

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Χρήση διατροφφαρμακευτικών στις υδατοκαλλιέργειες»**

**Αναστασία Βεργίδου**

**Βολος 2014**

## **«Χρήση διατροφφαρμακευτικών στις υδατοκαλλιέργειες»**

### Τριμελής εξεταστική επιτροπή

1. **Γκολομάζου Ελένη**, Λέκτορας, Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Επιβλέπων***,
2. **Καραπαναγιωτίδης Ιωάννης**, Λέκτορας, Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμός, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μελος***,
3. **Παναγιωτάκη Παναγιώτα**, Αναπληρώτρια καθηγήτρια, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μελος***.

**Στην οικογένεια μου**

### **Ευχαριστίες**

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα της εργασίας αυτής, κα. Γκολομάζου Ελένη για την πολύτιμη βοήθειά της και τη διαρκή υποστήριξη, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κ. Καραπαναγιωτίδη Ιωάννη και κα. Παναγιωτάκη Παναγιώτα, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον φίλο και συνεργάτη κ. Γεροντή Θοδωρή για την άμεση, ανιδιοτελή βοήθειά κατά την διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους δικούς μου ανθρώπους, για τη υποστήριξη τους, ο καθένας με τον δικό του τρόπο αλλά εξίσου σημαντικό.

## Περίληψη

Πολλές ουσίες φυτικής προέλευσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διατροφολογικές (ανοσοενισχυτικές). Δηλαδή, ουσίες που αποτελούν μέρος ενός τροφίμου με ιατρικά οφέλη, θεραπευτικές ιδιότητες, πρόληψη και καταπολέμηση ασθενειών. Η χρήση ανοσοενισχυτικών στις υδατοκαλλιέργειες ξεκίνησε λόγω της ασύνετης δόσολογίας αντιβιοτικών σε αυτές (ευδοκίμηση ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών και μείωση της αποτελεσματικότητάς τους) και δημιουργήθηκε η ανάγκη προστασίας των ψαριών από ασθένειες με νέους τρόπους. Σύμφωνα με μελέτες τα ανοσοενισχυτικά στις υδατοκαλλιέργειες επιφέρουν ευημερία, υγεία και παραγωγή ιχθύων. Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν δύο ουσίες φυτικής προέλευσης για την ανοσοενισχυτική τους δράση στην εκτροφή ιχθύων, το σκόρδο (*Allium sativum*) και η εχινάκεια (*Echinacea*), σε σύγκριση με την συμβατική τροφή. Σκόνη αυτών των ουσιών ενσωματώθηκε στο σιτηρέσιο των ψαριών και δημιουργήθηκε η τελική τροφή υπό την μορφή πελλέτας. Το πειραματικό ψάρι που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Ευρωπαϊκό χέλι (*Anguilla anguilla*) και η εκτροφή διήρκησε 30 ημέρες με τάισμα μια φορά την ημέρα. Στο πείραμα μετρήθηκαν η ένταση παρασίτωσης και η καταστροφή DNA στα ηπατοκύτταρα των χελιών. Η ένταση παρασίτωσης υπολογίστηκε με την καταμέτρηση παρασίτων στην αρχή και στο τέλος του πειράματος. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της καταστροφής του DNA στα ηπατοκύτταρα ήταν η «comet assay» ή «ανάλυση κομητών». Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το σκόρδο στην διατροφή των χελιών βοηθάει στην καταπολέμηση των παρασίτων σε ικανοποιητικό βαθμό σε σχέση με την συμβατική τροφή ενώ η εχινάκεια δε συνείσφερε στην θανάτωση παρασίτων. Το σκόρδο και η εχινάκεια δεν προκαλούν γενετοξικότητα και καταστροφή του DNA των χελιών.

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	9
1.1 Τα διατροφολογικά	9
1.2 Τα ανοσοενισχυτικά	9
1.2.1 Τα ανοσοενισχυτικά και οι υδατοκαλλιέργειες	9
1.3 Βιταμίνες	10
1.3.1 Οι βιταμίνες στην εκτροφή ιχθύων	11
1.4 Προβιοτικά	11
1.5 Πρεβιοτικά	12
1.5.1 Πρεβιοτικά και εκτροφή ιχθύων	13
1.6 Τα συμβιωτικά	13
1.7 Βότανα-Φυτά-Αιθέρια Έλαια-Φύκη	13
1.8 <i>Allium sativum</i> (Σκόρδο)	14
1.9 <i>Echinacea</i> (Εχινάκεια)	15
1.10 <i>Anguilla Anguilla</i> (Χέλι)	16
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	19
2.1 Πειραματικά ψάρια και συνθήκες εκτροφής	19
2.2 Πειραματικά σιτηρέσια	22
2.3 Δειγματοληψία	24
2.4 Παρασιτολογική Εξέταση	25
2.6 Απομόνωση ηπατοκυττάρων	26
2.7 Ανάλυση κομητών (Comet assay)	27
2.9 Επίστρωση αгарόζης σε αντικειμενοφόρο πλάκα	28
2.10 Λύση, ηλεκτροφόρηση και μέτρηση των κομητών	29
2.11 Στατιστική Ανάλυση	30
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	32
3.1 Παρασιτολογική εξέταση	32
3.2 Εκτίμηση του ποσοστού προσβολής	34
3.3 Εκτίμηση έντασης παρασίτωσης	35
3.4 Απομόνωση υπατοκυττάρων	36
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	40
4.1 Διατροφολογικά φυτικής προέλευσης	40
4.2 Εχινάκεια και θεραπευτικές ιδιότητες	43
4.3 Σκόρδο και θεραπευτικές ιδιότητες στους ιχθύες	44

4.4 Εφαρμογές της τεχνικής «ανάλυσης κομητών» .....	45
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>48</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>49</b>
<b>7. ABSTRACT .....</b>	<b>57</b>



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Τα διατροφφαρμακευτικά

Κάθε ουσία που μπορεί να αποτελεί μέρος ή τμήμα ενός τροφίμου, το οποίο παρέχει ιατρικά οφέλη, προάγει την πρόληψη και συνεισφέρει στη θεραπεία ασθενειών ορίζεται ως διατροφφαρμακευτική (DeFelice, 1992).

### 1.2 Τα ανοσοενισχυτικά

Παραδοσιακά τα ανοσοενισχυτικά είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται για να ενισχύσουν την απόκριση ενός εμβολίου βασισμένες σε ένα αντιγόνο ή στην ικανότητα πρόληψης μιας μόλυνσης. Όμως, ένας δεύτερος ρόλος για τα ανοσοενισχυτικά έχει γίνει ιδιαίτερα σημαντικός. Αυτός της καθοδήγησης του τύπου προσαρμοστικής ανταπόκρισης, για να παραχθούν οι πιο αποτελεσματικές μορφές ανοσίας για κάθε συγκεκριμένο παθογόνο (Kenney *et al.*, 2010).

Τα ανοσοενισχυτικά έχουν διάφορους τρόπους δραστηριότητας. Τα στερεά ανοσοενισχυτικά μπορούν να παρατείνουν την δράση των αντιγόνων που εμπεριέχονται σε αυτά, προστατεύοντάς τα από τη γρήγορη αποδόμηση (Thompson *et al.*, 1993). Παράλληλα, μπορούν να συμπεριφέρθουν ως αποθήκες αντιγόνων μακράς διάρκειας (Anderson, 1992).

#### 1.2.1 Τα ανοσοενισχυτικά και οι υδατοκαλλιέργειες

Η ασύνετη χρήση αντιβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες, έχει ως κατάληξη την ευδοκίμηση ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών, με αποτέλεσμα τη μειωμένη αποτελεσματικότητά τους. Έτσι, έχει δημιουργηθεί η ανάγκη προστασίας των ψαριών από ασθένειες με καινούριους τρόπους, με θεραπευτικές ιδιότητες ουσιών ανόμοιας φύσεως από αυτής των συνηθισμένων φαρμάκων.

Η χρήση ανοσοενισχυτικών στις υδατοκαλλιέργειες επιφέρει βελτίωση στην ευημερία, την υγεία και την παραγωγή των ιχθύων (Bricknell *et al.*, 2005). Επιπρόσθετα, εντείνουν τους μη ειδικούς μηχανισμούς στους υδρόβιους οργανισμούς με την υπαγωγή τους σε βιολογικές και συνθετικές ενώσεις (Siwicki *et al.*, 1994).

Τα ανοσοενισχυτικά που χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι τα εξής:

- Βιταμίνες
- Προβιοτικά
- Πρεβιοτικά
- Αιθέρια έλαια, εκχυλίσματα βοτάνων και φύκη

### 1.3 Βιταμίνες

Οι βιταμίνες είναι οργανικά στοιχεία που χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις λιποδιαλυτές και τις υδατοδιαλυτές.

Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες είναι οι εξής: η βιταμίνη B1 (θειαμίνη), η βιταμίνη B2 (ριβοφλαβίνη), η βιταμίνη B5 (παντοθενικό οξύ), η βιταμίνη B3 (νιασίνη), η βιταμίνη B6 (πυριδοξίνη, η βιταμίνη B12 (κοβαλαμίνη), η βιταμίνη B9 (φολικό οξύ), η βιταμίνη H (βιοτίνη) και η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ).

Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες είναι: η βιταμίνη A (αξηροφθόλη), η βιταμίνη E (τοκοφερόλη), η βιταμίνη K (ναφθοκινάνη) και η βιταμίνη D (χοληκαλσιφερόλη).

Είναι ουσίες αναγκαιότητας σε μικρές ποσότητες, η πρόσληψη τους γίνεται κατά κύριο λόγο με την τροφή και συμμετέχουν σε βασικές λειτουργίες του οργανισμού όπως ο μεταβολισμός και η ανάπτυξη (Moe *et al.*, 2004). Εξυπηρετούν πολλές και διαφορετικές λειτουργίες του οργανισμού όπως της αιμόστασης, της

σάρωσης των ελεύθερων ριζών, την όραση, την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης και την σύνθεση του DNA (Hand *et al.*, 2000).

Η ενίσχυση και η υποκίνηση του ανοσοποιητικού συστήματος, με την χρήση φυσικών υπερασπιστών όπως οι βιταμίνες, συμβάλλει στην αποφυγή των αντιβιοτικών και την πρόληψη των ασθενειών. Οι βιταμίνες αντιμετωπίζουν άμεσα τις βακτηριακές και ιογενείς μολύνσεις όπως επίσης και το stress στους οργανισμούς. Οι βιταμίνες με την υψηλότερη ανοσοενισχυτική δράση είναι η βιταμίνη A, η C και η E.

### **1.3.1 Οι βιταμίνες στην εκτροφή ιχθύων**

Η έλλειψη βιταμινών στις σύγχρονες υδατοκαλλιέργειες έχει παρατηρηθεί ότι δημιουργεί μια σειρά προβλημάτων στην εκτροφή υδρόβιων οργανισμών. Για παράδειγμα τα περισσότερα είδη ψαριών δεν μπορούν να συνθέσουν την βιταμίνη C και έτσι πρέπει να την προμηθευτούν από την τροφή τους (Lovell, 2000). Έτσι, είναι ιδιαίτερα σημαντική η χορήγηση πολυβιταμινών με σκοπό την άρτια υγεία των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών (Qin *et al.*, 2001).

## **1.4 Προβιοτικά**

Είναι οι ζωντανοί μικροβιακοί οργανισμοί που χορηγούνται στην τροφή, με ευμενή επίδραση στην υγεία του πεπτικού συστήματος (Verschuere *et al.*, 2000).

Είναι ουσίες που συνεισφέρουν στην ισορροπία της εντερικής μικροχλωρίδας και τις λειτουργίες της.

Τα προβιοτικά ως μικροοργανισμοί χορηγούνται από το στόμα και οδηγούν σε οφέλη για την υγεία και χρησιμοποιούνται εκτενώς στην υδατοκαλλιέργεια για την καταπολέμηση ασθενειών, ιδίως κατά των βακτηριακών. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ζώα όπου τα βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ κυριαρχούν, ένα ευρύ φάσμα

μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών έχουν εξεταστεί στην υδατοκαλλιέργεια. Η συχνότερη πηγή αυτών των οργανισμών είναι το πεπτικό σύστημα του ζώου ξενιστή. Ο τρόπος δράσης τους περιλαμβάνει τον ανταγωνιστικό αποκλεισμό και της ανοσοτροποποίησης. Τα προβιοτικά μπορούν επίσης να βελτιώσουν την όρεξη και να οδηγήσουν σε αύξηση της ανάπτυξης και καλύτερη μετατροπή των ζωοτροφών (Newaj-Fyzul, 2014)

Στις υδατοκαλλιέργειες η εφαρμογή των προβιοτικών ξεκίνησε σχετικά πρόσφατα, όμως το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας αυξάνεται συνεχώς (Gatesoupe, 1999). Αύτη η εφαρμογή φαίνεται πολλά υποσχόμενη αλλά χρειάζεται υπολογίσιμες προσπάθειες έρευνας. Ωστόσο, ένας μεγάλος αριθμός προβιοτικών προϊόντων έχει μελετηθεί εξονυχιστικά και έχει αποδειχθεί η αποτελεσματική τους χρήση στις ιχθυοκαλλιέργειες, με ωφέλειες στην αύξηση της παραγωγής των εκτρεφόμενων ψαριών (Pandiyan *et al.*, 2013).

