



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

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Επίδραση των αιθέριων ελαίων σε αιματολογικές παραμέτρους στην  
τσιπούρα»**



**Καριπίδης Φώτιος**

**ΒΟΛΟΣ 2021**

## **Εξεταστική Επιτροπή:**

Ελένη Γκολομάζου, Επίκουρη Καθηγήτρια (Δρ.) Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Γεωπονίας  
Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα.

Κωνσταντίνος Πούλος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήματος Ζωικής Παραγωγής,  
Αλιείας&Υδατοκαλλιεργειών

Παναγιώτης Λογοθέτης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήματος Ζωικής Παραγωγής,  
Αλιείας&Υδατοκαλλιεργειών

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ολοκληρώνοντας τις μεταπτυχιακές μου σπουδές στη Σχολή Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της μεταπτυχιακής μου εργασίας κ. Γκολομάζου Ελένη για την πολύτιμη καθοδήγησή της καθώς και την κ. Αντωνιάδου Ελένη για την σημαντική βοήθειά της. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που με στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια και ήταν σταθεροί αρωγοί στις σπουδές μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	σελ.1
ABSTRACT.....	σελ.2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	σελ.3
1.1.1. Συστηματική Κατάταξη.....	σελ.3
1.1.2. Μορφολογικά Χαρακτηριστικά.....	σελ.3
1.1.3. Οικολογία, γεωγραφική εξάπλωση και διατροφή.....	σελ.4
1.1.4. Εκτροφή Τσιπούρας.....	σελ.4
1.1.4.1 Εκτατική εκτροφή τσιπούρας.....	σελ.4
1.1.4.2 Εντατική εκτροφή τσιπούρας.....	σελ.5
1.1.5 Παραγωγή και Εμπόριο.....	σελ.7
1.2. Ευζωία Ιχθύων.....	σελ.8
1.2.1. Άλλοι τρόποι διατήρησης ευζωίας ιχθύων.....	σελ.10
1.2.2. Χρήση υλικών φυτικής προέλευσης για την ευζωία των ιχθύων.....	σελ.10
1.2.3. Αιθέρια έλαια.....	σελ.13
1.2.3.1. Ιδιότητες αιθέριων ελαίων.....	σελ.14
1.2.4. Χρήση των αιθέριων ελαίων στις υδατοκαλλιέργειες.....	σελ.14
1.2.4.1. Χρήση των αιθέριων ελαίων στην αναισθησία.....	σελ.14
1.2.4.2. Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Origanum vulgare</i> .....	σελ.14
1.2.4.3. Αιθέριο έλαιο του φυτού <i>Cinnamomum zeylanicum</i> .....	σελ.15
1.2.5. Τρόπος εξαγωγής αιθέριου ελαίου.....	σελ.16
1.3.Είδη απόσταξης.....	σελ.17
1.4 Κυκλοφορικό σύστημα των ιχθύων.....	σελ.19
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	σελ.24
2.1. Μέθοδος NEU-BAUER.....	σελ.28
2.1.1. Προετοιμασία δείγματος.....	σελ.31
2.1.3. Εισαγωγή του δείγματος στην πλάκα Neubauer.....	σελ.31
2.2. Αιματοκρίτης.....	σελ.32
2.3. Διαδικασία Χρώσης δειγμάτων.....	σελ.32
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	σελ.35
3.1. Αιματολογικοί δείκτες ερυθρών αιμοσφαιρίων.....	σελ.35
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	σελ.43
5.ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	σελ.46



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τσιπούρα είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα εκτρεφόμενα είδη ιχθύων στη Μεσόγειο με πολύ μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον. Σημαντική παράμετρος της παραγωγής και της εμπορίας της τσιπούρας αποτελεί η ευζωία των εκτρεφόμενων ιχθύων καθώς σχετίζεται με την ποιότητα του παραγομένου προϊόντος.

Ένας από τους σημαντικότερους δείκτες ευζωίας είναι η ανάλυση των αιματολογικών δεικτών. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης των αιθέριων ελαίων κανέλας και ρίγανης μέσω της χορηγούμενης τροφής, στους αιματολογικούς δείκτες της τσιπούρας. Για τον σκοπό αυτό σε πειραματικά ενυδρεία εφαρμοσθήκαν δύο συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου, ρίγανης και της κανέλας, 1% και 2% στην τροφή των εκτρεφόμενων ιχθυδίων, προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση τους στους αιματολογικούς τους δείκτες. Το πείραμα διήρκεσε 63 ημέρες και στο τέλος του μετρήθηκαν οι αιματολογικές παράμετροι των ερυθρών (RBC και Αιματοκρίτης) και των λευκών αιμοσφαιρίων (Ουδετερόφιλα, Λεμφοκύτταρα, Ηωσινόφιλα και Μονοκύτταρα).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου κανέλας ή ρίγανης στην τροφή των ιχθυδίων δεν είχε σημαντική επίδραση στους αιματολογικούς δείκτες των ερυθρών αιμοσφαιρίων της τσιπούρας. Αντίθετα, παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στους αιματολογικούς δείκτες των λευκών αιμοσφαιρίων καθώς ο αριθμός των Ουδετερόφιλων αιμοσφαιρίων παρουσίασε αύξηση, ενώ ο αριθμός των Λεμφοκυττάρων, Ηωσινοφίλων και Μονοκυττάρων αιμοσφαιρίων παρουσίασε μείωση, σε σχέση με τα ιχθυδία μάρτυρες. Επίσης το είδος του αιθέριου ελαίου σχετίζεται με τον βαθμό της επίδρασης αυτής καθώς διαπιστώθηκε πως το αιθέριο έλαιο της ρίγανης είχε μεγαλύτερη επίδραση σε σχέση με εκείνο της κανέλας.

Συμπεραίνεται πως η εμφάνιση, η ένταση και το είδος της επίδρασης των αιθέριων ελαίων στους αιματολογικούς δείκτες των ιχθύων, δεν είναι κάτι συγκεκριμένο, αλλά εξαρτώνται από το είδος του αιθέριου ελαίου, από την ποσότητα που αυτό περιλαμβάνεται στο διαιτολόγιο των ιχθύων και από το είδος των ιχθύων.

Λέξεις κλειδιά: Τσιπούρα, *Sparus aurata*, Αιθέριο έλαιο, Κανέλα, Ρίγανη, Αιματολογικοί δείκτες, Ευζωία

## **ABSTRACT**

«Effect of essential oils on hematological parameters in sea bream»

Sea bream is one of the most widely farmed fish species in the Mediterranean with a very high economic interest. An important aspect of the production and marketing of sea bream is the welfare of farmed fish as it relates to the quality of the product produced.

One of the most important indicators of well-being is the analysis of hematological indicators. The aim of the present study was to study the effect of cinnamon and oregano essential oils through the feed, on the hematological indicators of sea bream. For this purpose two concentrations of essential oil, oregano and cinnamon were applied in experimental aquariums, 1% and 2% in the feed of farmed juveniles, in order to evaluate their effect on their hematological indicators. The experiment lasted 63 days and at the end the hematological parameters of red blood cells (RBC and Hematocrit) and white blood cells (Neutrophils, Lymphocytes, Eosinophils and Monocytes) were measured.

The results showed that the addition of cinnamon or oregano essential oil to the feed of the juveniles had no significant effect on the blood markers of the red blood cells of the gilt.

Significant changes in WBC markers were observed as WBC counts increased, while WBC, Eosinophile and WBC counts decreased relative to control fish. Also the type of essential oil is related to the degree of this effect, as it was found that the essential oil of oregano had a greater effect than that of cinnamon.

It is concluded that the appearance, intensity and type of effect of essential oils on the hematological indicators of fish is not specific, but depend on the type of essential oil, the amount included in the diet of fish and the species of fish.

Keywords: Sea bream, Sparus aurata, Essential oil, Cinnamon, Oregano, Hematological indicators, Welfare

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Γενικά

### 1.1.1. Συστηματική Κατάταξη

Η συστηματική κατάταξη της τσιπούρας είναι η ακόλουθη:

Συνομοταξία: Chordata

Ομοταξία: Osteichthyes

Τάξη: Perciformes

Οικογένεια: Sparidae

Γένος: Sparus

Είδος: *Sparus aurata* (Κάπελος, 2011)

### 1.1.2. Μορφολογικά Χαρακτηριστικά

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) και τα υπόλοιπα είδη της οικογένειας Sparidae σχηματίζουν ένα σύνολο ειδών όπου μορφολογικά χαρακτηρίζεται από ένα υψηλό και συμπίεσμένο πλευρικά σώμα, μεγάλα κτενοειδή λέπια, ένα ραχιαίο πτερύγιο που εν μέρει είναι ακανθώδες και ένα διχαλωτό ουραίο πτερύγιο (Χώτος, 2010). Τα πτερύγια που βρίσκονται στην κοιλιακή χώρα έχουν μια σκληρή και πέντε μαλακές ακτίνες, ενώ το εδρικό πτερύγιο αντίστοιχα έχει τρεις σκληρές και δώδεκα μαλακές. Το στόμα της είναι ελαφρώς προεκτεινόμενο και τα δόντια της ανόμοια. Η προσαρμογή αυτή βοηθά στη σαρκοφαγία. Το σύνολο των λεπιών κατά μήκος της πλευρικής γραμμής είναι περίπου από 73 έως 85 λέπια. Το γεγονός ότι οι τσιπούρες διαθέτουν πολυάριθμα μυτερά δόντια και στις δύο γνάθους και πολυάριθμες σειρές χοντρών τραπεζιτών, τις βοηθά στην σύνθλιψη των οστράκων για την πρόσληψη της τροφής τους. Για αυτόν τον λόγο το έντερο τους, έχει εξελιχθεί στο να είναι ευθύ, κοντό και ανθεκτικό στα σχισίματα που προκαλούνται από τα κελύφη. Ακόμα ένα από τα χαρακτηριστικά της μορφολογίας της τσιπούρας είναι μια καστανόμαυρη κηλίδα στο βραγχιακό επικάλυμμα καθώς και μια πλατιά χρυσή λωρίδα ανάμεσα στα μάτια (FAO, 2006).



### **1.1.3. Οικολογία, γεωγραφική εξάπλωση και διατροφή**

Η τσιπούρα αποτελεί ένα κοινό είδος που απαντάται στη Μεσόγειο θάλασσα καθώς επίσης και κατά μήκος των ακτών του ανατολικού Ατλαντικού από τις Βρετανικές νήσους έως τη Σενεγάλη και σε σπάνιες περιπτώσεις στη Μαύρη Θάλασσα (FAO, 2006).

Οι τσιπούρες είναι ζώα ευρύαλα και ευρύθερμα και ζουν συχνότερα κοντά στις ακτές, ενώ μερικά είδη της οικογένειας αυτής ένα μέρος της ζωής τους το περνάνε μέσα σε λιμνοθάλασσες. Απαντώνται σε θαλασσινά αλλά και σε υφάλμυρα νερά εξαιτίας της ευρύαλης και ευρύθερμης φύσης τους. Επίσης προτιμούν να κολυμπούν σε περιοχές με αμμώδη βενθικά υποστρώματα, περιοχές με λιβάδια ποσειδωνίας, υφάλους και βάθος που φτάνει έως και τα 150 μέτρα. Είναι ψάρια κυρίως σαρκοφάγα και τρέφονται με δίθυρα, γαστερόποδα, καρκινοειδή εχινόδερμα, πολύχαιτους και τελεοστέους. Η τροφή τους ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του ψαριού και τη διαθεσιμότητα του στο περιβάλλον που βρίσκεται. Γενικά η τσιπούρα δεν είναι εκλεκτική ως προς ένα είδος στη διατροφή της και όταν ένα είδος τροφής σπανίζει τρέφεται σε εναλλακτικές πηγές τροφής. Όταν η τσιπούρα αυξάνει σε μέγεθος έχει την ικανότητα να διατραφεί με μεγαλύτερα και με πιο σκληρό κέλυφος ζώα (Κάπελος, 2011).

### **1.1.4. Εκτροφή Τσιπούρας**

Υπάρχουν δύο κυρίως τρόποι εκτροφής, ο εκτατικός και ο εντατικός τρόπος. Ο εκτατικός ήταν ο συνηθέστερος αλλά τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της βελτίωσης των γνώσεων της βιολογίας και της ανάπτυξης της τεχνολογίας έχει αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό η εντατική εκτροφή με τη βοήθεια της χρήσης πλωτών κλωβών. Στην Ελλάδα η τσιπούρα φτάνει το βάρος 300-350 g σε 14 με 16 περίπου μήνες και διατίθεται στο εμπόριο.

#### **1.1.4.1 Εκτατική εκτροφή τσιπούρας**

Εδώ και αιώνες η τσιπούρα αποτελούσε ένα από τα πιο σημαντικά εκτρεφόμενα είδη στις ελληνικές εκτατικές εκτροφές των λιμνοθαλασσών, καθώς και άλλων μεσογειακών περιοχών. Λόγω της μεγάλης εμπορικής αξίας της η τσιπούρα

αποδείχθηκε ένα πολύ καλό και πρακτικό είδος της εκτατικής ιχθυοκαλλιέργειας, εξαιτίας της προσαρμοστικότητας της σε δυσμενές περιβαλλοντικές συνθήκες και της διατροφής της με προϊόντα που βρίσκονται σχετικά χαμηλά στη κλίμακα της τροφικής αλυσίδας (Κλαουδάτος, 2012). Επίσης σημαντικά πλεονεκτήματα του είδους είναι ότι μπορεί να εκμεταλλευτεί τη φυσική παραγωγή της λεκάνης σε βενθικούς ασπόνδυλους οργανισμούς και επιπλέον ότι καλλιεργείται με επιτυχία σε συστήματα πολυκαλλιέργειών με άλλα είδη (Χώτος, 2010).

