα είδη, κυρίως λόγω του κλίματος και της εξαιρετικά μεγάλης ακτογραμμής της Ελλάδας. Έτσι, αναπτύχθηκε ο κλάδος της εκτροφής ευρύαλων ψαριών, που ζουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες, όπως η τσιπούρα (*Sparus aurata* L.) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax* L.). Η συνολική παραγωγή της χώρας από υδατοκαλλιέργειες εξελίχθηκε με γρήγορους ρυθμούς, αναδεικνύοντας τη χώρα μας στη μεγαλύτερη παραγωγό ευρύαλων ιχθύων στην Ευρώπη (Πάσχος, 2004).

A.2. Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Με την πάροδο των αιώνων οι ανθρώπινες ανάγκες άλλαξαν και η τεχνολογία εξελίχθηκε, ώστε στις μέρες μας η υδατοκαλλιέργεια να αποτελεί παγκοσμίως τον διατροφικό κλάδο που γνωρίζει τη μεγαλύτερη ανάπτυξη και έναν από τους σημαντικότερους και συγχρόνως οικονομικότερους τρόπους παραγωγής τροφίμων.

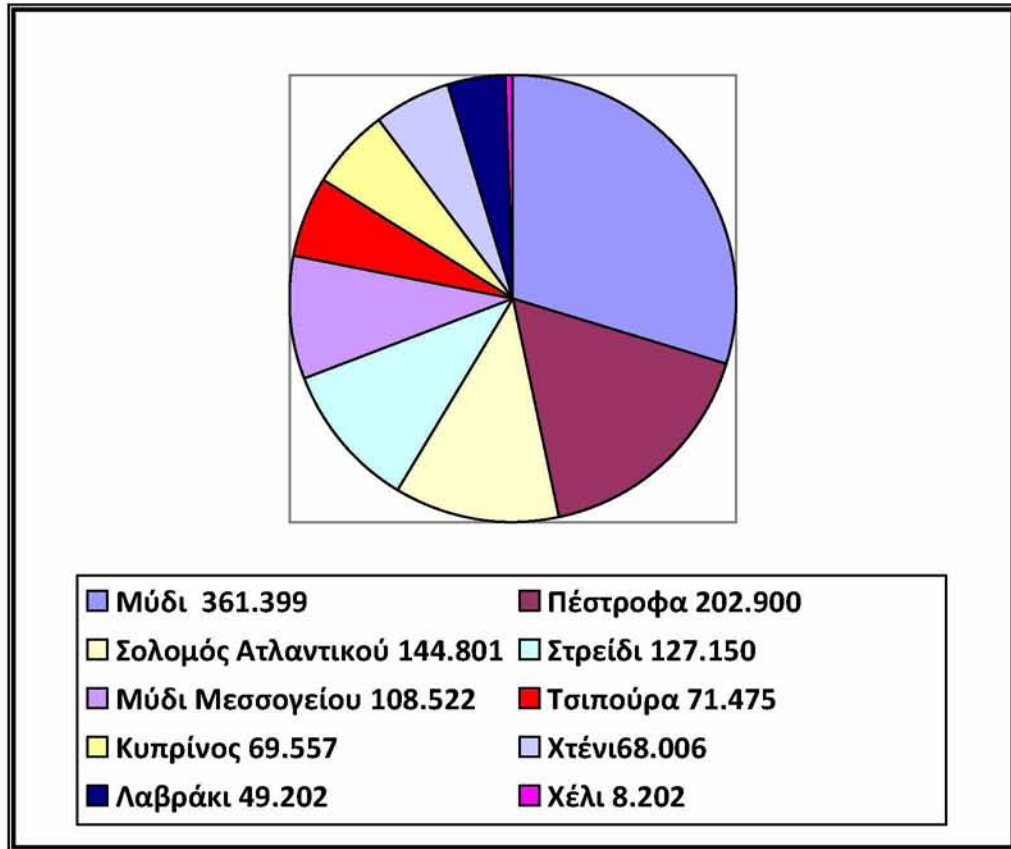
Η παγκόσμια παραγωγή το 2006 έφτασε τους 52 εκατ. τόνους (εξαιρουμένων των φυτικών προϊόντων), δηλαδή αυξήθηκε κατά 30 % από την αρχή της χιλιετίας (FAO, 2008). Η Κίνα παραμένει ο μεγαλύτερος παραγωγός παρέχοντας 34,4 εκατ. τόνους. Σήμερα, η υδατοκαλλιέργεια παρέχει το ήμισυ σχεδόν των ψαριών, των μαλακοστράκων και των μαλάκιων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση σε παγκόσμια κλίμακα. Προκαταρκτικές εκτιμήσεις για το 2007 δείχνουν ότι η παγκόσμια παραγωγή των υδατοκαλλιεργειών παρουσιάζει αύξηση κατά 7% συγκριτικά με το 2006 (FAO, 2008). Η συμβολή των υδατοκαλλιεργειών στην κάλυψη των παγκοσμίων αναγκών σε ψάρια, μαλάκια και καρκινοειδή συνεχίζει να αυξάνεται από 3,9% του συνολικού βάρους παραγωγής το 1970 σε 36% το 2006.

Η υδατοκαλλιέργεια παρέχει μια ενδιαφέρουσα ευκαιρία ανάπτυξης στην Ευρώπη, ιδιαίτερα δε για τις περιφέρειες, όπου παρατηρείται μείωση της θαλάσσιας

αλιείας. Αντιπροσωπεύει το 18,4% της συνολικής εγχώριας αλιευτικής παραγωγής και το 2% της παγκόσμιας παραγωγής υδατοκαλλιέργειας, η οποία διανύει περίοδο ραγδαίας αύξησης (Κοινή Αλιευτική Πολιτική, 2008).

Αυτή τη στιγμή όμως, η ευρωπαϊκή υδατοκαλλιέργεια δε συμμετέχει πλήρως στην ανάπτυξη που γνωρίζει ο κλάδος παγκοσμίως. Παρότι ήδη μιλούμε για μια σημαντική οικονομική δραστηριότητα, η συνολική παραγωγή του κλάδου της υδατοκαλλιέργειας στην Ευρωπαϊκή Ένωση παρουσίασε αύξηση 3-4 % μεταξύ 1995 και 1999, ενώ μεταξύ 2000 και 2006 η παραγωγή της παρέμεινε στάσιμη. Δεδομένου ότι η ζήτηση από την πλευρά των ευρωπαίων καταναλωτών για ψάρια και οστρακοειδή αυξάνεται διαρκώς, ενώ ταυτόχρονα οι εκφορτώσεις ανά είδος μειώνονται, οι εισαγωγές καλύπτουν το 60 % σχεδόν της ευρωπαϊκής κατανάλωσης.

Τα προϊόντα αλιείας και υδατοκαλλιέργειας διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ευρωπαϊκή και την παγκόσμια διατροφή ως πολύτιμη πηγή πρωτεϊνών και ως υγιεινή τροφή. Συνολικά, η κατανάλωση των προϊόντων αυτών αντιστοιχεί σε 16,1 kg/κεφαλή/έτος, σε αντίθεση με το 15,5% της λήψης ζωικών πρωτεϊνών. Σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία του FAO, τα πρώτα δέκα είδη ψαριών, που παράγονται στην υδατοκαλλιέργεια στην Ευρωπαϊκή Ένωση για το 2005, απεικονίζονται στο γράφ. 1, που ακολουθεί.



Γράφημα 1. Πρώτα δέκα είδη ψαριών που παράγονται στην υδατοκαλλιέργεια στην Ευρωπαϊκή Ένωση για το 2005 (όγκος σε τόνους)

Η Ευρώπη διαθέτει μια σειρά πλεονεκτημάτων στον τομέα της υδατοκαλλιέργειας. Είμαστε πρωτοπόροι στην τεχνολογία και την έρευνα, διαθέτουμε ισχυρή και υψηλά καταρτισμένη επιχειρηματική βάση και το κλίμα μας είναι κατάλληλο για την εκτροφή πολλών ειδών ιχθύων. Ίσως το μεγαλύτερό μας πλεονέκτημα είναι τα αυστηρά πρότυπα ποιότητας για τη διασφάλιση κατάλληλων για κατανάλωση προϊόντων, φιλικών προς το περιβάλλον, στο οποίο αναπτύσσονται και με σεβασμό απέναντι στα ίδια τα ψάρια. Ωστόσο, αυτά τα δυνατά σημεία συνοδεύονται και από προκλήσεις. Τα υψηλά πρότυπα σημαίνουν αναπόφευκτα υψηλότερο κόστος, με αποτέλεσμα οι ιχθυοκαλλιεργητές να δυσκολεύονται να αντιμετωπίσουν τον ανταγωνισμό στις αγορές της Ευρώπης, αλλά και του εξωτερικού (Κοινή Αλιευτική Πολιτική, 2008).

Για το μεσογειακό χώρο, ιδιαίτερα, πρέπει να τονιστεί η ανάγκη αύξησης της παραγωγής εξαιτίας της καθημερινώς αυξανόμενης έλλειψης ιχθυηρών, τόσο των προϊόντων των θαλάσσιων υδατοκαλλιεργειών όσο και των υφάλμυρων νερών. Ο μεσογειακός χώρος, εκτός από την σχετικά χαμηλή πρωτογενή παραγωγή του και την υπεραλίευση των φυσικών του αποθεμάτων, αποτελεί χώρο έντονης τουριστικής αξιοποίησως, που δυστυχώς συνδέεται με τη ρύπανση των παράκτιων περιοχών. Επομένως, παρόλα τα πλεονεκτήματα των υδατοκαλλιεργειών, δεν πρέπει η εφαρμογή τους να γίνεται με μοναδικό σκοπό το οικονομικό όφελος, αλλά οι διαθέσιμες γνώσεις, τα κεφάλαια και η τεχνολογία να συνεργάζονται, ώστε παράλληλα με την παραγωγή τροφίμων, να προστατεύεται και το περιβάλλον (Παπουτσόγλου, 1997).

A.3. Η ΠΑΡΟΥΣΑ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

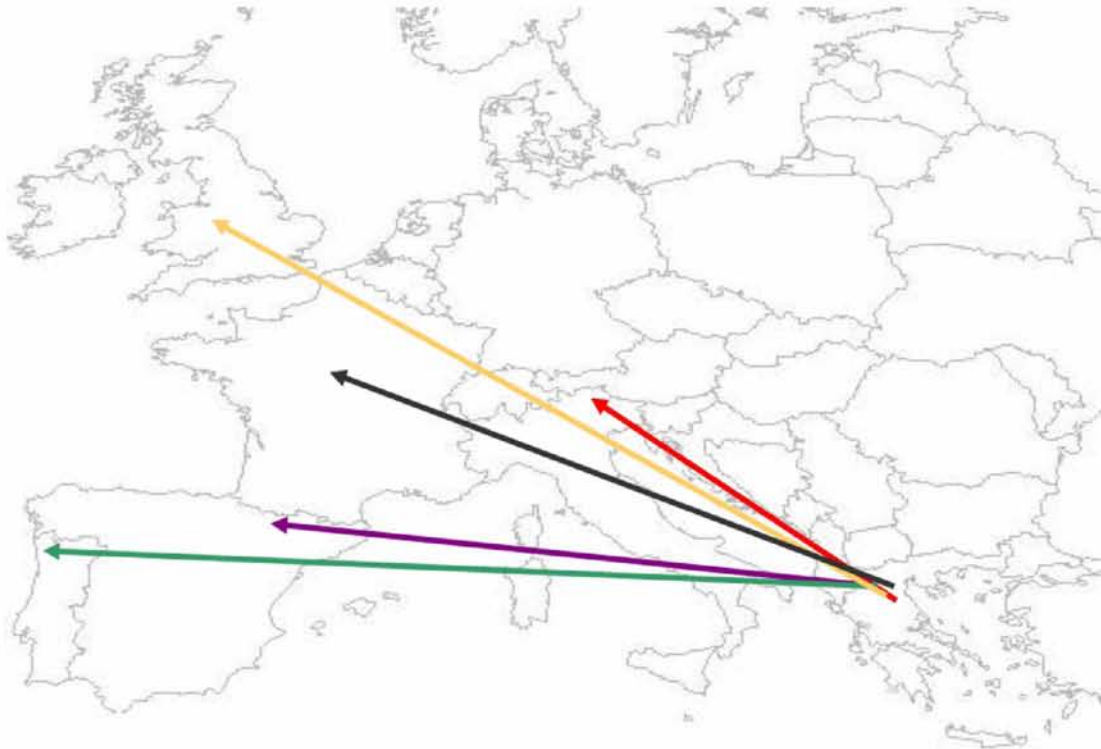
Στην Ελλάδα, κατά την τελευταία δεκαετία, παρουσιάζεται μια αύξηση στον αριθμό των ειδών των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών. Η αύξηση αυτή συνδέεται με την εκτροφή ειδών όπως κυπρίνοι, χέλια και θαλάσσια ευρύαλα ψάρια (κυρίως τσιπούρα και λαβράκι). Οι εντατικές καλλιέργειες θαλάσσιων ψαριών, όπως η τσιπούρα και το λαβράκι, αποτελούν έναν τομέα της ελληνικής οικονομίας, που αναπτύχθηκε σημαντικά τα τελευταία 15 χρόνια, αναδεικνύοντας τη χώρα μας ως τη μεγαλύτερη παραγωγό ευρύαλων ιχθύων στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ashley, 2007).

Η παραγωγή ιχθύων είχε θεαματική αύξηση στην Ελλάδα και ειδικότερα η εξέλιξη της συνολικής παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού, η οποία, σύμφωνα με τα τελευταία δημοσιευμένα στοιχεία του FAO ως το 2007, ώθησε τη χώρα μας στην μεγαλύτερη σε παραγωγή χώρα της Μεσογείου για το 2007, αγγίζοντας τους 120.000 τόνους ιχθύων (Πίνακας 1).

Χώρα	2003	2004	2005	2006	2007	%
Ελλάδα	97.000	82.000	85.000	100.000	120.000	48%
Τουρκία	27.000	31.000	38.600	46.000	64.000	26%
Ισπανία	17.000	17.700	21.100	29.100	33.000	13%
Ιταλία	16.700	17.500	17.100	18.000	18.300	7%
Γαλλία	4.800	5.600	6.200	7.800	6.200	2%
Πορτογαλία	4.000	4.000	4.000	3.000	3.000	1%
Κροατία	2.500	2.400	3.000	2.600	3.000	1%
Κύπρος	2.000	2.000	2.000	2.200	2.500	1%
Μάλτα	1.000	900	900	900	900	0%
Σύνολο	172.000	163.100	177.900	209.600	250.900	100%

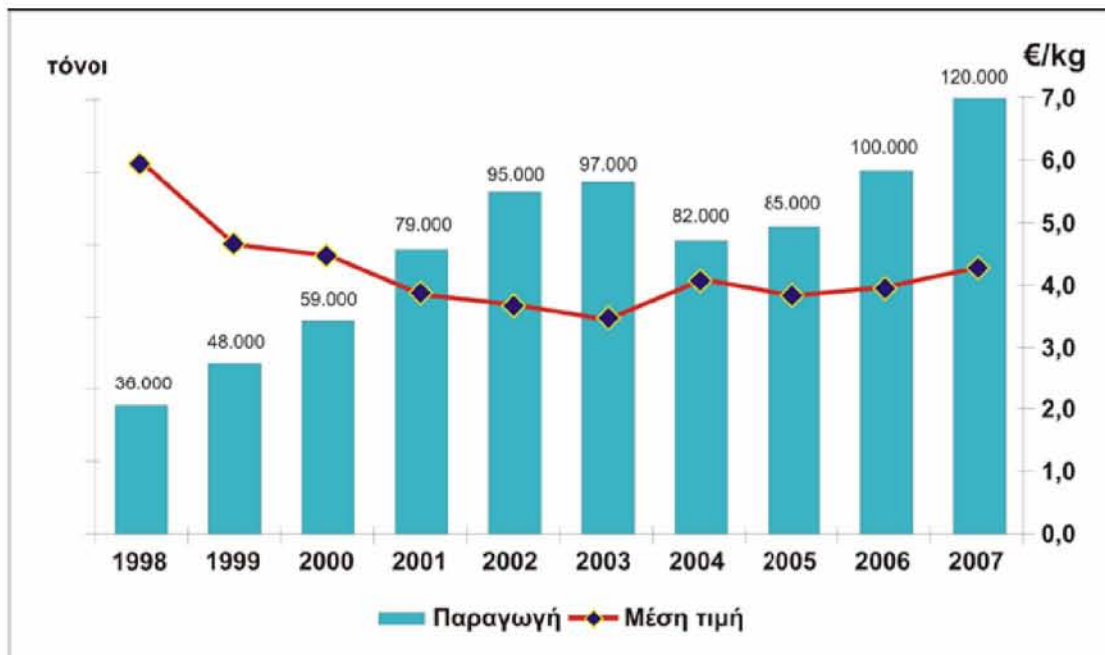
Πίνακας 1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ / ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ ΤΩΝ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΩΝ ΧΩΡΩΝ (τόνοι)
(FAO, 2008)

Ειδικότερα, όσον αφορά στην τσιπούρα και το λαβράκι, η Ελλάδα παράγει περίπου το 60% της συνολικής παραγόμενης ποσότητας των ειδών αυτών μεταξύ των Ευρωπαϊκών χωρών. Στην εσωτερική αγορά διατίθεται ένα ποσοστό που αποτελεί περίπου το 25% της συνολικής παραγωγής, ενώ τα υπόλοιπα διατίθενται σε χώρες του εξωτερικού, όπως η Ιταλία, η Αγγλία, η Γερμανία, η Γαλλία και άλλες χώρες (Εικ. 2). Αυτή η παραγωγή έχει ως αποτέλεσμα η Ελλάδα να είναι πρώτη μεταξύ των χωρών της Μεσογείου και της Ευρώπης στην παραγωγή και στην εξαγωγή θαλάσσιων ψαριών.



Εικ. 2. ΠΡΟΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ/ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ 2006
Ιταλία 33%, Αγγλία 8%, Γαλλία 10%, Ισπανία 13%, Πορτογαλία 5%, Ελλάδα 24%,
Λοιπές χώρες 7% (FAO Fishery Statistic, 2006)

Ωστόσο, με την ανάπτυξη του κλάδου αυξήθηκε και ο ανταγωνισμός, με αποτέλεσμα η αύξηση της παραγωγής να οδηγήσει σε μείωση της τιμής των ιχθύων, ωθώντας πολλές παραγωγικές μονάδες σε τιμές πώλησης χαμηλότερες του κόστους παραγωγής. Στην εικόνα 3 παρατηρείται η διακύμανση της μέσης τιμής πώλησης ανά κιλό ψαριού συγκριτικά με την παραγωγική ποσότητα σε τόνους στην Ελλάδα τα τελευταία χρόνια, γεγονός που σήμερα οδήγησε πολλές εταιρίες σε σοβαρά οικονομικά προβλήματα, καθώς και στη συγχώνευση μικρών εταιριών με μεγαλύτερες.



Εικ.3. ΕΞΕΛΙΞΗ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ & ΤΙΜΩΝ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ/ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ

(FAO Fishery Statistic, 2009)

A.4. ΜΟΡΦΕΣ-ΤΥΠΟΙ ΕΚΤΡΟΦΗΣ ΙΧΘΥΩΝ

Πολλοί τύποι υδατοκαλλιεργειών αναπτύχθηκαν στην πορεία της εξέλιξής τους. Ένας τρόπος διαχωρισμού τους είναι η παρουσίασή τους σε ζεύγη αντιθέτων: εκτατική ή εντατική, σε φυσικό περιβάλλον ή σε δεξαμενές, σε γλυκό ή θαλασσινό νερό, με συνεχή ροή ή με επανακυκλοφορία, παραδοσιακή ή σύγχρονη, κλασική ή βιολογική, προστατευμένη ή εκτεθειμένη, κτλ. Απλοποιώντας την όλη διαδικασία διακρίνουμε τρεις τύπους εκτροφής: τον εκτατικό, τον ημιεντατικό και τον εντατικό.