### 1.5 Πρεβιοτικά

Τα πρεβιοτικά είναι ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι είναι μη εύπεπτοι από τα πεπτικά ένζυμα του καταναλωτή και επιλεκτικά αυξάνουν τη δραστηριότητα ορισμένων ομάδων των ωφέλιμων βακτηρίων. Στο έντερο τα πρεβιοτικά υπόκεινται σε ζύμωση από τα ευεργετικά βακτήρια που παράγουν λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (Al-Sheraji *et al.*, 2013) με σκοπό την αναβάθμιση και την καλλιέργεια της υγείας του ξενιστή (Gibson *et al.*, 2005). Τούτέστι, τα πρεβιοτικά κατευθύνονται ανέπαφα στο έντερο του καταναλωτή και ωφελούν τις εργασίες συγκεκριμένων ευεργετικών βακτηρίων, των προβιοτικών και έτσι ενδυναμώνουν το ανοσοποιητικό σύστημα.

### 1.5.1 Πρεβιοτικά και εκτροφή ιχθύων

Αυτή τη στιγμή η εφαρμογή πρεβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες ως ανοσοενισχυτικά βρίσκει περιορισμένη χρήση όμως το ενδιαφέρον είναι συνεχώς αυξανόμενο. Κάποια από τα συνηθέστερα που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες είναι η ινουλίνη, οι φρουκτοολισακχαρίτες (FOS) και οι γαλακτοολισακχαρίτες (TOS) (Li, 2005).

### 1.6 Τα συμβιωτικά

Ο συνδυασμός των προβιοτικών με τα πρεβιοτικά πραγματοποιείται με σκοπό την εκμετάλλευση των συνεργιστικών τους δράσεων, αυτοί οι συνδυασμοί ονομάζονται συμβιωτικά. Σκοπός τους είναι η περαιτέρω ενίσχυση της προσπάθειας εγκατάστασης των μικροβιακών προσθέτων της τροφής στο πεπτικό σωλήνα και η διατήρησή τους εκεί.

### 1.7 Βότανα-Φυτά-Αιθέρια Έλαια-Φύκη

Η χρησιμοποίηση βοτάνων ενισχύει την άμυνα του οργανισμού συμβάλλοντας στην πρόληψη ασθενειών σε συνδυασμό με μια ισορροπημένη διατροφή. Ένας μεγάλος αριθμός φυτών έχει χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική για την θεραπεία και τον έλεγχο αρκετών ασθενειών λόγω των ανοσοενισχυτικών τους δυνατοτήτων. Τα βότανα ως ανοσοενισχυτικά ενεργοποιούν τους μη ειδικούς ή έμφυτους μηχανισμούς ενάντια σε βακτηριακές, ιογενείς και κυτταρικές λοιμώξεις (Williams *et al.*, 2008).

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα βοτάνων και αρωματικών φυτών στη διατροφή ζώων, συνεισφέροντας στη δημιουργία υγιεινότερων και ασφαλέστερων προϊόντων. Λίγες όμως είναι οι δημοσιευμένες εργασίες που αφορούν τη θεραπευτική χρήση των βοτάνων στην εκτροφή υδρόβιων οργανισμών.

Η χρήση των βοτάνων πρέπει να γίνεται προσεκτικά, ύστερα από επιστημονική έρευνα διότι η επίδραση τους εξαρτάται από τη χορηγούμενη δόση και υπάρχει πάντα η πιθανότητα για υπερδοσολογία (Yin *et al.*, 2006). Η δοσολογία εξαρτάται από το είδος, το φύλο, την ηλικία και τον τύπο εκτροφής (Sudhakaran *et al.*, 2006).

Τα φύκη είναι γνωστά για την υψηλή θρεπτική τους αξία που οφείλεται στην παρουσία πρωτεϊνών, ιχνοστοιχείων και βιταμινών καθώς και για την αφθονία τους σε βιοδραστικές ενώσεις με πολλά οφέλη στην υγεία. Αντιβιοτικές ιδιότητες ενάντια σε βακτήρια, μύκητες και ιούς έχουν τα ακατέργαστα εκχυλίσματα αρκετών ειδών φυκών. Ο συνδυασμός των φυκών με τα βότανα μπορεί να έχει ευεργετικά αποτελέσματα στο ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων όπως έχει μελετηθεί (Peddie & Wardle, 2005), αλλά και αντιμικροβιακή δράση σε παθογόνα βακτήρια (Immanuel *et al.*, 2004).

### **1.8 *Allium sativum* (Σκόρδο)**

Το σκόρδο είναι μονοετές ή και πολυετές ποώδες φυτό και προέρχεται από την κεντρική και ανατολική Ασία. Ακολουθεί η ακριβής κατάταξή του:

Βασίλειο: Φυτά (Plantae)

Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)

Ομοταξία: Μονοκοτυλήδονα (Liliopsida)

Τάξη: Λειριώδη (Liliales)

Οικογένεια: Λειριοειδή (Liliaceae)

Γένος: *Άλλιον* (*Allium*)

Είδος: *A. sativum*

Το σκόρδο περιέχει αιθέρια έλαια με υψηλή συγκέντρωση σε θειούχες ενώσεις όπως η αλλισίνη, η αλλιίνη και το αχοένιο και αυτές είναι οι ενεργές ουσίες του. Είναι πλούσιο σε βιταμίνες B1, B2 και B3 και περιέχει ασβέστιο, σίδηρο, φώσφορο, σελήνιο και θειάφι. Επίσης περιέχει λευκωματούχες ουσίες, λιπαρές, αμυλώδες, κυτταρίνη και τέφρα χρήσιμα στοιχεία για τον οργανισμό.

Το σκόρδο χρησιμοποιείται ευρέως στην μαγειρική, στην λαϊκή αλλά και σύγχρονη ιατρική ως διατροφολογική ουσία. Έχει πολυάριθμες θεραπευτικές ιδιότητες και σημαντική ανοσοενισχυτική δράση.

### **1.9 *Echinacea* (Εχινάκεια)**

Η εχινάκεια είναι ποώδες ανθοφόρο φυτό και προέρχεται από την ανατολική και κεντρική Αμερική. Η συστηματική της κατάταξη είναι η εξής:

Βασίλειο: Φυτά (Plantae)

Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)

Ομοταξία: Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)

Τάξη: Αστερώδη (Asterales)

Οικογένεια: Αστεροειδή (Asteraceae)

Γένος: Ηλίανθος (Heliantheae)

Είδος: Εχινάκεια (*Echinacea*)

Η εχινάκεια αποτελείται από 9 είδη, από τα οποία μόνο τρία (*Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia*, *Echinacea pallida*) χρησιμοποιούνται για φαρμακευτικούς σκοπούς.

Τα συστατικά της εχινάκειας είναι πολυσακχαρίτες, γλυκοσίδια (εχινακίνη), πολυκετυλένια, αλκυλαμίδια, βεταΐνη, εχινολόνη, χουμουλένιο, χαλκό, σίδηρο, κάλιο, ινουλίνη, βιταμίνες Α, C και Ε, αιθέρια έλαια, φλαβονοειδή τα αλκαμίδια και το καφεϊκό οξύ (εχινικοσίδη, κυναρίνη). Επίσης, περιέχουν ουσίες που υπάγονται στην κατηγορία των φαινολών, οι οποίες έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

### 1.10 *Anguilla Anguilla* (Χέλι)

Το ψάρι που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το Ευρωπαϊκό χέλι (*Anguilla Anguilla*), η ακριβής κατάταξη του οποίου είναι η παρακάτω (Εικόνα ):



**Εικόνα 1:** Ευρωπαϊκό χέλι (*Anguilla Anguilla*).

Συνομοταξία : Χορδωτά

Ομοταξία : Ακτινοπτερύγιοι



Υφομοταξία: Νεοπτερύγιοι

Τάξη: Εγγελυόμορφα

Οικογένεια: Anguillidae

Γένος: Anguilla

Είδος: A. Anguilla

Τα χέλια γεννιούνται στη θάλασσα των Σαργασσών (στον Ατλαντικό ωκεανό) και επιστρέφουν μόνο στο στάδιο της γεννητικής ωριμότητας για την αναπαραγωγή τους (6 με 12 ετών για τα αρσενικά και 9 με 18 για τα θηλυκά) ενώ, στα πρώτα χρόνια της ανάπτυξής τους ζουν στις υδάτινες λεκάνες της Ευρώπης καταναλώνοντας πλαγκτόν μέχρι να φθάσουν στο στάδιο του «κίτρινου χελιού».

Οι προνύμφες παραμένουν στη θάλασσα των Σαργασσών από ένα έως δύο χρόνια και ακολούθως, μεταφέρονται με το ρεύμα του κόλπου για 200 έως 300 ημέρες στις ακτές της Ευρώπης. Στη νότια Ευρώπη καταφθάνουν από τις αρχές του χειμώνα και στη βόρεια μέχρι τις αρχές του επόμενου καλοκαιριού.

Τα χέλια χαρακτηρίζονται ως σοβαρά απειλούμενο είδος στον κόκκινο κατάλογο της Διεθνούς Ένωσης για τη Διατήρηση της Φύσης και των Φυσικών Πόρων (IUCN) και συμπεριλαμβάνονται στο ευρωπαϊκό σχέδιο αποκατάστασης από το 2007.

Τα χέλια δεν αναπαράγονται πλέον σε συνθήκες αιχμαλωσίας, οι καλλιέργειές τους βασίζονται σήμερα στην αιχμαλώτιση νεαρών χελιών τα οποία αναπτύσσονται με συνθήκες εντατικής εκτροφής, με τη χρήση συστημάτων ανακυκλοφορίας του νερού, κυρίως στις Κάτω Χώρες, στη Δανία και στην Ιταλία. Με την άφιξη των χελιών στις υδατοκαλλέργειες υπόκεινται σε καραντίνα για μερικές εβδομάδες και

πραγματοποιούνται προοληπτικές θεραπείες σε περίπτωση ασθενειών. Αρχικά, λαμβάνουν φυσικές τροφές και σταδιακά αντικαθίσταται με τροφές που έχουν ως βάση το ιχθυέλαιο και το ιχθυάλευρο. Στο βάρος των 5 γραμμαρίων μεταφέρονται σε δεξαμενές όπου και τρέφονται με μικρούς κόκκους εμπλουτισμένες με φυτικά εκχυλίσματα και ιχθυάλευρα. Μετά τα 50 γραμμάρια εκτρέφονται εντατικά σε μεγάλες δεξαμενές κατηγοριοποιημένα ανάλογα το μέγεθος τους. Τέλος, στο ενήλικο στάδιό τους διατίθενται στην αγορά ή επιστρέφονται στο οικοσύστημα.

Τα χέλια αποτελούν βασικό μέρος της διατροφής σε πολλές χώρες της Ευρώπης και της Ασίας. Τοιουτοτρόπως, μετά τη θανατωσή τους μεταποιούνται στα εκτροφεία και πωλούνται επεξεργασμένα ή νωπά. Καταναλώνονται με ποικίλους τρόπους καθώς υπάρχουν πολλές συνταγές για την παρασκευή τους (Ευρωπαϊκή Επιτροπή Αλιείας, αναρτήθηκε 20 Απριλίου 2012).