Η εκτατική εκτροφή της τσιπούρας βασίζεται στη φυσική μετανάστευση των ευρύαλων ειδών όπου οι ιχθύες μπορούν να πιαστούν σε ιχθυοπαγίδες στο στόμιο επικοινωνίας της λιμνοθάλασσας με τη θάλασσα. Η πρακτική αυτή παρέχει μια πολύ περιορισμένη πηγή φυσικών ιχθυδίων και συνεπώς πολλές σύγχρονες εμπορικά εκτεταμένες μονάδες βασίζονται και σε άγρια ιχθύδια που αλιεύονται αλλά και σε ιχθύδια εκτρεφόμενα σε εκκολαπτήριο. Με αυτό το σύστημα η τσιπούρα φτάνει το πρώτο εμπορικό μέγεθος σε περίπου 20 μήνες όπως αναφέρθηκε προηγουμένως και συχνά εκτρέφεται μαζί με άλλα είδη ιχθύων όπως κέφαλους, χέλια και το ευρωπαϊκό λαβράκι. Είναι σημαντικό στα εκτροφεία να υπάρχουν χώροι διαχείμασης και διατήρησης της θερμοκρασίας για να μη κατέρχεται κάτω των 5 °C. Η συνολική παραγωγή αυτού του είδους πολυκαλλιέργειας κυμαίνεται από 30 έως 150 kg/ha/yr . Οι ιχθύες τρέφονται αποκλειστικά με τους πόρους της λιμνοθάλασσας και συνεπώς κατά τη διάρκεια του κύκλου παραγωγής δεν απαιτείτε παροχή συμπληρωματικής τροφής. Η ιχθυοπυκνότητα δεν υπερβαίνει τα 0,0025 kg/m<sup>3</sup>. (FAO 2006, Κάπελος 2011)

#### **1.1.4.2 Εντατική εκτροφή τσιπούρας**

Παραδοσιακά, οι τσιπούρες εκτρέφονται εκτενώς στις παράκτιες λίμνες και στις υφάλμυρες λίμνες της βόρειας Ιταλίας ("valli-coltura") και στη νότια Ισπανία ("esteros"). Στη δεκαετία του 1980 αναπτύχθηκε επιτυχώς σε αιχμαλωσία και αναπτύχθηκαν συστήματα εντατικής εκτροφής (ιδίως θαλάσσια κλουβιά). Έκτοτε το είδος αυτό έχει καταστεί ένα από τα κύρια προϊόντα της ευρωπαϊκής υδατοκαλλιέργειας. Αρχικά, αφορούσε κυρίως τη σύλληψη νεαρών ψαριών, αλλά τώρα το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής θαλασσίων ειδών προέρχεται από νεαρά άτομα που παράγονται σε τεχνολογικά εξελιγμένα εκκολαπτήρια που απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό.

Στην Ελλάδα η εντατική εκτροφή τσιπούρας έχει εφαρμοστεί με πλήρη επιτυχία. Από τα τέλη της δεκαετίας του 1980 και ύστερα αναπτύχθηκε με ιδιαίτερα έντονα αυξανόμενο ρυθμό η εκτροφή τσιπούρας με εντατικά συστήματα εκτροφής. Οι ιχθύες τρέφονται αποκλειστικά με τους πόρους της λιμνοθάλασσας και πλέον είναι η πρώτη σε παραγωγή χώρα της Μεσογείου και της Ευρώπης για το συγκεκριμένο είδος (Παπουτσογλου, 2008).

Η εντατική εκτροφή της τσιπούρας ξεκινά από τη δημιουργία και τη διατήρηση των συνόλων των γεννητόρων στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς. Αυτό συμβαίνει διότι κάθε ιχθυογεννητικός σταθμός επιθυμεί να διαθέτει το δικό του σύνολο γεννητόρων έτσι ώστε να γνωρίζει την ποιότητα των παραγόμενων αυγών ανάλογα με τις ανάγκες της παραγωγής. Τα ενήλικα ψάρια ετοιμάζονται για αναπαραγωγή με ελεγχόμενη έκθεση στο φως της ημέρας (φωτοχειρισμός) και με τον έλεγχο της θερμοκρασίας. Το αρσενικό γονιμοποιεί τα αυγά του θηλυκού, τα οποία επιπλέον στην επιφάνεια του νερού. Συλλέγονται τα αυγά από τις υπερχειλίσεις των δεξαμενών παραμονής των γεννητόρων και στη συνέχεια τοποθετούνται σε κυκλικές δεξαμενές με ελαφρά κωνικό πυθμένα για την εκκόλαση τους. Σε αυτές τις ίδιες δεξαμενές πραγματοποιείται και η εκτροφή των προνυμφών και των νυμφών τσιπούρας. Μετά από τρεις ή τέσσερις ημέρες, οι προνύμφες θα έχουν απορροφήσει το κρόκο τους και θα μπορούν να αρχίσουν να τρέφονται: πρώτα με μια δίαιτα φυτοπλαγκτόν και ζωοπλαγκτόν, μετά με ποσότητες αρταίμιας, και τέλος με τροφή με συγκέντρωση υψηλής πρωτεΐνης. Με το που θα γίνει η μεταμόρφωση τους, εισέρχονται στο στάδιο του ιχθυδίου και αφού φτάσουν το ασφαλές μέγεθος 1-1,5 g/άτομο και προσαρμοστούν στη διατροφή με συνθετικές τροφές, είναι έπειτα έτοιμες να τις μεταφέρουμε στις εγκαταστάσεις πάχυνσης. (Κλαουδάτος, 2012).

Η πάχυνση των ιχθύων γίνεται κυρίως στους ιχθυοκλωβούς, ενώ μπορεί να γίνει και σε χερσαίες εγκαταστάσεις σε ορθογώνιες δεξαμενές σκυροδέματος που ποικίλουν σε μέγεθος ανάλογα με το μέγεθος των ψαριών. Το FCR (ο δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής), είναι πολύ υψηλός περίπου 1,3:1. Κατά μέσο όρο οι μεγαλύτερες τσιπούρες από τη προπάχυνση με μέγεθος 10 g φτάνουν στο πρώτο εμπορικό μέγεθος (350-400 g) σε περίπου ένα χρόνο. Τα μικρότερα ιχθύδια που έχουν μέγεθος έως 5 g φτάνουν το ίδιο μέγεθος σε 16 μήνες (FAO, 2006).

### 1.1.5 Παραγωγή και Εμπόριο

Η ετήσια παραγωγή της Ελλάδας, ξεπερνάει τους 60.000 τόνους, και είναι πρώτη σε παραγωγή λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax* L.) και τσιπούρας (*Sparus aurata* L.) Στη χώρα μας υπάρχουν περισσότερες από 200 μονάδες εκτροφής, ενώ σε πολλές μονάδες εφαρμόζεται η εντατική εκτροφή νέων ειδών, όπως το μυτάκι ή χιόνα (*Diplodus puntazzo* G), το φαγκρί (*Pagrus pagrus* L.), ο σαργός (*Diplodus sargus* L.), η συναγρίδα (*Dentex dentex* L.), το λιθρίνι (*Pagelus erithrinus* L.) και η γλώσσα (*Solea solea* L.).

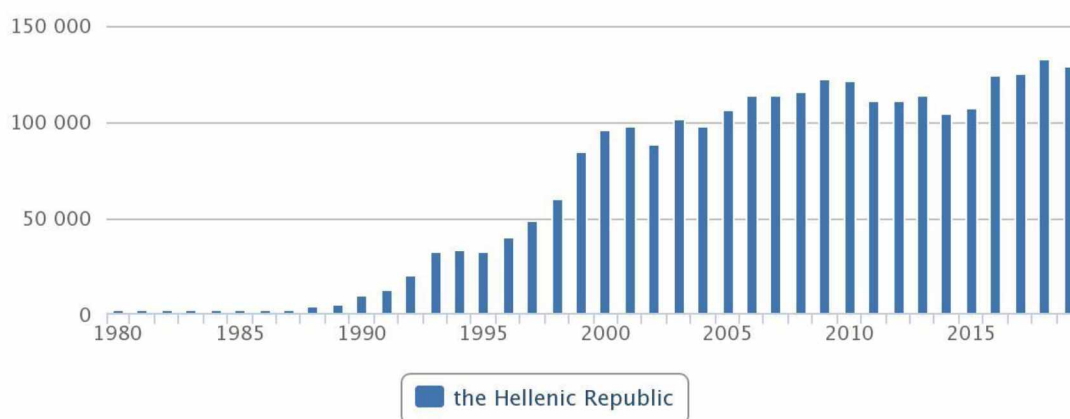
Οι περισσότερες τσιπούρες προέρχονται από υδατοκαλλιέργειες. Ο μεγαλύτερος παραγωγός παγκοσμίως είναι η Ευρωπαϊκή Ένωση και ακολουθεί σε μεγάλη απόσταση η Τουρκία. Εντός της Ευρωπαϊκής ένωσης η Ελλάδα είναι η μεγαλύτερη παραγωγός και ακολουθεί η Ισπανία. Το εμπόριο μεταξύ ΕΕ και τρίτων χωρών είναι πολύ περιορισμένο. Από την άλλη μεριά το ενδοκοινοτικό εμπόριο είναι πολύ σημαντικό, με την Ελλάδα να πραγματοποιεί τις μεγαλύτερες εξαγωγές προς την Ιταλία, τη Πορτογαλία, την Ισπανία και τη Γαλλία, με την τσιπούρα και το λαβράκι να αποτελούν ακόμη τα κύρια παραγόμενα είδη. Η σύγχρονη μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια είναι ο δεύτερος μεγαλύτερος κλάδος θαλασσινής ιχθυοκαλλιέργειας παγκοσμίως μετά την παραγωγή του ατλαντικού σολομού. Σήμερα ο κλάδος παράγει πάνω από 250.000 τόνους ψάρια (τσιπούρα, λαβράκι, χιόνα, συναγρίδα κ. ά.). Η Ελλάδα είναι η βασική χώρα παραγωγός μεσογειακών ιχθύων. Έχει μερίδιο της τάξης του 50% της παγκόσμιας παραγωγής.

Η παραγωγή άγριων και εκτρεφόμενων ιχθύων *Sparus aurata* στις μεσογειακές χώρες έχει σημαντικό ρόλο στην ικανοποίηση της αυξημένης ζήτησης για ανθρώπινη κατανάλωση. Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχει μεγαλύτερη καταναλωτική προτίμηση για τα άγρια ψάρια που αλιεύονται σε σχέση με τα εκτρεφόμενα (Grigorakis 2007). Είναι επομένως σημαντικό να ενισχυθεί η ελκυστικότητά των εκτρεφόμενων ιχθύων, με την διεξαγωγή συγκριτικών μελετών για τα ποιοτικά χαρακτηριστικά και τις αλλαγές που συμβαίνουν στα άγρια και εκτρεφόμενα ψάρια κατά τις διαδικασίες μετά την αλίευσή τους.

Η Ελλάδα ήταν η κύρια Ευρωπαϊκή χώρα παραγωγής ιχθύων υδατοκαλλιεργειών με ποσοστό που ξεπερνούσε τους 120 000 τόνους, πριν ξεκινήσει η οικονομική κρίση του

2008. Παρόλα αυτά και μετά από αυτήν, συνεχίζει να παράγει με σταθερούς ρυθμούς ποσοστό περίπου 110 000 τόνων (FAO 2019)

Total aquaculture production for the Hellenic Republic (tonnes)  
Source: FAO FishStat



## Ετήσια παραγωγή ιχθυοκαλλιεργειών στην Ελλάδα ανά τόνους (FAO 2019)

### 1.2. ΕΥΖΩΪΑ ΙΧΘΥΩΝ

Η ευζωΐα των ιχθύων σε συνθήκες εκτροφής έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστήμης και ιδιαίτερα της ζωικής παραγωγής. Τα τελευταία χρόνια η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσμοθετήσει κανόνες στα στάδια της εκτροφής. Ο ΕΚ 710/2009 περιλαμβάνει κανόνες για την παραγωγή ιχθυδίων υδατοκαλλιέργειας και αναφέρεται στη προστασία αυτών κατά την θανάτωσή τους.

Η ευζωΐα των ζώων εξαρτάται από δύο κυρίως παραμέτρους: α) τους παράγοντες που τη συνθέτουν και β) την εκτίμηση των παραγόντων αυτών. Για παράδειγμα, η ανατομία του εγκεφάλου των ιχθύων παρόλο που παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές με αυτή των θηλαστικών, παρατηρείται και στις δύο περιπτώσεις η ύπαρξη κατεχολαμινών που αυτό προκύπτει από τα εξωτερικά ακουστικά ερεθίσματα όπως η μουσική (Papoutsoglou et al., 2008)

Η ευζωΐα των ιχθύων γενικά χωρίζεται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες.

- 1) Η πρώτη εξαρτάται από την λειτουργία των αισθήσεων όταν αντιμετωπίζει το ψάρι κατάσταση φόβου ή πόνου. Παρόλο που δεν έχουν νευρικό σύστημα για να καταλάβουμε ότι «πονούν», μπορούμε να δούμε όμως ότι οι ιχθύες αντιδρούν στα θετικά ερεθίσματα της ανταμοιβής (Duncan 2006).
- 2) Η δεύτερη ορίζεται από τη δυνατότητα των ιχθύων να προσαρμόζονται στο φυσικό τους περιβάλλον και να βρίσκονται σε καλή φυσική κατάσταση. Αν ένα ζώο δεν διατηρεί τις φυσιολογικές του λειτουργίες στο περιβάλλον που βρίσκεται τότε δεν ακολουθεί πρότυπο ευζωΐας (Broom, Johnson 1993)
- 3) Η τρίτη στηρίζεται στη δυνατότητα που δίνεται στους ιχθύες να έχουν φυσιολογικές συμπεριφορές σε διαφορετικές συνθήκες εκτροφής (Kiley Worthington, 1989).