- 1) Ο εκτατικός τύπος εκτροφής χαρακτηρίζεται από τα πολλά είδη (πολυκαλλιέργεια), τη χαμηλή ιχθυοπυκνότητα και τη μη χορήγηση τροφής. Η ανθρώπινη παρέμβαση είναι μικρή, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις καθοριστική. Η λογική σε αυτό τον τύπο εκτροφής είναι: εμπλουτισμός – αλίευση, δηλαδή εμπλουτισμός με γόνο ή βελτίωση των φυσικών πεδίων αναπαραγωγής ή και τα δύο και κατά χρονικά διαστήματα αλίευση.

- 2) Ο ημιεντατικός τύπος εκτροφής χαρακτηρίζεται από πολλά είδη ψαριών, σχετικά χαμηλή ιχθυοπυκνότητα, περιορισμένη χορήγηση τροφής και υποδομή μικρής κλίμακας. Ο τύπος αυτός εκτροφής εφαρμόζεται σε μικρές τεχνητές λίμνες.
- 3) Ο εντατικός τύπος εκτροφής χαρακτηρίζεται από υψηλή ιχθυοπυκνότητα, υποχρεωτική χορήγηση τροφής, λίγα ή ένα είδος ψαριού (μονοκαλλιέργεια), πλήρης και ελεγχόμενη υποδομή (λεκάνες εκτροφής, δεξαμενές εκκολαπτηρίου, τμήματα υποστήριξης της παραγωγής) (Πάσχος, 2004).

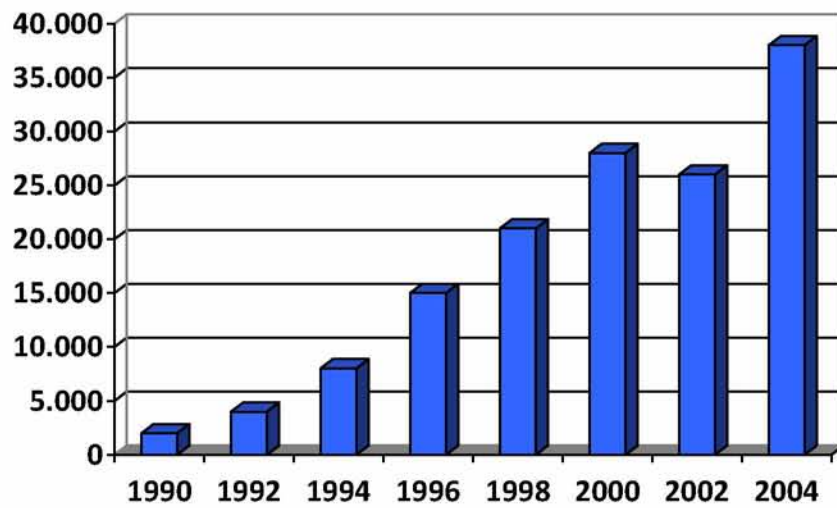
A.5. Η ΕΝΤΑΤΙΚΗ ΘΑΛΑΣΣΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Τη δεκαετία του 1960 κάνει την εμφάνισή της στην Ιαπωνία μια σημαντική καινοτομία στον τομέα των ιχθυοκαλλιεργειών: ο πλωτός κλωβός (Εικ. 4). Τα ψάρια διατηρούνται αιχμάλωτα μέσα σε ένα μεγάλο δίκτυο. Οι κλωβοί φτάνουν στην Ευρώπη, ιδίως στη Νορβηγία και στη Σκωτία, στα τέλη της δεκαετίας του 1960, για την εκτροφή ενός νέου είδους, του σολομού του Ατλαντικού.

Οι μεσογειακές χώρες μελετούν και αναπτύσσουν την ιχθυογονία του λαβρακιού και της τσιπούρας. Στο γράφημα 2, που ακολουθεί, παρατηρείται η εξέλιξη της συνολικής παραγωγής τσιπούρας στην Ελλάδα, σύμφωνα με τα τελευταία δημοσιευμένα στοιχεία του FAO. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1990, η εκτροφή των εν λόγω ειδών επεκτείνεται σε ολόκληρη τη Μεσόγειο και στα Κανάρια νησιά. Ο σολομός, το λαβράκι και η τσιπούρα εξακολουθούν να είναι μέχρι σήμερα τα κυριότερα προϊόντα της ευρωπαϊκής θαλασσοκαλλιέργειας με ποιοτική διαφοροποίηση, που ανταποκρίνεται στον κατακερματισμό της αγοράς.



Εικ.4. Πλωτοί ιχθυοκλωβοί



Γράφημα 2. Εξέλιξη της συνολικής παραγωγής της τσιπούρας στην Ελλάδα (1990-2004).

B. Η ΤΣΙΠΟΥΡΑ

Η τσιπούρα είναι είδος της Μεσογείου και ένα από τα δυο κυριότερα εκτρεφόμενα είδη στις μεσογειακές και ελληνικές θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες. Αποτελεί από παλιά αντικείμενο παραδοσιακής εκτατικής εκτροφής σε παράκτιες λιμνοθάλασσες και υφάλμυρες υδάτινες λεκάνες. Η τεχνητή αναπαραγωγή της τσιπούρας κατέστη δυνατή μόλις τη δεκαετία του 1980, γεγονός που είχε ως συνέπεια να αναπτυχθούν ακολούθως συστήματα εντατικής εκτροφής, κυρίως εντός κλωβών στη θάλασσα. Συνεπώς, η τσιπούρα εξελίχθηκε σε ένα από τα βασικά ψάρια που εκτρέφονται στο πλαίσιο της ευρωπαϊκής ιχθυοκαλλιέργειας.

B.1. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ

Φύλο: Χορδωτά

Υπόφυλο: Σπονδυλόζωα

Ομοταξία: Οστειχθύες

Υφομοταξία: Ακτινοπτερύγιοι

Υπερτάξη: Τελεόστεοι

Τάξη: Περκόμορφοι

Υπόταξη: Περκοειδείς

Οικογένεια: *Sparidae*

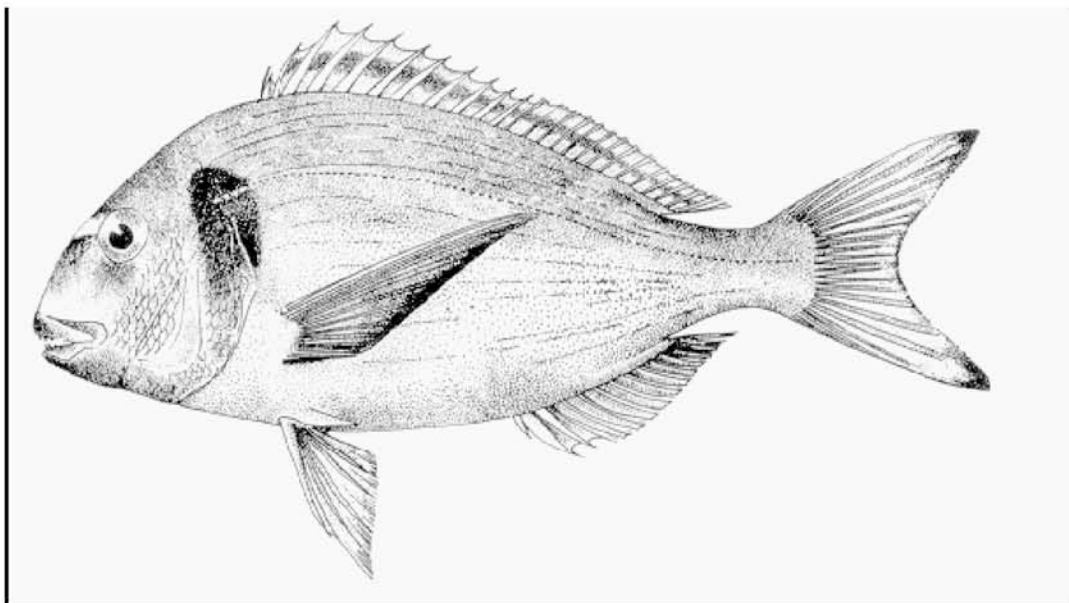
Γένος: *Sparus*

Είδος: *S. aurata* (Linnaeus, 1758)

B.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η τσιπούρα είναι ένα ψάρι με ένα χαρακτηριστικό ασημογάλαζο χρώμα στην κορυφή της ράχης της, και ασημί, γαλάζιες γκρι αποχρώσεις στα πλευρά. Το σώμα του έχει ατρακτοειδές, ελαφρώς ωοειδές σχήμα και έχει μία μαύρη κηλίδα στο κάλυμμα των βραγχίων, στην αρχή της πλευρικής γραμμής (Εικ. 5). Επίσης,

εμφανίζει έναν χρυσοκίτρινο χρωματισμό ανάμεσα στους οφθαλμούς. Τέλος, έχει μαύρες ζωνώσεις στην άκρη της ουράς. Το σώμα του είναι στενόμακρο, παχύ και συμπιεσμένο πλευρικά. Διαθέτει ουραίο, ένα ενιαίο ραχιαίο και ένα εδρικό πτερύγιο. Το κεφάλι του είναι μεγάλο με απότομο, κοντό ρύγχος, που εκτείνεται ως το ύψος του μέσου των οφθαλμών. Το στόμα είναι μικρό με 6 κυνόδοντες και, στην κάτω γνάθο του διαθέτει πολλά μικρά στρογγυλεμένα δόντια σε 5-6 σειρές, τα οποία χρησιμεύουν για να συνθλίβει την τροφή του (οστρακόδερμα).



Εικ.5. Εξωτερική μορφολογία της τσιπούρας (Schneider, W., 1990)

B.3. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ

Είναι κατεξοχήν ευρύαλο και ευρύθερμο είδος, δηλαδή χαρακτηρίζεται από την ικανότητα να ζει σε περιβάλλον με διαφορετικές αλατότητες και θερμοκρασίες. Κυρίως ζει σε υποτροπικά κλίματα. Συχνάζει σε αμμουδερούς και βραχώδεις βυθούς, σε παράκτια νερά, λιμνοθάλασσες και εκβολές ποταμών. Φυσικοί πληθυσμοί της τσιπούρας συναντώνται στη Μεσόγειο Θάλασσα, κατά μήκος των ανατολικών ατλαντικών ακτών από τη Μεγάλη Βρετανία στη Σενεγάλη (Fisher et al., 1987) και, πιο σπάνια, στη Μαύρη Θάλασσα (Sola et al., 2006). Αντιπρόσωποι του είδους

βρίσκονται και γύρω από τα Κανάρια Νησιά. Απαντάται σε βάθη από 1-30 μέτρα, ενώ ενήλικα έχουν βρεθεί σε βάθη ως και 150 μέτρα (Fisher et al., 1987).

B.4. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ

Η τσιπούρα στο φυσικό περιβάλλον ζει απομονωμένη ή σε μικρές συναθροίσεις. Πρόκειται για κυρίως στατικό ψάρι το οποίο, ωστόσο, μεταναστεύει χαρακτηριστικά την άνοιξη προς τις υφάλμυρες παράκτιες λιμνοθάλασσες για αναζήτηση τροφής και πιο ήπιες θερμοκρασίες (τροφική μετανάστευση). Στο τέλος του φθινοπώρου όμως, επιστρέφει στην ανοιχτή θάλασσα για να αναπαραχθεί, εξαιτίας της ευαισθησίας που παρουσιάζει σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Αποτελεί σαρκοφάγο ψάρι που τρέφεται στις μικρές ηλικίες, κυρίως με μικρού μεγέθους καρκινοειδή, ενώ στις μεγαλύτερες ηλικίες με μύδια, γαστερόποδα και καρκινοειδή (Sola et al., 2006). Ευκαιριακά μπορεί να είναι και φυτοφάγο (Bauchot and Hureau, 1990).

B.5. ΕΚΤΡΟΦΗ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ

I. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Η τσιπούρα χαρακτηρίζεται από πρώτανδρο ερμαφροδιτισμό. Η αναστροφή του είδους λαμβάνει χώρα μετά το δεύτερο έτος ηλικίας και σε μέσα βάρη μεγαλύτερα των 500-700 γραμμαρίων. Αυτό που έχει παρατηρηθεί ωστόσο, όταν τα ψάρια κρατούνται σε αιχμαλωσία, είναι ότι επικρατεί κάποια κοινωνική ισορροπία, κατά την οποία διατηρείται μια σταθερή αναλογία αρσενικών προς θηλυκά στην ίδια ομάδα ψαριών και πέρα από την οποία σταματά η εναλλαγή του φύλου. Έτσι, σε κοινωνίες που έχουν παραμείνει αδιατάραχτες, μπορεί να βρεθούν αρσενικά ψάρια με μεγάλα σωματικά βάρη (Rondriguez, 1994). Πρόσφατα σχετικά αποτελέσματα εργασιών υποδηλώνουν την ύπαρξη μιας ενδοκρινικής απάντησης σε κοινωνικο-φυλετικά

ερεθίσματα κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής διεργασίας στην τσιπούρα (Meiri, 2002).

Στη Μεσόγειο η αναπαραγωγή της τσιπούρας λαμβάνει χώρα από το τέλος Οκτωβρίου - Δεκέμβριο έως Μάρτιο στους 13-17°C, ενώ στον Ατλαντικό από Ιανουάριο έως Απρίλιο (Rondrizez, 1994). Το είδος κατά την περίοδο ωοτοκίας μετοικίζει μαζικά από τα υφάλμυρα νερά προς τα βαθύτερα νερά της θάλασσας (Παπουτσόγλου, 1994), δεν υπάρχουν όμως στοιχεία για τις ακριβείς περιοχές αναπαραγωγής του.

Η ωρίμανση των γονάδων των ψαριών και η αναπαραγωγική τους συμπεριφορά είναι αντιδράσεις σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως η θερμοκρασία και η διάρκεια της ημέρας (Barnabe, 1994), συνεπώς είναι δυνατό με τον κατάλληλο χειρισμό αυτών των αβιοτικών παραγόντων να επιτευχθεί παραγωγή αυγών καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου (Zohar et al., 1995). Αυτό εκμεταλλεύονται σήμερα οι μονάδες εκτροφής της τσιπούρας.

Στο τμήμα γεννητόρων, κάτω από απόλυτα ελεγχόμενες συνθήκες, τα ψάρια γεννούν τα αβγά (γεννήτορες ή μάνες) μέσα σε ειδικές δεξαμενές. Η αναλογία θηλυκών-αρσενικών στις δεξαμενές ωοτοκίας ισούται με 2/3. Αν όμως κάποια δεξαμενή έχει έλλειψη σε αρσενικά, απομακρύνονται όλα τα αρσενικά από τη δεξαμενή και τότε γίνεται η αντίστροφη μετατροπή. Τα ψάρια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αυγών στις ιχθυοκαλλιέργειες μπορεί να προέρχονται από τη φύση, ή από γόνο που έχει παραχθεί και εκτραφεί εντατικά. Τα τελευταία χρόνια κυριαρχεί η χρήση ψαριών, που υφίστανται επιλογή με σημαντικά κριτήρια τη γρήγορη αύξηση και την ανθεκτικότητα στις ασθένειες.

Για την τσιπούρα γνωρίζουμε ότι η ωοτοκία, στις άγριες περιοχές, λαμβάνει χώρα στα βαθύτερα νερά της θάλασσας (Παπουτσόγλου, 1994), όπου μετοικίζουν τα ενήλικα άτομα το χειμώνα, όμως παρατηρείται ότι τα νεαρά στάδια ανιχνεύονται σε λιμνοθάλασσες ή παράκτιες περιοχές, όπου οι αλατότητες κυμαίνονται από 7,1-

38ppm (Mosconi, 1990). Ωστόσο, στις υδατοκαλλιέργειες ρυθμίζονται και αναπαράγονται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους κάτω από ελεγχόμενες μεθόδους (αλλαγές στη συγκεκριμένη πυκνότητα του ύδατος, της θερμοκρασίας και της περιόδου φωτός). Η ωτοκία κάθε πληθυσμού διαρκεί περίπου 3-4 μήνες και κατά την περίοδο αυτή μπορούν να παραχθούν 20.000-30.000 αυγά ανά κιλό βάρους θηλυκού ημερησίως (Zohar, 1995).

Τα αυγά επιπλέουν στην επιφάνεια των δεξαμενών ωτοκίας και συλλέγονται βάσει αυτής της ιδιότητας. Συλλέγονται από τον ωοσυλλέκτη, επιλέγονται τα καλύτερα σε ποιότητα, καταμετράται ο αριθμός και το βάρος τους και μεταφέρονται στη μονάδα επώασης, όπου εκκολάπτονται 48 ώρες αργότερα.

Η μονάδα επώασης αποτελείται από μια δεξαμενή που τροφοδοτείται με νερό και συνεχή οξυγόνωση (>80%) του ύδατος. Οι συνθήκες επώασης πρέπει να διατηρούνται σταθερές. Συγκεκριμένα, οξυγόνωση 8 mg/L, θερμοκρασία 16,3-16,7οC, αλατότητα 35 psu, φυσική φωτοπερίοδος, διαυγές νερό, PH 7-8. Η άριστη πυκνότητα είναι 103-104 αυγά/L και η συνήθης θνησιμότητα 16.2-25%. Όταν η πυκνότητα ανέβει από 20.000 στις 30.000 αυγά/L, η θνησιμότητα αυξάνεται σημαντικά.

Την επώαση ακολουθεί μεταφορά των προνυμφών σε δεξαμενή. Διεξάγονται καθημερινοί έλεγχοι μέχρι την εμφάνιση του στόματος, το οποίο σηματοδοτεί την έναρξη παροχής ζωντανής τροφής. Τότε ξεκινά το νυμφικό στάδιο. Οι νύμφες κατανέμονται σε δεξαμενές ανάλογα με την ηλικία και τον αριθμό τους. Το νυμφικό στάδιο τελειώνει και η τροφή των ιχθυδίων γίνεται αδρανής βιομηχανοποιημένη. Η επιβίωση των προνυμφών στις καλλιέργειες φτάνει στο 80%, ενώ στο φυσικό περιβάλλον δεν ξεπερνά το 5%. Το λαρβικό στάδιο διαρκεί περίπου 50 ημέρες στη θερμοκρασία 17 με 18° C.

II. ΠΡΟΠΑΧΥΝΣΗ

Τα ιχθύδια μεταφέρονται από τις δεξαμενές εκκόλαψης, όπου βρίσκονται κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, στις δεξαμενές προπάχυνσης, όπου οι συνθήκες είναι φυσικές. Το στάδιο προπάχυνσης διαρκεί τόσο όσο είναι απαραίτητο, ώστε να εξασφαλιστεί η επιβίωση των ευαίσθητων οργανισμών του εκκολαπτηρίου. Η μεταφορά γίνεται όταν τα ιχθύδια έχουν ηλικία 60-70 ημερών και μέσο βάρος 0,4-0,5 g. Η ιχθυοπυκνότητα στη δεξαμενή προπάχυνσης αρχικά είναι 2 Kg/m³, ενώ στο τέλος της προπάχυνσης φτάνει τα 10 Kg/m³. Η τροφή σε αυτό το στάδιο είναι τεχνητή με μεγάλη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και δίδεται υπό ξηρά μορφή με αυτόματες ταιίστρες ή με το χέρι. Ο έλεγχος είναι καθημερινός, σε δείγμα 100 ιχθυδίων για κάθε δεξαμενή, και γίνεται με αιματολογικές εξετάσεις και ακτινογραφίες-Χ για διαπίστωση σκελετικών ανωμαλιών. Ακόμη, πραγματοποιείται έλεγχος για τυχόν κανιβαλισμούς και για σκελετικές ανωμαλίες. Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι η επιβίωση σε αυτό το πρώτο στάδιο εκτροφής των ιχθυδίων να φτάνει το 85-90% του αρχικού αριθμού των ιχθυδίων, που μεταφέρθηκαν στις δεξαμενές προπάχυνσης. Σε ηλικία 120-149 ημερών τα ιχθύδια με μέσο βάρος 1.5-2 g μεταφέρονται στις μονάδες πάχυνσης.