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Πειραματικά ψάρια και συνθήκες εκτροφής

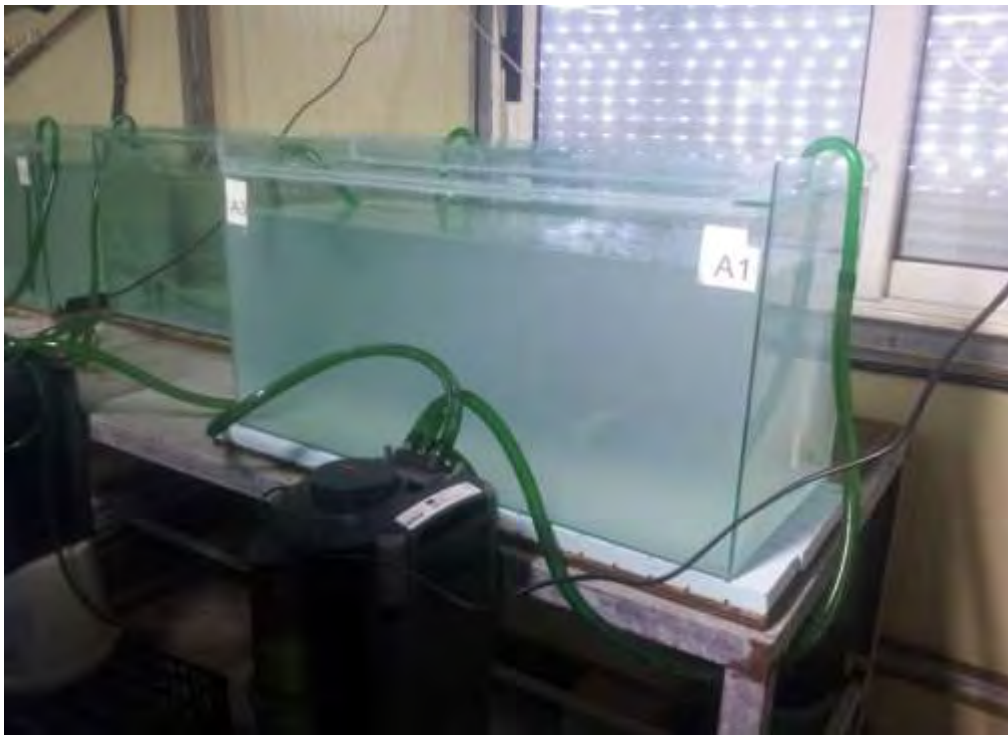
Τα πειραματικά ψάρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν ψαριά προερχόμενα από μονάδα εντατικής εκτροφής χελιών από την περιοχή της ΒΔ Ελλάδας. Χρησιμοποιήθηκαν τρία ενυδρεία στα οποία τοποθετήθηκαν συνολικά 60 ψάρια. Οι εγκαταστάσεις που εκτελέστηκε το πείραμα ήταν του Τμήματος Ιχθυολογίας και Υδατινου Περιβαλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.



**Εικόνα 2:** Εγκαταστάσεις διεξαγωγής του πειράματος.

Για την διεξαγωγή του πειράματος, δημιουργήθηκε κλειστό σύστημα κυκλοφορίας νερού. Στον εξοπλισμό του κλειστού συστήματος νερού, περιλαμβάνονταν:

- Τρία γυάλινα ενυδρεία χωρητικότητας 47 L
- Τρία φίλτρα καθαρισμού νερού
- Σύστημα παροχής οξυγόνου
- Σύστημα πλαστικών σωλήνων



**Είκονα 3:** Γυάλινο ενυδρείο όπου τοποθετήθηκαν τα χέλια και σύστημα παροχής οξυγόνου.



Εικόνα 4: Βιολογικό φίλτρο καθαρισμού του νερού

**Εικόνα 4:** Βιολογικό φίλτρο καθαρισμού του νερού

Για τον καθαρισμό του νερού χρησιμοποιήθηκαν μία σειρά από φίλτρα. Το κατώτερο νερό των τριών ενυδρείων, με την βοήθεια σωλήνων διοχετεύονταν στο μηχανικό και έπειτα στο βιολογικό φίλτρο. Στο μηχανικό φίλτρο, γινόταν η συγκράτηση των στερεών προϊόντων του μεταβολισμού και των υπολειμμάτων τροφής. Ακολούθως, το νερό διοχετεύονταν στο βιολογικό φίλτρο, το οποίο αποτελούνταν από ειδικές πέτρες αποτελούμενες από μικροπόρους για την ανάπτυξη των απονιτροποιητικών βακτηρίων του γένους *Nitrosomonas* και *Nitrobacter*, ώστε να επιτυγχάνεται η μετατροπή της αμμωνίας, σε νιτρώδη και νιτρικά. Στο ίδιο φίλτρο

είχε τοποθετηθεί και σύστημα παροχής οξυγόνου για τον εμπλουτισμό του ανακυκλούμενου νερού με διαλυμένο οξυγόνο. Πριν χρησιμοποιηθεί το κύκλωμα, τα ενυδρεία καθαρίστηκαν με ξύδι και νερό και ακολούθησε έκπλυση με νερό. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτροφή προερχόταν από τα δίκτυο ύδρευσης της περιοχής, νέες ποσότητες του οποίου προσθέτονταν σε καθημερινή βάση στο σύστημα εκτροφής για την ανανέωση του καθώς και σιφωνισμός (30%). Η διάρκεια σταθεροποίησης του νερού των ενυδρείων διήρκεσε μια εβδομάδα και η διάρκεια προσαρμογής τους ήταν μια ημέρα.

Στο κλειστό σύστημα κυκλοφορίας γλυκού νερού η θερμοκρασία ήταν  $21 \pm 0,2^\circ \text{C}$ , το pH  $8,28 \pm 0,27$  και το διαλυμένο οξυγόνο διατηρήθηκε  $>6,5 \text{ mg/L}$ .

## 2.2 Πειραματικά σιτηρέσια

Τα εκτρεφόμενα άτομα σιτίζονταν με βιομηχανική τροφή μια φορά την ημέρα. Μετά από δύο εβδομάδες εγκλιματισμού τα ψάρια χωρίστηκαν σε 3 διατροφικές ομάδες των 20 ψαριών και ξεκίνησε η εκτροφή τους με σκόρδο και εχινάκεια στα δυο ενυδρεία αντίστοιχα ενώ το τρίτο ενυδρείο ορίστηκε ως μάρτυρας (Πιν. ). Το σκόρδο και η εχινάκεια αποτελούσαν το 0,4% της τροφής και το καθημερινό σιτηρέσιο ήταν το 20% του σωματικού βάρους των ιχθύων.

**Πίνακας 1:** Ενυδρείο/ διατροφφαρμακευτική ουσία και αριθμός χελιών

Ενυδρείο/ Διατροφφαρμακευτική ουσία/ Αριθμός χελιών	Control	Σκόρδο	Εχινάκεια
1	20		
2		20	
3			20

Αναλυτικότερα τα συστατικά των πειραματικών σιτηρεσίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2

**Πίνακας 2:** Συστατικά των τριών πειραματικών σιτηρεσίων ανά κιλό τροφής

Σύσταση σε πρώτες ύλες	Μάρτυρας	Σκόρδο	Εχινάκεια
Ιχθυάλευρο	60,5	60,5	60,5
Σιτάρι, Άλευρο	19,5	19,1	19,1
Γλουτένη καλαμποκιού	15	15	15
Ιχθυέλαιο	4	4	4
Πρόμιγμα ανόργανων & βιταμινών	0,3	0,3	0,3
Αντιμυκυτιακό	0,2	0,2	0,2
Φωσφορικό Μονοασβέστιο	0,3	0,3	0,3
Vit C	0,1	0,1	0,1
Vit E	0,1	0,1	0,1

Σκόρδο	0	0,4	0
Εχινάκεια	0	0	0,4

**Πίνακας 3 :** Θρεπτική σύσταση σιτηρεσιών επί της %

	Control	Σκόρδο	Εχινάκεια
Ποσοστό %	100	100	100
Υγρασία	7,97	7,92	7,92
Ξηρή ουσία	91,33	91,38	91,38
Πρωτεΐνη	49,88	49,84	49,84
Λίπος	10,11	10,11	10,11
Υδατάνθρακες	19,54	19,24	19,24
Ινώδεις ουσίες	0,68	0,67	0,67
Τέφρα	12,49	12,89	12,89
Ενέργεια	19,11	19,04	19,04

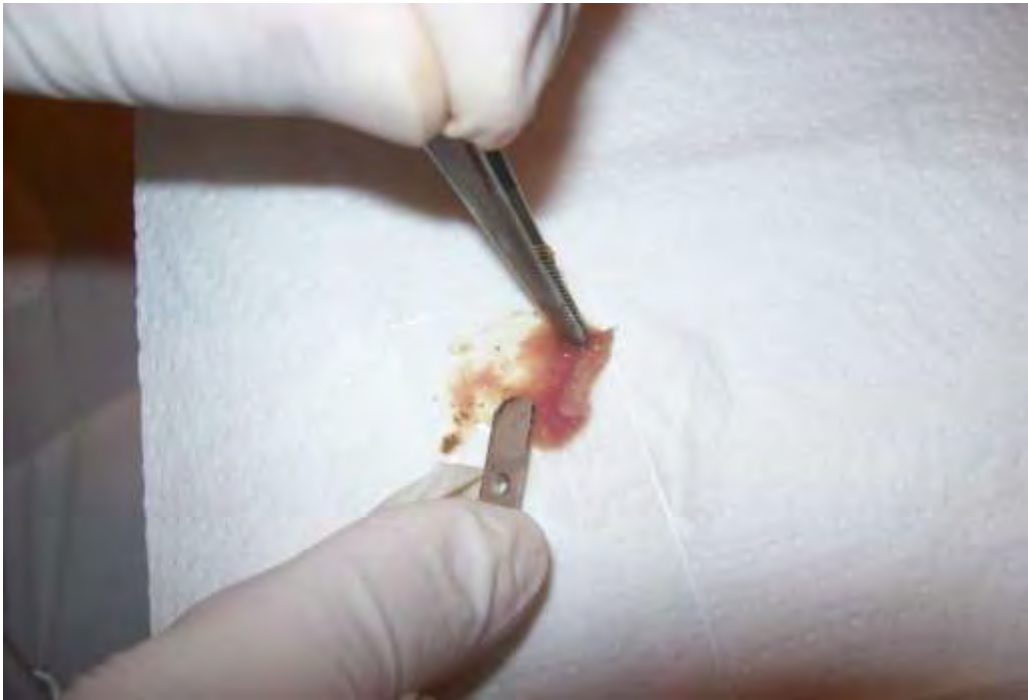
### 2.3 Δειγματοληψία

Η συνολική διάρκεια του διατροφικού πειράματος ήταν 30 ημέρες. Κατά τη διάρκεια του πειράματος γινόταν έλεγχος των θνησιμοτήτων. Ατομικά για κάθε ψάρι, ζυγίστηκε το σωματικό βάρος και μετρήθηκε το ολικό μήκος σώματος. Πέντε χέλια από κάθε ενυδρείο στην αρχή και στο τέλος του πειράματος, συλλέχθηκαν τυχαία και μεταφέρθηκαν σε δοχείο που περιείχε διαλυμένη ποσότητα αναισθητικού για τη θανάτωσή τους. Αμέσως μετά την θανάτωση, τα ψάρια μετρήθηκαν, ζυγίστηκαν και έγινε εκτομή για την αφαίρεση του ήπατος και των βραγχίων.

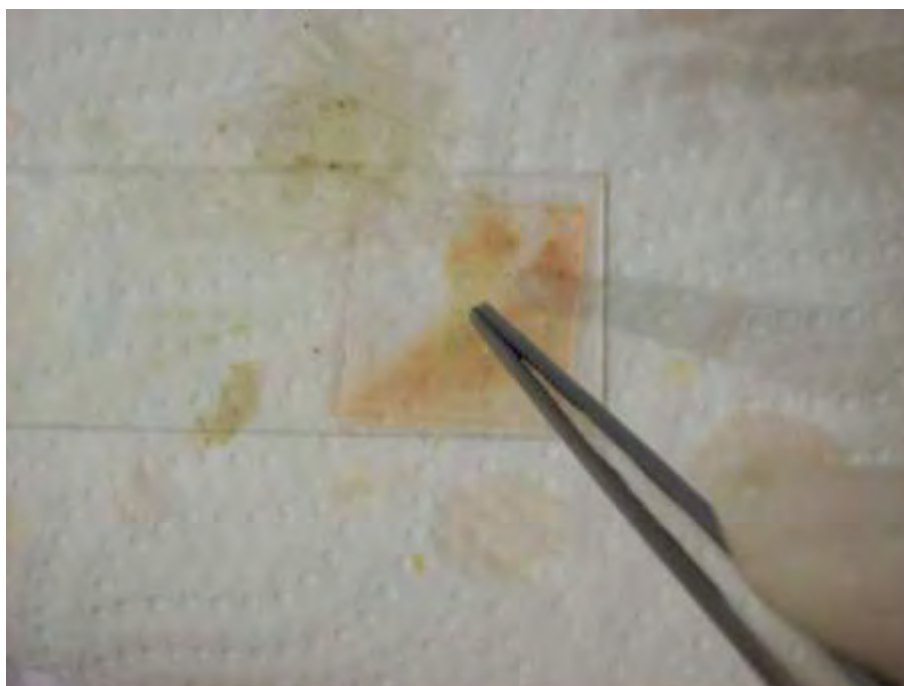


## 2.4 Παρασιτολογική Εξέταση

Στα ψάρια πραγματοποιήθηκε εξωτερική παρασιτολογική εξέταση νωπών παρασκευασμάτων από τα βράγχια για την ανίχνευση εξωπαρασίτων. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε κάθε παρασκεύασμα από μια σταγόνα φυσιολογικού ορού και τα δείγματα καλύφθηκαν με καλυπτρίδες. Μετα πραγματοποιήθηκε η εξέταση των παρασίτων σε οπτικό μικροσκόπιο, η καταμέτρησή.