Έχει αποδειχθεί ότι η καταπόνηση που υφίστανται τα ψάρια επηρεάζει τους ρυθμούς αύξησής τους μέσω πολλαπλών βιοχημικών μηχανισμών που πραγματοποιούνται στο σώμα τους, ειδικά σε συνθήκες εντατικής εκτροφής (Pickering, 1993). Λόγω της μείωσης της όρεξης, παρατηρείται ότι ελαττώνεται η δραστηριότητα των ψαριών κατά τη διάρκεια παροχής της τροφής (Iwama, 1997). Επίσης αυξάνονται τα επίπεδα της κορτιζόλης, με αποτέλεσμα να επιταχύνεται ο καταβολισμός. Η κορτιζόλη περιλαμβάνει την επαγωγή βιοχημικών οδών που ενισχύουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα (Vijyan et al., 1997, Diouf et al., 2000). Αυτό έχει ως συνέπεια οι στρεσογόνοι παράγοντες να ενεργοποιούν την γλυκογονόλυση και τη γλυκονεογένεση, κατά την οποία βιοσυντίθεται γλυκόζη από ελεύθερα αμινοξέα (Milligan, 1997).

Οι μελέτες σε μοριακό επίπεδο μπορούν να δώσουν πολύτιμα στοιχεία για τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην αντίδραση στο stress. Η έρευνα σε αυτήν την κατεύθυνση θα αποδώσει στο μέλλον σημαντική γνώση, με ταυτοποίηση βιοδεικτών με προγνωστική και διαγνωστική χρησιμότητα (Μαλανδράκης 2014).

### **1.2.1. Άλλοι τρόποι διατήρησης ευζωΐας ιχθύων**

Η χρήση των αντιστρεσσογόνων φαρμάκων είναι μια κοινή πρακτική στην σύγχρονη ιχθυοκαλλιέργεια. Τέτοιες ουσίες χρησιμοποιούνται για να προκαλέσουν αναισθησία κατά τη διάρκεια μεταφοράς - αλλαγής δεξαμενής, τεχνητής αναπαραγωγής και κατά τη διάρκεια πιθανού χειρουργείου, μειώνοντας έτσι στρεσογόνα προβλήματα όπως η εξασθένηση του ανοσοποιητικού (Ross and Ross, 1999). Επίσης προκαλούνται αλλαγές στη χημική σύσταση του αίματος μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα εάν ενοχληθούν οι ιχθύες (Barton and Iwama, 1991). Σε αυτές τις αλλαγές συμπεριλαμβάνονται και αλλαγές στις ορμόνες του πλάσματος στο αίμα, στις ενεργειακές μεταβολές και στην ηλεκτρολυτική ισορροπία.

Το αίμα κατέχει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία όλων των ανοσοποιητικών συστημάτων, καθώς έρχεται σε άμεση επαφή με τα διάφορα όργανα και ιστούς του σώματος. Ως εκ τούτου η φυσιολογική κατάσταση ενός ζώου μπορεί να φανεί μέσω μιας ανάλυσης στο αίμα του (Martinez and Souza, 2002).

Τα είδη ιχθύων που αντιδρούν στο οξυγόνο μπορούν να αντέξουν τις τοξικές επιδράσεις που προκαλούνται από το στρες. Πολλές εκθέσεις εκτός νερού μπορεί να προκαλέσουν ζημιές στο ψάρι, συμπεριλαμβανομένης και της μείωση των βασικών λειτουργιών του, εξαιτίας των αλλαγών των ενζυμικών δραστηριοτήτων στον οργανισμό του (Galloway and Handy, 2003; Dogan and Can, 2011a; Narra, 2016). Οι αιματολογικές και βιοχημικές αναλύσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες πιθανής τοξικότητας του περιβάλλοντος στην υγεία των ιχθύων (Narra, 2016).

### **1.2.2. Χρήση υλικών φυτικής προέλευσης για την ευζωΐα των ιχθύων**

Για χιλιάδες χρόνια ο κόσμος χρησιμοποιούσε θεραπευτικά φυτά για την θεραπεία διάφορων ασθενειών. Η αρχαιότερη καταγεγραμμένη μαρτυρία χρήσης θεραπευτικών φυτών βρέθηκε πάνω σε πήλινο δοχείο των Σουμέριων περίπου το 5000 π.Χ. (Petrovska, 2012).

Η δημοσίευση δύο βιβλίων από τον Γερμανό ιατρό Adam Lonicer και από τον Giovanni Battista το 1551 και 1563 αντίστοιχα. περιείχαν μεθόδους παραλαβής αιθέριων ελαίων από τα αρωματικά φυτά, καθώς επίσης και αναλυτικές περιγραφές

των απαραίτητων συσκευών (Urdang, 1948). Κατά την διάρκεια του 17ου αιώνα, ο Γάλλος Ιατρός Joseph Du Chesne αναφέρει ότι οι τρόποι παραλαβής και προετοιμασίας των αιθέριων ελαίων είναι γνωστοί σε όλους, ενώ τουλάχιστον 20 αιθέρια ελαία χρησιμοποιούνταν συχνά στα φαρμακεία. Ο De la Croix το 1881 ανέφερε ότι εκτίμησε την αντιβακτηριακή δράση των αιθέριων ελαίων σε εργαστηριακές μελέτες (Burt, 2004). Στη συνέχεια, κατά την διάρκεια του 19ου αιώνα, με την ανάπτυξη της επιστήμης της χημείας αναπτύχθηκε επίσης και ο τομέας των αιθέριων ελαίων (Urdang, 1948). Το 1887, ο Otto Wallach πρότεινε τη δομή του ισοπροπενίου για τα τερπενοειδή, ενώ το 1894 έγινε γνωστή η χημική δομή της καμφοράς και του α-πινένιου (Banthorpe, 1994). Τον ίδιο αιώνα τα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνταν κυρίως από την βιομηχανία τροφίμων και δευτερευόντως για φαρμακευτικούς σκοπούς στην αντιμετώπιση ασθενειών (Urdang, 1948). Το 90 % της παγκόσμιας παραγωγής των αιθέριων ελαίων χρησιμοποιείται από την βιομηχανία τροφίμων και αρωμάτων (Holmes, 2007). Από τη στιγμή που γνωρίζουμε τόσα πολλά πράγματα για τα αιθέρια έλαια, είναι λογικό και η νομοθεσία γύρω από αυτά να είναι ελαστική στη χρήση τους λόγω της χαμηλής επικινδυνότητάς τους (Isman, 2006).

Πολλά αρωματικά φυτά και τα αιθέρια έλαιά τους χρησιμοποιούνται ως καλλυντικά, αρώματα, σε εναλλακτικές και συμπληρωματικές θεραπείες και στη βιομηχανία τροφίμων, ενώ ταυτόχρονα η χρήση τους σε όλο τον κόσμο αυξάνεται όλο και περισσότερο (Bakkali et al., 2008). Στη σημερινή εποχή είναι γνωστά 17.500 αρωματικά φυτά (Bruneton, 1999) τα περισσότερα των οποίων είναι μέλη των οικ. Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae, Piperaceae (Enan, 2001). Έχουν ανιχνευτεί και ταυτοποιηθεί περισσότερα από 30.000 αιθέρια έλαια (Chen, 2008).

Στη σημερινή εποχή, τα παραδοσιακά θεραπευτικά φυτά συνεχίζουν να αποτελούν την κύρια πηγή θεραπευτικής φροντίδας σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες (Calixto, 2005). Πολυάριθμες μελέτες έχουν εφαρμοστεί πάνω στις βιολογικές δραστηριότητες και στη χημική σύσταση των βιοενεργών φυτών (Ayyanar et al., 2011; Banskota et al., 2003). Το ενδιαφέρον στα θεραπευτικά φυτά για την ανθρώπινη και ζωική υγεία είναι υψηλό εξαιτίας των πολλαπλών παρενεργειών και του κόστους των συνταγογραφημένων φαρμάκων (Hoareau and Da-Silva, 1999). Τα φυτά αυτά επίσης περιέχουν συστατικά με πολύπλοκη χημική σύνθεση όπου παρουσιάζουν ποικίλες βιολογικές δραστηριότητες, καθιστώντας τα ιδανικά για τη θεραπεία



πολυπαραγοντικών ασθενειών και συνεπώς καλή εναλλακτική χρήση αντί των αντιβιοτικών, με μικρό ρίσκο εμφάνισης αντοχής σε αυτά (Gostner et al., 2012; Srivastava et al., 2014).

Οι Ιχθυοκαλλιέργειες είναι η μεγαλύτερη αναπτυσσόμενη ζωική παραγωγή τροφίμων με μέση ετήσια αύξηση 6.2% κάθε χρόνο την περίοδο 2000–2012 (FAO, 2014). Παρόλα αυτά, η ανάπτυξη της ιχθυοεκτροφής είναι συχνά συνδεδεμένη με την υψηλή ιχθυοφόρτιση, οδηγώντας σε υπερπληθυσμό και κακή ποιότητα νερού, βοηθώντας έτσι την εξάπλωση των παθογόνων και στην αύξηση πιθανών ασθενειών και θνησιμότητας (Bondad-Reantaso et al., 2005). Προκειμένου να αποφευχθεί οικονομική ζημία που προκαλείται εξαιτίας αυτών, τα κτηνιατρικά φάρμακα χρησιμοποιούνται συχνά στις ιχθυοεκτροφές για την αποφυγή εξάπλωσης ασθενειών (Rico et al., 2013). Η εντατική χρήση συνθετικών φαρμάκων εμφανίζει πολλαπλά μειονεκτήματα για το περιβάλλον αλλά και για την υγεία των ιχθύων. Η εντατική χρήση αντιβιοτικών είχε αποτέλεσμα τη συσσώρευση οσμών στους εκτρεφόμενους ιχθύες (Cabello et al., 2006; Romero-Ormazabal et al., 2012) και την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών των παθογόνων στα αντιπαρασιτικά σκευάσματα (Miranda and Zemelman, 2002; Seyfried et al., 2010). Επίσης η χρήση των αντιπαρασιτικών φαρμάκων, όπως το τριχλωροφόν ή το praziquantel στις εμβαπτίσεις ιχθύων είναι επικίνδυνα για τα ζώα και το περιβάλλον (Forwood et al., 2013; Umeda et al., 2006). Οι εμβολιασμοί, που θεωρείται ότι είναι η πλέον αποτελεσματικότερη μέθοδος στην αποφυγή εξάπλωσης ασθενειών στις ιχθυοεκτροφές, έχουν υψηλό οικονομικό κόστος για την εκτενή χρήση τους από τους ιχθυοπαραγωγούς και οι περισσότεροι από αυτούς είναι αποτελεσματικοί σε έναν μόνο τύπου παθογόνου (Pasnik et al., 2005; Sakai, 1999). Η εξάπλωση ασθενειών στις ιχθυοεκτροφές είναι συχνά συνδεδεμένη με την ευζωία των ιχθύων, καθώς οι περισσότεροι παθογόνοι μικροοργανισμοί εκμεταλλεύονται τους ιχθύες με χαμηλό ανοσοποιητικό και υψηλό στρες για να εισβάλουν. Συνεπώς εναλλακτικές λύσεις θα πρέπει να μεγιστοποιήσουν το ανοσοποιητικό και την καλή υγεία των ιχθύων, σαν μία στρατηγική αντιμετώπισης αυτών των παθογόνων. (Ashley et al., 2007; Davis et al., 2002; Iguchi et al., 2003).

### 1.2.3. Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια είναι μια ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών φυτικής προέλευσης και παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Greathead, 2003). Οι *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι τα αιθέρια έλαια μπορούν να επηρεάσουν ευνοϊκά τα ζυμωτικά φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα στην μεγάλη κοιλία των μηρυκαστικών (Busquet et al. 2006) και να τονώσουν την λειτουργία του ανοσοβιολογικού τους συστήματος (Conha et al. 1996). Στις *in vivo* μελέτες, έχει παρατηρηθεί βελτίωση των αποδόσεων και της ποιότητας των ζωικών προϊόντων τόσο των μονογαστρικών (Zigger 2001, Botsoglou et al. 2003, Namkunk et al. 2004, Allan et al. 2005, Lippens et al. 2006, Janz et al. 2007) όσο και των μηρυκαστικών ζώων (Greathead 2003, Cardozo et al. 2006, Benchaar et al. 2007, Simitzis et al. 2007, Giannenas et al. 2011)

Οι κυριότερες θεραπευτικές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων είναι οι ακόλουθες (Steflitsch & Steflitsch, 2008).

- Χαλαρωτικές, κατασταλτικές, αντικαταθλιπτικές
- Σπασμολυτικές, πεπτικές, διουρητικές
- Επουλωτικές
- Εντομοκτόνες, απωθητικές
- Αποχρεμπτικές
- Αποσμητικές
- Αντισηπτικές, αντιβακτηριακές, αντικές, αντιμυκητιακές
- Ανοσοδιεγερτικές, ορμονικές
- Αναλγητικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιτοξικές, υπεραιμικές

Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικά υγρά που περιέχουν τις ουσίες που είναι υπεύθυνες για τα αρώματα των φυτών, που έχουν παραχθεί από διάφορα όργανα, όπως άνθη, σπόροι, φύλλα, βλαστοί, καρποί και ρίζες (Bakkali *et al.*, 2008). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή των αιθέριων ελαίων ποικίλουν όπως η απόσταξη με υδρατμούς, η υδροαπόσταξη, η μικροαπόσταξη με υδρατμούς, η εκχύλιση με οργανικό διαλύτη, η απόσταξη σε κενό και η έκθεση σε μικροκύματα (Βουρλιώτη-Αράπη 2010).

### 1.2.3.1. Ιδιότητες αιθέριων ελαίων

Είναι ευρέως γνωστό ότι τα αιθέρια έλαια έχουν αντιβακτηριακές, αντιοξειδωτικές, αντικές και αντιμυκητιακές ιδιότητες, όπως αναφέρουν πολλοί συγγραφείς (Burt 2004, Fisher and Phillips 2008). Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα αποτελέσματα των αιθέριων ελαίων αναφορικά με την χρήση τους ως συντηρητικά, έχουν μελετηθεί εκτενώς με άμεση εφαρμογή αντιμικροβιακών δοκιμασιών, συμπεριλαμβανομένων διαφορετικών μεθόδων διάχυσης ή διάλυσης (Burt 2004, Mejlholm και Dalgaard 2002). Οι άμεσες εφαρμογές αιθέριων ελαίων όπως του κίμινου *Cuminum cyminum* και της δάφνης *Laurus nobilis* και οι επιπτώσεις τους στα ιχθυοαλιεύματα είναι σπάνιες. Αναφέρεται ότι το αιθέριο έλαιο του κίμινου και της δάφνης παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των ιχθύων, σκουμπρί (Erkan και Bilen 2010) και κοκκινόψαρο (Erkan et al. 2010), χωρίς να επηρεάζονται δυσμενώς οι αισθητικές ιδιότητες των ιχθύων, όταν χρησιμοποιούνται σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση (1%).