III. ΠΑΧΥΝΣΗ

Η πάχυνση είναι το δεύτερο στάδιο εκτροφής ιχθυδίων. Στις μονάδες πάχυνσης μεταφέρονται τα ιχθύδια από τους ιχθυογεννητικούς σταθμούς. Η τελική προετοιμασία του γόνου, μέχρι να μεταφερθεί στους πλωτούς ιχθυοκλωβούς για την τελική πάχυνσή του σε έτοιμο ψάρι, γίνεται σε μεγάλες δεξαμενές πάχυνσης. Η ιχθυοπυκνότητα είναι γύρω στα 15 Kg/m³. Στις μονάδες πάχυνσης εκτρέφονται μέχρι να φτάσουν στο εμπορεύσιμο μέγεθος των 350-400 g. Οι ιχθυοτροφές, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των ψαριών, παρασκευάζονται από ιχθυάλευρα και έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και βιταμίνες. Ο συνολικά απαιτούμενος χρόνος για να φτάσουν τα ψάρια σε εμπορεύσιμο μέγεθος είναι 16-20

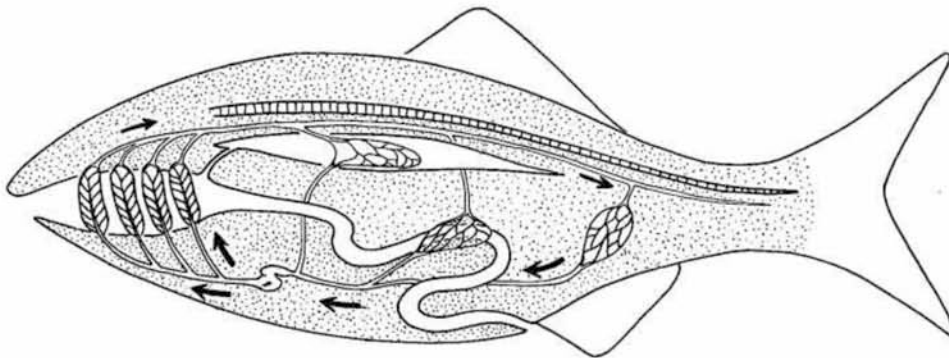
μήνες μέσα στις μονάδες πάχυνσης. Στο διάστημα αυτό ελέγχονται σε καθημερινή βάση όλες οι περιβαλλοντικές παράμετροι που επηρεάζουν την υγιή ανάπτυξή τους (www.fishbase.org).

Γ. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ

Γ.1. ΤΟ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Στους τελεόστεους ιχθύες, συνεπώς και στην τσιπούρα, το κυκλοφορικό σύστημα αποτελείται, όπως και σε όλα τα υπόλοιπα σπονδυλωτά, από τον υγρό αιματικό ιστό και από ένα αγγειακό σύστημα, μέσω του οποίου μεταφέρεται το αίμα. Το καρδιαγγειακό σύστημα αποτελείται από την καρδιά, η οποία λειτουργεί ως αντλία και βρίσκεται σε επικοινωνία με τις αρτηρίες, τις φλέβες και τα τριχοειδή αγγεία. Η καρδιά βρίσκεται στην περικαρδιακή κοιλότητα, κοιλιακά και οπισθίως των βραγχίων. Είναι δίχωρη, αποτελείται δηλαδή από έναν κόλπο και μία κοιλία, περιλαμβάνει όμως ακόμη τον φλεβώδη κόλπο και τον αρτηριακό κώνο (Fox, 2000).

Η κυκλοφορία του αίματος, στους τελεόστεους ιχθύες είναι απλή. Το μη οξυγονωμένο αίμα αντλείται από την καρδιά και προωθείται, μέσω της κοιλιακής αορτής, στα βράγχια, όπου γίνεται η οξυγόνωση του, και διανέμεται στο υπόλοιπο σώμα, πριν επιστρέψει και πάλι στην καρδιά (Εικ. 6).



Εικ. 6. Η κυκλοφορία του αίματος στους τελεόστεους ιχθύες.

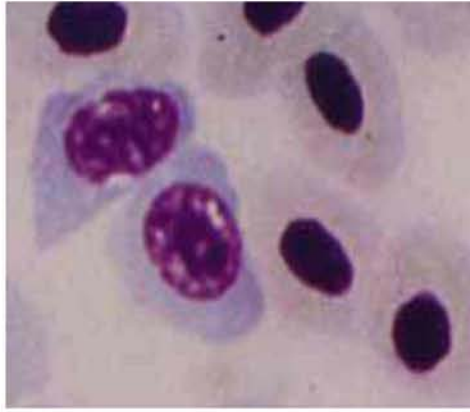
Με την κυκλοφορία του αίματος εξυπηρετούνται μια σειρά από σημαντικές λειτουργίες του οργανισμού. Με το πλάσμα μεταφέρονται θρεπτικά συστατικά από τον πεπτικό σωλήνα στους ιστούς και προς τα όργανα αποθήκευσης (π.χ. ήπαρ), βασικά χημικά συστατικά, διαλυμένα αέρια (οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα), υποπροϊόντα του μεταβολισμού, όπως γαλακτικό οξύ από τους μυς στο ήπαρ, και

χημικές ρυθμιστικές ουσίες. Τα κυτταρικά στοιχεία χρησιμεύουν στη μεταφορά του οξυγόνου και συμμετέχουν στην χυμική και κυτταρική ανοσία.

Γ.2. ΤΟ ΑΙΜΑ

Στους τελεόστεους ιχθύες ο όγκος του αίματος αντιστοιχεί περίπου στο 3-4% του σωματικού τους βάρους, αντίθετα με τους ελασμοβράγχιους ιχθύες και τα άλλα σπονδυλωτά, όπου το ποσοστό αυτό κυμαίνεται στο 5-8% (Ferguson, 2006). Το αίμα των ψαριών περιλαμβάνει το πλάσμα και τα κύτταρα του αίματος. Στην τσιπούρα, η οποία ακολουθεί το αιματολογικό πρότυπο των σπονδυλωτών οργανισμών, οι τύποι κυττάρων που απαντώνται στο αίμα της είναι τα ανώριμα ερυθροκύτταρα, τα ώριμα ερυθροκύτταρα, τα θρομβοκύτταρα, τα ετερόφιλα (ουδετερόφιλα) και τα οξεόφιλα (εωσινόφιλα) κοκκιοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, τα πλασμοκύτταρα και τα μονοκύτταρα-μακροφάγα (Lopez-Ruiz et al., 1992).

Τα **ερυθροκύτταρα** είναι τα πλέον πολυάριθμα κύτταρα στο αίμα των ιχθύων και αποτελούν τον πιο ευδιάκριτο τύπο κυττάρων. Περιέχουν αιμοσφαιρίνη και συμμετέχουν κυρίως στη μεταφορά οξυγόνου από τα βράγχια στους ιστούς και του διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς προς την καρδιά και τα βράγχια (Groman, 1982). Τα ώριμα ερυθροκύτταρα αποτελούν ατρακτοειδή κύτταρα και φέρουν έναν ωοειδή κεντρικό πυρήνα, που χρωματίζεται έντονα πορφυρός, ενώ το κυτταρόπλασμα τους χρωματίζεται κυανό-γκρι με χρώση Giemsa. Επίσης, σε αίμα τσιπούρας έχουν εντοπιστεί και οξεόφιλοι ερυθροβλάστες (άωρης μορφής κύτταρα), οι οποίοι έχουν οβάλ σχήμα. Πρόκειται για κύτταρα με μεγάλο πυρήνα, ο οποίος περιέχει κόκκινη χρωματίνη με τη μορφή συσπειρώσεων και περιβάλλεται από κυτταρόπλασμα, το οποίο χρωματίζεται γαλάζιο με χρώση Giemsa.(Εικ. 7) (Lopez-Ruiz et al., 1992).



Εικ. 7. Οξεόφιλοι ερυθροβλάστες και ώριμα ερυθροκύτταρα (Lopez-Ruiz et al., 1992).

Με την μικροσκοπική παρατήρηση, με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, τα ερυθροκύτταρα του αίματος της τσιπούρας χαρακτηρίζονται από μια ομαλή κυτταρική επιφάνεια, παρόμοια με αυτές που παρατηρήθηκαν σε άλλα τελεόστεα (Esteban et al., 1989). Ωστόσο, σε συγκριτική μελέτη μεταξύ διαφόρων ειδών ψαριών της οικογένειας *Sparidae*, που εκτρέφονται στη Μεσόγειο, διαπιστώθηκε πως στο αίμα της τσιπούρας συναντώνται τα μικρότερα σε διάμετρο ερυθροκύτταρα (Pavlidis et al., 2007).

Όσον αφορά στην ποσοτική ανάλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αυτή πραγματοποιείται με την αρίθμηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και τη μέτρηση της ποσότητας της αιμοσφαιρίνης. Ο όγκος και το περιεχόμενο των ερυθρών αιμοσφαιρίων εκτιμούνται κυρίως με τους ερυθροκυτταρικούς δείκτες, οι οποίοι είναι: ο μέσος όγκος ερυθροκυττάρων (MCV), η μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ανά ερυθροκύτταρο (MCHC), η μέση περιεκτικότητα των ερυθροκυττάρων σε αιμοσφαιρίνη (MCH).

Μείωση του αριθμού των ερυθροκυττάρων, της ποσότητας της αιμοσφαιρίνης ή της τιμής του αιματοκρίτη οδηγεί στο συμπέρασμα της ύπαρξης αναιμίας. Η αναιμία με τη σειρά της αποτελεί ένδειξη νόσου στον οργανισμό. Μπορεί να οφείλεται σε αιμορραγία, αιμόλυση ή υποπλασία. Η αιμορραγική αναιμία αποτελεί συνήθως επακόλουθο τραύματος, ειδικά των βραγχίων. Τα εξωπαράσιτα μπορούν επίσης να προκαλέσουν αναιμία, το ίδιο και μερικά βακτήρια ή ιοί, τα οποία καταστρέφουν το

αγγειακό ενδοθήλιο. Ακόμη, δερματικά έλκη, οφειλόμενα σε βακτήρια, μπορούν να προκαλέσουν αναιμία από αιμορραγία (Ferguson, 2006).

Επιπροσθέτως, οι απαιτήσεις των ψαριών σε οξυγόνο ποικίλουν ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης και τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Συνεπώς, ο αριθμός των ερυθροκυττάρων μεταβάλλεται σαν αποτέλεσμα του ενεργειακού κόστους παραγωγής των ερυθρών κυττάρων και της κυκλοφορίας αίματος στους ιστούς. Εξάλλου, τοξικά αίτια μπορεί να οφείλονται για την ύπαρξη αιμολυτικής αναιμίας, όπως συμβαίνει τακτικά από ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως απολυμαντικά. Αξίζει να σημειωθεί πως η ύπαρξη χλωρίου στο νερό προκαλεί την καταστροφή των ερυθροκυττάρων ως αποτέλεσμα της διακοπής βασικών μεταβολικών οδών (Ferguson, 2006).

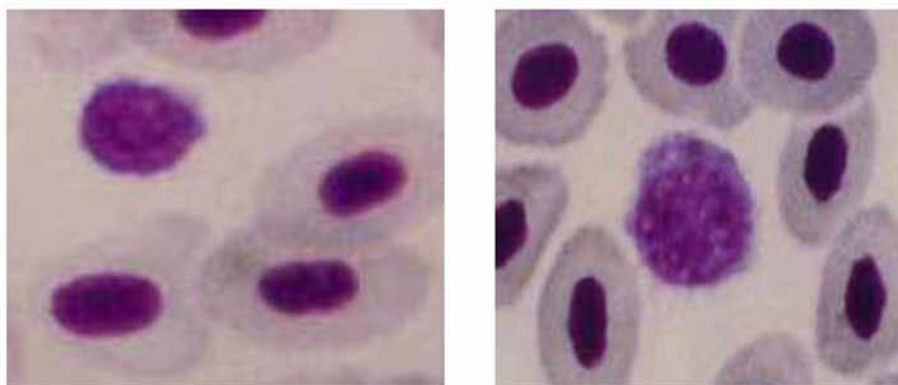
Τα **λευκά αιμοσφαίρια** των ψαριών είναι λιγότερο άφθονα συγκριτικά με τα ερυθρά και λειτουργούν με ποικίλους τρόπους προκειμένου να απαλλάξουν το αίμα από διάφορους βλαπτικούς παράγοντες. Μετρήσεις των μεταβολών του συνολικού αριθμού των λευκοκυττάρων ή των ποσοστών των διαφόρων τύπων των κυττάρων αυτών οδηγούν συχνά στην αντίληψη μιας παθολογικής κατάστασης.

Ασθενείς οργανισμοί παράγουν λευκοκύτταρα για τη σύνθεση αντισωμάτων κατά την καταπολέμηση μιας νόσου ή την αντιμετώπιση βακτηρίων. Ακόμη, ιογενείς μολύνσεις, συχνά, προκαλούν λευκοπενία λόγω καταστροφής των αιμοποιητικών οργάνων. Οι αντιδράσεις των λευκοκυττάρων σε παρασιτώσεις είναι ευμετάβλητες. Ωστόσο, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός της μεταβολής του αριθμού των λευκοκυττάρων, καθώς αποτελούν έναν πολύ ευαίσθητο δείκτη στρες στα ψάρια. Συγκεκριμένα, ενώ η απόκριση του οργανισμού σε περιβαλλοντικές επιδράσεις ποικίλει ανάλογα με τον τύπο και την ένταση της καταπόνησης, πολύ συχνή είναι η παρατήρηση λευκοπενίας, η οποία είναι συνδεδεμένη με τη λεμφοπενία και, σε ορισμένες περιπτώσεις, με την ουδετεροφιλία. Λευκοπενία, οφειλόμενη σε στρες,

επηρεάζεται από παράγοντες, όπως η υψηλή θερμοκρασία, το θερμικό σοκ, ο συνωστισμός, η μεταφορά, ο τοκετός και οι τοξικές ουσίες (Ferguson, 2006).

Υπάρχουν αρκετοί τύποι λευκοκυττάρων, οι οποίοι συναντώνται στο αίμα των ιχθύων και επιτελούν διάφορες λειτουργίες. Οι κύριοι τύποι λευκοκυττάρων είναι τα λεμφοκύτταρα, τα θρομβοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα.

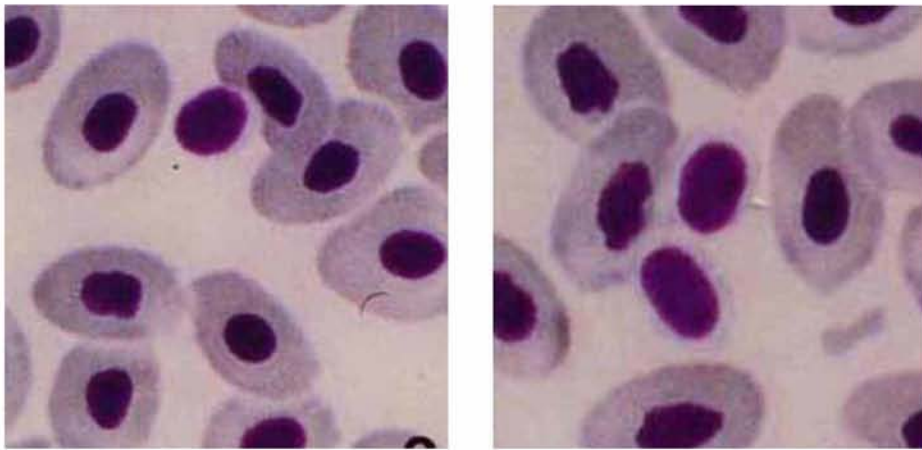
Τα **λεμφοκύτταρα** μπορεί να ποικίλουν σε μέγεθος μεταξύ των ειδών των ιχθύων, η μορφολογία τους όμως είναι περισσότερο σταθερή. Πρόκειται για μικρά σφαιρικά κύτταρα, τα οποία διαθέτουν έναν μεγάλο, σφαιρικό, έκκεντρο πυρήνα και ένα ελάχιστο, σε σχήμα λεπτού δακτυλίου, γύρω από τον πυρήνα, κυτταρόπλασμα (Εικ. 8, 9). Η παρουσία μικρού μεγέθους λεμφοκυττάρων ερμηνεύεται ως το προχωρημένο στάδιο ωριμότητας των κυττάρων αυτών (Blaxhall και Daisley, 1973, Ellis, 1977, Barber et al., 1981). Τα λεμφοκύτταρα μπορούν να μεταναστεύουν μέσω του επιθηλίου και του συνδετικού ιστού και δρύνε στα πλαίσια της χυμικής και της κυτταρικής ανοσίας (Groman, 1982).



Εικ.8, 9. Μικρό και μεγάλο λεμφοκύτταρο σε επίχρισμα αίματος ψαριού με χρώση Giemsa (Lopez-Ruiz et al., 1992).

Τα **θρομβοκύτταρα** αποτελούν τα πιο ευδιάκριτα κύτταρα αίματος στο αίμα των ιχθύων, μετά από τα ερυθροκύτταρα, και πιστεύεται ότι συμβάλλουν στη διαδικασία της πήξης του αίματος (Doggett and Harris, 1989), βοηθώντας στη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη (Groman, 1982). Εμφανίζονται είτε ως

μεμονωμένα κύτταρα είτε σε συναθροίσεις. Στην τσιπούρα έχουν παρατηρηθεί τρεις μορφές θρομβοκυττάρων: στρογγυλά, επιμήκη και ατρακτοειδή. Τα θρομβοκύτταρα διαθέτουν έναν μεγάλο κεντρικό και έντονα χρωματισμένο πυρήνα, που φέρει χρωματίνη, και περιβάλλεται από κυτταρόπλασμα. Το κυτταρόπλασμά τους δεν βάφεται με χρώση Giemsa και έχει τη μορφή φωτοστέφανου γύρω από τον πυρήνα (Εικ. 10, 11) (Pavlidis et al., 2007). Κατά την παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, τα θρομβοκύτταρα στο αίμα της τσιπούρας εμφανίζουν σχετικά τραχιά επιφάνεια, παρόμοια με κρατήρα, εικόνα ανάλογη εκείνης των ανθρωπίνων αιμοπεταλίων (Hattori et al., 1969).



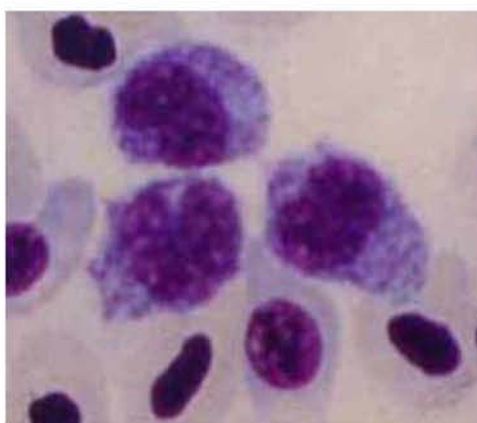
Εικ. 10,11. Θρομβοκύτταρα σε στρογγυλό και σε οβάλ σχήμα σε επίχρισμα αίματος ψαριού με χρώση Giemsa (Lopez-Ruiz et al., 1992).

Τα **μονοκύτταρα ή μακροφάγα** κύτταρα του αίματος αποτελούν, συνήθως, ένα μικρό ποσοστό του πληθυσμού των λευκοκυττάρων. Αποτελούν σφαιρικά κύτταρα, που διαθέτουν ευρείες κυτταρικές αποφύσεις. Ο πυρήνας τους είναι μεγάλος, με σχήμα νεφρού, και το κυτταρόπλασμα τους, το οποίο χρωματίζεται κυανό με χρώση Giemsa, δίνει στα κύτταρα ένα ασύμμετρο περίγραμμα (Εικ. 12) (Pavlidis et al., 2007).