**Εικόνα 5:** Τοποθέτηση βραγχίων χελιού σε καλυπτρίδα



**Εικόνα 6:** Τελικό δείγμα μετά από ξύσιμο βραγχίων χελιού για την ανίχνευση παρασίτων στο οπτικό μικροσκόπιο.

## 2.6 Απομόνωση ηπατοκυττάρων

Οι ιστοί του ήπατος μεταφέρθηκαν αμέσως σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου «Falcon» που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα HBSS (Hank's salt solution) και τοποθετήθηκαν πάνω στο πάγο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο για την απομόνωση των ηπατοκυττάρων. Το διάλυμα HBSS είναι ελεύθερο ασβεστίου και μαγνησίου, όπου το ασβέστιο επιδρά ανασταλτικά στο διαχωρισμό των κυττάρων του ιστού, ενώ το μαγνήσιο αναστέλλει τη δράση της κολλαγονάσης (Baksi & Frazier., 1990).

Η διαδικασία απομόνωσης κυττάρων που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία αποτελούνταν από δύο μέρη (Baksi & Frazier., 1990: Devaux *et al.*, 1997: Mitchelmore & Chipman., 1998). Στο πρώτο μέρος, γίνεται ο καθαρισμός του ιστού με διαδοχικές πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα HBSS ελεύθερο ασβεστίου-μαγνησίου (Ca ή Mg) και στο δεύτερο, διαδραματίζεται η αφομοίωση του ήπατος.

Αμέσως μετά τον καθαρισμό του ιστού, πραγματώνονται ενέσεις κολλαγονάσης (CLS, type I) συγκέντρωσης 0,04% (κολλαγονάση σε διάλυμα HBSS). Η κολλαγονάση είναι ένα ένζυμο το οποίο ευνοεί στο να αφομοιωθεί ο ιστός του ήπατος. Αφού γίνει η «πέψη» του ιστού για 15 λεπτά, το ήπαρ μεταφέρεται σε δισκίο “petri”, όπου και τεμαχίζεται σε μικρά τμήματα. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται πάνω σε τριμμένο πάγο. Όλο το τεμαχισμένο ήπαρ μαζί με το διάλυμα HBSS, το οποίο περιέχει κολλαγονάση, μεταφέρεται σε μικρό γυάλινο δοχείο ζέσεως και τοποθετείται πάνω σε μηχανήμα ανάδευσης για το χρονικό διάστημα του ενός τετάρτου της ώρας. Εν συνεχεία, το περιεχόμενο του δοχείου μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου «Falcon», αφού πρώτα στραγγιστεί με αποστειρωμένη γάζα. Ακολουθεί φυγοκέντριση του αιωρήματος των κυττάρων στις 2.000 στροφές για πέντε λεπτά και μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου κρατείται το pellet, και προστίθεται φρέσκο διάλυμα HBSS. Ακολουθούν δύο διαδοχικές πλύσεις με HBSS (φυγοκέντριση στις 2,000 στροφές για πέντε λεπτά) και τέλος το εναπομείναν pellet διαλύεται σε 7 – 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS (phosphatebufferedsaline). Η ποσότητα του διαλύματος PBS που προστίθεται υπολογίζεται ώστε η τελική συγκέντρωση των βιώσιμων κυττάρων να είναι 100.000/ml. Ο υπολογισμός του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων γίνεται με χρώση ηωσίνης συγκέντρωσης 4% (5μl χρωστικής σε περίπου 45μl κυτταρικού αιωρήματος) και καταμέτρησή τους σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer.

## 2.7 Ανάλυση κομητών (Comet assay)

Η ανάλυση κομητών ή comet assay είναι μια αρκετά ευπαθής τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση της βλάβης του DNA σε επίπεδο απομονωμένων κυττάρων. Σε αυτή τη τεχνική της μικρο-γέλης ηλεκτροφόρησης, ένας μικρός αριθμός

κυττάρων, όπως κύτταρα που προέρχονται από καλλιέργειες ή κύτταρα που απομονώνονται από διάφορους ιστούς, τοποθετούνται με τη μορφή αιωρήματος σε λεπτό στρώμα αγαρόζης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Τα κύτταρα λύνονται από διάλυμα κορεσμένο σε άλας NaCl. Σχηματίζονται πυρήνες αποτελούμενοι από μη νουκλεοσωμικό αλλά υπερελικωμένο DNA. Ακολουθώντας της ηλεκτροφόρησης και της χρώσης τους με τη φθορίζουσα ουσία, βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), τα κύτταρα με βλάβη στο DNA, εμφανίζουν αυξημένη μετανάστευση του κερματισμένου χρωμοσωμικού DNA από τον πυρήνα προς την άνοδο, λαμβάνοντας το σχήμα του κομήτη. Η εφαρμογή της μεθόδου σε αλκαλικό περιβάλλον είναι η πιο συχνή και το ποσοστό των θραυσμάτων που μεταναστεύουν, είναι ανάλογο της βλάβης του DNA. Μεταξύ των παραμέτρων που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του ποσοστού του κερματισμένου DNA, είναι η εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά του κομήτη, η εκατοστιαία αναλογία του DNA στον πυρήνα, το μήκος της ουράς, η διάμετρος του πυρήνα, το συνολικό μήκος του κομήτη και η παράμετρος TM-TailMoment, όπου ορίζεται ως το γινόμενο του μήκους της ουράς, επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη και η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ως μέτρο κερματισμού το DNA.

## **2.9 Επίστρωση αγαρόζης σε αντικειμενοφόρο πλάκα**

Μετά την απομόνωση των ηπατικών κυττάρων, ακολούθησε η τοποθέτησή τους με τη μορφή αιωρήματος (20μL) σε λεπτή στρώση αγαρόζη σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Προηγουμένως, η αντικειμενοφόρος πλάκα είχε εμβαπτισθεί σε καθαρή αλκοόλη και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στους -20°C για 30 λεπτά. Παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης (NMP NormalMeltingPoint) συγκέντρωσης 0,5% σε διάλυμα PBS. Μετά την ανάδυσή και την ομογενοποίηση του, το διάλυμα

τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για μικρό χρονικό διάστημα (2 λεπτά) μέχρι να γίνει διαυγές. Αφού στέγνωσε η αντικειμενοφόρος πλάκα από την αιθανόλη, εμβαπτίστηκε στη ζεστή αгарόζη (>60 °C) για σύντομο χρονικό διάστημα (4 sec), ώστε να επικαθήσει στην κρύα και καθαρή επιφάνειά της. Αμέσως μετά, αφαιρέθηκε από την αгарόζη, καθαρίστηκε προσεχτικά η κάτω επιφάνειά της και τοποθετήθηκε πάνω σε πάγο για να ζελατινοποιηθεί.

Ένα δεύτερο διάλυμα, αгарόζης (LMP LowMeltingPoint) συγκέντρωσης 0,5% παρασκευάστηκε με τον ίδιο τρόπο, για την ανάμιξή του με το κυτταρικό αιώρημα. Όταν έφτασε σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C), 20μl κυτταρικού αιωρήματος προστέθηκαν σε 80μl αгарόζης (LMP) και τοποθετήθηκαν στην αντικειμενοφόρο πλάκα που ήταν καλυμμένη με πήκτωμα αгарόζης και τοποθετήθηκε η καλυπτρίδα. Η αντικειμενοφόρος πλάκα που έφερε τα κύτταρα τοποθετήθηκε σε πάγο για 15 λεπτά. Μετά τη ζελατινοποίηση και της δεύτερης στρώσης αгарόζης, η καλυπτρίδα απομακρύνθηκε με προσοχή.

## 2.10 Λύση, ηλεκτροφόρηση και μέτρηση των κομητών

Μετά το τέλος του προηγούμενου σταδίου, η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε σε διάλυμα λύσης. Το διάλυμα περιείχε άλας NaCl συγκέντρωσης 2.5 M, EDTA (ethylenediaminetetraaceticacid) συγκέντρωσης 100 mM, Tris συγκέντρωσης 10 mM και τέλος προστίθενται 1% Triton – X 100 και 10% DMSO (dimethylsulfoxide). Στη συνέχεια, το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με συμπυκνωμένο διάλυμα HCl ή NaOH (pH 10) και τοποθετήθηκε στους 40C για περίπου 30 λεπτά (το κρύο διάλυμα βοηθάει στη διατήρηση της σταθερότητας της αгарόζης) (Tice *et al.*, 2005). Στο κρύο διάλυμα λύσης, τοποθετήθηκαν οι αντικειμενοφόρες πλάκες (οι οποίες φέρουν τα ηπατικά κύτταρα) και παρέμειναν

στους 40C για τουλάχιστον μία ώρα. Κατά το ανωτέρω χρονικό διάστημα έλαβε χώρα η λύση των κυττάρων καθώς η κυτταρική μεμβράνη λύεται και το DNA σχηματίζει πυρήνες .

Πριν την ηλεκτροφόρηση, οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκαν στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης που περιείχε 1,5 l βασικό διάλυμα (pH>12,1 & 40C), όπου και παρέμειναν για 15 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη του DNA που είναι απαραίτητη για την ανίχνευση θραυσμάτων μονόκλωνου DNA. Το παραπάνω διάλυμα παρασκευάστηκε από 0,075 M NaOH και 1 mM EDTA σε απεσταγμένο νερό. Μετά την πάροδο των 15 λεπτών, ξεκίνησε η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε συνθήκες 25 V, 300 mA για χρονική διάρκεια 15 λεπτών (Mitchelmore & Chipman., 1998).

Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εκπλύθηκαν με προσοχή σε ουδέτερο διάλυμα (διάλυμα Tris 0,4 M), ώστε το βρωμιούχοαιθίδιο να μπορεί να δράσει κατά το στάδιο της χρώσης (McKelvey-Martin *et al.*, 1993). Σε κάθε αντικειμενοφόρο, προστέθηκαν 50μl βρωμιούχοαιθιδίου συγκέντρωσης 20μg/ml. Εκατό περίπου κύτταρα συλλέχτηκαν τυχαία από κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα τα οποία αναλύθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (ZeissAxiostarplus) εφοδιασμένο με φίλτρο διέγερσης και αποκοπής στα 515-560nm 590 nm αντίστοιχα, σε μεγέθυνση 40x. Οι εικόνες καταγράφονταν από βιντεοκάμερα υψηλής ανάλυσης και προβάλλονταν σε οθόνη H/Y μέσω του λογισμικού ProgResCapturePro 2.1, ενώ η επεξεργασία-ανάλυση των «κομητών» έγινε με το λειτουργικό πρόγραμμα CASP.

## 2.11 Στατιστική Ανάλυση

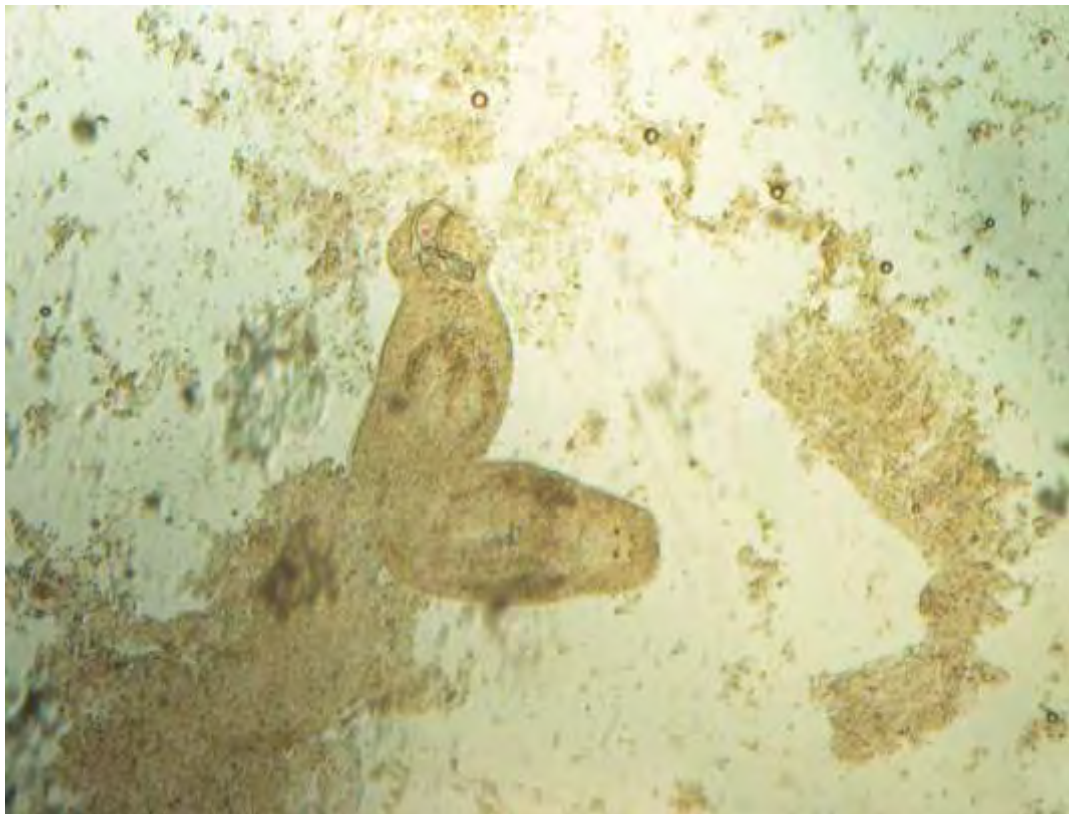
Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε στατιστικό πακέτο SPSS for Windows και Microsoft Excel. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε  $\alpha=0,05$ . Για τις

πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήθηκε μη παραμετρικό Tukey test (Zar, 1996).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

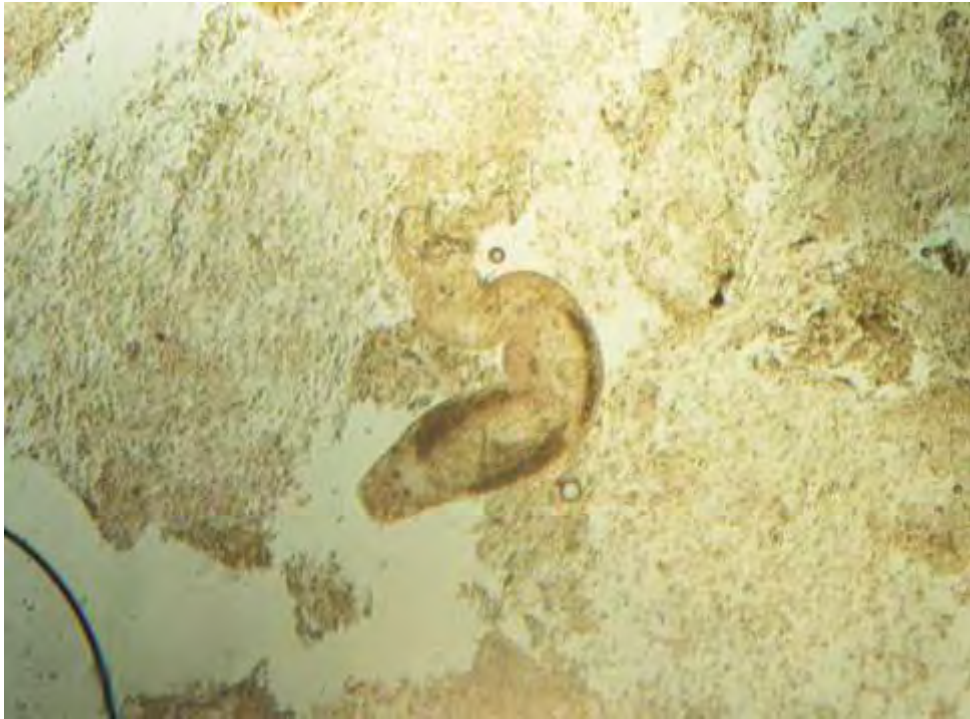
#### 3.1 Παρασιτολογική εξέταση

Μετά την εξέταση των δειγμάτων στο οπτικό μικροσκόπιο, παράσιτα ανιχνεύθηκαν στα βράγχια, νεκρά είτε ζωντανά. Τα παράσιτα αυτά κατηγοριοποιούνται στην ομάδα των μονογενών παρασίτων της τάξης *Dactylogyrida*, του είδους *Pseudodactylogyrus*.



**Εικόνα 7:** Παράσιτο

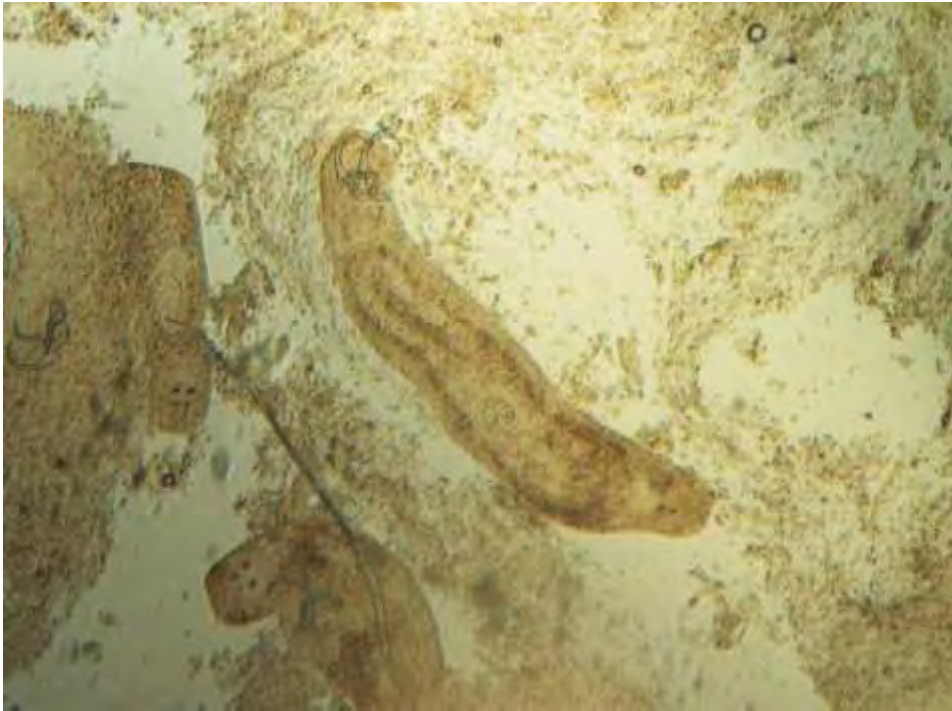




**Εικόνα 8:** Παράσιτο



**Εικόνα 9:** Παράσιτο

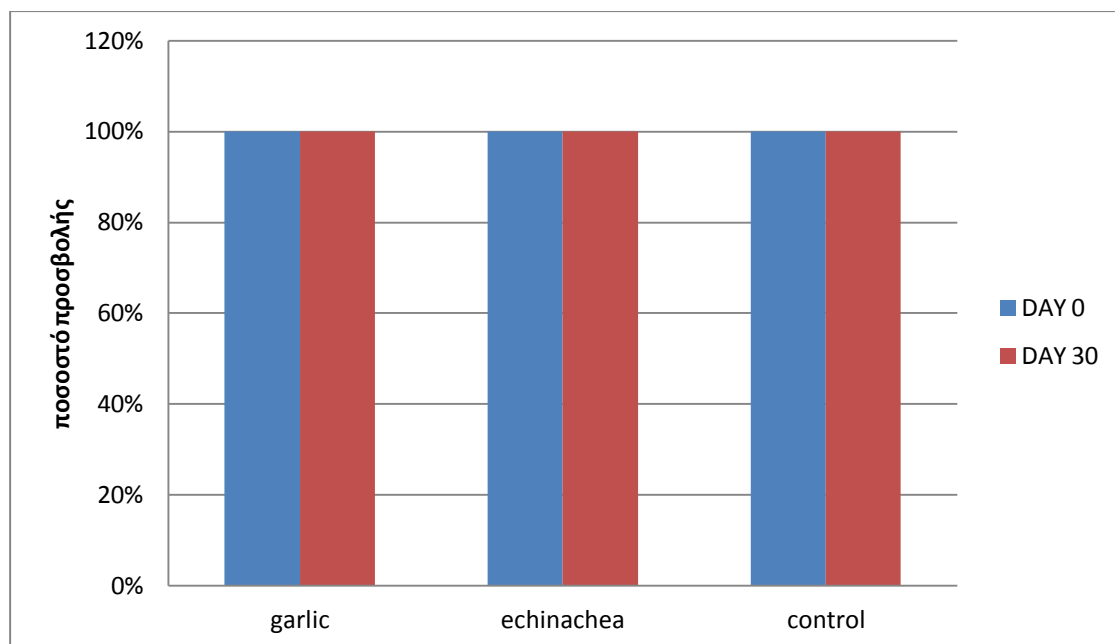


**Εικόνα 10:** Παράσιτο

### 3.2 Εκτίμηση του ποσοστού προσβολής

Στο Σχήμα 3.1 φαίνεται το ποσοστό προσβολής από το παρασίτο στα χέλια (*A. anguilla*), όπως υπολογίστηκε από τις δειγματοληψίες κατά την έναρξη του πειράματος (Day 0) και κατά την λήξη του (Day 30) για κάθε διατροφολογική ουσία (εχινάκεια και σκόρδο) και για τον μάρτυρα (Control).

Όπως παρατηρείται στο σχήμα όλοι οι ιχθύες είχαν προσβληθεί από παράσιτα σε κάθε μεταχείριση και σε κάθε διατροφολογική ουσία.

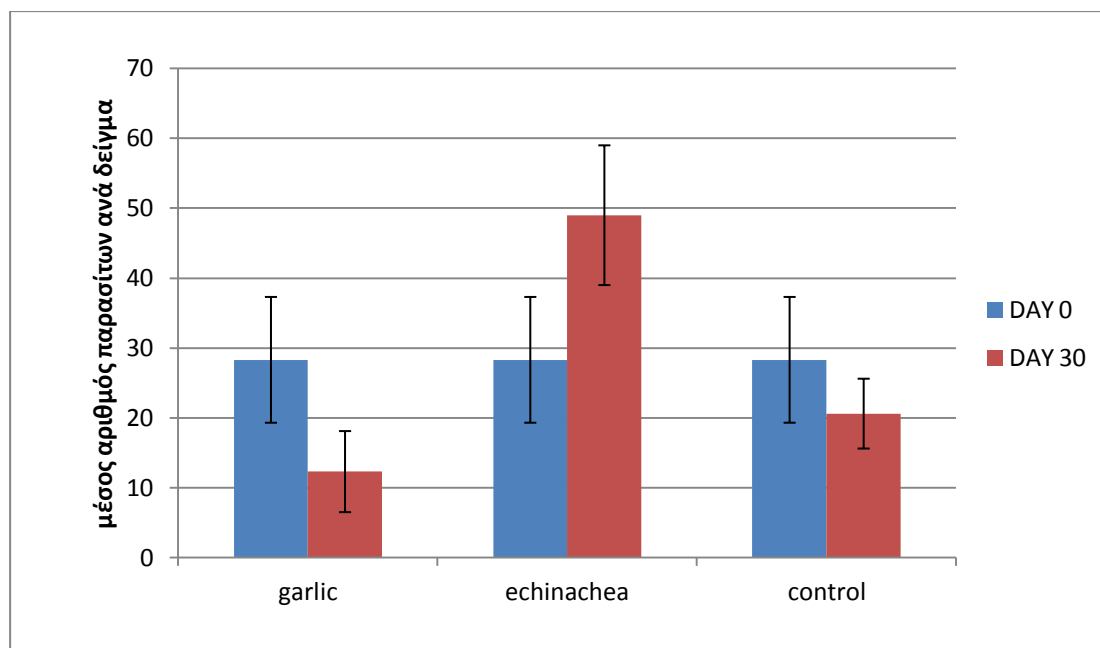


**Σχήμα 3.1 :** Ποσοστό προσβολής χελιών από τα παράσιτα για κάθε διατροφολογική ουσία (εχινάκεια και σκόρδο) και Control, στις δύο δειγματοληψίες (day0, day30).

### 3.3 Εκτίμηση έντασης παρασίτωσης

Στο Σχήμα 3.2 φαίνεται ο μέσος όρος αριθμού παρασίτων ανά δείγμα χελιών (*A. anguilla*) για κάθε ουσία εχινάκεια και σκόρδο και τον μάρτυρα (Control), κατά την έναρξη του πειράματος (Day 0) και κατά την λήξη του (Day 30), όπως υπολογίστηκε μετά την παρασιτολογική καταμέτρηση.

Όπως, διακρίνεται στο παρακάτω σχήμα ένας μεγάλος αριθμός παρασίτων ανά δείγμα υπήρχε στην πρώτη δειγματοληψία (Day 0) και στις τρεις διατροφικές ομάδες ψαριών. Στην δεύτερη δειγματοληψία, ο μέσος αριθμός παρασίτων ανά δείγμα μειώθηκε στο σκόρδο και στην control τροφή. Ενώ στην δεύτερη δειγματοληψία, στην εκτροφή με εχινάκεια ο μέσος αριθμός παρασίτων αυξήθηκε σε μεγάλο βαθμό.