### 1.2.4. Χρήση των αιθέριων ελαίων στις υδατοκαλλιέργειες

#### 1.2.4.1. Χρήση των αιθέριων ελαίων στην αναισθησία

Το καλύτερο αναισθητικό για τους ιχθύες ιχθυοκαλλιεργειών πρέπει να προκαλεί γρήγορη αναισθησία και ανάνηψη για να μειώνει το στρες σε αυτά, να είναι ασφαλές για τα ψάρια και το χρήστη, να μην αφήνει κατάλοιπα στους ιστούς διότι μπορεί να προκαλέσει πιθανές επιπλοκές καθώς και να είναι οικονομικό και εύκολο στη χρήση του. Μέσω των βραγχίων τα αναισθητικά εισέρχονται στον οργανισμό, αφού έχουν ήδη διαλυθεί στο νερό στο οποίο βρίσκονται οι ιχθύες (Τσαντήλας et al., 2005).

#### 1.2.4.2. Αιθέριο έλαιο του φυτού *Origanum vulgare*

Το *Origanum vulgare* (ριγανέλαιο) είναι αιθέριο έλαιο στο οποίο έχουν αναφερθεί μόνο φαρμακευτικές ιδιότητες (Καραφέρης 2013). Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί σε πείραμα στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*) για την αντιμετώπιση του βακτηρίου *Aeromonas hydrophila* (Zheng et al., 2009).

## Γενικά χαρακτηριστικά

Η ρίγανη (*Origanum vulgare*) είναι αρωματικό ποώδες, πολυετές, φυτό, το οποίο ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae. Το συγκεκριμένο είδος περιλαμβάνει έξι υποείδη και τέσσερις βοτανικές ποικιλίες

Το φυτό έχει ύψος 20-80 εκ., έχει ωοειδή φύλλα αντίθετα μήκους 1-4 εκ. επενδυμένα με αρωματικά, αδενικά στίγματα και φέρει μικρά, χρώματος άσπρου-μωβ άνθη.

Η ρίγανη είναι ιθαγενές φυτό της Ευρώπης και της κεντρικής Ασίας. Σήμερα η καλλιέργειά της έχει επεκταθεί και σε μέρη της ανατολικής και δυτικής περιοχής των Ηνωμένων Πολιτειών και του Καναδά.

### 1.2.4.3. Αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum zeylanicum*

Το έλαιο κανέλας θεωρείται μια ιδανική θεραπεία για το αναπνευστικό, το πεπτικό σύστημα. *In vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν φανερώσει ότι υπάρχουν πολλές ευεργετικές επιδράσεις των φαρμακευτικών ιδιοτήτων της κανέλας (*Cinnamomum zeylanicum*) (Ranasinghe et al., 2013).

## Γενικά χαρακτηριστικά

Το *Cinnamomum verum* ανήκει στην οικογένεια των Lauraceae και είναι ένα μικρό αειθαλές τροπικό δέντρο όπου μεγαλώνει και φτάνει μέχρι τα 10 m ύψος όπου ευδοκιμεί στη Σρι Λάνκα. Στην Ινδία έχει εισαχθεί και καλλιεργείται σε πολλές περιοχές κυρίως της νότιας Ινδίας. Τα φύλλα κανέλας χρησιμοποιούνται στην παραγωγή αιθέριου ελαίου αλλά επίσης κυρίως και στην παραγωγή μπαχαρικών. Η χαρακτηριστική μορφή των φύλλων της κανέλας έχει δερματώδη εμφάνιση συνήθως στην ανάποδη πλευρά του φύλλου του ενώ είναι στιλπνή και από τις δύο μεριές (Li et al., 2008). Η ευγενόλη έχει αναφερθεί ότι είναι το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου του φύλλου της κανέλας (70-95%) (Senanayake et al., 1978). Άλλα σημαντικά συστατικά είναι η λιναλόλη, η κανελααλδεύδη (cinnamaldehyde) (Variyar and Bandopadhyaya, 1989), βενζοϊκό βενζύλιο (Rao et al, 1988).

### 1.2.5. Τρόπος εξαγωγής αιθέριου ελαίου

Τα αιθέρια έλαια συσσωρεύονται σε κύτταρα, σε εκκριτικές κοιλότητες ή σε αδενικά τριχίδια των φυτών. Είναι σφαιρικές κατασκευές με καταφρακτικά κύτταρα (στόματα) και στο εσωτερικό τους περιέχεται το αιθέριο έλαιο. Στην περίπτωση των εσπεριδοειδών, τα στόματα μπορούν να παρατηρηθούν αρκετά εύκολα. Εκτός από τα ανώτερα φυτά ζώα της ξηράς και της θάλασσάς, έντομα, μανιτάρια και μικροοργανισμοί είναι επίσης γνωστά για την παρόμοια βιοσύνθεσή τους στα πτητικά τους συστατικά (Berger, 2007). Σε γενικό βαθμό τα αιθέρια έλαια έχουν οσμή, όπου χρησιμοποιείται σε διαφορετικές βιομηχανίες, ειδικότερα στα αρώματα, στα τρόφιμα (όπως μπαχαρικά, συντηρητικά κ.α.) και στα φαρμακευτικά προϊόντα για θεραπευτική χρήση (Zygodlo & Juliani, 2000).

Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι εξαγωγής αιθέριων ελαίων. Ένας από τους πιο διαδεδομένους είναι με την απόσταξη ατμού, αφού επιτρέπει την εξαγωγή των ελαφρώς πτητικών, υδατοδιαλυτών ουσιών σε χαμηλές θερμοκρασίες. Έχει ιδιαίτερη χρήση όταν τα συστατικά βράζουν σε υψηλή θερμοκρασία (υψηλότερη από 100 °C) και είναι ευαίσθητα όταν πραγματοποιείται η αποσύνθεση τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. Παρόλο που αυτή η μεθοδολογία παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε ότι δεν είναι μία απλή διαδικασία μεταφοράς ατμού. Η απελευθέρωση των συστατικών που υπάρχουν στα στόματα προκαλείται από ρήξη κυτταρικού τοιχώματος και είναι αποτέλεσμα της υψηλότερης πίεσης και της επέκτασης περιεκτικότητας σε λάδι του στοιχείου που παράγεται από την υψηλή θερμότητα. Η ροή ατμού μπαίνει μέσα από τα στόματα, τα «σπάει» και τελικά αποσπά το αιθέριο έλαιο (Baser, 2010).



**Εικόνα 1:** Αιθέριο έλαιο κανέλας και ρίγανης

### 1.3 Είδη απόσταξης

Οι κοινές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή αιθέριων ελαίων είναι:

- **Υδροαπόσταξη:** Η τεχνική περιλαμβάνει απόσταξη νερού που βρίσκεται σε άμεση επαφή με φρέσκα ή μερικές φορές αποξηραμένα φυτικά υλικά. Το φυτικό υλικό αλέθεται και ζυγίζεται και μετά μεταφέρεται στο Clevenger. Το φυτικό υλικό θερμαίνεται από δύο έως τρεις φορές το βάρος του νερού με άμεσο ατμό. Το δοχείο απόσταξης θερμαίνεται, ενώ οι υδρατμοί και το λάδι απομακρύνονται μέσω υδρόψυκτου συμπυκνωτή.
- **Υδροδιάχυση:** Η υδροδιάχυση είναι μια μέθοδος εξαγωγής αιθέριων ελαίων, όπου ο ατμός σε ατμοσφαιρική πίεση (ατμός χαμηλής πίεσης <0-1 bar) διέρχεται μέσω του φυτικού υλικού από την κορυφή του θαλάμου εξαγωγής, με αποτέλεσμα τα αιθέρια έλαια να διατηρούν το αρχικό άρωμα.

- **Ευελιξία:** Αυτή η διαδικασία ισχύει για άνθη όπως γιασεμί ή τεμπέρι, που έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο και τόσο ευαίσθητη που η θέρμανση θα καταστρέψει τα άνθη πριν απελευθερώσει τα αιθέρια έλαια. Τα πέταλα λουλουδιών τοποθετούνται σε δίσκους άοσμου φυτικού ή ζωικού λίπους που θα απορροφήσουν το αιθέριο έλαιο των λουλουδιών. Τα χρησιμοποιημένα πέταλα αφαιρούνται και αντικαθίστανται με φρέσκα. Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται έως ότου το λίπος ή το λάδι κορεστεί με το αιθέριο έλαιο. Αυτό ονομάζεται μείγμα *Enfleurage*. Η προσθήκη αλκοόλ βοηθά στο διαχωρισμό του αιθέριου ελαίου από τις λιπαρές ουσίες. Στη συνέχεια, το αλκοόλ εξατμίζεται αφήνοντας μόνο το αιθέριο έλαιο, επομένως η μέθοδος *Enfleurage* είναι η καλύτερη μέθοδος.
- **Κρύο πάτημα:** Μια άλλη μέθοδος εξαγωγής αιθέριου ελαίου που δεν έχει υψηλή εφαρμογή στην επιστημονική έρευνα είναι η ψυχρή πίεση. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή εσπεριδοειδών ελαίων από περγαμόντο, σταφύλι, λεμόνι κ.λπ.. Τα φρούτα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για να αποσταχθούν τα αιθέρια έλαια, τοποθετούνται πάνω σε αιχμηρές προεξοχές που βγάζουν τις φλούδες. Σε αυτή τη φάση διαπερνούν τα μικροσκοπικά σακουλάκια που περιέχουν το αιθέριο έλαιο. Ολόκληρο το φρούτο συμπιέζεται για να συμπιέσει το χυμό και να διαχωριστεί με φυγοκέντρωση.
- **Απόσταξη ατμού:** Αυτή είναι η πιο κοινή και παλαιότερη μορφή μέθοδος εξαγωγής αιθέριων ελαίων. Σε αυτήν την τεχνική, το επιθυμητό φυτό (φρέσκο ή μερικές φορές αποξηραμένο) τοποθετείται πρώτα στο δοχείο. Στη συνέχεια προστίθεται ατμός και περνά μέσα από το φυτό που περιέχει αρωματικά μόρια ή έλαια. Έπειτα, το φυτό απελευθερώνει αυτά τα αρωματικά μόρια, τα οποία τοποθετούνται μέσα σε μία συσκευή ψύξης. Το κρύο νερό χρησιμοποιείται για την ψύξη των ατμών. Καθώς κρύνονται, συμπυκνώνονται και μετατρέπονται σε υγρή κατάσταση.
- **Εκχύλιση με διαλύτη:** Αυτή η μέθοδος συντελεί στην εκχύλιση των αιθέριων ελαίων με τη χρήση διαλύτη. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το μέρος του φυτού που θα χρησιμοποιηθεί για εκχύλιση. Για παράδειγμα, φύλλα, ρίζες, φρούτα εκχυλίζονται με βενζόλιο με ή χωρίς μείγμα ακετόνης ή πετρελαϊκού αιθέρα, στο κρύο ή σε σημείο βρασμού, ενώ τα άνθη εκχυλίζονται με αιθέρους. Ο διαλύτης εισέρχεται στο φυτό για να διαλύσει τα κεριά και το χρώμα του λαδιού. Μετά την εκχύλιση, ο διαλύτης απομακρύνεται με απόσταξη υπό μειωμένη πίεση αφήνοντας πίσω το ημιστερεό συμπύκνωμα. Αυτό το συμπύκνωμα εκχυλίζεται με απόλυτη αιθανόλη. Το δεύτερο

εκχύλισμα ψύχεται για καθίζηση των κεριών και στη συνέχεια διηθείται. Αυτό το αλκοολικό διάλυμα χωρίς κεριά αποστάζεται υπό μειωμένη πίεση για να απομακρυνθεί το αλκοόλ και τέλος το αιθέριο έλαιο

- **Διαδικασία υποβοηθούμενης από μικροκύματα (MAP):** Η διαδικασία MAP χρησιμοποιεί φούρνο μικροκυμάτων για να διεγείρει μόρια νερού στον φυτικό ιστό, προκαλώντας ρήξη των κυττάρων και απελευθέρωση του αιθέριου ελαίου που παγιδεύεται στο επιπλέον κυτταρικό ιστό των φυτών. Αυτή η τεχνική έχει αναπτυχθεί και αναφερθεί από πολλούς συγγραφείς, ως τεχνική για την εξαγωγή αιθέριων ελαίων, προκειμένου να επιτευχθεί καλή απόδοση της ουσίας και να μειωθεί ο χρόνος εκχύλισης. Αυτή η τεχνική έχει επίσης εφαρμοστεί για την εξαγωγή σαπωνιών από ορισμένα φαρμακευτικά φυτά.
- **Εκχύλιση καρβοξειδίου:** Σε αυτήν την τεχνική, το φυτικό υλικό τοποθετείται σε δοχείο υψηλής πίεσης και διοξείδιο του άνθρακα διέρχεται μέσω του δοχείου. Το διοξείδιο του άνθρακα μετατρέπεται σε υγρό και δρα ως διαλύτης για την εξαγωγή του αιθέριου ελαίου από το φυτικό υλικό. Όταν η πίεση μειώνεται, το διοξείδιο του άνθρακα επιστρέφει σε αέρια κατάσταση χωρίς να αφήνει υπολείμματα. Οι ιδιότητες του αιθέριου ελαίου που εξάγονται με οποιαδήποτε από τις τεχνικές που περιγράφονται παραπάνω εξαρτώνται από τη χημική σύνθεση του ελαίου (Hamid et al., 2011).

#### 1.4 Κυκλοφορικό σύστημα των ιχθύων

Ο αιματολογικές αναλύσεις αποτελούν σημαντικά διαγνωστικά εργαλεία, τόσο στην ανθρώπινη ιατρική όσο και στην κτηνιατρική. Έχουν καθιερωθεί εργαστηριακά πρωτόκολλα για τις αιματολογικές αναλύσεις και έχουν θεσπιστεί συγκεκριμένες τιμές αιματολογικών δεικτών.