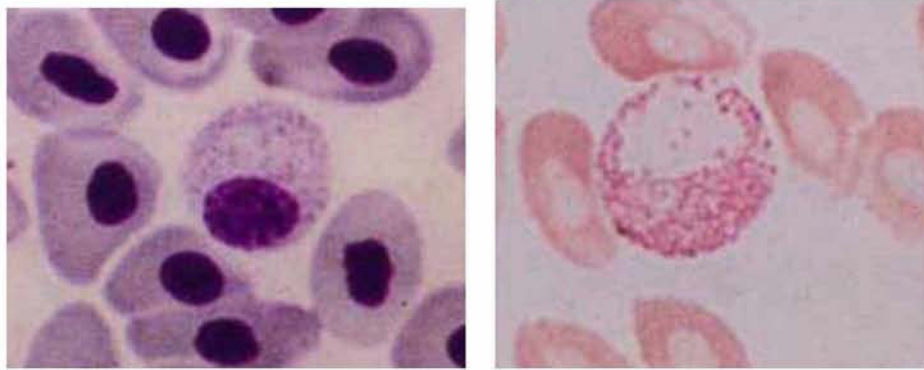


Εικ. 12. Μονοκύτταρο-μακροφάγο σε επίχρισμα αίματος ψαριού με χρώση Giemsa (Lopez-Ruiz et al., 1992).

Τα **κοκκιοκύτταρα** είναι λευκοκύτταρα με εμφανείς κυτταροπλασματικούς κόκκους. Ανάλογα με τις χρωστικές που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία των κυττάρων, διακρίνονται τρεις κυρίως τύποι κοκκιοκυττάρων: τα εωσινόφιλα (Εικ. 13,14), τα βασεόφιλα και τα ουδετερόφιλα. Τα ουδετερόφιλα αποτελούν τον τύπο που απαντάται πιο συχνά στους ιχθύες (Εικ. 13), ενώ τα βασεόφιλα δεν έχουν παρατηρηθεί στο αίμα της τσιπούρας (Lopez-Ruiz et al., 1992).

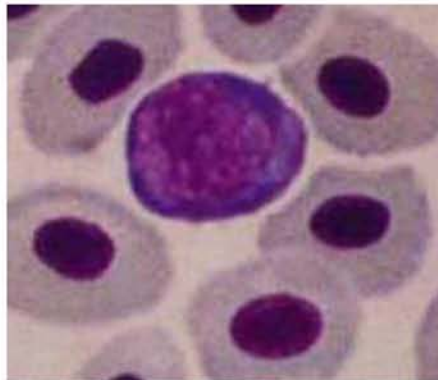


Εικ. 13. Ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα σε επίχρισμα αίματος ψαριού με χρώση Giemsa (Lopez-Ruiz et al., 1992).



Εικ. 14,15. Εωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα σε επίχρισμα αίματος ψαριού με χρώση Giemsa και με εωσίνη (Lopez-Ruiz et al., 1992).

Τα **πλασμοκύτταρα** αποτελούν κύτταρα του αίματος, τα οποία συναντώνται σπάνια στους ιχθύες. Αποτελούνται από έναν μεγάλο στρογγυλό πυρήνα, περιβαλλόμενος από κυτταρόπλασμα, το οποίο χρωματίζεται έντονα μπλε με χρώση Giemsa (Εικ.16).



Εικ. 16. Πλασμοκύτταρα σε επίχρισμα αίματος ψαριού με χρώση Giemsa (Lopez-Ruiz et al., 1992).

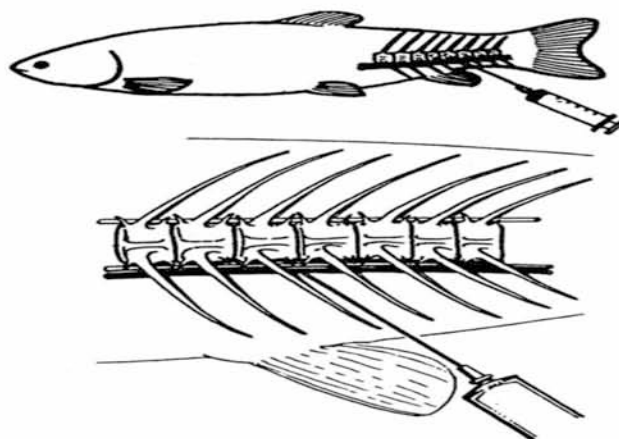
Η λειτουργία της **αιμοποίησης** λαμβάνει χώρα κατά μήκος του δικτυοενδοθηλιακού στρώματος του αγγειακού συστήματος και των οργάνων, που σχετίζονται με αυτό, δηλαδή την καρδιά, τον θύμο αδένα, το σπλήνα, το νεφρό και το ήπαρ, ή μέσα σε άλλους σωματικούς ιστούς, όπως είναι ο υποβλεννογόσιος χιτώννας του εντέρου. Σε πολλά είδη, ο μεγαλύτερος αριθμός των βλαστικών κέντρων των αιμοβλαστών, απαντάται μέσα στον πρόνεφρο και το σπλήνα. Ωστόσο, εστίες

αιμοποίησης εντοπίζονται και μέσα στο ήπαρ, στο μεσόνεφρο, στο επικάρδιο της καρδιάς και στον θύμο αδένα (Groman, 1982).

Τα κύτταρα του αίματος παράγονται στους αιμοποιητικούς ιστούς, η ωρίμανσή τους, όμως, συμβαίνει στην κυκλοφορία (Hrubec and Smith, 2000). Η παραγωγή των κυττάρων του αίματος, η αποθήκευση και εν συνεχεία απελευθέρωσή τους, καθώς και η καταστροφή των εξασθενημένων κυττάρων του αίματος και των ξένων παραγόντων από κύτταρα της μη ειδικής ανοσολογικής απάντησης, αποτελούν λειτουργίες, οι οποίες κατά κύριο λόγο διαδραματίζονται στο σπλήνα (Spazier et al., 1992).

Γ.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΙΜΟΛΗΨΙΑΣ

Η λήψη αίματος από ψάρια μεγάλου μεγέθους (>200g) πραγματοποιείται από την ουραία φλέβα ή αρτηρία είτε με πλευρική είτε με κοιλιακή προσέγγιση. Κατά την πλευρική προσέγγιση, η βελόνη εισέρχεται με γωνία 45° κάτω από την πλευρική γραμμή κοντά στη βάση του μίσχου της ουράς (σημείο τομής της πλευρικής γραμμής με το οπίσθιο άκρο του εδρικού πτερυγίου). Στη συνέχεια, προωθείται διαμέσου των μυών προς τη σπονδυλική στήλη. Στην αίσθηση αντίστασης λόγω επαφής με το σπόνδυλο, η βελόνη οδηγείται κοιλιακά και πλευρικά προς τη σπονδυλική στήλη (1-3mm) κάνοντας ταυτόχρονα αναρρόφηση με τη σύριγγα (Collins, 1993). Η αναρρόφηση πρέπει να γίνεται αργά για την αποφυγή ρήξης των αγγείων, καθώς τα ψάρια έχουν χαμηλή πίεση αίματος. Στην κοιλιακή προσέγγιση, η βελόνη εισέρχεται διαμέσου των μυϊκών μαζών των κάτω κοιλιακών τοιχωμάτων, κάθετα με τον οριζόντιο άξονα του σώματος και 1cm οπισθίως του εδρικού πτερυγίου και ακολουθεί η ίδια διαδικασία με την πλευρική προσέγγιση (Εικ. 17). Η αιμοληψία από τα αγγεία της ουράς συστήνεται ως καλύτερη μέθοδος για τη λήψη μεγάλης ποσότητας αίματος (Lewbart, 2001, Meyers, 2004, Noga, 1996, Reimschuessel, 2000, Svobodová and Vykusová, 1991, White, 2000).



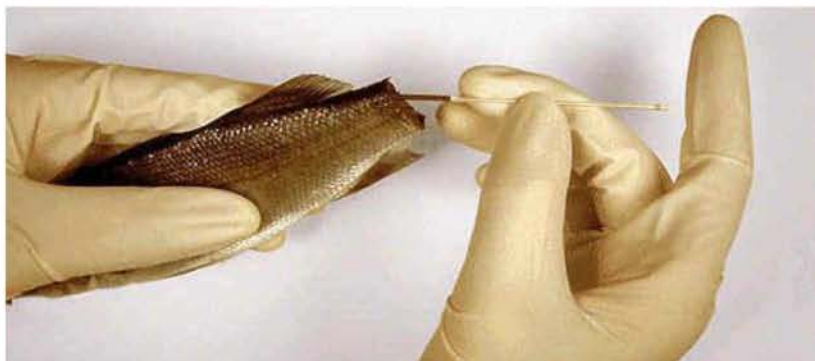
Εικ. 17. Προσέγγιση των αγγείων της ουράς για αιμοληψία (Svobodoná and Vykusoná, 1991).

Η λήψη αίματος μπορεί να γίνει εναλλακτικά και από την καρδιά. Η καρδιά συνήθως βρίσκεται κοντά στο οπίσθιο άκρο της βραγχιακής κοιλότητας. Σύμφωνα με αυτή τη τεχνική, στα μεγάλα μεγέθους ψάρια, η βελόνη εισέρχεται με γωνία 20° με 25° προς την κοιλιακή μέση γραμμή του ψαριού στο ύψος του πρόσθιου άκρου των θωρακικών πτερυγίων και προωθείται κρανικά, ώσπου να διαπεράσει την περικαρδιακή κοιλότητα (Εικ. 18). Με τον τρόπο αυτό, μπορούν να ληφθούν 3-5 ml αίματος από ένα ψάρι 7-9 kg, χωρίς να υπάρχουν συνέπειες για την υγεία του (White, 2000). Στα ψάρια μικρού μεγέθους, η σύριγγα αντικαθίσταται με τριχοειδή σωλήνα, ο οποίος εισέρχεται στην κοιλιακή επιφάνεια του ψαριού υπό γωνία 60° ως προς τον επιμήκη άξονα του σώματος. Το ακριβές σημείο εισόδου εντοπίζεται 1-2mm προσθίως από το σημείο τομής της κοιλιακής μέσης γραμμής με τη γραμμή που ενώνει τα πρόσθια άκρα των θωρακικών πτερυγίων (Svobodoná and Vykusoná, 1991). Βέβαια, συγκριτικά με τη λήψη αίματος από τα αγγεία της ουράς, είναι προφανές πως η λήψη αίματος από την καρδιά εγκυμονεί περισσότερους κινδύνους για τον οργανισμό του ψαριού, γι' αυτό και συνήθως αποφεύγεται σε μεγάλα ψάρια, που η επιβίωσή τους είναι υψίστης σημασίας (Noga, 1996). Για την καλλιέργεια αίματος, σε περιπτώσεις βακτηριακής σηψαιμίας, συνίσταται η λήψη αίματος από τον κόλπο της καρδιάς, καθώς σε αυτό το σημείο παρατηρείται η μεγαλύτερη συγκέντρωση φαγοκυττάρων (Moeller, 2007).



Εικ. 18. Λήψη αίματος από την καρδιά.

Στα ψάρια μικρού μεγέθους (μικρότερα από 8cm), η λήψη αίματος επιτυγχάνεται με την αποκοπή της ουράς στο ύψος του μίσχου της. Μετά την αναισθητοποίηση και την τοποθέτησή τους σε μία επίπεδη επιφάνεια αποκόπτεται η βάση της ουράς με τη βοήθεια νυστεριού. Στη συνέχεια, τοποθετείται ένας ηπαρινισμένος τριχοειδής σωλήνας κοιλιακά της σπονδυλικής στήλης, στη ραχιαία αορτή που έχει αποκαλυφθεί και το αίμα προωθείται στο σωλήνα (τριχοειδές φαινόμενο) (Εικ. 19). Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι προκαλείται επιμόλυνση του υγρού των ιστών, πράγμα που πρέπει να ληφθεί υπόψη σε περίπτωση που χρησιμοποιηθούν δείγματα για χημικές αναλύσεις (Noga, 1996, Reimschuessel, 2000). Τέλος, λίγες σταγόνες αίματος μπορούν να ληφθούν με την αποκοπή των βραγχίων (Reimschuessel, 2000).



Εικ. 19. Αποκοπή της ουράς για λήψη αίματος.

Δ. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα ψάρια είναι ποικιλόθερμοι οργανισμοί που υπόκεινται σε διάφορες αλλαγές του περιβάλλοντος, μέσα στο οποίο διαβιούν (Demir, 1992). Κάθε περιβαλλοντική αλλαγή μπορεί να επηρεάσει τις φυσιολογικές λειτουργίες τους και αυτό να απεικονιστεί στο αίμα. Έγιναν πολλές προσπάθειες να προσδιοριστούν οι αιματολογικές παράμετροι που είναι χρήσιμες για τη διάγνωση πολλών ασθενειών των ιχθύων, αλλά είναι γεγονός πως οι αιματολογικές τιμές μπορούν να επηρεαστούν από περιβαλλοντικούς και βιολογικούς παράγοντες, όπως είναι η ηλικία, το βάρος, το φύλο, η διατροφή, το είδος, τα βακτήρια, τα παράσιτα, συμπεριλαμβανομένων και των παραμέτρων της ποιότητας ή της θερμοκρασίας του νερού, τη διαθεσιμότητα οξυγόνου, το pH (Steinhagen et al., 1990, Haider, 1973). Επίσης, οι μέθοδοι δειγματοληψίας και η διάρκεια και ο τύπος της αναισθησίας μπορούν να προκαλέσουν μεταβολή των παραμέτρων του αίματος (Ferguson, 2006).

Ενώ τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο ανοσοποιητικό σύστημα του ψαριού, ωστόσο πολύ λίγες αναφορές υπάρχουν για τη δομή και τη μορφολογία των κυττάρων του αίματος. Επίσης, η ονοματολογία, η ταξινόμηση και η οντογένεσή τους δεν έχουν ακόμη εξακριβωθεί (Hyder et al, 1983), ενώ διάφορες μορφές έχουν περιγραφεί για τον ίδιο τύπο κυττάρου (Gardner και Yevich, 1969, Ellis, 1977, Rowley et al., 1988).

Παρ' όλο που σε ορισμένες περιπτώσεις οι αιματολογικές εξετάσεις αποδεικνύονται εξαιρετικά χρήσιμες, ωστόσο δεν αποτελούν εξετάσεις ρουτίνας στη διάγνωση των ασθενειών των ψαριών. Το γεγονός ότι δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία τιμές αναφοράς για τις παραμέτρους του αίματος δυσκολεύει την ανάγνωση του αιμογράμματος και συνεπώς την εκτίμηση της κατάστασης της υγείας του ψαριού.

Διάφορα νοσήματα που παρατηρούνται σε ψάρια των υδατοκαλλιεργειών, όπως παρασιτώσεις και βακτηριαίμιες, μπορούν να διαγνωστούν με τη μικροσκοπική

παρατήρηση απλών επιχρισμάτων αίματος (Horton and Okamura, 2003). Επιπλέον, διάφορες μελέτες των παραμέτρων του αίματος προσδιορίζουν τη λειτουργία των κυττάρων του αίματος ως ανοσολογική απάντηση (Hyder et al., 1983). Ακόμη, οι τιμές των αιματολογικών παραμέτρων έχουν μεγάλη σημασία για τις τοξικολογικές παραμέτρους (Anderson and Zeeman, 1995). Στην περίπτωση της αναιμίας, η αιματολογική ανάλυση κρίνεται αναγκαία. Η αναιμία γίνεται αντιληπτή με την παρατήρηση του χρώματος των βραγχίων, τα οποία παρουσιάζουν ροδαλό χρωματισμό σε αντίθεση με τον φυσιολογικό έντονο κόκκινο χρωματισμό (Noga, 1996).

Η γνώση της φυσιολογικής μορφολογίας των κυττάρων του αίματος αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εκτίμηση της φυσιολογικής κατάστασης και της υγείας των ψαριών. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τη σύνθεση του αίματος των ιχθύων έχουν παρουσιάσει αντιφατικά αποτελέσματα, προκαλώντας προβλήματα στην ερμηνεία. Ωστόσο, η αιματολογία, σε συνδυασμό με άλλες διαγνωστικές μεθόδους, θα μπορούσε να συμβάλει στην εκτίμηση της κατάστασης της υγείας ενός ψαριού και κατ'επέκταση, στη διάγνωση μιας νόσου (Pavlidis, 2007).

Σκοπό της εργασίας αυτής, επομένως, αποτελεί η μελέτη και η περιγραφή των κυττάρων του περιφερικού αίματος της εκτρεφόμενης τσιπούρας εμπορεύσιμου μεγέθους στη χώρα μας.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. Πειραματικό υλικό

Για τη διεξαγωγή της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 150 τσιπούρες ιχθυοκαλλιέργειας εμπορεύσιμου μεγέθους, οι οποίες προήλθαν από εντατική εκτροφή σε χερσαίες εγκαταστάσεις στην περιοχή της Κατερίνης (εικ. 20). Συγκεκριμένα, πρόκειται για εκτρεφόμενα ψάρια τα οποία προέρχονται από άγριους γεννήτορες και στη συνέχεια η εκτροφή τους πραγματοποιείται σε χωμάτινες δεξαμενές χωρίς να ακολουθεί τα πρότυπα εκτροφής σε κλωβούς. Τα ψάρια μεταφερθήκαν σε τρεις δεξαμενές 15 μέρες πριν την έναρξη της δειγματοληψίας, προκειμένου να εγκλιματιστούν. Εκεί οι διάφοροι χειρισμοί ήταν λιγότερο στρεσογόνοι για τα ψάρια. Τη διατροφή τους αποτελούσαν εμπορικά σύμπληκτα, κατάλληλα για διατροφή τσιπούρας, δύο φορές την ημέρα. Το τάισμα διακόπηκε 24 ώρες πριν την έναρξη των χειρισμών.



Εικ. 20. Εκτρεφόμενη τσιπούρα.

Της έναρξης των αιμοληψιών προηγήθηκε έλεγχος των ψαριών. Ειδικότερα, λήφθηκε ένα ψάρι από κάθε μία από τις πειραματικές δεξαμενές, προκειμένου να γίνουν βακτηριολογικές και παρασιτολογικές εξετάσεις, εξασφαλίζοντας ότι τα δείγματα αίματος προέρχονται από υγιή ψάρια. Η κατάσταση της υγείας τους παρακολουθούνταν καθημερινά και γινόταν έλεγχος των περιβαλλοντικών

παραμέτρων. Η θερμοκρασία του νερού τον μήνα Ιούλιο, που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες, κυμαίνονταν μεταξύ 24 και 24,5°C. Επίσης, κατά την ανάλυση του νερού προσδιορίστηκαν οι τιμές των παρακάτω παραμέτρων (πίνακας 2):

O ₂	Αλατότητα	Αμμωνία NH ₃	Νιτρικά NO ₃	Νιτρώδη NO ₂	PH	Θ
7-8 mg/lit.	35-36‰	2,5mg/l	30mg/l	0,5mg/l	8,2	24-24,5 °C

Πίνακας 2. Τιμές παραμέτρων ύδατος

B. Δειγματοληψία

Τα ψάρια συλλέχθηκαν με τη χρήση απόχης, με γρήγορους και προσεκτικούς χειρισμούς για την αποφυγή έντονου stress και αναισθητοποιήθηκαν με φαινοξυαιθανόλη (Merk, Germany).

Η λήψη αίματος πραγματοποιήθηκε με σύριγγα 2,5 ml από την ουραία φλέβα με πλευρική προσέγγιση, όπου η βελόνα (21G) εισήλθε με γωνία 45°, στη συνέχεια οδηγήθηκε κοιλιακά και πλευρικά προς τη σπονδυλική στήλη κάνοντας ταυτόχρονα αναρρόφηση (εικ. 21,22).



Εικ. 21. Αιμοληψία τσιπούρας.

Η ποσότητα του αίματος που συλλέχθηκε ήταν περίπου 1,5 ml και αμέσως τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο με ηπαρίνη, για να αποφευχθεί η πήξη του αίματος. Έπειτα, παρασκευάστηκαν επιχρίσματα χρησιμοποιώντας ολικό αίμα και χρωματίστηκαν με χρώση Giemsa και Diff-Quick, έτσι ώστε να ακολουθήσει η μικροσκοπική παρατήρηση.

Μετά την αιμοληψία, σε κάθε ψάρι μετρήθηκε το ολικό βάρος (W, g) σε ζυγό ακριβείας και το ολικό του μήκος (TL, cm). Για τις μετρήσεις μήκους χρησιμοποιήθηκε ιχθυόμετρο, στο οποίο τοποθετήθηκαν τα ψάρια και έγινε η ανάγνωση του ολικού τους μήκους (TL), όπου μετρήθηκε η απόσταση από το άκρο του ρύγχους, έχοντας το στόμα κλειστό, μέχρι την άκρη του ουραίου πτερυγίου.