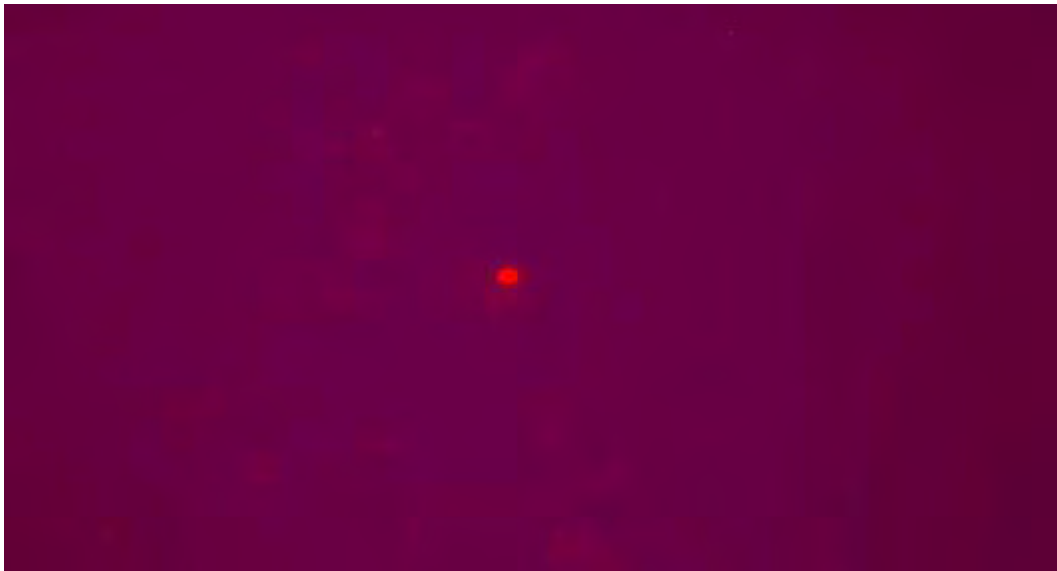
**Σχήμα 3.2 :** Μέσος όρος παρασίτων ανά δείγμα ιχθύων (*A. anguilla*) για κάθε ανοσοενισχυτική ουσία (σκόρδο, εχινάκεια) και Control στις δύο δειγματοληψίες (day0, day30).

### 3.4 Απομόνωση υπατοκυττάρων

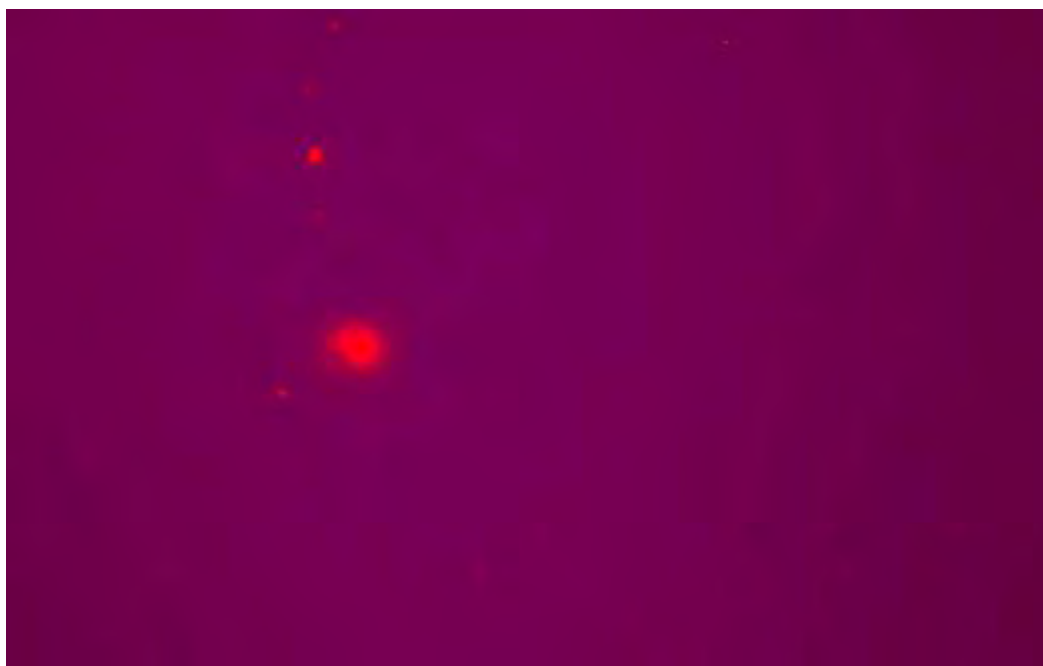
Τα κύτταρα που απομονώθηκαν ήταν από το ήπαρ χελιών (*A. anguilla*) και πραγματοποιήθηκε εντοπισμός των ζωντανών κυττάρων με τη χρήση χρώσης ιωσίνης ερυθρού χρώματος. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες για τον υπολογισμό των ζωντανών κυττάρων με σκοπό τη χρήση τους στις ακόλουθες διαδικασίες του πειράματος. Μια αρχική εκτίμηση της βλάβης του DNA προσδιορίζεται με το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας των κυττάρων και εν συνεχεία μετράται από την μετατόπιση μεταξύ του πυρήνα του κυττάρου (αλλιώς «κεφαλή του κομήτη») και την «ουρά» λόγω του κερματισμού του DNA του πυρήνα. Στο παρών πείραμα χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος TM – Tail Moment η οποία είναι το γινόμενο της ουράς επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη.



**Εικόνα :** Ηπατοκύτταρο χελιού (*Anguilla anguilla*) σε πήκτωμα αγαρόζης και αλκαλικό pH μετά από χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) όπως φαίνονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Το κύτταρο έχει ελάχιστο βαθμό κερματισμού, με αποτέλεσμα το DNA να παραμένει στον πυρήνα.



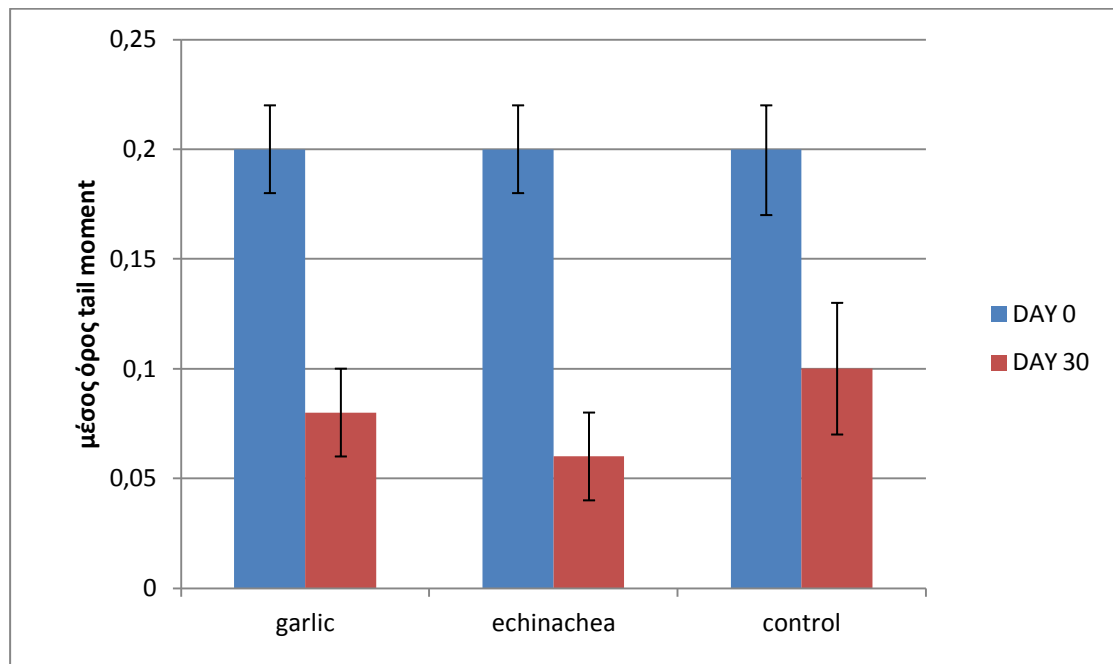
**Εικόνα :** Ηπατοκύτταρο χελιού (*Anguilla anguilla*) σε πήκτωμα αγαρόζης και αλκαλικό pH μετά από χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) όπως φαίνονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Το κύτταρο έχει με ελάχιστο βαθμό κερματισμού, με αποτέλεσμα το DNA να παραμένει στον πυρήνα.



**Εικόνα :** Ηπατοκύτταρο χελιού (*Anguilla anguilla*) σε πήκτωμα αγαρόζης και αλκαλικό pH μετά από χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Το κύτταρο έχει υποστεί ελάχιστο κερματισμό, το DNA μεταναστεύει έξω από το κυτταρικό σώμα (κεφαλή του κομήτη) και μέσα στο πήκτωμα της αγαρόζης (ουρά του κομήτη).

Στο παρακάτω Σχήμα 3.3 παρουσιάζεται ο μέσος όρος του Tail Moment για κάθε διατροφολογική ουσία εχινάκεια και σκόρδο και τον μάρτυρα (Control), κατά την έναρξη του πειράματος (Day 0) και κατά την λήξη του (Day 30), όπως υπολογίστηκε από την ανάλυση των κομητών.

Παρατηρήθηκε ότι το σκόρδο διαφέρει στατιστικώς σημαντικά με την εχινάκεια ( $\alpha < 0,05$ ) ενώ το σκόρδο δεν διαφέρει στατιστικώς σημαντικά με την control τροφή. Αντιθέτως, η εχινάκεια διαφέρει στατιστικώς σημαντικά με την control.



**Σχήμα 3.3 :** Μέσος όρος TM ανά δείγμα ιχθύων (*A. anguilla*) για κάθε ανοσοενισχυτική ουσία (σκόρδο, εχινάκεια) και Control στις δύο δειγματοληψίες (day0, day30).

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 Διατροφφαρμακευτικά φυτικής προέλευσης

Είναι γνωστό ότι τα βότανα έχουν ανοσοενισχυτικές ιδιότητες για τους οργανισμούς και έτσι βοηθούν στην πρόληψη ασθενειών ακόμη και στην καταπολέμηση τους. Πολλά φυτά χρησιμοποιούνται στην καθημερινή διατροφή από αρχαιοτάτων χρόνων για την ενίσχυση του οργανισμού. Ενίσχυση ενάντια σε βακτήρια, ιούς, παράσιτα και κυτταρικές λοιξώσεις.

- Οι ασθένειες των ψαριών που οφείλονται σε παράσιτα είναι ιδιαίτερες σημαντικές, διότι τα είδη των παρασίτων που ζουν εις βάρος των εμπορικών ψαριών είναι χιλιάδες ενώ πιθανότατα στο μέλλον θα ανακαλυφθούν και άλλα (Φώτης & Αγγελίδης, 2003). Τα μονογενή είναι τα πιο κοινά και πολυπληθή εξωπαρασιτικά τρηματώδη των ψαριών, με μεγαλύτερη ποικιλότητα ειδών να προκύπτει στις τροπικές περιοχές σε σύγκριση με τις εύκρατες του πλανήτη (Ramasamy *et al.*, 1995). Είναι εξωτερικά παράσιτα που παρατηρούνται σε όλες τις ομάδες ψαριών, αλλά έχουν μεγαλύτερη ποικιλότητα στους οστεϊχθύες, ενώ μόνο οχτώ οικογένειες έχουν καταγραφεί στους χονδριχθύες (Cribb *et al.*, 2002). Εκτιμάται ότι περισσότερο από το 95% των μονογενών απαντώνται ως παρασιτικές μορφές στο δέρμα και τα βράγχια των ψαριών (Euzet & Combes., 1998). Οι παθολογικές αλλαγές που παρατηρούνται στον ξενιστή οφείλονται σε υπερπλασία της μεμβράνης των βραγχίων αλλά και σε νέκρωση και αποσύνθεση των ιστών στα σημεία όπου τα παράσιτα τοποθετούν τα όργανα προσκόλλησης με τους ξενιστές.

Στις ιχθυοκαλλιέργειες, οι ειδικές περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η υψηλή θερμοκρασία σε συνδυασμό με υψηλή ιχθυοφόρτιση και η κακή διαχείριση της



εκτροφής ευνοούν καταστάσεις παρασιτισμού και ως αποτέλεσμα υψηλές θνησιμότητες στους πληθυσμούς. Είναι επομένως σαφές πως η γνώση του παρασιτικού φορτίου των ελεύθερων ψαριών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη ή την έγκαιρη διάγνωση μιας παθολογικής κατάστασης σε εκτρεφόμενα ψάρια, έτσι ώστε η τελευταία να αντιμετωπιστεί με όσο το δυνατόν λιγότερες απώλειες.

Λίγες είναι οι βιβλιογραφικές αναφορές στις θεραπευτικές ιδιότητες των βοτάνων στην εκτροφή υδρόβιων οργανισμών.