Εκτός από ορισμένα είδη, τα όργανα της κλινικής χημείας που αναπτύχθηκαν για την ανθρώπινη ιατρική και κτηνιατρική, χρησιμοποιούνται και στις αναλύσεις που αφορούν τους ιχθύες.

Ωστόσο, καθώς συνεχίζεται η ανάπτυξη αιματολογικών αναλύσεων για διαφορετικά είδη, παρουσιάζονται προκλήσεις που αφορούν την ιδιαιτερότητα των αιματολογικών χαρακτήρων του κάθε είδους. Για παράδειγμα τα ερυθροκύτταρα των ιχθύων έχουν



πυρήνα στο εσωτερικό τους, σε αντίθεση με αυτά των θηλαστικών που δεν έχουν, ενώ τα λευκοκύτταρα (λχ. θρομβοκύτταρα, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και βασεόφιλα) εμφανίζουν παρόμοια μορφολογία με τα λευκοκύτταρα των ανώτερων θηλαστικών (κατά την χρώση Romanowsky–Giemsa).

### **Κλινική Χημεία**

Τα δείγματα αίματος συλλέγονται συνήθως με φλεβοκέντηση της ουραίας φλέβας, η οποία βρίσκεται ακριβώς κοιλιακά προς τον νωτιαίο μυελό, είτε με κοιλιακή είτε με πλευρική προσέγγιση. Το αίμα στη συνέχεια μεταφέρεται αμέσως είτε σε σωλήνα διαχωρισμού ορού είτε σε σωλήνα επικαλυμμένο με ηπαρίνη. Ορός πλάσματος ή ηπαρίνης είναι και οι δύο αποδεκτοί για αιματολογικές αναλύσεις ρουτίνας. Η χρήση σωλήνων ηπαρίνης επιτρέπει τον διαχωρισμό του πλάσματος από ερυθροκύτταρα χωρίς καθυστέρηση. Η σταθερότητα του δείγματος από τα είδη ιχθύων είναι συγκρίσιμη με εκείνη άλλων σπονδυλωτών.

### **Αιματολογία Ιχθύων**

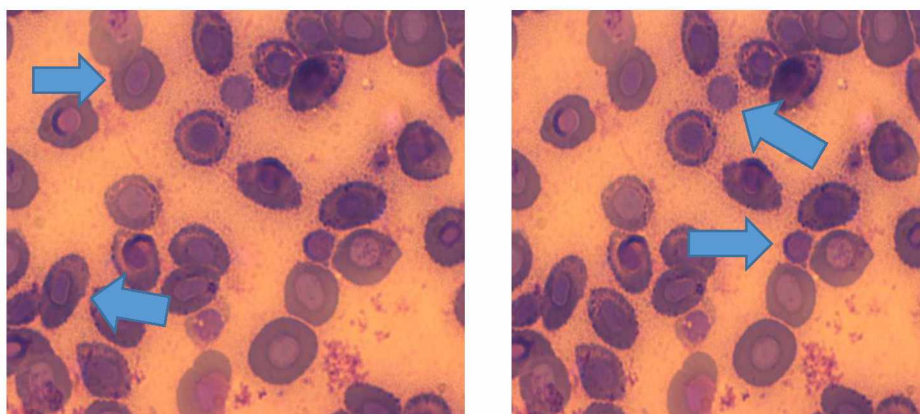
Περιγραφή της μορφολογίας των κυττάρων του αίματος των ψαριών (επιχρισμένα με αίμα τύπου Romanowsky)

Ερυθροκύτταρα:

Τα ερυθροκύτταρα των ψαριών μοιάζουν με τα αντίστοιχα των πτηνών / ερπετών. Έχουν ωοειδές σχήμα με άφθονο λείο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και έναν κεντρικό πυκνό πυρήνα ωοειδούς σχήματος. Το μέγεθος των κυττάρων ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τα είδη. Αυτό αποδείχθηκε εκτενώς από τη δουλειά της Dorothy Charman Saunders στη δεκαετία του 1960 όπου μέτρησε ώριμα ερυθροκύτταρα από πάνω από 600 δείγματα θαλάσσιων ψαριών του Πουέρτο Ρίκο και, σε μια δεύτερη μελέτη, πάνω από 200 ψάρια από την Ερυθρά Θάλασσα.

### Λεμφοκύτταρα:

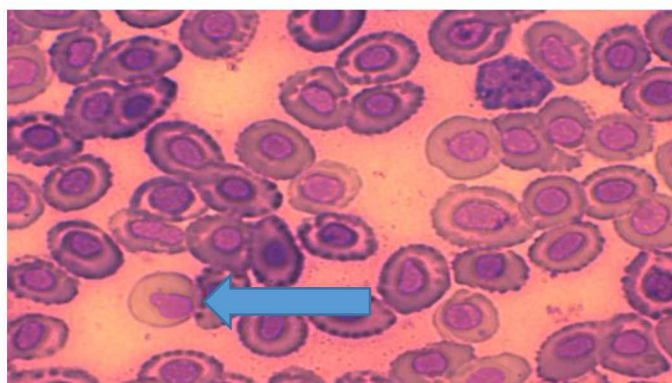
Είναι παρόμοια με αυτά που βρίσκονται στα πουλιά και τα ερπετά. Τα λεμφοκύτταρα ψαριών είναι μικρά στρογγυλά κύτταρα με υψηλή αναλογία N: C και ένα χείλος λείου γαλάζιου κυτοπλάσματος γύρω από τον μεγάλο πυκνό πυρήνα σχήματος οβάλ στρογγυλού. Τα λεμφοκύτταρα ορισμένων ψαριών, εμφανίζονται συχνά παραμορφωμένα με «φλύκταινες» ή εκροές της κυτταρικής μεμβράνης. Ορισμένοι συγγραφείς ταξινομούν περαιτέρω το μέγεθος ως μικρό και μεγάλο, αν και η λειτουργική διαφορά δεν είναι ακόμη κατανοητή.



**Εικόνα 2:** Αριστερά Εμπύρηνα Ερυθρά Αιμοσφαίρια/ Δεξιά Λεμφοκύτταρα

### Μονοκύτταρα:

Όπως και με τα λεμφοκύτταρα, η μορφολογία των μονοκυττάρων ψαριών είναι συγκρίσιμη με εκείνη που βρίσκεται σε θηλαστικά, πουλιά και ερπετά. Τα μονοκύτταρα είναι μεγάλα, συνήθως στρογγυλά κύτταρα με άφθονο μπλε κυτταρόπλασμα που συχνά περιέχουν κενοτόπια. Ο πυρήνας μπορεί να είναι στρογγυλός, οβάλ ή λοβωτός.



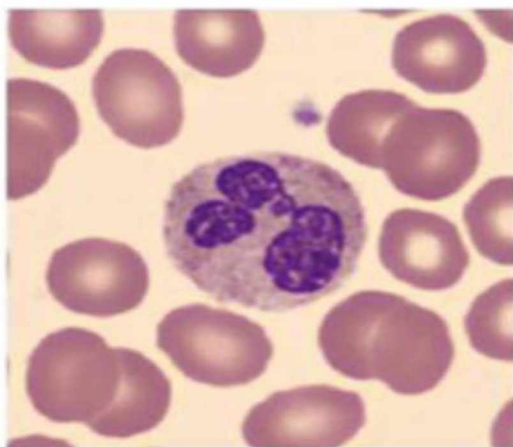
**Εικόνα 3:** Μονοκύτταρο

#### Βασεόφιλα:

Η μορφολογία των βασεόφιλων ψαριών είναι παρόμοια με αυτήν των χερσαίων ζώων. Είναι εξαιρετικά σπάνιες στους περισσότερους τελεόστεους ιχθύες, αλλά απαντώνται συνήθως σε χαμηλούς αριθμούς σε περιφερικά επιχρίσματα αίματος από είδη σαλαχιών. Κατά την χρώση Wright, οι κόκκοι χρωματίζονται μπλε-μαύροι, ενώ οι κόκκοι μπορεί να εμφανίζονται ως κενά κατά την χρώση τύπου Romanowsky 3 βημάτων. Ο πυρήνας είναι συνήθως δύσκολο να παρατηρηθεί λόγω της αφθονίας των κόκκων.

#### Ουδετερόφιλα:

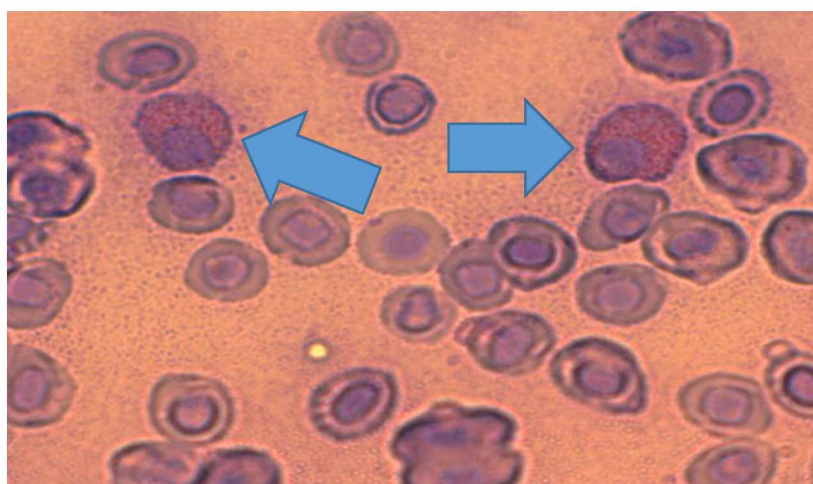
Τα ουδετερόφιλα είναι μεγάλα στρογγυλά κύτταρα με άφθονο διαυγές κυτταρόπλασμα και έναν εκκεντρικό, συμπυκνωμένο πυρήνα που είναι είτε στρογγυλός είτε πολυστρωματικός. Το κυτταρόπλασμα είναι συχνά ανοιχτό γκρι και, σε ορισμένα κύτταρα, περιέχει πολύ λεπτά αζουρόφιλα κοκκία. Αυτός ο τύπος κυττάρου αναφέρεται μερικές φορές ως ετερόφιλος. Τα ουδετερόφιλα στα ελασμοβράγχια εμφανίζονται ως μεγάλα κύτταρα με διαυγές άχρωμο κυτταρόπλασμα που περιέχει έναν στρογγυλό ή πολυστρωματικό πυκνό πυρήνα, συχνά και τα δύο βρίσκονται στο ίδιο επίχρισμα αίματος.



**Εικόνα 4:** Ουδετερόφιλο

## Ηωσινόφιλα

Τα ηωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα είναι μια κατηγορία πολυμορφοπύρηνων λευκών αιμοσφαιρίων, συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία είναι υπεύθυνα για την καταπολέμηση πολυκύτταρων παράσιτων και ορισμένων λοιμώξεων στα σπονδυλωτά. Είναι κοκκιοκύτταρα που αναπτύσσονται κατά την διάρκεια της αιμοποίησης στον μυελό των οστών, πριν μετοικήσουν στο αίμα. Είναι μεγάλα στρόγγυλου σχήματος κύτταρα με ανοιχτό μπλε κυτταρόπλασμα γεμάτα με μεγάλους στρογγυλούς έως ωοειδείς ηωσινόφιλους κόκκους. Το χρώμα των κόκκων ποικίλλει ανάλογα με τα είδη, από έντονο κόκκινο ή πορτοκαλί έως ανοιχτό ροζ. Ο πυρήνας μπορεί να είναι είτε στρογγυλός είτε πολλαπλός.



**Εικόνα 5:** Ηωσινόφιλα

Τα κύτταρα του αίματος των ιχθύων έχουν πολλές λειτουργίες που μπορούν να βοηθήσουν στις αντιδράσεις του ανοσοποιητικού και να διατηρήσουν την ομοιόσταση διαφόρων φυσιολογικών συνθηκών του σώματος. Γενικά η μορφογένεση των αιμοποιητικών κυττάρων στους ιχθύες έχει δείξει ότι είναι όμοια με αυτή των ανώτερων σπονδυλωτών, με κύτταρα όπου προέρχονται από πολυμορφικά αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (Fijan, 2002). Παρόλα αυτά υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία ιχθύων στο κόσμο και οι έρευνες μέχρι τώρα δείχνουν ότι τα αιματοποιητικά όργανα όπως και η μορφολογία των κυττάρων του αίματος είναι διαφορετικά από είδος σε είδος. (Fijan, 2002, Ivanovski et al., 2009; Kondera, 2011; Yuan, Zhu, Jiang, & Chai, 2011; Yang et al., 2015).

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το πείραμα της παρούσης μεταπτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας στο Βόλο. Το πείραμα διήρκησε 63 ημέρες και σε αυτό χρησιμοποιήθηκαν άτομα τσιπούρας, τα οποία προμηθεύτηκαν από τον ιχθυογεννητικό σταθμό της εταιρείας 'ΣΕΛΟΝΤΑ Α.Β.Ε.Ε.'. Τα ιχθύδια μεταφέρθηκαν από τις εγκαταστάσεις του ιχθυογεννητικού σταθμού πολύ προσεκτικά σε ειδικές ισοθερμικές δεξαμενές (για την διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας κατά τη μεταφορά) με οξυγόνο.

Ακολούθως τα ιχθύδια τοποθετήθηκαν στα πειραματικά ενυδρεία. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 5 ενυδρεία και σε κάθε ενυδρείο τοποθετήθηκαν με τυχαία επιλογή 25 ιχθύδια τσιπούρας.

Το κάθε ενυδρείο είχε χωρητικότητα 125 L και διέθετε κλειστό κύκλωμα κυκλοφορίας νερού. Επίσης διέθετε μηχανικό-βιολογικό φίλτρο νερού για την απομάκρυνση αμμωνίας, περιττωμάτων και υπολειμμάτων τροφής τα οποία δεν καταναλώνονταν από τα ιχθύδια, έτσι ώστε να μην υπάρχει αρνητική επίδραση στα αναπτυσσόμενα ιχθύδια που μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα του πειράματος.