Εικ. 22. Αιμοληψία τσιπούρας.

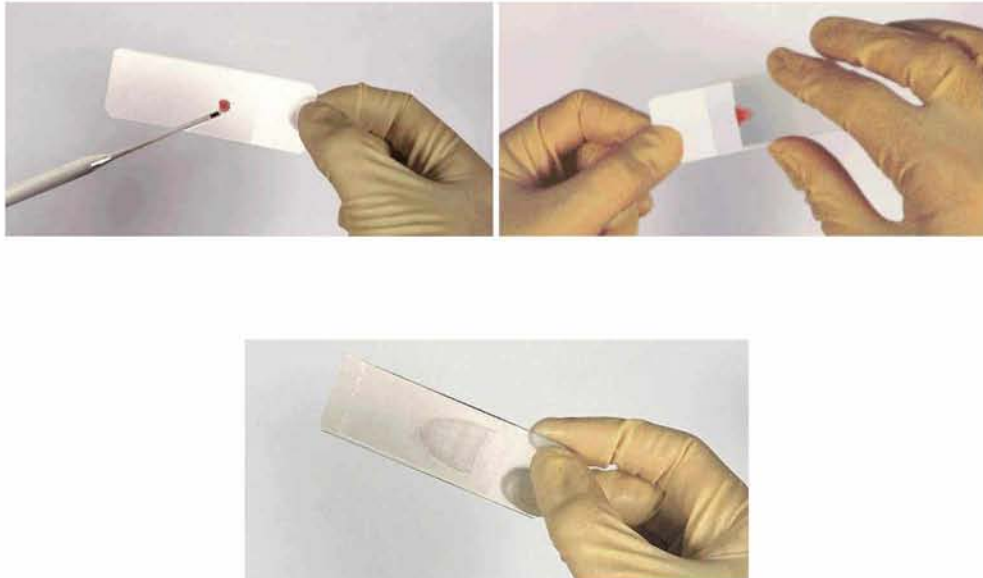
Γ. Μέθοδοι επεξεργασίας και ανάλυσης δειγμάτων

1. Παρασκευή επιχρισμάτων αίματος

Ο σκοπός αυτής της μεθόδου είναι η δημιουργία μιας μονοστιβάδας κυττάρων πάνω σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα. Συνεπώς, τοποθετείται μία σταγόνα αίματος πάνω σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα. Στη συνέχεια, τοποθετείται μία αντικειμενοφόρος με μία κλίση 35° ως 40° επάνω στην πρώτη και αφήνεται η

σταγόνα αίματος να κυλήσει κατά μήκος της κοινής επιφάνειας των δύο αντικειμενοφόρων πλακών. Πιέζοντας σταθερά και διατηρώντας σταθερή πίεση την αντικειμενοφόρο πάνω και κατά μήκος της δεύτερης αντικειμενοφόρου πλάκας με το αίμα και μακριά από τη σταγόνα αίματος, προκειμένου να αποφευχθεί η παραμόρφωση ή η καταστροφή των αιμοκυττάρων, δημιουργείται μία λεπτή μεμβράνη αίματος (Εικ. 23).

Στη συνέχεια, το επίχρισμα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, ακολουθεί μονιμοποίηση με μεθανόλη για 5 λεπτά και βάφεται με κατάλληλες χρωστικές. Για κάθε δείγμα αίματος παρασκευάστηκαν δύο επιχρίσματα προς χρώση.



Εικ. 23. Παρασκευή επιχρισμάτων αίματος.

2. Χρώση Giemsa και Diff-Quick

Μετά την παρασκευή των επιχρισμάτων αίματος ακολούθησε η χρώση τους. Για τη χρώση και, κατ' επέκταση, την αναγνώριση των κυττάρων του αίματος χρησιμοποιήθηκαν πρωτόκολλα δύο χρώσεων: η χρώση Giemsa και η χρώση Diff-Quick.

Η χρώση Giemsa χρησιμοποιείται κυρίως για τη διαφοροποίηση της μορφολογίας των περιφερικών κυττάρων του αίματος, του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος του κάθε κυττάρου. Πριν τη χρώση, η χρωστική αραιώθηκε με την προσθήκη αποσταγμένου νερού, σε αναλογία 1/9 (V/V), όπου χρησιμοποιήθηκε ένα μέρος χρωστικής προς εννέα μέρη αποσταγμένου νερού. Η παραμονή της χρωστικής στα επιχρίσματα αίματος διήρκεσε 20 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολούθησε πλύσιμο με νερό βρύσης, μέχρι την απομάκρυνση της περίσσειας χρωστικής. Τέλος, τα πλακάκια αφέθηκαν να στεγνώσουν σε κατακόρυφη θέση σε θερμοκρασία δωματίου (NCCLS, 2000, Garcia, 2001).

Η χρώση Diff-Quick είναι μια γρήγορη χρώση, η οποία χρησιμοποιείται και για την ταυτοποίηση των διαφόρων συστατικών του αίματος. Πρόκειται για ένα set χρώσης, που αποτελείται από δύο διαλύματα χρωστικών, η κάθε μία από τις οποίες παραμένει για 30 sec, και το μονιμοποιητικό της Diff-Quick (Εικ. 24). Την πρώτη χρωστική αποτελεί ένα διάλυμα ξανθίνης, η οποία χρωματίζει πορτοκαλί τους κόκκους του κυτταροπλάσματος, και η δεύτερη αποτελεί ένα διάλυμα του μπλε του μεθυλενίου, χάρη στο οποίο χρωματίζεται ο πυρήνας και το κυτταρόπλασμα σε αποχρώσεις του μπλε. Αρχικά, βυθίζονται τα επιχρίσματα μέσα στο μονιμοποιητικό της Diff Quick για 30 sec και στη συνέχεια στα διαλύματα των δύο χρωστικών. Τέλος, ακολουθεί ξέπλυμα με αποσταγμένο νερό για απομάκρυνση της περίσσειας των χρωστικών ουσιών (Skipper et al., 1989).

Έπειτα, ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση και φωτογράφιση των επιχρισμάτων με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (OLYMPUS B×40) προσαρτημένη σε οπτικό μικροσκόπιο (OLYMPUS UTVO5×C-3).



Εικ. 24. Set χρώσης Diff-Quick.

3. Ανάλυση αίματος

Η ανάλυση των έμμορφων συστατικών του αίματος της τσιπούρας και, κατ'επέκταση, ο προσδιορισμός της εκατοστιαίας αναλογίας των κυττάρων αυτών, πραγματοποιήθηκε σε αυτόματο αναλυτή Advia 120 (Εικ.25), σε κτηνιατρικό εργαστήριο, όπου απεστάλθηκαν τα δείγματα αίματος αμέσως μετά την αιμοληψία. Ο προσδιορισμός του αιματοκρίτη προσδιορίζεται βάση τόσο των ερυθρών αιμοσφαιρίων όσο και της αιμοσφαιρίνης.



Εικ. 25. Αυτόματος αιματολογικός αναλυτής Advia.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. Μετρήσεις βάρους και ολικού μήκους σώματος

Κατά την έναρξη της μελέτης πραγματοποιήθηκε μέτρηση του ολικού μήκους των ψαριών σε cm και του βάρους σώματος σε g με ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας (Πίνακας 3). Σύμφωνα με την ανάλυση των δεδομένων, υπολογίζεται πως ο μέσος όρος του ολικού μήκους των ψαριών είναι 28.16 ± 2.29 cm, ενώ το βάρος τους είναι 335.73 ± 77.13 g κατά μέσο όρο.

A/A	Ολικό Μήκος(TL) (cm)	Βάρος (g)
T-1	27	325
T-2	24	184
T-3	29	401
T-4	28	352
T-5	24	196
T-6	27	265
T-7	27	260
T-8	29	370
T-9	28	310
T-10	23	174,5
T-11	27,5	334
T-12	28,5	349,5
T-13	29	352
T-14	32	454
T-15	29	334
T-16	29,5	378
T-17	32	478
T-18	31	510
T-19	32	496
T-20	35	550

A/A	Ολικό Μήκος(TL) (cm)	Βάρος (g)
T-21	28	348
T-22	27	325
T-23	28	268
T-24	28	320
T-25	28,5	286
T-26	29	405
T-27	29	280
T-28	30	325
T-29	26	258
T-30	26	236
T-31	28	350
T-32	29	390
T-33	24	196
T-34	28	284
T-35	27	268
T-36	26	245
T-37	28	330
T-38	28	310
T-39	27	280
T-40	28	345
T-41	28	290
T-42	31	404
T-43	24	208
T-44	31	430
T-45	30	390
T-46	28	280
T-47	28	320
T-48	30	365
T-49	29	285
T-50	29	340

A/A	Ολικό Μήκος(TL) (cm)	Βάρος (g)
T-51	31	390
T-52	31	410
T-53	32	450
T-54	29	380
T-55	32	460
T-56	34	510
T-57	26	310
T-58	22	230
T-59	28	380
T-60	27	344
T-61	23	242
T-62	26	255
T-63	28	260
T-64	29	370
T-65	27	300
T-66	22	195
T-67	26,5	325
T-68	28	330
T-69	29	350
T-70	32	428
T-71	27	296
T-72	30	380
T-73	31	445
T-74	30	490
T-75	32	492
T-76	34	510
T-77	28	345
T-78	25	220
T-79	30	415
T-80	29	366

A/A	Ολικό Μήκος(TL) (cm)	Βάρος (g)
T-81	25	225
T-82	28	296
T-83	28	280
T-84	30	385
T-85	27	260
T-86	28	338
T-87	25	198
T-88	29	365
T-89	30	358
T-90	31	445
T-91	28	356
T-92	30	368
T-93	32	452
T-94	29	362
T-95	27	336
T-96	28	352
T-97	29	354
T-98	27	318
T-99	28	342
T-100	29	348
T-101	28	328
T-102	24	196
T-103	29	405
T-104	28	348
T-105	25	199
T-106	27	256
T-107	29	382
T-108	27	263
T-109	28	318
T-110	28	342

A/A	Ολικό Μήκος(TL) (cm)	Βάρος (g)
T-111	27	320
T-112	29	390
T-113	26	265
T-114	23	188
T-115	29	410
T-116	28	330
T-117	28,5	290
T-118	31	410
T-119	28	345
T-120	31	430
T-121	25	198
T-122	28	288
T-123	28	326
T-124	29	365
T-125	29	388
T-126	31	480
T-127	27	290
T-128	28	345
T-129	27,5	334
T-130	23	198
T-131	31	402
T-132	29	365
T-133	28	318
T-134	28	324
T-135	28	339
T-136	27	298
T-137	27	332
T-138	26	290
T-139	28	342
T-140	32	492

A/A	Ολικό Μήκος(TL) (cm)	Βάρος (g)
T-141	29	370
T-142	27	288
T-143	25	278
T-144	28	340
T-145	27	314
T-146	26,5	282
T-147	28	367
T-148	27	318
T-149	28	305
T-150	28	319

Πίνακας 3. Μέτρηση ολικού μήκους (cm) και βάρους σώματος (g).

B. Ανάλυση Αίματος

Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν 20 ψάρια τυχαίου μήκους και βάρους, τα οποία αποτελούν αντιπροσωπευτικό δείγμα του συνόλου (13,3%) προκειμένου να προσδιοριστούν οι αιματολογικές παράμετροι των ιχθύων στις δεδομένες συνθήκες εκτροφής σε χωμάτινες δεξαμενές.

Κατά την εξέταση των έμμορφων συστατικών του αίματος πραγματοποιήθηκε η ποσοτική ανάλυση των έμμορφων συστατικών (ερυθρά, λευκά και θρομβοκύτταρα) και η μορφολογική εξέταση αυτών. Η ποσοτική ανάλυση των παραμέτρων του αίματος (Γενική αίματος) έγινε σε αυτόματο αναλυτή, όπου προσδιορίστηκε αρχικά η ερυθρή σειρά. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των ερυθροκυττάρων (RBC), η ποσότητα της αιμοσφαιρίνης (Hgb), η τιμή του αιματοκρίτη (HCT), ο μέσος όγκος ερυθροκυττάρων (MCV), η μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ανά ερυθροκύτταρο (MCHC) και η μέση περιεκτικότητα των ερυθροκυττάρων σε αιμοσφαιρίνη (MCH) (Πίνακας 4).

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε ο λευκοκυτταρικός τύπος, ο οποίος περιλαμβάνει την εκατοστιαία αναλογία των ουδετερόφιλων, των εωσινόφιλων, των λεμφοκυττάρων, των μονοκύτταρων-μακροφάγων, καθώς και των θρομβοκυττάρων (PLT) (Πίνακας 5).

A/A	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC
	x10.e3/ μ L	x10.e6/ μ L	g/Dl	%	fL	pg	g/dL
T_1	87.49	3.12	6.8	25.4	81.5	21.9	26.9
T_2	104.9	1.77	7.4	15.6	88.5	42.2	47.6
T_3	126.6	2.25	10.7	22.3	99.1	47.4	47.9
T_4	57.86	2.74	5.2	22.6	82.3	18.8	22.8
T_5	53.12	2.64	8.4	30.5	115.5	31.9	27.6
T_6	105.5	2.46	9.5	18.8	76.3	38.7	50.7
T_7	61.92	2.74	9.7	20.4	74.7	35.3	47.3
T_8	80.7	2.82	10.9	20.3	72.1	38.7	53.6
T_9	111.9	2.24	8.3	16.7	74.4	36.9	49.6
T_10	46.83	2.49	7.4	22.6	91.1	29.9	32.9
T_11	117.7	3.31	10.5	32.9	99.2	31.7	31.9
T_12	59.89	2.54	9.6	21.3	83.8	37.8	45.1
T_13	63.3	2.67	9.3	22.5	84.3	34.8	41.3
T_14	61.88	2.86	10.8	24.8	86.8	37.7	43.6
T_15	54.6	2.12	8.9	20.7	97.7	41.9	42.9
T_16	81.1	2.11	8.4	16.6	78.5	39.9	50.7
T_17	45.78	2.51	7.2	21.7	90.9	28.33	32.6
T_18	121.5	2.65	16.7	22.8	85.9	63.1	73.4
T_19	142.1	3.18	16.0	26.1	81.8	50.1	61.2
T_20	89.1	3.32	11.3	20.9	71.7	37.8	56.3

Πίνακας 4. Γενική αίματος.

A/A	%NEUT	%LYMPH	%MONO	%EOS	%BASO	PLT x10.e3/μL
T_1	16.6	80.3	3	0.1	0	285
T_2	24.6	72.8	2.6	0	0	479
T_3	23.2	74.6	1.9	0.3	0	391
T_4	23.2	75.1	1.7	0	0	485
T_5	10.3	86.8	2.7	0.1	0	391
T_6	22.0	76.0	2.0	0	0	446
T_7	21.4	76.3	2.3	0.1	0	531
T_8	20.3	78	2.6	0	0	504
T_9	24.5	74.6	1.9	0	0	647
T_10	23.2	72.6	4.2	0	0	440
T_11	64.5	20.7	14.8	0	0	89
T_12	22.8	74.4	2.8	0	0	345
T_13	14.9	83.2	1.8	0.1	0	478
T_14	15.6	81.1	3.3	0	0	456
T_15	20.9	77.2	1.9	0	0	533
T_16	25.8	73.6	0.6	0	0	58
T_17	22.1	71.9	6	0	0	432
T_18	16.5	82.3	0.9	0.3	0	459
T_19	19.8	79.6	0.5	0.1	0	46
T_20	21.2	78.3	0.5	0	0	497

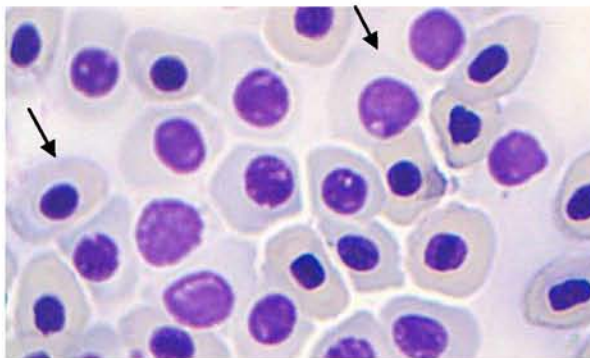
Πίνακας 5. Λευκοκυτταρικός τύπος.

Γ. Μικροσκοπική Παρατήρηση

Τέλος, περιγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής παρατήρησης των επιχρισμάτων αίματος του γενικού συνόλου των ψαριών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 150 επιχρίσματα αίματος με χρώση Giemsa και 150 επιχρίσματα αίματος που χρωματίστηκαν με Diff- Quick προκειμένου να περιγραφεί η μορφολογία των κυττάρων του αίματος της τσιπούρας.

1. Ερυθροκύτταρα

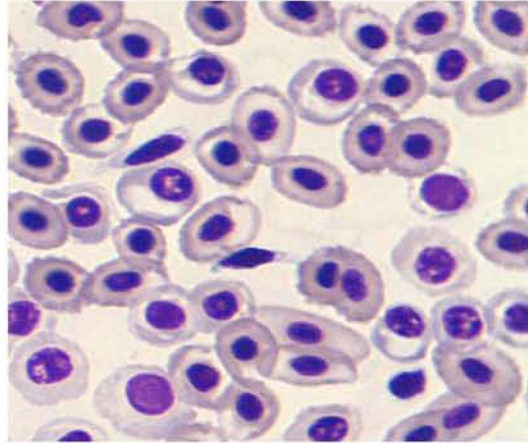
Στο περιφερικό αίμα της τσιπούρας χαρακτηριστική είναι η παρουσία των ώριμων και των άωρων ερυθροκυττάρων. Τα ώριμα ερυθροκύτταρα έχουν ωειδές σχήμα και στο κέντρο τους υπάρχει ένας ωειδής έντονα χρωματισμένος πυρήνας. Το κυτταρόπλασμα είναι ομοιογενές και χρωματίζεται κυανό-γκρι. Στα άωρα ερυθροκύτταρα ο πυρήνας εμφανίζεται πιο μεγάλος σε μέγεθος, βρίσκεται κεντρικά και είναι ωειδής μορφής. Διαθέτουν χρωματίνη, δικτυωτής εμφάνισης, η οποία είναι πορφυρόχρωμη, ενώ το κυτταρόπλασμα είναι ανοιχτό κυανό με χρώση Giemsa και Diff-Quick (Εικ 26).



Εικ. 26. Ωριμα και άωρα ερυθροκύτταρα (x40).

2. Θρομβοκύτταρα

Τρεις τύποι ώριμων θρομβοκυττάρων εντοπίστηκαν κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση. Το σχήμα τους ήταν στρογγυλό, επίμηκες και ωειδές. Τα επιμήκη και τα ωειδή θρομβοκύτταρα είναι πιο συχνά ορατά. Αποτελούνται από ένα μεγάλο και έντονα χρωματισμένο πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, που δεν είναι ιδιαίτερα εμφανές (Εικ. 27).

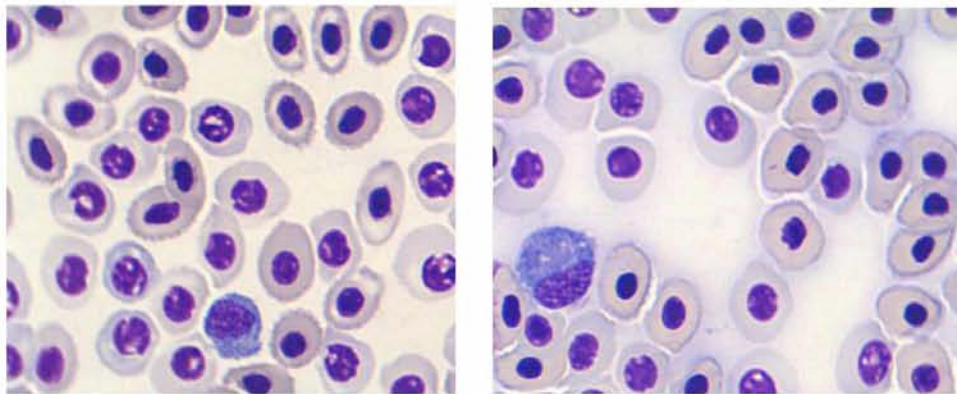


Εικ. 27. Θρομβοκύτταρα σε επίχρισμα αίματος τσιπούρας (x40).