Μερικά από τα θετικά αποτελέσματα χρήσης βοτάνων και αιθέριων ελαίων στις υδατοκαλλιέργειες είναι τα εξής:

- η ενεργοποίηση του μηχανισμού φαγοκυττάρωσης και της εξωτερικής οξειδωτικής δραστηριότητας λευκοκυττάρων με την προσθήκη, στην τροφή ιριδίζουσας πέστροφας, εκχυλισμάτων των φυτών *Viscum album*, *Urtica dioica*, *Zingiber officinale* (Düğenci *et al.*, 2003)
- η ενίσχυση του ανοσοποιητικού, η αύξηση της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας και του συντελεστή μετατρεψιμότητας με τη χρήση των βοτάνων *Ocimum sanctum* και *Withania omnifera* στα νεαρά άτομα του *Epinephelus tauvina*, προστατεύοντας τα από το παθογόνο βακτήριο *Vibrio harveyi* (Sivaram *et al.*, 2004)
- η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού, ανυψώνοντας τα επίπεδα των ερυθρών αντισωμάτων και της γλοβουλίνης, του ινδικού κυπρίνου (*Catla catla*) με τη χρήση σπόρων του βοτάνου *Achyranthes aspera* Linn (Rao & Chakrabarti, 2005)
- η αύξηση της δραστηριότητας της αντιπρωτεάσης με τη χρήση του αιθέριου ελαίου μαύρου κύμινου (*Nigella sativa*) μαζί με εκχύλισμα

τσουκνίδας (Quercetin), στην ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) (Awad *et al.*, 2013)

- η καταπολέμηση παρασίτων με την συνεργιστική χρήση δυο βοτάνων *Dioscorea zingiberensis* και *Ginkgo biloba* σε μορφή σκόνης, στο ψάρι *Carassius auratus* (Jiang *et al.*, 2014)
- η καταπολέμηση του παρασίτου *Miamiensis avidus* έως και 80%, με τη διατροφολογική χρήση του εκχυλίσματος του βοτάνου *Suaeda maxima* (Harikrishnan *et al.*, 2012c)
- η μείωση της έντασης παρασίτωσης του *Ichthyophthirius multifiliis* με τη χρήση εκχυλίσματος του βοτάνου *Galla chinensis* (Qizhong *et al.*, 2013)
- η μείωση των θανάτων και η ενίσχυση της φαγοκυτταρικής και αναπνευστικής δραστηριότητας των φαγοκυττάρων του αίματος στα ψάρια του είδους *Oreochromis niloticus* εκτρεφόμενα με τον συνδιασμό δύο Κινέζικων βοτάνων (*Astragalus membranaceus* και *Lonicera japonica*) και μολυνσμένα με το βακτήριο *Aeromonas hydrphila* (Laszlo *et al.*, 2008)
- η διατροφή του ψαριού *Epinephelus coiides* με το βότανο *Sauropus androgynus* L. Merr είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού θνησιμότητάς από την προσβολή με το *Vibrio alginolyticus*, την αύξηση του σωματικού βάρους και ειδικού ρυθμού ανάπτυξης και την καλύτερη αναπνευστική λειτουργία (Samad *et al.*, 2014)
- η αύξηση του ποσοστού επιβίωσης του ψαριού *Cyprinus carpio* L. μολυνσμένου με το βακτήριο *Aeromonas hydrphila*, μετά την εκτροφή του για 80 ημέρες με το φυτό – βότανο *Rehmania glutinosa*

ενσωματωμένο στην τροφή του ψαριού υπό τη μορφή σκόνης από τις ρίζες του (Wang *et al.*, 2015)

- η ενσωμάτωση του βοτάνου *Mentha piperita* (peppermint) στην τροφή του ψαριού *Lates calcanifer* ενδυνάμωσε το ανοσοποιητικό του ενάντιο στο παθογόνο βακτήριο *V. harveyi*, ενεργοποίησε την ανάπτυξη και άυξησε το σωματικό βάρος στα προσβεβλημένα ψάρια (Talpur., 2014)

Η χρήση των βοτάνων πρέπει να γίνεται προσεκτικά, ύστερα από επιστημονική έρευνα διότι η επίδραση τους εξαρτάται από τη χορηγούμενη δόση και υπάρχει πάντα η πιθανότητα για υπερδοσολογία (Yin *et al.*, 2006).

#### 4.2 Εχινάκια και θεραπευτικές ιδιότητες

Η εχινάκεια είναι ένα φυτό – βότανο με ευεργετικές ιδιότητες και για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται ευρέως για φαρμακευτικούς σκοπούς. Είναι ένα ασφαλές φυσικό προϊόν με ανοσοενισχυτικές ιδιότητες και σύμμαχος για την αντιμετώπιση αρκετών ασθενειών στους οργανισμούς.

Στην παρούσα έρευνα η εκτροφή χελιών με εχινάκεια, στο καθημερινό σιτηρέσιό τους για 30 ημέρες, ενσωματωμένη υπό την μορφή σκόνης και δεν είχε σημαντική επίδραση στην θανάτωση παρασίτων και ούτε στη μείωση του ποσοστού προσβολής των ψαριών από παράσιτα.

Σχετικά με την ανοσοενισχυτική δράση της εχινάκεια έχουν παρατηρηθεί ερευνητικά τα παρακάτω :

- η εκτροφή γαρίδας (*Litopenaeus vannamei*) με τροφή ψεκασμένη με σκόνη εχινάκειας (*Echinacea purpurea*) για 30 ημέρες βοήθησε στην

αντιμετώπιση της ασθένειας λευκή κηλίδωση (Medina-Beltran *et al.*, 2012)

#### 4.3 Σκόρδο και θεραπευτικές ιδιότητες στους ιχθύες

Το σκόρδο έχει πολυάριθμες θεραπευτικές ιδιότητες και σημαντική ανοσοενισχυτική δράση στον οργανισμό. Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για δράση του σκόρδου στους οργανισμούς για την καταπολέμηση ασθενειών όλων των μορφών.

Στην παρούσα έρευνα η εκτροφή χελιών με σκόρδο, στο καθημερινό σιτηρέσιό τους για 30 ημέρες, ενσωματωμένο υπό την μορφή σκόνης μείωσε την προσβολή παρασίτων και αύξησε τα ποσοστά θνησιμότητάς αυτών.

Σχετικά με την παρασιτική δράση του σκόρδου έχουν παρατηρηθεί τα εξής αποτελέσματα σε διάφορες έρευνες:

- η χρήση σκόρδου ενσωματωμένο στην τροφή του ψαριού *Lates calcarifer* (barramundi) για 30 ημέρες μείωσε σημαντικά την προσβολή από τα παράσιτα του είδους *Neobenedenia* sp. έως και 70% σε σύγκριση με την control τροφή και δεν επηρεάστηκε η γευστικότητα της τροφής (Militz *et al.*, 2013)
- η χρήση εκχυλίσματος σκόρδου στην εκτροφή του ψαριού *Poecilia reticulate* (guppy) μολυσμένου με το παράσιτο του είδους *Gyrodactylus turnbulli*, έδειξε την αποκόλληση των παρασίτων και ακινησία γεγονός που υποδεικνύει των θάνατό τους. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν στοματικές θεραπείες με ξηρή σκόνη σκόρδου στο ίδιο ψάρι, μολυνόμενο με τα παράσιτα *G. Turnbulli* και *Dactylogyrus* sp. για 14 ημέρες και ως αποτέλεσμα μειώθηκε η μέση

επικράτηση και η μέση ένταση παρασίτωσης σε σχέση με την control (Fridman *et al.*, 2014)

- η θεραπεία με μπάνιο εκχυλίσματος σκόρδου για την καταπολέμηση του παρασίτου *Ichthyophthirius multifiliis* στο ψάρι *Poecilia latipinna* (sail fin molly) μειώνει τις θνησιμότητες λόγω παρασίτωσης και γενικότερα την υγεία των ψαριών (Gholipour-Kanani *et al.*, 2012)
- η χρήση εκχυλίσματος σκόρδου σε εκτροφή ψαριών βοήθησε στην θανάτωση των παρασίτων υπεύθυνων για την ασθένεια λευκής κηλίδωσης (white spot disease) (Buchmann *et al.*, 2003)

#### 4.4 Εφαρμογές της τεχνικής «ανάλυσης κομητών»

Οι κύριες εφαρμογές της μεθόδου είναι η μελέτη του μηχανισμού βλάβης του DNA και της βιολογικής σημασίας αυτής, η καταγραφή των μεταλλαξιογόνων και των καρκινογόνων ουσιών, ο έλεγχος της δράσης των αντιοξειδωτικών ουσιών και ο συνδυασμός των παραπάνω για την εκτίμηση του στρες σε ζωντανούς οργανισμούς.

Ιδιαίτερα η μελέτη της επίδραση τοξικών ουσιών στο DNA υδρόβιων οργανισμών είναι σπουδαίας σημασίας και συσχετίζεται με την καρκινογένεση. Μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει την υψηλή συγκέντρωση γενετικών ανωμαλιών και οδηγεί στον δυσέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ακολουθώντας, μέσω των γενετικών κυττάρων, η υψηλή δραστηριότητα των τοξικών ουσιών συνεισφέρει στη δημιουργία κληρονομικών ανωμαλιών, στην τερατογένεση και επηρεάζει την προσαρμοστικότητα των ατόμων στο φυσικό τους περιβάλλον. Στους υδρόβιους εκτρεφόμενους οργανισμούς τα προβλήματα αναπαραγωγής είναι σημαντικότερα από τα προβλήματα που προκαλούνται λόγω καρκινογένεσης (Mitchelmore & Chipman.,

1998) κυρίως για οικονομικούς λόγους, αλλά και για λόγους υγείας των καταναλωτών.

Η αξιολόγηση της τοξικότητας γενικά στους υδρόβιους οργανισμούς, είτε στο εργαστήριο, είτε στο πεδίο, γίνεται σε επίπεδο μορίων ή χρωμοσωμάτων. Η επίπτωση μιας μετάλλαξης στο DNA είναι δύσκολο να προβλεφθεί εκτός αν αναλυθεί και μελετηθεί εκτεταμένως και επισταμένως η συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος. Ακόμη η φύση των μεταλλαξιογόνων παραγόντων είναι δύσκολο να προσδιοριστεί. Από την άλλη, συγκεκριμένες καρκινογόνες – μεταλλαξιογόνες ουσίες είναι δυνατό να βρεθούν με την χρήση αντισωμάτων. Η συγκεκριμένη πληροφορία είναι χαρακτηριστική για τη μεταβολή στο DNA, αλλά μόνο υποθέσεις μπορούμε να κάνουμε για το αντίκτυπο που θα επακολουθήσει, λόγω καρκινογένεσης. Εξειδικευμένη ανίχνευση των μεταλλαξιογόνων ουσιών είναι δύσκολο να γίνει στο πεδίο, λόγω της πληθώρας των τοξικών ουσιών και των περιορισμένων γνώσεων που διαθέτουμε για το σύνολό τους (Mitchelmore and Chipman, 1998).

Η δημιουργία θραυσμάτων συσχετίζεται με τις μεταλλαξιογόνες και καρκινογόνες ιδιότητες μερικών τοξικών ρυπαντών. Ήταν γνωστό ότι έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες οδηγεί σε απώλεια της ακεραιότητας του DNA, και επομένως είναι σημαντικός ο υπολογισμός των θραυσμάτων των κλώνων του μορίου, ως δείκτη τοξικότητας (Shugart., 1990).

Οι μηχανισμοί που προκαλούν τη θραύση του μονόκλωνου ή δίκλωνου DNA, είναι πολλοί και διαφορετικοί. Όπως προαναφέρθηκε κερματισμός του DNA προκαλείται εκτός από την ιονίζουσα ακτινοβολία και στις ευαίσθητες σε αλκαλικό περιβάλλον περιοχές του DNA, του ενεργού οξυγόνου, με την επίδραση της υπερϊώδους ακτινοβολίας και άλλων δραστικών ενδιάμεσων χημικών προϊόντων. Επιπρόσθετα, συχνή είναι η δημιουργία θραυσμάτων κατά την επιδιόρθωση εκτομής.

Συνεπώς, η μέτρηση των θραυσμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο εκτίμησης της τοξικότητας ενός μεγάλου φάσματος τοξικών ουσιών που δρουν με διαφορετικούς τρόπους. Είναι σημαντική η διευκρίνιση ότι θραύσματα μπορούν να δημιουργηθούν μέσω μηχανισμών που δε σχετίζονται άμεσα με την τοξικότητα των παραγόντων. Θράυση του DNA μπορεί να προκληθεί και από την αύξηση της συγκέντρωσης ενδογενών δραστικών ουσιών, όπως υπεροξειδία και μονοξειδίο του αζώτου.

Η ευαισθησία και το μεγάλο εύρος εφαρμογής της μεθόδου ανεξάρτητα της φύσης των τοξικών παραγόντων, σε πολλούς τύπων κυττάρων και σε όλους τους οργανισμούς από τα βακτήρια ως τον άνθρωπο, μπορεί να φανεί χρήσιμη και πρακτική δίνοντας της το συγκριτικό πλεονέκτημα σε σχέση με τις υπόλοιπες τεχνικές.