Πριν από την έναρξη του πειράματος πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των ενυδρείων, του μηχανικού-βιολογικού φίλτρου και ολόκληρου του χώρου του εργαστηρίου έτσι ώστε να ικανοποιούνται οι απαιτήσεις ευζωίας των ιχθυδίων που θα εγκαθίστανται στα ενυδρεία. Τα ενυδρεία τοποθετήθηκαν το ένα δίπλα στο άλλο σε σειρά (εικόνα 6).

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η επίδραση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης και της κανέλας στα ιχθύδια της τσιπούρας. Εφαρμοσθήκαν δύο συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου, 1% και 2 % στην τροφή των ιχθυδίων, τόσο για το αιθέριο έλαιο ρίγανης όσο και της κανέλας. Συνολικά τα ιχθύδια της τσιπούρας υποβλήθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές μεταχειρίσεις έκθεσής τους σε αιθέριο έλαιο. Η κάθε μεταχείριση εφαρμόστηκε σε ξεχωριστό ενυδρείο εκτροφής. Σε ένα επιπλέον ενυδρείο δεν έγινε καμία εφαρμογή αιθέριου ελαίου και αυτό χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Στο παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι πέντε διαφορετικές μεταχειρίσεις του πειράματος.



Σε κάθε ένα από τα πέντε ενυδρεία τα ιχθύδια υποβλήθηκαν σε διαφορετική μεταχείριση αναφορικά με την έκθεσή τους στο αιθέριο έλαιο της ρίγανης και της κανέλας. Χρησιμοποιήθηκαν δύο συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου, τόσο της κανέλας όσο και της ρίγανης.

Στο ενυδρείο που τοποθετήθηκαν τα ιχθύδια, η 1η ομάδα ήταν οι μάρτυρες, οι οποίοι σιτίζονταν με ποσοστό τροφής 100% χωρίς την προσθήκη αιθέριων ελαίων, η 2η ομάδα ταιΐζονταν με τροφή όπου την είχαμε εμπλουτίσει με ποσότητα αιθέριου ελαίου κανέλας 1%, η 3η με αιθέριο έλαιο κανέλας 2%, η 4η με αιθέριο έλαιο ρίγανης 1% και η 5η με αιθέριο έλαιο ρίγανης 2 %.

Η προσφερόμενη ποσότητα τροφής στα ιχθύδια βασίστηκε σε πίνακες εκτροφής, τους οποίους προτείνει η εταιρία ιχθυοτροφών BIOMAR Hellas. Ο υπολογισμός της ποσότητας της τροφής γίνονταν σε συνάρτηση με την θερμοκρασία και το μέγεθος των ψαριών και αναπροσαρμοζόταν ανάλογα με την βιομάζα των ιχθυδίων σε κάθε ενυδρείο όπως αυτή προέκυπτε μετά από κάθε 2 εβδομάδες περίπου, όταν ζυγίζονταν όλα τα άτομα που βρίσκονταν μέσα σε αυτό. Η παροχή της ιχθυοτροφής γινόταν καθημερινά στις 11:00 πμ εκτός της Κυριακής.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν 4 δειγματοληψίες για την μέτρηση του βάρους. Η διαδικασία της μέτρησης ήταν ως εξής: τα ψάρια εξ αλιεύονταν προσεκτικά με μία απόχη, έτσι ώστε να μην στρεσσαριστούν και να μην τραυματιστούν. Στη συνέχεια τοποθετούνταν σε έναν κάδο, ο οποίος περιείχε φαινοξυαιθανόλη που ήταν απαραίτητη για την αναισθητοποίηση τους και νερό (μέσα από το ενυδρείο). Εφόσον αναισθητοποιούνταν όλα τα ψάρια, μετρούσαμε ξεχωριστά για το καθένα το βάρος του σε ζυγαριά ακριβείας. Οι μετρήσεις καταγράφονταν σε ένα χαρτί για κάθε ενυδρείο ξεχωριστά. Αμέσως μετά τη μέτρηση τα ψάρια τοποθετούνταν με προσοχή να μην τραυματιστούν σε έναν κάδο με νερό (μέσα από το ενυδρείο) χωρίς αναισθητικό για την ανάνηψη τους και έπειτα επανατοποθετούνταν στα ενυδρεία. Την τελευταία μέρα τα ψάρια θανατώθηκαν χρησιμοποιώντας υψηλή δόση αναισθητικού.



**Εικόνα 6:** Πειραματικά Ενυδρεία - διάταξη

Καθ' όλη την διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος, το νερό που χρησιμοποιήθηκε στα πειραματικά ενυδρεία, προετοιμάζονταν με συγκεκριμένη διαδικασία, έτσι ώστε να εξασφαλισθούν οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των ιχθυδίων. Αρχικά μία λεκάνη ανάμιξης γεμιζόταν με νερό βρύσης. Στη συνέχεια για την αποχλωρίωση του νερού στην λεκάνη, προστίθετο διάλυμα extreme 5ml/38lt και

ανακινούταν με έναν πλαστικό σωλήνα για την καλύτερη διάλυση του αποχλωρωτικού διαλύματος. Κατά την διάρκεια της ανάδευσης γινόταν η προσθήκη άλατος Instant Ocean Seasalt για να επιτευχθεί το κατάλληλο ποσοστό αλατότητας. Ο έλεγχος της αλατότητας μέσα στην λεκάνη κουβά γινόταν με ειδικό ηλεκτρονικό μετρητή της αλατότητας Eutech instruments ecoscan salt6 (εικόνα 7). Όταν η αλατότητα έφτανε στα επιθυμητά επίπεδα, το νερό μεταφερόταν με τη χρήση μικρότερων λεκανών για την πλήρωση των πειραματικών ενυδρείων, μέχρι την επιθυμητή στάθμη. Ύστερα γινόταν επαναπροσδιορισμός της αλατότητας του νερού στο εσωτερικό του ενυδρείου, με βέλτιστες τιμές  $30-32 \pm 1$  ‰.

Σε καθημερινή βάση ή κάθε δύο μέρες γινόταν αντικατάσταση του 30-40 % του συνολικού όγκου του νερού των ενυδρείων και παράλληλα σιφωνισμός για τον καθαρισμό περιττωμάτων και υπολειμμάτων τροφής που είχαν κατακαθίσει στον πυθμένα. Μετά από οποιαδήποτε αντικατάσταση του νερού γινόταν μέτρηση της θερμοκρασίας του νερού (βέλτιστες τιμές 22-24 °C).

Κάθε ενυδρείο διέθετε μια αερόπετρα, η οποία απελευθέρωνε φυσαλίδες αέρα από τους συμπιεστές αέρα στο εργαστήριο, με ρυθμιζόμενη συχνότητα και ένταση. Τέλος ανά τακτά χρονικά διαστήματα προστίθετο στο εσωτερικό του μηχανικού-βιολογικού φίλτρου ή στο νερό, απευθείας διάλυμα βακτηρίων Niteout II της εταιρείας MICROBE-LIF με σκοπό την νιτροποίηση των αζωτούχων οργανικών ενώσεων.





**Εικόνα 7:** Ηλεκτρονικός μετρητής της αλατότητας Eutech instruments ecoscan salt6

Στο τέλος, μετά την θανάτωση των ιχθύων, πάρθηκε αίμα από 5 ιχθύδια της κάθε δεξαμενής έτσι ώστε να έχουμε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα του πληθυσμού για να εκτιμηθούν πιθανές επιδράσεις επί της ευζωίας των ιχθυδίων, μέσω των αιματολογικών παρατηρήσεων.

## 2.1. Μέθοδος NEU-BAUER

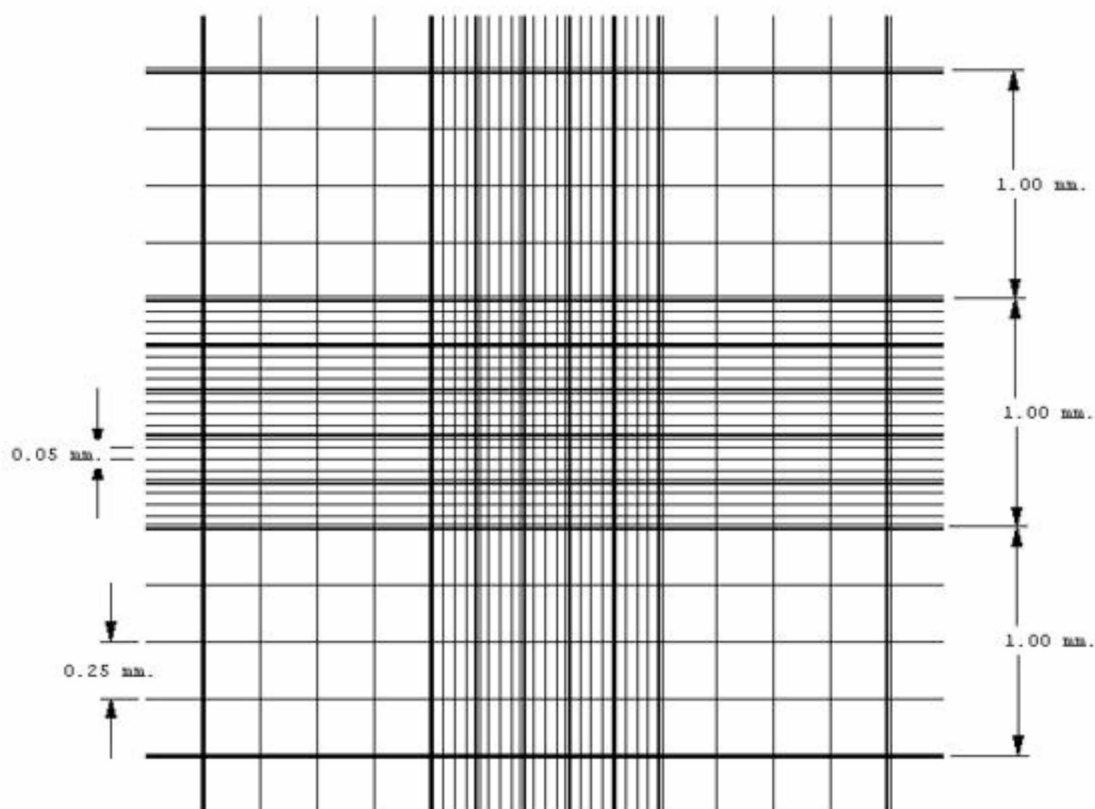
Παρόλο που έχει αναπτυχθεί μια ποικιλία αυτοματοποιημένων οργάνων καταμέτρησης κυττάρων, το Αιμοκυτταρόμετρο παραμένει η πιο κοινή μέθοδος που χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση κυττάρων σε όλο τον κόσμο. Το αιμοκυτταρόμετρο που χρησιμοποιείται πιο συχνά είναι η πλάκα Neubauer (ή «Βελτιωμένο Neubauer»).

Η πλάκα του Neubauer είναι μια παχιά γυάλινη πλάκα με μέγεθος γυάλινης αντικειμενοφόρου πλάκας (30x70x4mm). Η περιοχή καταμέτρησης αποτελείται από δύο τετράγωνες διαμορφωμένες περιοχές. Υπάρχουν καταθλίψεις ή τάφροι και στις

δύο πλευρές ή μεταξύ των περιοχών στις οποίες τα τετράγωνα πάνω στην πλάκα σχηματίζουν ένα σχήμα «Η».

Η κύρια βασική περιοχή στο κέντρο της πλάκας είναι  $3 \text{ mm}^2$  χωρισμένη σε 9 μεγάλα τετράγωνα το καθένα με επιφάνεια  $1 \text{ mm}^2$  (εικόνα 8). Το μεγάλο κεντρικό τετράγωνο (το οποίο μπορεί να φανεί εξ ολοκλήρου με μεγέθυνση 10X), χωρίζεται σε 25 μεσαία τετράγωνα με διπλές ή τριπλές γραμμές.

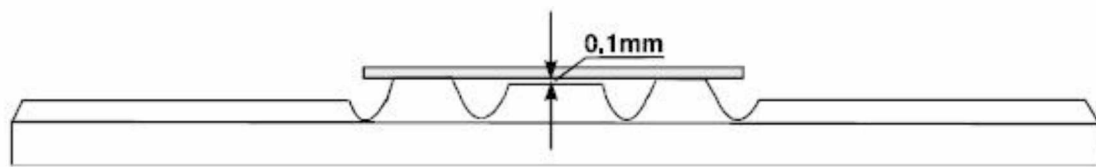
Κάθε ένα από αυτά τα 25 τετράγωνα χωρίζεται και πάλι σε 16 μικρά τετράγωνα με μονές γραμμές, έτσι ώστε κάθε ένα από τα μικρότερα τετράγωνα να έχει επιφάνεια  $1/400 \text{ mm}^2$ .



**Εικόνα 8:** Διάταξη της βασικής περιοχής της πλάκας Neubauer

Το γυάλινο κάλυμμα είναι ένα τετράγωνο γυαλί πλάτους 22 mm. Το γυάλινο κάλυμμα τοποθετείται στην κορυφή της πλάκας Neubauer, καλύπτοντας την κεντρική περιοχή. Η ελεγχόμενη περιοχή είναι 0,1 mm χαμηλότερη από τον υπόλοιπο θάλαμο.

Έτσι, όταν ένα κάλυμμα κάλυψης διατηρείται στην περιοχή μέτρησης, υπάρχει ένα κενό 0,1 mm (1/10 mm) μεταξύ της ολίσθησης του καλύμματος και της περιοχής με την οποία βρίσκεται σε επαφή.



Εικόνα 9: Σχηματική αποτύπωση κατακόρυφης τομής της πλάκας Neubauer

Η μέτρηση μπορεί να γίνει είτε στο κεντρικό μεγάλο τετράγωνο είτε στα γωνιακά τετράγωνα, ανάλογα με το μέγεθος των κυττάρων που μελετώνται.