3. Κοκκιοκύτταρα

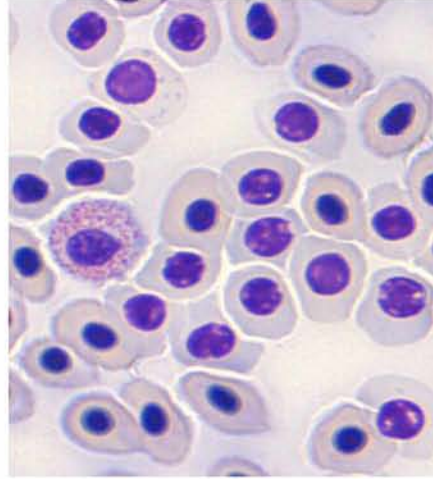
Ουδετερόφιλα, εωσινόφιλα λευκοκύτταρα απαντώνται, κυρίως, στο περιφερικό αίμα της τσιπούρας.

Τα **ουδετερόφιλα** είναι ωοειδής ή ακανόνιστης μορφής κύτταρα. Διαθέτουν μεγάλο, δίλοβο, συνήθως, πυρήνα, ο οποίος βρίσκεται στο κέντρο του κυττάρου και περιβάλλεται από κυτταρόπλασμα, το οποίο χρωματίζεται ελαφρώς γαλάζιο. Στο κυτταρόπλασμα περιέχονται κόκκοι, που χρωματίζονται βαθύ μπλε με χρώση Giemsa και Diff-Quick (Εικ. 28).



Εικ. 28. Ουδετερόφιλα σε επίχρισμα αίματος τσιπούρας (x40).

Τα **εωσινόφιλα** είναι στρογγυλα κύτταρα με έναν κεντρικό πυρήνα. Στο κυτταρόπλασμα, γαλάζιου συνήθως χρώματος, περιέχονται άφθονα κοκκία, τα οποία βάφονται κόκκινο με χρώση Diff-Quick (Εικ. 29).

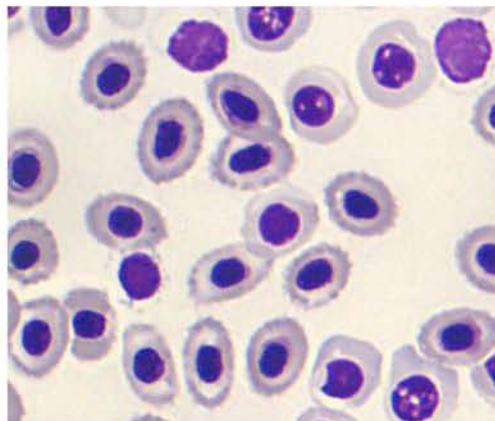


Εικ.29. Εωσινόφιλο σε επίχρισμα αίματος τσιπούρας (x40).

Βασεόφιλα δεν παρατηρήθηκαν στα επίχρισματα του αίματος της τσιπούρας.

4. Λεμφοκύτταρα

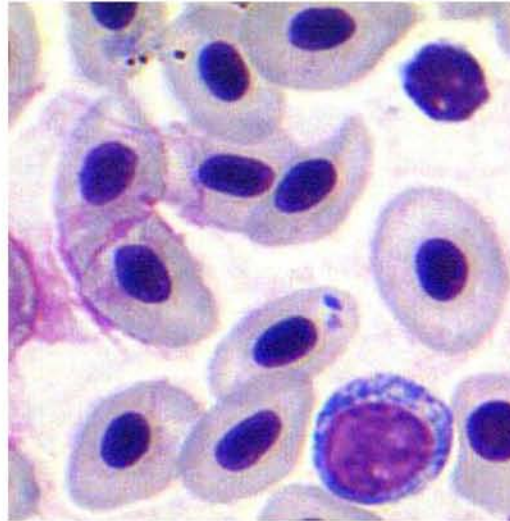
Στο αίμα της τσιπούρας παρατηρούνται μικρά και μεγάλα λεμφοκύτταρα, στρογγυλής ή ακανόνιστης μορφής κύτταρα, που αποτελούνται από ένα μεγάλο, στρογγυλό και έντονα χρωματισμένο πυρήνα, ο οποίος περιβάλλεται από ένα λεπτό κυτταρόπλασμα, μπλε, κυρίως, χρώματος (Εικ. 30).



Εικ. 30. Μικρά και μεγάλα λεμφοκύτταρα σε επίχρισμα αίματος τσιπούρας (x40).

5. Πλασμοκύτταρα

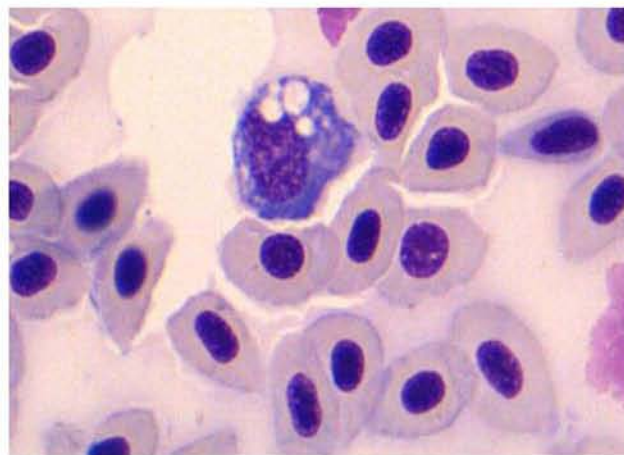
Πλασμοκύτταρα διακρίθηκαν σπάνια. Πρόκειται για κύτταρα με στρογγυλό πορφυρό χρωματισμένο πυρήνα και ένα έντονο σκούρο μπλε χρωματισμένο κυτταρόπλασμα με χρώση Giemsa (Εικ.31).



Εικ. 31. Πλασμοκύτταρο σε επίχρισμα αίματος τσιπούρας (x40).

6. Μονοκύτταρα μακροφάγα

Τα μονοκύτταρα-μακροφάγα έχουν την εικόνα ενός κυττάρου με μεγάλο, στρογγυλό πυρήνα, νεφροειδούς σχήματος, ο οποίος βρίσκεται κεντρικά και ένα σκούρο μπλε κυτταρόπλασμα με ορισμένα κοκκία και φυσαλίδες, τα οποία βάφονται μπλε με Giemsa (Εικ. 32).



Εικ. 32. Μονοκύτταρο σε επίχρισμα αίματος τσιπούρας (x40).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αυτή η μελέτη σχεδιάστηκε για να παρέχει πληροφορίες σχετικά με το εκτρεφόμενο είδος της τσιπούρας, προκειμένου να προωθηθεί η έγκαιρη διάγνωση της νόσου και η κατανόηση της φυσιολογίας του οργανισμού. Ικανοποιητικά συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν όσον αφορά τη μορφολογία των κυττάρων του αίματος, καθώς και τις μεθόδους και τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση αίματος στα ψάρια. Ωστόσο, ο προσδιορισμός των τιμών των αιματολογικών παραμέτρων και η διακύμανση των τιμών τους αποτελεί σημαντική απόδειξη για την ύπαρξη πολλών παραγόντων, που μπορούν να επηρεάσουν αυτές τις παραμέτρους, καθώς και να συμβάλλει στην αναγνώριση και την κατανόηση αυτής της επίδρασης. Σύμφωνα με μελέτες και σε άλλα είδη ιχθύων, οι τιμές των αιματολογικών παραμέτρων μεταβάλλονται ανάλογα με την ηλικία, το γένος, την ποιότητα του νερού, τη φωτοπερίοδο και την εποχή (Hrubec and Smith, 2000).

Για τον προσδιορισμό των αιματολογικών παραμέτρων του περιφερικού αίματος των ψαριών στις προαναφερόμενες συνθήκες εκτροφής, που ακολουθούν διαφορετικό πλάνο από το σύνηθες της εκτροφής σε κλωβούς, επιλέχθηκαν τυχαία 20 άτομα με μέσο βάρος 353.65 ± 107 , ως αντιπροσωπευτικό δείγμα του συνόλου των ιχθύων (150 άτομα), γεγονός που είναι στατιστικά αποδεκτό. Η διακύμανση αυτή στο μέγεθος των ψαριών είναι σύνηθες κατά την εκτροφή σε χωμάτινες δεξαμενές διότι δεν είναι εφικτή η συχνή διαλογή μεγεθών. Εξάλλου, στις χωμάτινες δεξαμενές υπάρχει πρωτογενής παραγωγικότητα (φυτοπλαγκτόν/ζωοπλαγκτόν) που δεν κατανέμεται ομοιόμορφα στη δεξαμενή και κατ'επέκταση δεν είναι το ίδιο εκμεταλλεύσιμη από όλα τα ψάρια, με άμεσο αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση στην ανάπτυξη των ψαριών.

Κατά τον προσδιορισμό των αιματολογικών παραμέτρων υπολογίστηκε πως ο μέσος όρος της τιμής του αιματοκρίτη είναι $22.3 \pm 4.15\%$, η τιμή της αιμοσφαιρίνης 9.65 ± 2.78 g/dl, ο μέσος όγκος ερυθροκυττάρων (MCV) είναι $85,8 \pm 10,95$ fL, η μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ανά ερυθροκύτταρο (MCHC) $44,3 \pm 12,52$ g/dl και

η μέση περιεκτικότητα των ερυθροκυττάρων σε αιμοσφαιρίνη (MCH) $37,24 \pm 9,66$ pg, τιμές οι οποίες θα μπορούσαν να χαρακτηρίσουν την ποσοτική ανάλυση του αίματος στο σύνολο των ιχθύων στις δεδομένες συνθήκες εκτροφής, σε χωμάτινες εγκαταστάσεις, χωρίς σημαντικό στατιστικό σφάλμα.

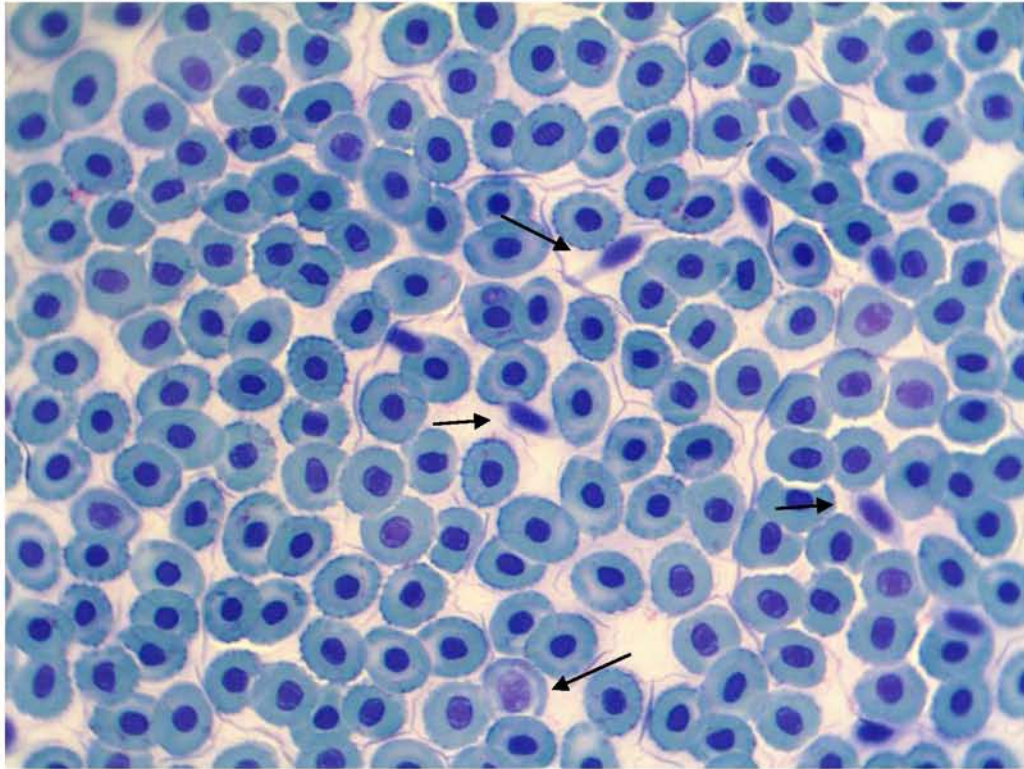
Το περιφερικό αίμα της τσιπούρας αποτελείται από ερυθροκύτταρα, θρομβοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, πλασμοκύτταρα και μονοκύτταρα-μακροφάγα σε αναλογίες που είναι σύμφωνες με εκείνες άλλων σπονδυλωτών. Ωστόσο, κάποιες ιδιαιτερότητες οι οποίες θεωρούνται χαρακτηριστικές των ψαριών, δεν έλλειπαν και από το αίμα της τσιπούρας. Ειδικότερα, η παρουσία πυρήνα στα ώριμα ερυθροκύτταρα και θρομβοκύτταρα, το οποίο θεωρείται χαρακτηριστικό των ψαριών, παρατηρήθηκε και στο αίμα της τσιπούρας.

Αξίζει να σημειωθεί πως κατά την μικροσκοπική παρατήρηση των επιχρισμάτων του αίματος εντοπίστηκαν δύο ή περισσότερες μορφές κυττάρων του ίδιου είδους, όπως διάφορες μορφές ερυθροκυττάρων και θρομβοκυττάρων. Οι μορφές αυτές αντιστοιχούν, συνήθως, σε ανώριμες μορφές των κυττάρων. Επιπλέον, είναι γεγονός πως τα κύτταρα που απαντώνται στο αίμα της τσιπούρας στο υψηλότερο ποσοστό είναι τα λεμφοκύτταρα.

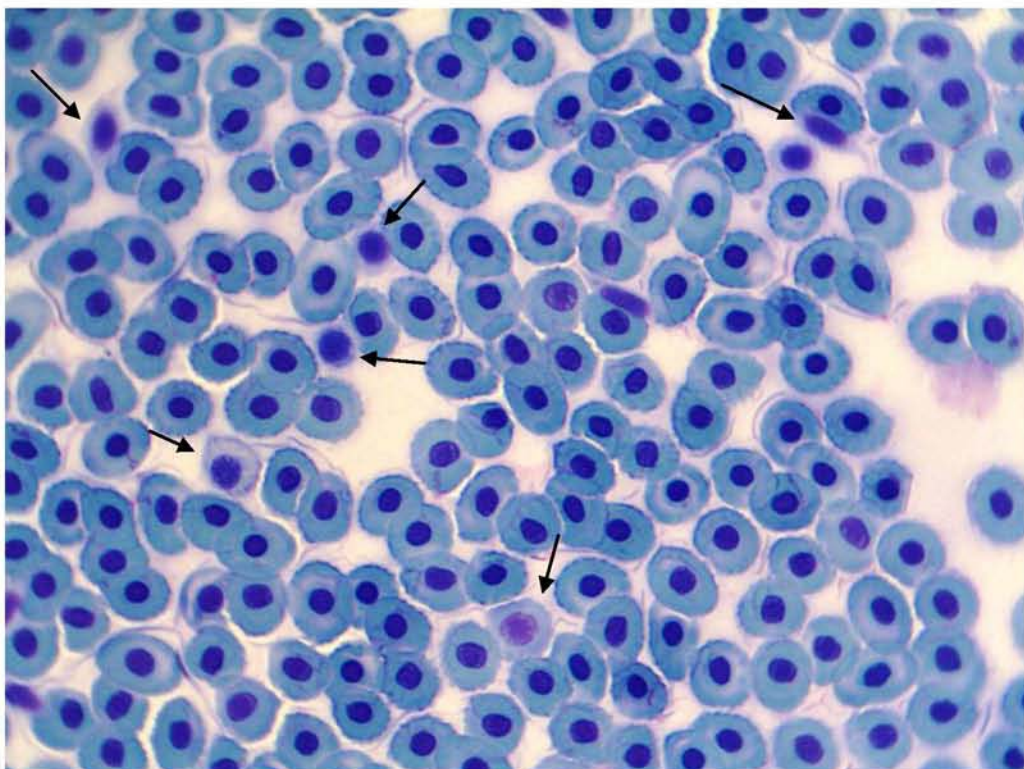
Κατά την αιματολογική ανάλυση παρατηρήθηκε πως το ποσοστό λίπους στο αίμα ήταν πολύ αυξημένο, και η έντονη λιπαιμία είχε ως συνέπεια την αυξημένη αιμόλυση των κυττάρων, γεγονός που επηρεάζει τις μετρήσεις των κυττάρων σε αυτόματο αναλυτή και τον προσδιορισμό των παραμέτρων του αίματος. Η λύση των κυττάρων μπορεί να προκαλέσει σφάλμα κατά την αναγνώριση και την αρίθμηση των κυττάρων, καθώς αλλάζει η μορφολογία των κυττάρων αυτών που έχουν υποστεί λύση. Έτσι, τα ερυθροκύτταρα μπορεί να υποστούν λύση και ο πυρήνας τους να χρωματίζεται όμοια με λευκοκύτταρο. Ακόμη, όταν τα θρομβοκύτταρα είναι ενεργά, είναι στρογγυλής μορφής και εμφανίζουν ομοιότητες με τα λεμφοκύτταρα, με

αποτέλεσμα να συμβαίνει εσφαλμένη διάκριση και ταυτοποίηση των κυττάρων (Hrubec and Smith, 2000).

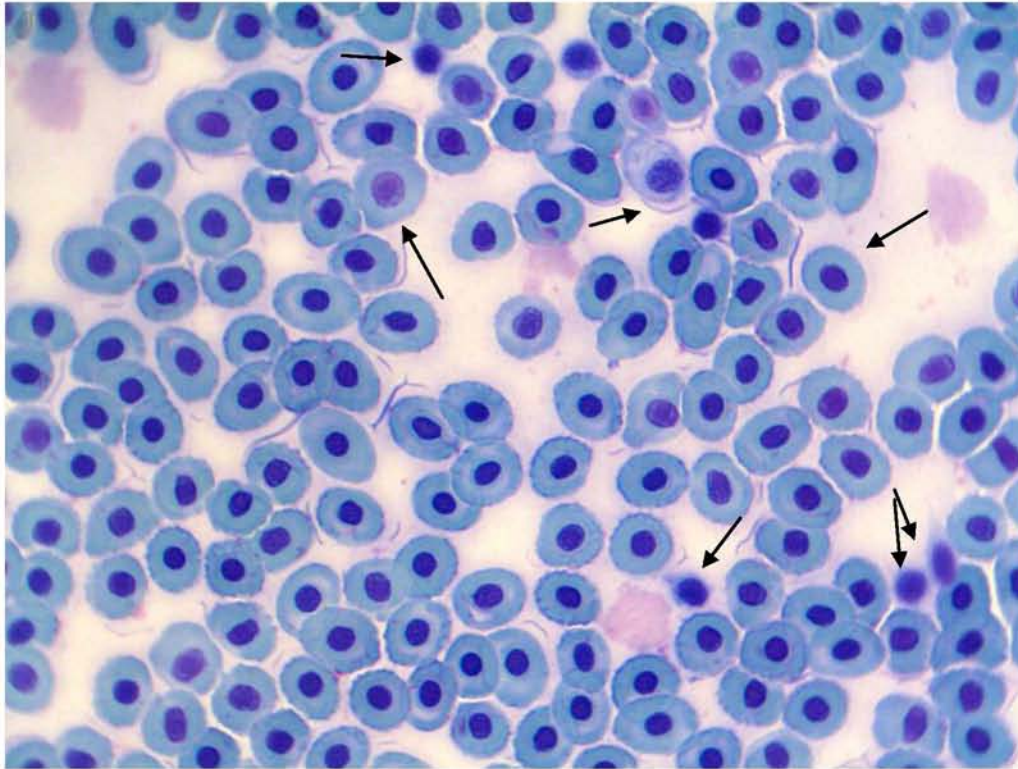
Η μορφολογία των κυττάρων του αίματος της τσιπούρας μελετήθηκε σε επιχρίσματα αίματος τα οποία χρωματίστηκαν με χρώση Giemsa και με χρώση Diff-Quick. Είναι γεγονός πως η ποιότητα των επιχρισμάτων επηρεάζει την ποιότητα και την αξιοπιστία της μέτρησης των κυττάρων (Hrubec and Smith, 2000). Οι διάφορες χρωστικές που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη χρώση επιχρισμάτων αίματος, όπως Giemsa, eosin ή toluidine blue, τροποποιήθηκαν σε διάφορες μελέτες προκειμένου να επιτευχθεί το καλύτερο αποτέλεσμα για τη χρώση επιχρισμάτων (Lopez-Ruiz et al., 1992). Η περιγραφή των κυττάρων με τις δύο διαφορετικές χρώσεις που χρησιμοποιήσαμε είναι παρόμοια, ωστόσο όμως στα επιχρίσματα αίματος με χρώση Giemsa η διάκριση των κυττάρων γίνεται με μεγαλύτερη δυσκολία, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα σφάλματος στην αναγνώριση και την ταυτοποίηση των κυττάρων, γεγονός που αποδεικνύεται και με την παρατήρηση της εικόνας των επιχρισμάτων που χρωματίστηκαν με χρώση Giemsa (Εικ. 33,34 και 35).