Στην παρούσα εργασία με την με την εφαρμογή της τεχνικής comet assay δεν βρέθηκε γενοτοξικότητα στα ηπατοκύτταρα των χελιών μετά από την χορήγηση των διατροφολογικών και τα ψάρια δεν καταπονήθηκαν από τις διατροφολογικές ουσίες. Επίσης, η έκταση της βλάβης του DNA που προκλήθηκε σε όλα τα διατροφολογικά σε κάθε μεταχειρίσεις ήταν πολύ μικρή.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα έρευνα προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- το σκόρδο ως διατροφφαρμακευτικό στην εκτροφή χελιών μειώνει την ένταση της παρασίτωσης
- το σκόρδο ως διατροφφαρμακευτικό στην εκτροφή χελιών βοηθά στην θανάτωση των παρασίτων
- ότι η εχινάκεια ως διατροφφαρμακευτικό στην εκτροφή χελιών δεν έχει σημαντική επίδραση στην θανάτωση των παρασίτων
- με την τεχνική comet assay δεν βρέθηκε γενοτοξικότητα στα ηπατοκύτταρα των χελιών μετά από την χορήγηση των διατροφφαρμακευτικών
- τα ψάρια δεν καταπονήθηκαν από τις διατροφφαρμακευτικές ουσίες
- η έκταση της βλάβης του DNA που προκλήθηκε σε όλα τα διατροφφαρμακευτικά, σε κάθε μεταχειρίσεις ήταν πολύ μικρή



## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Al-Sheraji, S.H., Ismail, A., Manap, M.Y., Mustafa, S., Yosof, R.M. & Hassan, F.A. (2013). Prebiotics as functional foods: A Review, *Journal of functional foods*, 5 (4), 1542-1553.
- Anderson, D.P. (1992). Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture, *Annual Review of Fish Diseases*, 281-307
- Awad E., Austin D. & Lyndon R.A. (2013). Effect of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Aquaculture*, 388-391, 193-197.
- Baksi, S. M. & Frazier, J. M. (1990). Isolated hepatocytes—model systems for toxicology research, *Aquatic Toxicology*, 16, 229–259.
- Bricknell, I. & Dalmo R.A. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture, *Fish & Shellfish Immunology*, 19 (5), 457-472
- Buchmann, K., Jensen. P.B. & Kruse. K.D. (2003). Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophirius multifiliis* theronts and tomocysts: in vitro experiments, *Aquaculture*, 65, 21-24.
- Chao, J., Zhuo-Qi W., Lei, L., Guang, L. & Gao-Xue, W., (2014). Synergy of herbal ingredients combination against *Dactylogyrus spp.* in an infected goldfish model for monogenean management, *Aquaculture*, 433, 115-118.

- Collins, A. R., Duthie, S. J., & Dobson, V. L. (1993). Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA, *Carcinogenesis*, 14, 1733–1735.
- Cribb, T.H., Chisholm, L.A. & Bray, R.A. (2002). Diversity in the Monogenea and Digenea Q does lifestyle matter?. *International Journal of Parasitology*, 32, 321-328.
- DeFelice, S.L. (1992). The nutraceutical initiative: a recommendation for U.S. Economic and regulatory reforms, *Genetic Engineering News*, 12, 13–15.
- Dennog, C., Hartmann, A., Frey, G., & Speit, G. (1996). Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy, *Mutagenesis*, 11, 605–609.
- Devaux, A., Pesonens, M. & Monod, G. (1997). Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes, *Toxicology in Vitro*, 11, 71-79.
- Dügenci S.K., Arda N. & Candan A. (2003). Some medicinal plants as immunostimulant for fish, *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 99-106.
- Euzet, L. & Combes, C. (1998). The selection of habitats among the monogenea, *International Journal for Parasitology*, 28, 1645-1652.
- Fridman, S., Sinai, T. & Zilberg, D. (2014). Efficacy of garlic based treatments against monogenean parasites infecting guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)), *Veterinary Parasitology*, 203, 51-58.
- Fuscoe, J. C., Afshari, A. J., George, M. H., et al. (1996). In vivo genotoxicity of dichloroacetic acid: evaluation with the mouse peripheral blood micronucleus assay and the single cell gel assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27, 1–9.

- Gatesoupe, F-J. (1999). The use of probiotics in aquaculture, *Aquaculture*, 180, 147-165.
- Gholipour-Kanani, H., Sahandi, J. & Taheri, A. (2012). Influence of Garlic (*Allium sativum*) and Mother worth (*Matricaria chamomilla*) Extract on *Ichthyophthirius multifiliis* parasite treatment in sail fin molly (*Poecilia latipinna*) ornamental fish, *APCBEE Procedia*, 4, 6-11.
- Gibson, S., McCartney, A.L., & Rastall, R.A. (2005). Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections, *British Journal of Nutrition*, 93 (1), S31-S34.
- Hand, M.S., Thatcher C.D., Remillard (Eds.) R.L. (2000). *Small Animal Clinical Nutrition*, 4.
- Harikrishnan, R., Kim, J.S., Kim, M.C., Dharaneedharan, S., Kim, D.H., Hong, S.H., Song, C.Y., Balasundaram, C. & Heo M.S., (2012c). Effect of dietary supplementation with *Suaeda maritima* on blood physiology, innate immune response, and disease resistance in olive flounder against *Miamiensis avidus*, *Experimental parasitology*, 131,195–203.
- Hartmann, A., Herkommer, K., Glóck, M., & Speit, G. (1995). The DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells in vivo and in vitro studied with the single cell gel test (SCG), *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 25, 180–187.
- Kenney, R.T., & Cross, A.S. (2010). Adjuvants for the future. In New Generation Vaccines, M.M. Levine, G. Dougan, M.F. Good, M.A. Liu, G.J. Nabel, J.P. Nataro, and R. Rappuoli, eds, *New York: Informa Healthcare USA, Inc*, 250–262.
- Laszlo, A., Guojun, Y., Pao, X., Laszlo, V., Gabor, Szigeti., Zsigmond, J. & Galina, J. (2008). Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera*

*japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*, *Aquaculture*, 275 (1-4), 26-33.

- Li, P. & Gatlin III, D.M.,(2005). Evaluation of the prebiotic GroBiotic®-A and brewers yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops*×*M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*, *Aquaculture*, 248 (1-4), 197-205.
- Lovell R.T. (2000). Nutrition of Ornamental Fish: Kirk's Current Veterinary Therapy, 1191–1196
- McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.P. & Collins, A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review, *Mutation Research*, 288, 47-63.
- Medina-Beltran, V., Luna-Gonzalez, A., Fierro-Coronado, J.A., Campa-Cordova, A.I., Peraza-Gomez, V., Flores-Miranda, M. & Rivera, J.N.G. (2012). *Echinacea purpurea* and *Uncaria tomentosa* reduce the prevalence of WSS in rithleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions, *Aquaculture*, 358-359, 164-169.
- Merk, O. & Speit, G. (1998). Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32, 260–268.
- Militz, T.A., Southgate, P.C., Carton, A.G. & Hutson K.T. (2013). Dietary supplementation of garlic (*Allium sativum*) to prevent monogenen infection in aquaculture, *Aquaculture*, 408-409, 95-99.

- Mitchelmore, C.L. & Chipman, J.K. (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring, *Mutation Research*, 399, 135–147.
- Moe, Y.Y., Koshio, S., Teshima, S., Ishikawa, M., Matsunaga, Y. & Panganiban, A.J. (2004). Effect of vitamin C derivatives on the performance of larval kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicas*, *Aquaculture*, 242, 501-502.
- Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A.H. & Austin, B. (2014). Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture, *Aquaculture*.
- Olive, P.L. (1989). Cell proliferation as a requirement for development of contact effect in Chinese hamster V79 spheroids, *Radiation Research*, 117, 79–92.
- Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., Georgea, E.G.J., Subaramaniyan, K., Manikkam, S. & Sadayappan, B. (2013). Probiotics in aquaculture, *Drug Invention Today*, 5 (1), 55-59.
- Pfuhler, S. & Wolf, H.U. (1996). Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27, 196–201.
- Qin, Q., Wu, Z. & Pan, J. (2001). Disease resistance and humoral immunostimulatory effects of vitamin C on grouper, *Epinephelus Awoara*, *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 18 (3), 247-252.
- Qizhong, Z., De-Hai, X. & Klesiu, P.H, (2013). Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirious multifiliis*, *Veterinary parasitology*, 198 (1-2), 45-53.

- Ramasamy, P., Brennan, G.P. & Halten, D.W. (1995). Ultrastructure of the Surface Structures of *Allodiscocotyla diacanthi* (Polypisthocotylea: Monogenea) from the Gills of the Marine Teleost Fish, *Scomberoides tol*, 25, 43-54.
- Rao, Y.V. & Chakrabarti, R. (2005). Stimulation of immunity in Indian major carp *Catla catla* with herbal feed ingredients, *Fish & Shellfish Immunology*, 18 (4), 237-334.
- Samad, A.P.A., Santoso, U., Lee, M-C. & Nan, F-H. (2014). Effects on dietary katuk (*Sauropus androgynus* L. Merr.) on growth, non-specific immune and diseases resistance against *Vibrio alginolyticus* infection in grouper *Epinephelus coioides*, *Fish & Shellfish Immunology*, 36 (2), 582-589.
- Sauvaigo, S., Serres, C., Signorini, N., Emonet, N., Richard, M. J., & Cadet, J. (1998). Use of the single cell gel electrophoresis assay for the immunofluorescent detection of specific DNA damage, *Analytical Biochemistry*, 259, 1–7.
- Shugart, L. (1990). Biological monitoring: testing for genotoxicity, in: Biomarkers of Environmental Contamination, *Lewis Publishers*, Chelsea: 217–227.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., & Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184–191.
- Sivaram, V., Babu M.M, Immanuel, G., Murugadass, S., Citarasu, T. & Marian, M.P. (2004). Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle

supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections, *Aquaculture*, 237 (1-4), 9-20.

- Siwicki, A.K., Anderson, D.P. & Rumsey, G.L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41, 125-139.
- Speit, G. & Hartmann, A. (1995). The contribution of excision repair to the DNA-effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis*, 10, 555–559.
- Sudhakaran, D.S., Sirekha, P., Devasree, L.D., Premsingh, S. & Michael, R.D. (2006). Immunostimulatory effect of *Tinospora cordifolia* Miers leaf extract in *Oreochromis mossambicus*, *Indian journal of experimental biology*, 44 (9), 726-32.
- Thompson, I., White, A., Fletcher, T.C., Houlihan, D.F. & Secombes, C.J. (1993). The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C, *Aquaculture*, 114, 1-18
- Tice, R. R. (1995). The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells, in *Environmental Mutagenesis* (Phillips, D. H. and Venitt, S., eds.), *BIOS Scientific Publishers, Oxford*, 315–339.
- Verschuere, K., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic Bacterias Biological Control Agents in Aquaculture, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4), 655-671.

- Williams, C.A. & Lamprecht E.D. (2008). Some commonly fed herbs and other functional foods in equine nutrition: A review, *The Veterinary Journal*, 178, 21-31.
- Yin, G., Jeney, G., Racz, T., Xu, P., Jun, X. & Jeney, Z. (2006). Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Aquaculture*, 253, 39–47.
- Zar, J., H. (1996). Biostatistical analysis. 2<sup>nd</sup> Edition. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Wang, J-L., Meng, X-L., Lu, R-H., Wu, C., Luo, Y-T., Yan, X., Li, X-J., Kong, X-H. & Nie, G-X. (2015). Effects of *Rehmannia glutinosa* on growth performance immunological parameters and disease resistance to *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Aquaculture*, 435, 293-300.
- Talpur, A.D. (2014). *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio Harveyi* infection, *Aquaculture*, 420-421, 71-78.
- ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
- Φώτης, Γ. & Αγγελίδης, Π. (2003). Ιχθυοπαθολογία: Παρασιτικά νοσήματα Ιχθύων., *Εκτροφή και Παθολογία Ιχθύων, Σύγχρονη Παιδεία*, Θεσσαλονίκη, 1-430.
-



## 7. ABSTRACT

Many herbal substances can be used as nutraceuticals (immunostimulants). Namely substances which consist parts of food with medical benefits, healing properties, prevention and fight against many diseases. The use of immunostimulants in aquaculture started due to misguided dosage of antibiotics (flourish of resistant bacterial strains and reduction of their effectiveness) and it created the need of protecting fish from diseases with new ways. According to studies immunostimulants in aquaculture induce prosperity, health and fish production. In this study, two herbal substances were used for their immunostimulance in fish breeding, garlic (*Allium sativum*) and echinacea, compared with control. Powder of these herbal substances was incorporated in the fish ration and created the final food in pellets. The experimental fish were eels (*Anguilla anguilla*) and their breeding lasted 30 days, feeding once a day. In this study were measured the infestation intensity and the DNA damage at the eel hepatocytes. The infestation intensity was estimated with the parasite measurement at the beginning and at the end of the experiment. The technique that it was used for the estimation of DNA damage was comet assay. According to the results, garlic used in eel breeding helps impugn parasites satisfactorily, in relation with the control, and echinacea didn't help in killing the parasites. Garlic and echinacea didn't cause genotoxicity and DNA damage at the eels.