#### Καταμέτρηση περιοχής WBC (White Blood Cells)

Οι τέσσερις μεγάλες επιφάνειες που τοποθετούνται στις γωνίες χρησιμοποιούνται για τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων. Δεδομένου ότι η συγκέντρωσή τους είναι χαμηλότερη από τα ερυθρά αιμοσφαίρια απαιτείται μεγαλύτερη περιοχή για την καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων.

#### Καταμέτρηση περιοχής RBC (Red Blood Cells)

Το μεγάλο κεντρικό τετράγωνο χρησιμοποιείται για μετρήσεις RBC. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, αυτή η περιοχή υποδιαιρείται σε 25 μεσαίες πλατείες, οι οποίες με τη σειρά τους χωρίζονται σε 16 τετράγωνα.

Από τις 25 μεσαίες πλατείες, μόνο τα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα και το κεντρικό τετράγωνο εντός του μεγάλου κεντρικού τετραγώνου χρησιμοποιούνται για την εκτέλεση μετρήσεων RBC.

### **2.1.1. Προετοιμασία δείγματος**

Ανάλογα με τον τύπο του δείγματος, ένα παρασκεύασμα αραιώσης με κατάλληλη συγκέντρωση θα πρέπει να προετοιμάζεται για τον υπολογισμό των κυττάρων. Συνήθως, το εύρος συγκέντρωσης για έναν αριθμό κυττάρων με την πλάκα Neubauer κυμαίνεται μεταξύ 250.000 κυττάρων / ml και 2,5 εκατομμυρίων κυττάρων / ml.

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατάλληλη αραιώση του μίγματος ως προς τον αριθμό των κυττάρων που πρέπει να μετρηθούν. Εάν το δείγμα δεν είναι αρκετά αραιωμένο, τα κελιά θα είναι πολύ γεμάτα και δύσκολο να μετρηθούν.

### **2.1.3. Εισαγωγή του δείγματος στην πλάκα Neubauer**

Με μια πιπέτα λαμβάνονται προσεκτικά περίπου 20 μl του κυτταρικού μείγματος (αραιώση). Τοποθετείται το άκρο της πιπέτας στην άκρη του καλύμματος και αφαιρείται αργά το υγρό μέχρι να γεμίσει η πλάκα μέτρησης.

Η τριχοειδής δράση θα βοηθήσει να διασφαλιστεί ότι ο θάλαμος μέτρησης είναι γεμάτος, αλλά πρέπει να ληφθεί μέριμνα ώστε να μην υπερφορτωθεί η πλάκα. Ένας όγκος 10 μl επαρκεί για να γεμίσει μια πλάκα μέτρησης.

### **Υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων**

Ο συνολικός αριθμός κυττάρων ανά μικρόλιτρο δείγματος μπορεί να υπολογιστεί από τον αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν και την περιοχή που μετρήθηκε. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι ελεγχόμενες περιοχές του θαλάμου περιέχουν ακριβή όγκο αραιωμένου δείγματος.

Δεδομένου ότι μετράμε μόνο έναν μικρό όγκο αραιωμένου δείγματος, πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένας γενικός τύπος για τη μετατροπή του αριθμού σε αριθμό κυττάρων / μικρόλιτρο.

## 2.2. Αιματοκρίτης

Ένας σημαντικός δείκτης ευζωίας των ιχθύων είναι και ο αιματοκρίτης. Ο αιματοκρίτης (HCT) είναι μια τιμή που προκύπτει από αιματολογική εξέταση και δείχνει το ποσοστό του όγκου που καταλαμβάνουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια στο αίμα. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι ο πιο πολυπληθής τύπος κυττάρου του αίματος και ο βασικός μηχανισμός που διαθέτει ο οργανισμός του ιχθύ για τη μεταφορά οξυγόνου στους διάφορους ιστούς μέσω της ροής του αίματος.

Για τον αιματοκρίτη χρησιμοποιήθηκε ειδική φυγόκεντρος συσκευή, ενώ παράλληλα καταμετρήθηκε και το ποσοστό των αιμοσφαιρίων με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου (Εικόνα 11) σε μεγέθυνση 4×100.

## 2.3. Διαδικασία Χρώσης δειγμάτων

Αρχικά ελήφθησαν δείγματα αίματος από 5 τυχαίους ιχθύες (n=5) από κάθε ενυδρείο (μεταχειρίσεις), μετά την αναισθητοποίησή τους, πριν την τελική τους θανάτωση. Μέσα από τα φιαλίδια συλλογής του αίματος, ελήφθη μικροποσότητα αίματος με τα ειδικά τριχοειδή σωληνάρια μικροαιματοκρίτη. Η φυγοκέντριση των δειγμάτων του αίματος διαρκούσε 10 min στις 3500 rpm.

Ακολούθως, μετά τον διαχωρισμό του πλάσματος από το αίμα, τα τριχοειδή σωληνάρια τοποθετήθηκαν στον πίνακα αιματοκρίτη και ελήφθησαν οι μετρήσεις που αφορούσαν τον αιματοκρίτη των ιχθυδίων της τσιπούρας.

Στη συνέχεια τα δείγματα αραιώθηκαν 1 ml NaCl και 5μl αίμα και ακολούθως μικρή ποσότητα απλώθηκε πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα με την βοήθεια καλυπτρίδας. Στο βιολογικό αυτό υλικό εφαρμόστηκαν οι χρωστικές Giemsa και May-Grunwald.



**Εικόνα 10:** Πειραματικά ενδρεία με εγκατεστημένα τα ιχθύδια της τσιπούρας





**Εικόνα 11:** Οπτικό μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση των λευκών αιμοσφαιρίων

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Αιματολογικοί δείκτες ερυθρών αιμοσφαιρίων

Στον παρακάτω πίνακα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των προσδιορισμών (μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα) των αιματολογικών δεικτών που αφορούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια των ιχθυδίων της τσιπούρας, στα οποία είτε χορηγήθηκε συνήθης τροφή (μάρτυρες - Cont), είτε εμπλουτισμένη με αιθέριο έλαιο κανέλας, σε δοσολογία 1 και 2 % (Cin 1% και Cin 2%), ή αιθέριο έλαιο ρίγανης σε δοσολογία επίσης 1 και 2 % (Orig 1% και Orig 2%).

Πίνακας 1. Αποτελέσματα αιματολογικών δεικτών (μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα), των ερυθρών αιμοσφαιρίων των ιχθυδίων τσιπούρας για τις πέντε πειραματικές μεταχειρίσεις.

	Αιματολογικές Παράμετροι (ερυθρών αιμοσφαιρίων)	
	RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	Αιματοκρίτης (%)
Cont	3,82 $\pm$ 0,44	37,2 $\pm$ 2,4
Cin 1%	3,80 $\pm$ 0,72	40,2 $\pm$ 4,5
Cin 2%	3,72 $\pm$ 0,42	42,6 $\pm$ 5,7
Orig 1%	3,23 $\pm$ 0,38	45,6 $\pm$ 2,2
Orig 2%	2,12 $\pm$ 0,29	33,4 $\pm$ 5,6

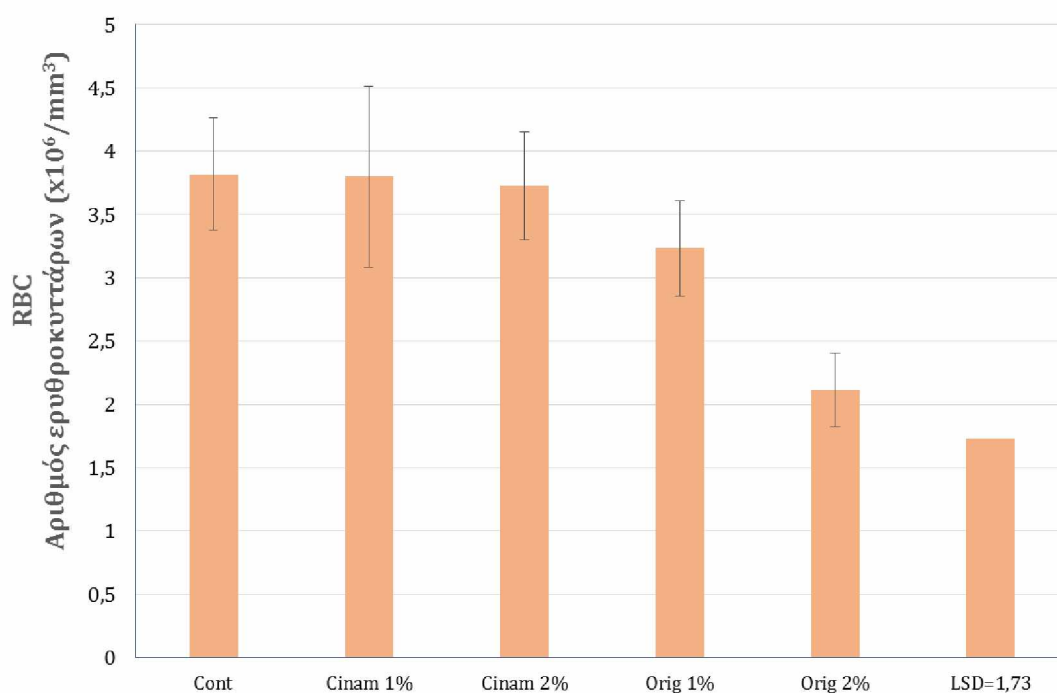
#### I. Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων ανά μονάδα όγκου του αίματος (RBC).

Οι μέσες τιμές RBC που προσδιορίστηκαν από τις αναλύσεις του αίματος των ιχθυδίων της τσιπούρας στην παρούσα εργασία κυμάνθηκαν μεταξύ 2,12 και 3,82 ανάλογα με την μεταχείριση (προσθήκη ή όχι αιθέριου ελαίου στην τροφή των ιχθυδίων).

Πιο συγκεκριμένα οι τιμές του RBC στα ιχθύδια που δεν έγινε προσθήκη αιθέριων ελαίων και στα ιχθύδια που έγινε προσθήκη αιθέριου ελαίου κανέλας 1 και 2 % και αιθέριου ελαίου ρίγανης 1%, ήταν μεγαλύτερες από  $3 \times 10^6/\mu\text{L}$  αίματος. Οι τιμές αυτές συμφωνούν με τις τιμές του RBC που αναφέρονται σε σχετικές μελέτες, οι οποίες αφορούν τους αιματολογικούς δείκτες για το είδος *Sparus aurata* (Fazio et al, 2018).



Μόνο στην μεταχείριση που αφορά την προσθήκη ριγανέλαιου 2% στην τροφή των ιχθυδίων της τσιπούρας, ο δείκτης RBC υποχώρησε σε σχέση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Γενικά όμως οι τιμές RBC και για τις πέντε πειραματικές μεταχειρίσεις δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά, όπως προκύπτει από την ανάλυση της διασποράς (παρατίθεται στο παράρτημα) και την γενική δοκιμασία του F για τις τιμές RBC της παρούσας εργασίας ( $F=1,78$  με 4 και 14 BE,  $P=0,189$ ) (εικόνα 12).

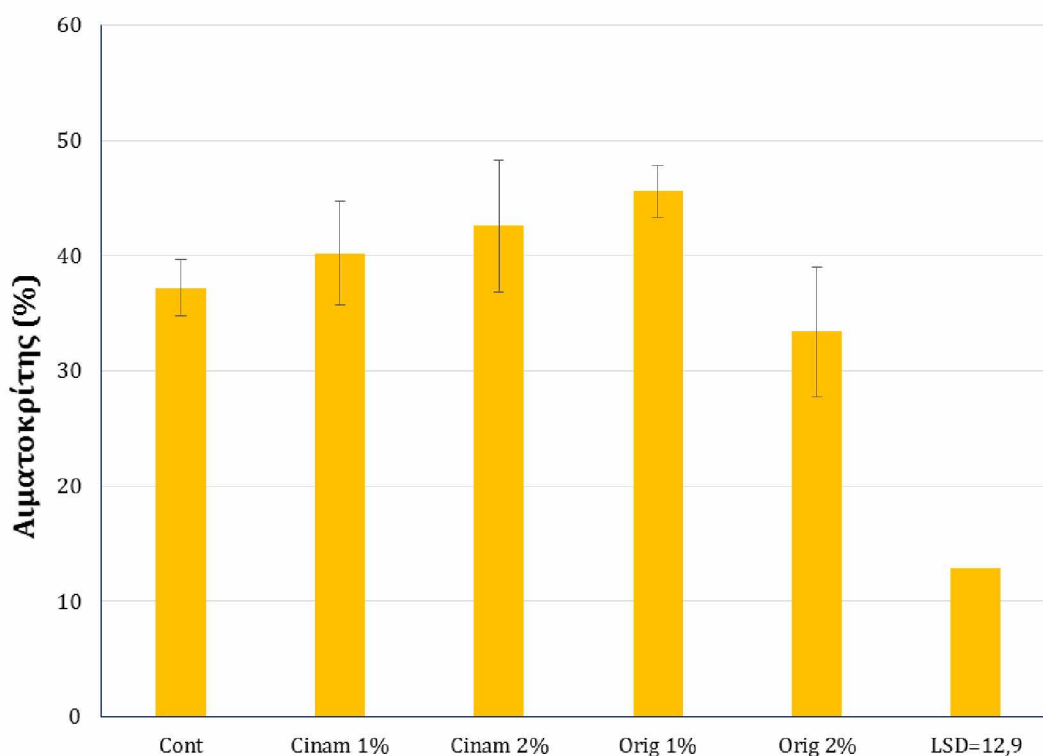


Εικόνα 12: Μέσοι και τυπικά σφάλματα των τιμών RBC, των ιχθυδίων της τσιπούρας που δέχθηκαν στην διαίτά τους αιθέρια έλαια κανέλας και ρίγανης σε συγκέντρωση 1 και 2%. Μεταξύ των μεταχειρίσεων δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $\alpha=0,05$ ).