Εικ. 33. Διάφορες μορφές ερυθροκυττάρων και λευκοκυττάρων παρατηρούνται σε επιχρίσματα αίματος τσιπούρας με χρώση Giemsa (x40).



Εικ. 34. Διάφορες μορφές ερυθροκυττάρων και λευκοκυττάρων παρατηρούνται σε επιχρίσματα αίματος τσιπούρας με χρώση Giemsa (x40).



Εικ. 35. Διάφορες μορφές ερυθροκυττάρων και λευκοκυττάρων παρατηρούνται σε επιχρίσματα αίματος τσιπούρας με χρώση Giemsa (x40).

Ερυθροκύτταρα

Τα ερυθροκύτταρα αποτελούν τον τύπο των κυττάρων που κυριαρχεί στο περιφερικό αίμα της τσιπούρας, καθώς και στην πλειοψηφία των ιχθύων (Rowley et al., 1988). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων του αίματος επιβεβαιώνουν την παραπάνω άποψη, καθώς πρόκειται για τα πιο πολυάριθμα κύτταρα με μέσο όρο $2.63 \times 10^6 / \mu\text{L}$. Στα επιχρίσματα αίματος, ένας βαθμός βασηοφιλίας παραμένει στα ερυθροκύτταρα, η οποία εξαρτάται από την ωριμότητα του κυττάρου (Weinreb, 1963). Σε ορισμένα είδη παρατηρήθηκαν ως επί το πλείστον ώριμα ερυθροκύτταρα (Gardner and Yevich, 1969). Ωστόσο, στα επιχρίσματα αίματος τσιπούρας παρατηρήθηκαν ώριμες και άωρες μορφές εμπύρηνων ερυθροκυττάρων. Η παρουσία των δύο αυτών μορφών κυττάρων έχει επιβεβαιωθεί και με την παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Lopez-Ruiz et al., 1992).

Θρομβοκύτταρα

Στα ψάρια, τα θρομβοκύτταρα αποτελούν τη δεύτερη πιο κοινή, μετά τα ερυθροκύτταρα, κατηγορία κυττάρων του αίματος (Groman, 1982, Murray, 1984), γεγονός που επαληθεύεται και με τα αποτελέσματα της ανάλυσης του αίματος στον αυτόματο αναλυτή, με μέσο όρο της τιμής των θρομβοκυττάρων στα δείγματα αίματος που αναλύσαμε να αγγίζει $400 \times 10^3/\mu\text{L}$. Ωστόσο, η μορφολογία τους έχει ελάχιστα μελετηθεί συγκριτικά με τα ερυθροκύτταρα και τα λευκοκύτταρα (Zapata, 1980). Στην τσιπούρα εντοπίσαμε στρογγυλά και επιμήκη, κυρίως, θρομβοκύτταρα ώριμης μορφής. Δεν παρατηρήθηκαν προθρομβοκύτταρα, όπως συνέβη σε ανάλογη μελέτη σε κυπρινοειδή (Gardner and Yevich, 1969). Πολλές ομοιότητες υπάρχουν μεταξύ θρομβοκυττάρων και λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα να υπάρχει σύγχυση κατά την αναγνώρισή τους. Ωστόσο, στην τσιπούρα η διαφοροποίηση ήταν πιο εύκολη εξαιτίας των χρωματικών χαρακτηριστικών των δύο αυτών τύπων κυττάρων. Το κυτταρόπλασμα των θρομβοκυττάρων ήταν άχρωμο, έχοντας την εικόνα φωτοστέφανου γύρω από τον έντονα χρωματισμένο πυρήνα, σε αντίθεση με το χρωματισμένο κυτταρόπλασμα των λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, στο αίμα της τσιπούρας δεν παρατηρήθηκαν κοκκία στα θρομβοκύτταρα παρόμοια με εκείνα που έχουν αναφερθεί σε λαβράκι (Romestand and Trilles, 1984).

Κοκκιοκύτταρα

Κανένα άλλο είδος κυττάρων στα ψάρια δεν έχει προκαλέσει τόση σύγχυση όσο τα λευκοκύτταρα (Rowley et al., 1988). Παρόλα αυτά όμως, η χρήση των διαφόρων τεχνικών χρώσεων και η προσεκτική μελέτη των αποτελεσμάτων επέτρεψαν τον εντοπισμό των ουδετερόφιλων, των εωσινόφιλων και των βασεόφιλων κυττάρων στο περιφερικό αίμα της τσιπούρας.

Παρατηρείται ότι τα ουδετερόφιλα έχουν, κυρίως, ένα ακανόνιστο ωοειδές περιγράμμα, ένα μεγάλο πυρήνα με λοβούς, καθώς και μεγάλα διάσπαρτα κοκκία.

Πρόκειται για τα πιο συνηθισμένα κοκκιοκύτταρα στο αίμα των ψαριών, όπου το ποσοστό τους αγγίζει το 23% κατά μέσο όρο στο αίμα που αναλύθηκε. Τα εωσινόφιλα είναι σφαιρικά, με στρογγυλό κεντρικό πυρήνα και πολυάριθμα μικρότερα διάσπαρτα κοκκία, τα οποία βάφονται κόκκινα. Τα βασεόφιλα δεν εντοπίστηκαν στα επιχρίσματα του αίματος της τσιπούρας. Η απουσία ή η σπανιότητα των βασεόφιλων στο αίμα των ψαριών έχει ευρέως παρατηρηθεί σε διάφορες μελέτες (Drezwina, 1911, Werzberg, 1911, Saunders, 1966, Weinberg et al., 1972).

Λεμφοκύτταρα

Τα λεμφοκύτταρα αποτελούν τα κύτταρα που παρατηρούνται πιο συχνά στο αίμα των ψαριών (Rowley et al., 1988), γεγονός που αποδεικνύει και η παρουσία τους σε υψηλό ποσοστό, κατά μέσο όρο 74%, στις εκτρεφόμενες τσιπούρες που μελετήθηκαν. Ορισμένοι συγγραφείς περιγράφουν έναν ενιαίο τύπο λεμφοκυττάρων (Weinberg et al., 1972, Hightower et al., 1984, Roubal, 1986, Kusuda and Ikeda, 1987), αλλά συνήθως περιγράφονται μικρά και μεγάλα λεμφοκύτταρα, τα οποία αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια ωρίμανσης των κυττάρων αυτών (Barber and Westermann, 1975, Etlinger et al., 1976, Ellis, 1977, Christensen et al., 1978, Cannon et al., 1980). Η παρουσία των λεμφοκυττάρων στο αίμα της τσιπούρας, που μελετήσαμε, χαρακτηρίζεται από μικρά και μεγάλα λεμφοκύτταρα, παρόμοιας δομής με εκείνα που διακρίνονται στα άλλα σπονδυλωτά, κυρίως ψάρια (Blaxhall, 1983, Savage, 1983, Cenini, 1984, Temmink και Bayne, 1987, Doggett και Harris, 1989, Fujimaki και Isoda, 1990).

Πλασμοκύτταρα

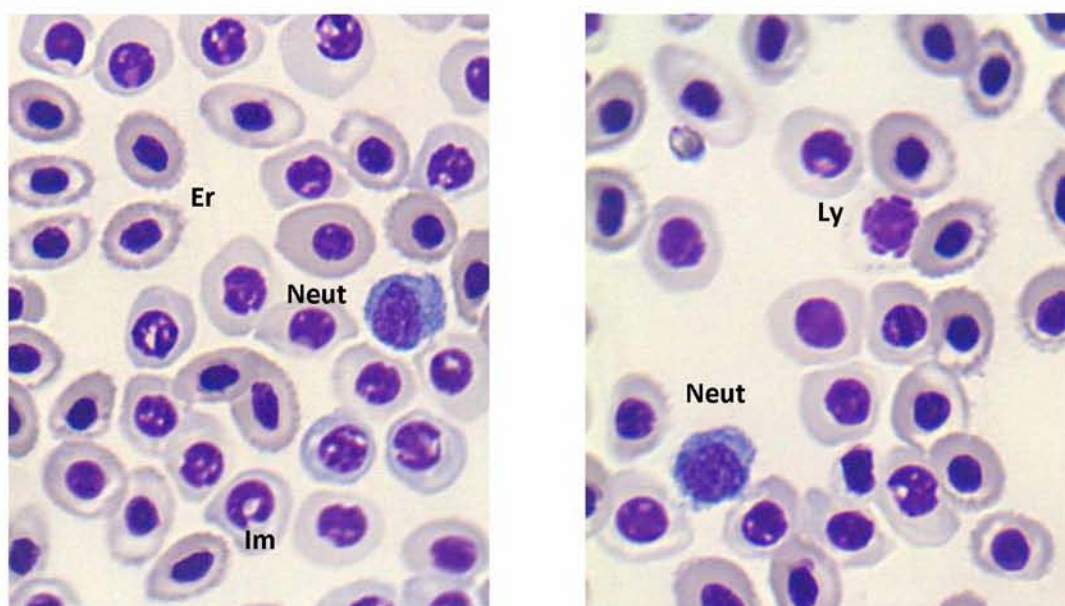
Υπάρχουν αναφορές σύμφωνα με τις οποίες δεν έχουν εντοπιστεί πλασμοκύτταρα στο αίμα των ψαριών κατά την παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Romestand and Trilles, 1984). Ωστόσο, στο επίχρισμα αίματος της τσιπούρας εντοπίσαμε ελάχιστα πλασμοκύτταρα που διαθέτουν ένα μεγάλο

στρογγυλό πυρήνα, περιβαλλόμενο από κυτταρόπλασμα, το οποίο χρωματίζεται έντονα μπλε.

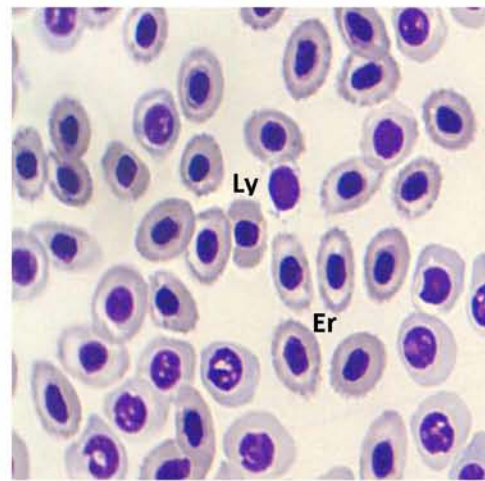
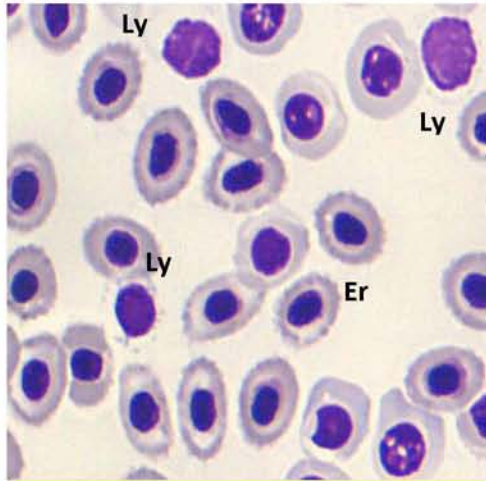
Μονοκύτταρα-Μακροφάγα

Οι περισσότερες από τις μελέτες σχετικά με το αίμα των τελεόστων ιχθύων υποδεικνύουν την απουσία των μονοκυτταρων-μακροφάγων (Catton, 1951, Jakowska, 1956, Boyar, 1962, Weinreb, 1963, Saunders, 1968). Με την παρατήρηση με οπτικό μικροσκόπιο εντοπίσαμε μονοκυττάρα-μακροφάγα στο αίμα της τσιπούρας σε ποσοστό 3% κατά μέσο όρο, αποτελούμενα από νεφροειδούς μορφής πυρήνα και κυτταρόπλασμα, το οποίο εμφανίζει έντονη κενοτοπίωση.

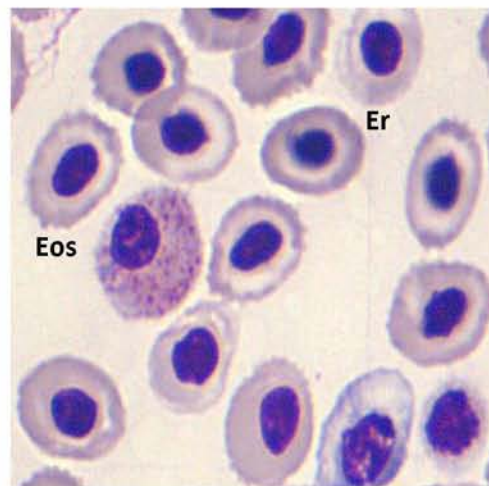
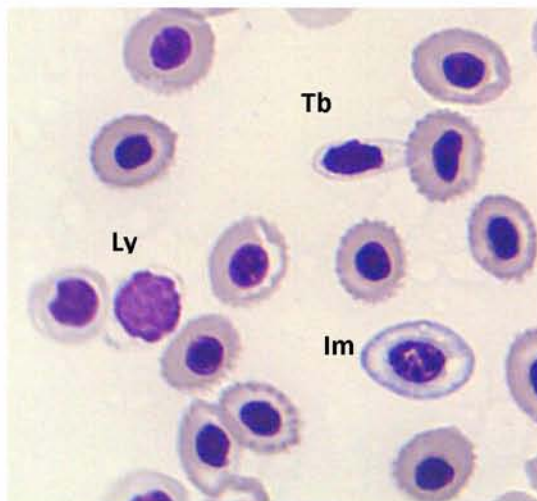
Η **μορφολογία των κυττάρων** στο αίμα της τσιπούρας απεικονίζεται εκτενέστερα στις εικόνες, που ακολουθούν (Εικ. 36-52).



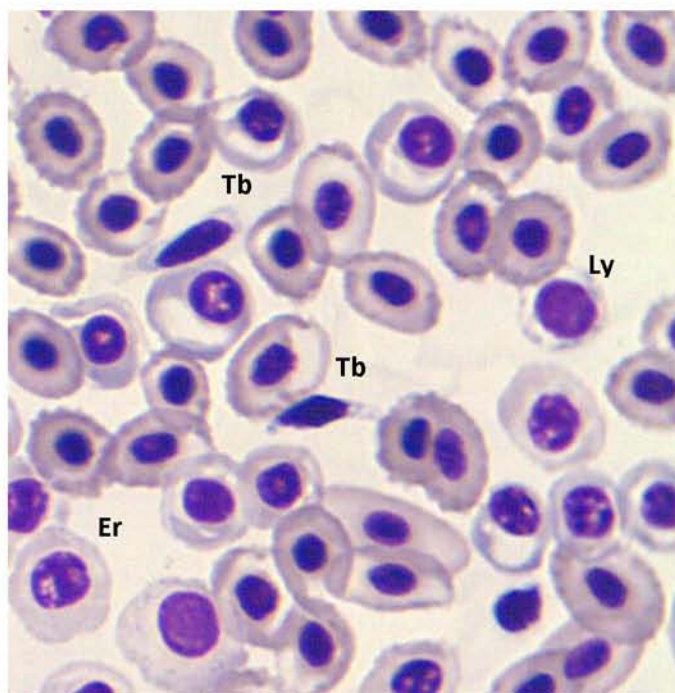
Εικ. 36, 37. Στριμα και άωρα (*Im*) ερυθρά αιμοσφαίρια (*Er*), λεμφοκύτταρα (*Ly*) και ουδετερόφιλα (*Neut*) διακρίνονται σε επιχρίσματα αίματος τσιπούρας με χρώση Diff-Quick (x40).



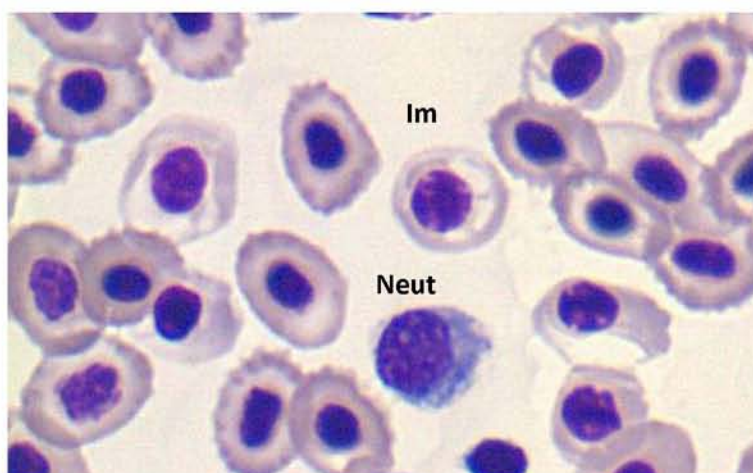
Εικ. 38, 39. Ωριμα και άωρα ερυθρά αιμοσφαίρια (**Er**), μεγάλα και μικρά λεμφοκύτταρα (**Ly**) διακρίνονται σε επιχρίσματα αίματος τσιπούρας με χρώση *Diff-Quick* (x40).



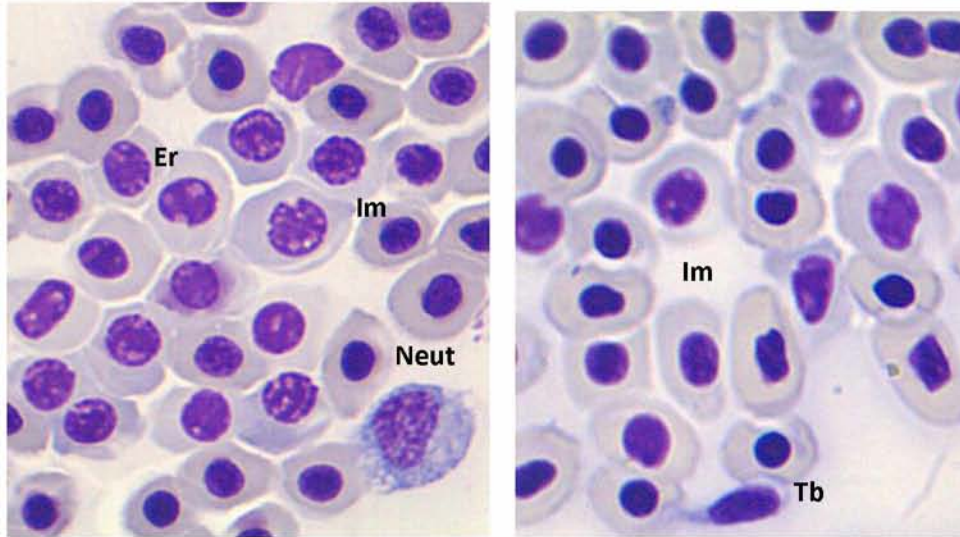
Εικ. 40, 41. Ωριμα και άωρα ερυθρά αιμοσφαίρια (**Er**), λεμφοκύτταρα (**Ly**), θρομβοκύτταρο (**Tb**) και εωσινόφιλο (**Eos**) παρατηρούνται σε επιχρίσματα αίματος τσιπούρας με χρώση *Diff-Quick* (x40).



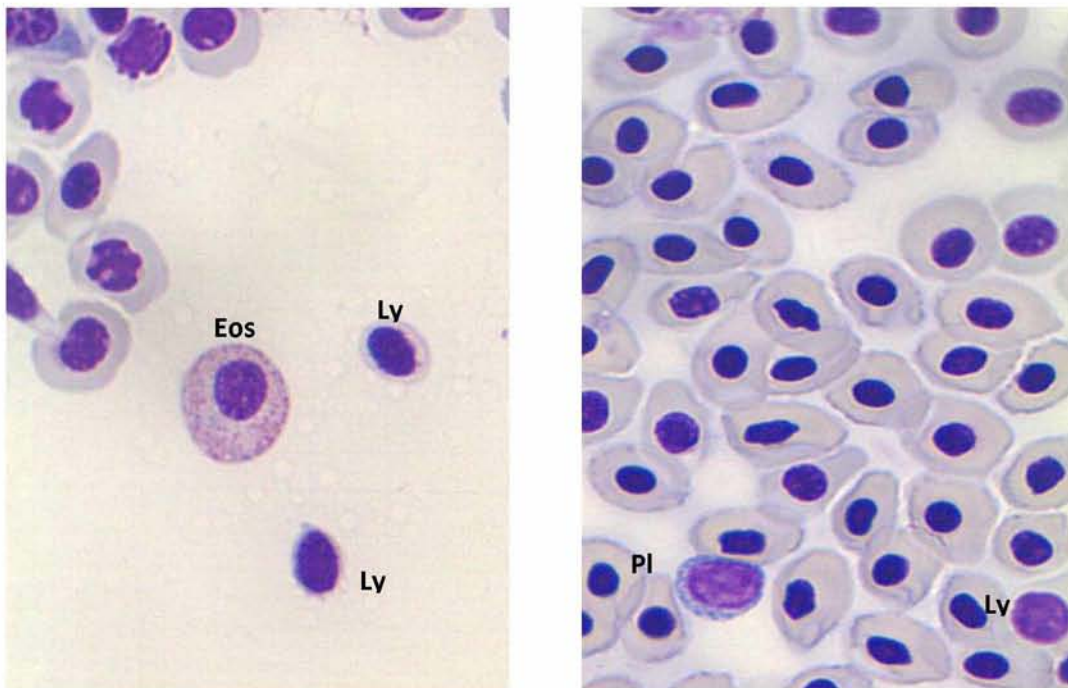
Εικ. 42. Ωριμα και άωρα ερυθροκύτταρα (**Er**), λεμφοκύτταρα (**Ly**) και θρομβοκύτταρα (**Tb**) παρατηρούνται σε επιχρίσματα αίματος τσιπούρας με χρώση *Diff-Quick* (x40).



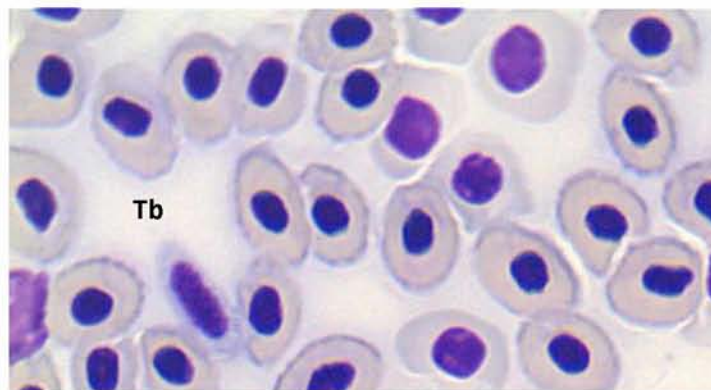
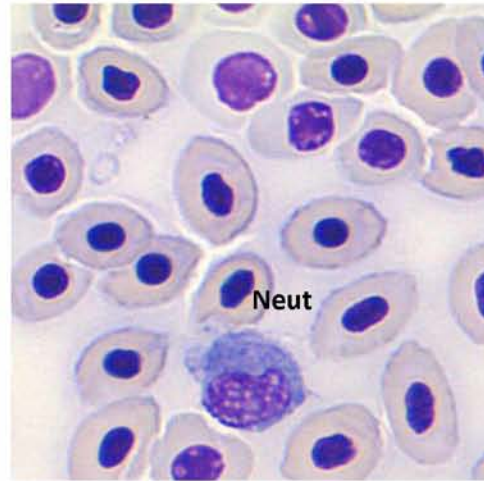
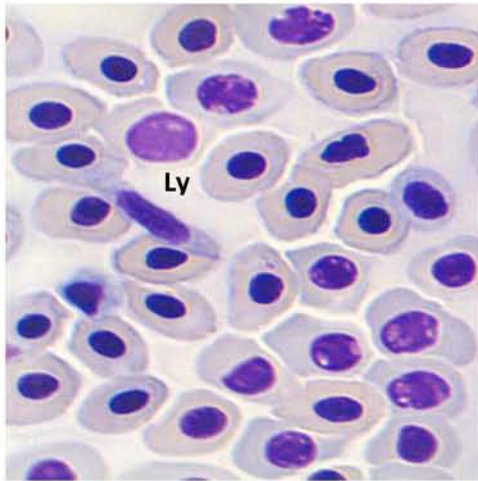
Εικ. 43. Άωρα ερυθροκύτταρα (**Im**) και ουδετερόφιλο (**Neut**) παρατηρούνται σε επιχρίσματα αίματος τσιπούρας με χρώση *Diff-Quick* (x40).



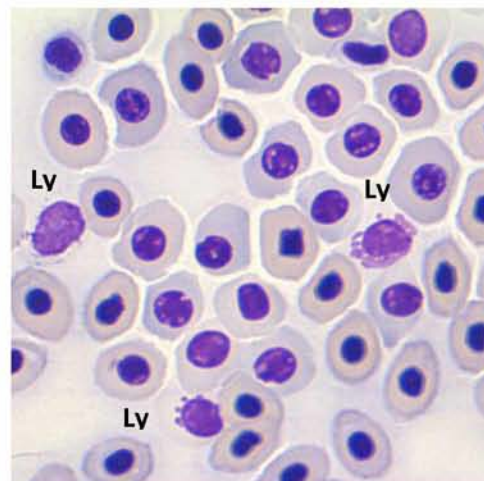
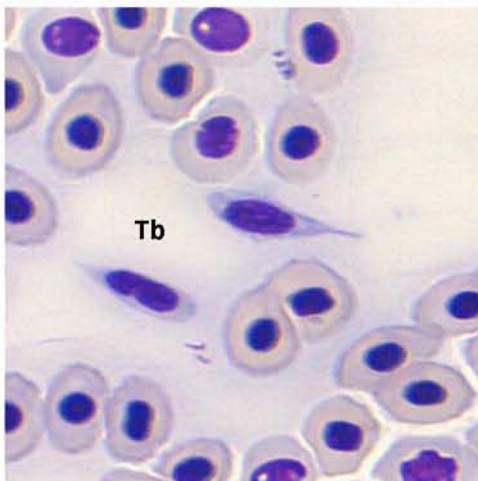
Εικ. 44, 45. Θρομβοκύτταρο (**Tb**), ουδετερόφιλο (**Neut**), άωρα ερυθροκύτταρα (**Im**) και ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια (**Er**) παρατηρούνται σε επιχρίσματα αίματος τσιπούρας με χρώση Diff-Quick (x40).



Εικ. 46, 47. Λεμφοκύτταρα (**Ly**), εωσινόφιλο (**Eos**) και πλασμοκύτταρο (**Pl**) παρατηρούνται σε επιχρίσματα αίματος τσιπούρας με χρώση Diff-Quick (x40).



Εικ. 48, 49, 50. Διάφορες μορφές θρομβοκυττάρων (**Tb**), λεμφοκύτταρα (**Ly**), και ουδετρόφιλο (**Neut**) παρατηρούνται σε επιχρίσματα αίματος τσιπούρας με χρώση Diff-Quick (x40).



Εικ. 51, 52. Διάφορες μορφές θρομβοκυττάρων (**Tb**) και μικρά και μεγάλα λεμφοκύτταρα (**Ly**) παρατηρούνται σε επιχρίσματα αίματος τσιπούρας με χρώση Diff-Quick (x40).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anderson DP and Zeeman MG (1995) Immunotoxicology in fish. In: Fundamentals of Aquatic Toxicology. G. M. Rand (Ed.) Taylor and Francis: Washington, DC, USA, p. 317-404.
- Ashley PJ (2007) Fish welfare: current issues in aquaculture. Applied animal behavior Science, 104: 199-235.
- Barber DL and Westermann JE (1975) Morphological and histochemical studies on a PAS-positive granular leukocyte in blood and connective tissues of *Catostomus commersonii* Lacepede (teleostei: pisces). Am J Anat, 142: 205-220.
- Barnabe G (1994) Aquaculture. Ellis Horwood Limited: London. p. 403.
- Bauchot ML and Hureau JC (1990) Sparidae. In: Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA), J.C. Quero, J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post and L. Saldanha (eds.), JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. 104: 790-812.
- Blaxhall PC (1983) Electron microscope studies of fish lymphocytes and thrombocytes. J Fish Biol, 22: 223-229.
- Blaxhall PC and Daisley KW (1973) Routine haematological methods for use with fish blood. J Fish Biol, 5: 771-781.
- Boyar HC (1962) Blood cell types and differential counts in Atlantic herring, *Clupea harengus harengus*. Copeia, 1962: 463-465.
- Cannon MS, Mollenhauer HH, Eurell TE, Lewis DH, Cannon AM and Tompkins C (1980) An ultrastructural study of the leukocytes of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J Morphol, 64: 1-23.
- Catton WT (1951) Blood cell formation in certain teleost fishes. Blood, J American Society of Hematology, Washington, 6: 39-60.
- Cenini P (1984) The ultrastructure of leucocytes in carp (*Cyprinus carpio*). J Zool (Lond), 204: 509-520.

- Christensen GM, Fiandt JT and Poeschl BA (1978) Cells, proteins, and certain physical-chemical properties of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) blood. J Fish Biol, 12: 51-60.
- Collins R (1993) Principles of disease diagnosis. In: Brown L (ed). Aquaculture for veterinarians, fish husbandry and medicine. Pergamon Press: New York, p. 69-89.
- Demir N (1992) İhtiyoloji. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, 219: 170-176.
- Doggett TA and Harris JE (1989) Ultrastructure of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*. J Fish Biol, 33: 747-756.
- Drezwina A (1911) Contribution a l'étude des leucocytes granuleux du sang des poissons. Arch Anat Microsc, 13: 219-376.
- Ellis AE (1977) The leucocytes of fish: a review. J Fish Biol, 11: 453-491.
- Esteban MA, Munoz J and Meseguer J (2000) Blood cells of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Flow cytometric and microscopic studies. Anat Rec, 258: 80-89.
- Etlinger HM, Hodgins HO and Chiller JM (1976) Evolution of the lymphoid system. I. Evidence for lymphocyte heterogeneity in rainbow trout revealed by the organ distribution of mitogenic responses. J Immunol, 116: 1547-1553.
- FAO (2008) The State of World Fisheries and Aquaculture, Rome, Italy. <http://www.fao.org>.
- FEAP (2008) The Federation of European Aquaculture Producers. Production and Price Reports of Member 2001–2008. Prepared by the FEAP, May 2008.
- Ferguson HW (2006) Systemic Pathology of Fish: a text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease. Scotian Press, 2nd Edition. Dalton House, 60 Windsor Avenue, London SW19 2RR, UK.
- Fischer W, Schneider M and Bauchaut ML (1987) Fiches FAO Catalogue d' Fishery and Aquaculture Statistics, Food and agriculture organization of the united nations, Rome, 2009.

- Fox R (2000) Introduction to the anatomy and identification of freshwater fishes.
<http://www.iim.csic.es>.
- Fujimaki Y and Isoda M (1990) Fine-structural study of leucocytes in the goldfish, *Carassius auratus*. J Fish Biol, 36: 321-831.
- Garcia LS (2001) Diagnostic Medical Parasitology, ed. 4, ASM Press, Washington, DC, USA, p. 850-872.
- Gardner GR and Yevich PP (1969) Studies on the blood morphology of three estuarine cyprinodontiform fishes. J Fish Res Board Can, 26: 433-447.
- Groman DB (1982) Histology of the Striped Bass, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, p.1-16.
- Haider G (1973) Comparative studies of blood morphology and haemopoiesis of some teleost. Observations on Cells of the Red Series. Journal of Zoology, 179: 355-383.
- Hattori A, Tokunaga J, Fujita T and Matsuoka M (1969) Scanning electron microscopic observations on human blood platelets and their alterations induced by thrombin. Arch Histol Jpn, 31: 37-54.
- Hightower JA, McCumber LJ, Welsh MG, Whatley DS, Hartvigsen RE and Sigel MM (1984) Blood cells of *Fundulus heteroclitus* (L.). J Fish Biol, 24: 587-598.
- Horton T and Okamura B (2003) Post-hemorrhagic anaemia in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), caused by blood feeding of *Ceratothoa oestroides* (Isopoda: Cymothoidae). Journal of Fish Diseases, Stirling, 26: 401-406.
- Hrubec T and Smith S (2000) Hematology in Fish. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, editors. Schalm's veterinary hematology. 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, p. 1120-1125.
- Hyder SL, Cayer ML and Pettey CL (1983) Cell types in peripheral blood of the nurse shark: an approach to structure and function. Tissue Cell, 15: 437-455.

- Jakowska S (1956) Morphology and nomenclature of blood cells of teleosts. Rev Hematol, 11: 519-539.
- Kusuda R and Ikeda Y (1987) Studies on classification of eel leucocytes. Bull Jpn SOCS ci Fish, 53: 205-209.
- Lewbart G (2001) Diagnostic techniques for fish. <http://www.vin.com>.
- Lopez-Ruiz A, Angeles Esteban M and Meseguer J (1992) Blood cells of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): light and electron microscopic studies. Anat Rec, 234: 161-171.
- Meiri I, Gothilf Y, Zohar Y and Elizur A (2002) Physiological changes in the spawning gilthead seabream, *Sparus aurata*, succeeding the removal of males. J Exp Zool, 292: 555-564.
- Meyers TR (2006) Standard necropsy procedures for Finfish. NWFHS laboratory procedures manual, second edition.
- Moeller RB (2007) Fish necropsy and biopsy procedures. <http://www.cichlid-forum.com>.
- Mosconi P and Chauvet C (1990) Variabilite spatio-temporelle de la croissance des juveniles de *Sparus aurata* entre les zones lagunaires et marines du golfe du Lion. Vie Milieu, 40: 305-311.
- Murray SA (1984) Haematological study of the bluegill, *Lepomis macrochirus* RAF. Comp Biochem Phys, 78: 787-791.
- NCCLS (2000) Laboratory Diagnosis of Blood-Borne Parasitic Diseases Approved Guideline M15-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, USA, p. 1-36.
- Noga EJ (1996) Fish disease : diagnosis and treatment. St. Louis: Mosby Year Book, p. 367.
- Parker R (1995) Aquaculture Science. Delmar Thomson Learning, 2nd end, NY, USA, p. 1-26.

- Pavlidis M, Futter CW, Katharios P and Divanach P (2007) Blood cell profile of six Mediterranean mariculture fish species. *Journal of Applied Ichthyology*, 23: 70-73.
- Reimschuessel R (2000) Necropsy techniques in aquarium fish. *Kirk's current veterinary therapy XIII small animal practice*. PA: W.B. Saunders company. Philadelphia, USA.
- Roberts RJ Broodstock management and egg and larval quality. *Blachwell Science Ltd, Oxford*. 424: 94-117.
- Rodríguez CJ and Gomez EJ (1994) Gilthead Sea Bream Aquaculture, In: Petrall. I.E.S. Sancti Petri, San Fernando, Spain.
- Romestand B and Trilles JP (1984) Nomenclature et cytologie descriptive des elements figures du sang et des organes hematopoiétiques du bar (*Dicentrarchus labrax*). *Rec Med Vet*, 160: 833-840.
- Roubal FR (1986) Blood and other possible inflammatory cells in the sparid *Acanthopagrus australis* (Gunther). *J Fish Biol*, 28: 573-593.
- Rowley AF, Hunt TC, Page M and Mainwaring G (1988) Fish. In: *Vertebrate Blood Cells*, 1st ed. A.F. Rowley and N.A. Ratcliffe, eds. Cambridge University Press, Cambridge. p. 19-127.
- Saunders DC (1966) Elasmobranch blood cells. *Copeia*, 2: 348-351.
- Saunders DC (1968) Differential blood cell counts of 50 species of fishes from the Red Sea. *Copeia*, p. 491-498.
- Savage AG (1983) The ultrastructure of the blood cells of the pike *Esox lucius L.* *J Morphol*, 178: 187-206.
- Schneider W (1990) FAO species identification sheets for fishery purposes. Field guide to the commercial marine resources of the Gulf of Guinea. Prepared and published with the support of the FAO Regional Office for Africa. FAO, Rome. p. 268.

- Skipper R and DeStephano D (1989) A rapid stain for *Campylobacter pylori* in gastrointestinal tissue sections using Diff-Quik®. *J Histotechnol*, 12: 303–304.
- Sola L, Moretti A, Crosetti D, Karaiskou N, Magoulas A, Rossi AR, Rye M, Triantafyllidis A and Tsigenopoulos CS (2006) Gilthead seabream - *Sparus aurata*. In: “Genetic effects of domestication, culture and breeding of fish and shellfish, and their impacts on wild populations.” In: D. Crosetti, S. Lapègue, I. Olesen, T. Svaasand (eds). Italy, p. 1-6.
- Spazier E, Storch V and Braunbeck T (1992) Cytopathology of spleen in eel *Anguilla anguilla* exposed to a chemical spill in the Rhine river. *Dis Aquat Org*, 14: 1-22.
- Steinhagen D, Kruse P and Körting W (1990) Some Haematological Observations on Carp *Cyprinus carpio* L.. Experimentally infected with *Trypanoplasma borelli* Laveran & Mesnil. 1901 (Protozoa: Kitenoplastida). *Journal of Fish Diseases*, 14: 157-162.
- Svobodová Z and Vykusová B (1991) Diagnostics, prevention and therapy of fish diseases and intoxications. <http://www.fao.org>.
- Temmink JH and Bayne CJ (1987) Ultrastructural characterization of leucocytes in the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*, L.). *Dev Comp Immunol*, 11: 125-137.
- Weinberg SR, Siegel CD and Gordon AS (1972) Studies on the peripheral blood cell parameters and morphology of the red paradise fish, *Macropodus opercularis*. Effect of food deprivation on erythropoiesis. *Anat Rec*, 175: 5-14.
- Weinreb EL (1963) Studies on the Fine Structure of Teleost Blood Cells. I. Peripheral blood cells. *Anat Rec*, 147: 219-238.
- Werzberg A (1911) Studien zur vergleichenden Haemozytologie einiger poikilothermer Vertebraten. *Folia Haematol*, 11: 17-193.

- White MR (2000) Performing diagnostic procedures on salmonid fishes. Compendium on continuing education for the practicing veterinarian, 22: 160-166.
- Zapata A (1980) Splenic erythropoiesis and thrombopoiesis in elasmobranchs: An ultrastructural study. Acta Zool, 61: 59-64.
- Zohar Y, Harel M, Hassin S and Tandler A (1995) Gilt-head Sea Bream (*Sparus aurata*). In: Broodstock Management and Egg and Larval Quality (eds N.R. Bromage & R.J. Roberts). Blackwell Science, Oxford. p. 94-117.
- Βασικά στοιχεία σχετικά με την Κοινή Αλιευτική Πολιτική, Έκδοση 2008, Βέλγιο.
<http://ec.europa.eu/fisheries>.
- Παπουτσόγλου Σ (1994) Μαθήματα Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας. Ειδικό Μέρος. Εκτροφές Υδρόβιων Οργανισμών. Σ. Γαβριήλ, Αθήνα. σελ. 194.
- Παπουτσόγλου Σ (1997) Εισαγωγή στις Υδατοκαλλιέργειες. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- Πάσχος Γ (2004) Ιχθυοκαλλιέργειες εσωτερικών υδάτων, Β΄ έκδοση, Ιωάννινα.
<http://www.fishbase.org>.