## II. Αιματοκρίτης

Οι τιμές του αιματοκρίτη που προσδιορίστηκαν από τις αναλύσεις του αίματος των ιχθυδίων της τσιπούρας στην παρούσα εργασία, δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των πέντε πειραματικών μεταχειρίσεων και ήταν αντίστοιχες με τις τιμές που αναφέρουν άλλοι ερευνητές για το είδος της τσιπούρας (Fazio et al, 2018). Η στατιστική του F, που προκύπτει από την ανάλυση της διασποράς των τιμών του

αιματοκρίτη, ήταν μη σημαντική ( $F=1,17$  με 4 και 20 ΒΕ,  $P=0,3$ ) και παρατίθεται στο παράρτημα της εργασίας. Αυτό σημαίνει ότι η προσθήκη των αιθέριων ελαίων της κανέλας και της ρίγανης δεν είχε σημαντική επίδραση στον αιματοκρίτη των ιχθυδίων της τσιπούρας. (εικόνα 13).



Εικόνα 13: Μέσοι και τυπικά σφάλματα των τιμών του αιματοκρίτη, των ιχθυδίων της τσιπούρας που δέχθηκαν στην διαίτά τους αιθέρια έλαια κανέλας και ρίγανης σε συγκέντρωση 1 και 2%. Μεταξύ των μεταχειρίσεων δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $\alpha=0,05$ ).

### 3.2. Αιματολογικοί δείκτες λευκών αιμοσφαιρίων

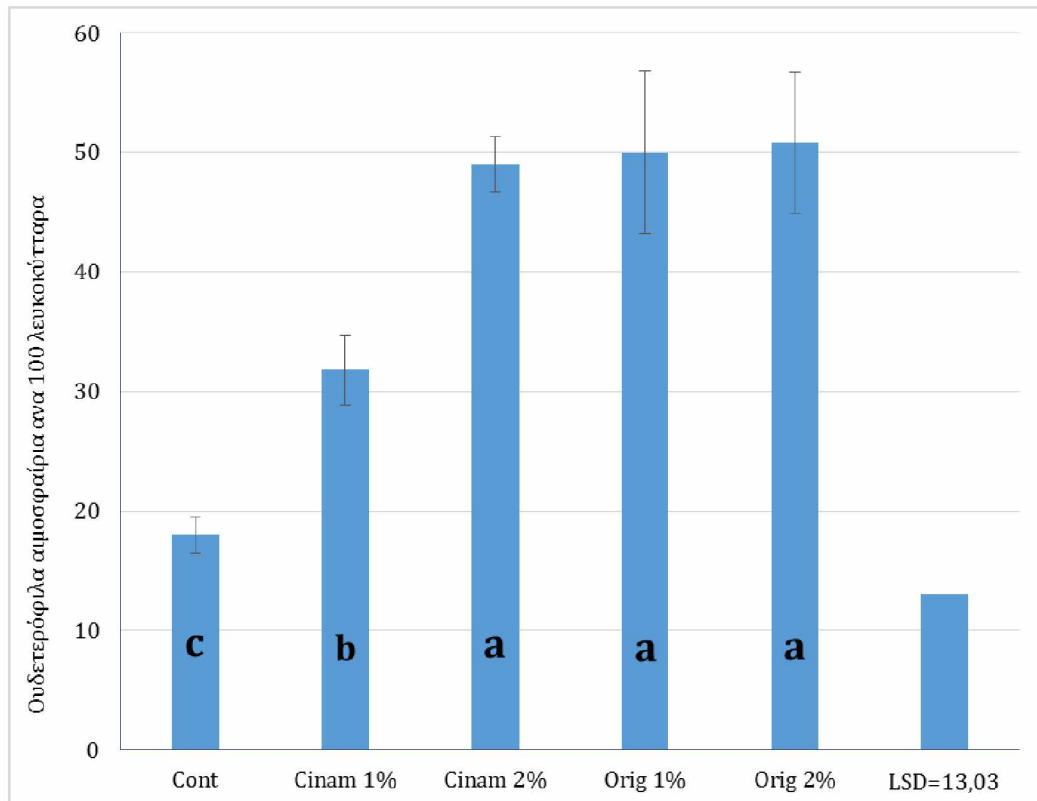
Στον παρακάτω πίνακα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των προσδιορισμών (μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα) των αιματολογικών δεικτών που αφορούν τα λευκά αιμοσφαίρια των ιχθυδίων της τσιπούρας, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Πίνακας 2. Αποτελέσματα αιματολογικών δεικτών (μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα), των λευκών αιμοσφαιρίων των ιχθυδίων τσιπούρας για τις πέντε μεταχειρίσεις του πειράματος. Οι τιμές αφορούν αριθμό του εκάστοτε τύπου λευκών αιμοσφαιρίων σε σύνολο 100 λευκών.

	Αιματολογικές Παράμετροι (λευκών αιμοσφαιρίων)			
	Ουδετερόφιλα	Λεμφοκύτταρα	Ηωσινόφιλα	Μονοκύτταρα
Cont	18±1,5	66,8±2,5	9±0,9	6,2±1,6
Cin 1%	31,8±2,9	58,4±3,9	4,8±1,1	5,4±1,0
Cin 2%	49±2,3	35,2±5,9	6±1,5	4,8±1,4
Orig 1%	50±6,8	43,8±6,3	4±1,1	2,4±0,5
Orig 2%	50,8±5,9	45,6±6,0	2,2±0,6	1,4±0,5

### III. Αριθμός ουδετερόφιλων αιμοσφαιρίων ανά 100 λευκοκύτταρα

Στην εικόνα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού των ουδετερόφιλων κυττάρων ανά 100 λευκοκύτταρα, στα δείγματα αίματος των ιχθυδίων του πειράματος. Η ανάλυση της διασποράς έδειξε ότι υπάρχει σημαντική επίδραση των αιθέριων ελαίων ( $F=10,87$  με 4 και 20 ΒΕ,  $P<0,001$ ).

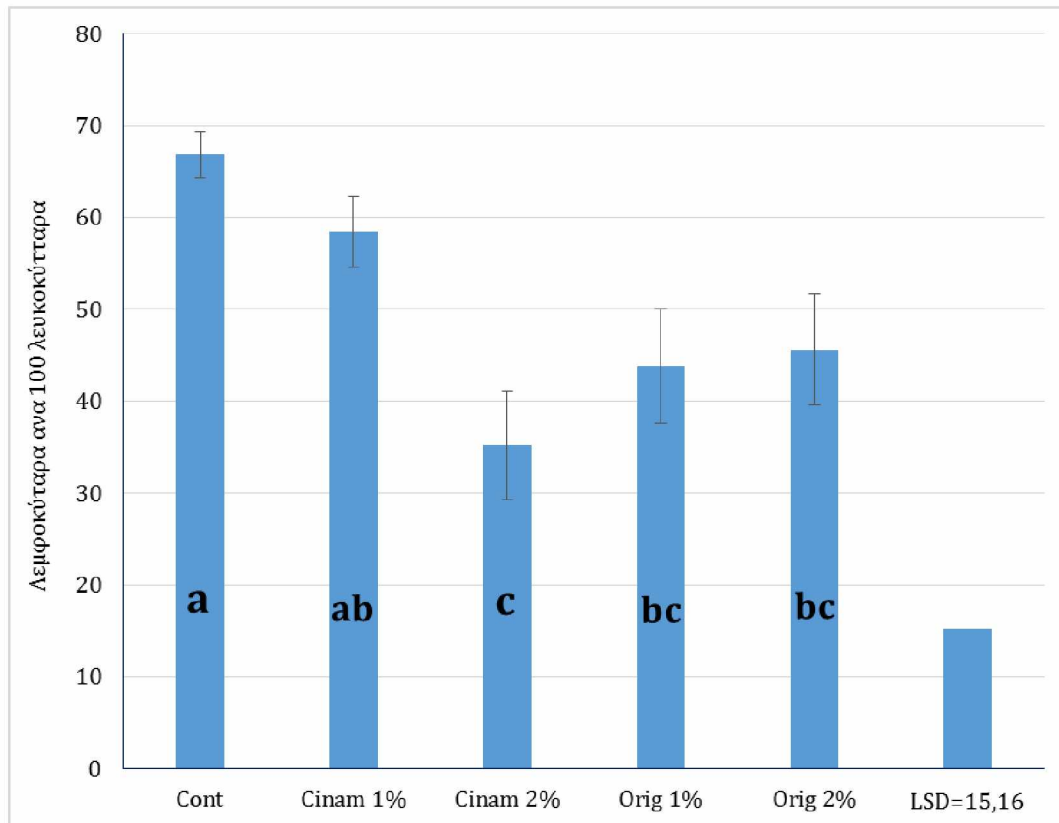


Εικόνα 14: Μέσοι και τυπικά σφάλματα του αριθμού των ουδετερόφιλων αιμοσφαιρίων που αντιστοιχούν σε 100 λευκοκύτταρα, των ιχθυδίων της τσιπούρας που δέχθηκαν στην διαίτά τους αιθέρια έλαια κανέλας και ρίγανης σε συγκέντρωση 1 και 2%. Οι μέσοι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $\alpha=0,05$ ), σύμφωνα με την δοκιμασία SNK.

Οι συγκρίσεις των μέσων φανερώνουν ότι η αύξηση στην δόση του χορηγούμενου αιθέριου ελαίου της κανέλας προκαλεί αύξηση στον αριθμό των ουδετερόφιλων κυττάρων στα ιχθυδία της τσιπούρας και ότι το αιθέριο της ρίγανης είχε μεγαλύτερη επίδραση.

#### IV. Αριθμός λεμφοκυττάρων ανά 100 λευκοκύτταρα

Η χορήγηση αιθέριων ελαίων στην τροφή των ιχθυδίων της τσιπούρας είχε σημαντική επίδραση και στον αριθμό των λεμφοκυττάρων (εικόνα 15). Από την ανάλυση της διασποράς των τιμών που αφορούσαν τα λεμφοκύτταρα προέκυψε σημαντική τιμή για την τιμή του πειραματικού F ( $F=10,87$  με 4 και 20 ΒΕ,  $P<0,001$ ).



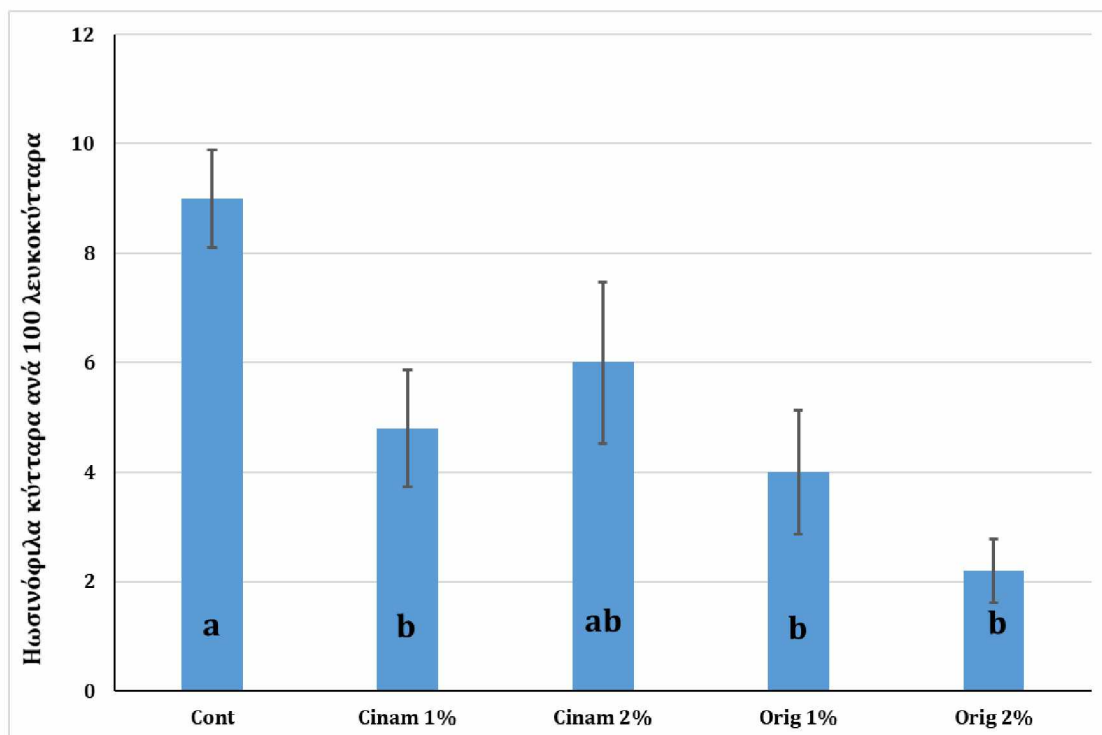
Εικόνα 15: Μέσοι και τυπικά σφάλματα του αριθμού των λεμφοκυττάρων που αντιστοιχούν σε 100 λευκοκύτταρα, των ιχθυδίων της τσιπούρας που δέχθηκαν στην διαίτά τους αιθέρια έλαια κανέλας και ρίγανης σε συγκέντρωση 1 και 2%. Οι μέσοι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $\alpha=0,05$ ), σύμφωνα με την δοκιμασία SNK.

Οι συγκρίσεις των μέσων των πειραματικών μεταχειρίσεων δείχνουν ότι η αύξηση στην χορήγηση αιθέριου ελαίου κανέλας, όπως και η χορήγηση ριγανέλαιου (ανεξάρτητα από δόση) επιφέρει σημαντική ελάττωση των λεμφοκυττάρων στην τσιπούρα.

## V. Αριθμός Ηωσινόφιλων κυττάρων ανά 100 λευκοκύτταρα

Σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων του πειράματος, διαπιστώθηκαν και στον αιματολογικό δείκτη που αφορά τα ηωσινόφιλα κύτταρα ( $F=6,24$  με 4 και 19 ΒΕ,  $P<0,002$ ). Στην εικόνα 16 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων που αφορούν τα ηωσινόφιλα κύτταρα. Οι τιμές αφορούν τις πραγματικές μετρήσεις, ενώ η ανάλυση της διασποράς και οι συγκρίσεις των μέσων των μεταχειρίσεων έγιναν μετά από μετατροπή των αρχικών τιμών στις τετραγωνικές τους ρίζες (παρατίθεται στο

παράρτημα της εργασίας) και με την εξαίρεση μιας ακραίας τιμής (Outlier) στην μεταχείριση με την χορήγηση 2% αιθέριου ελαίου κανέλας (Cin 2%).



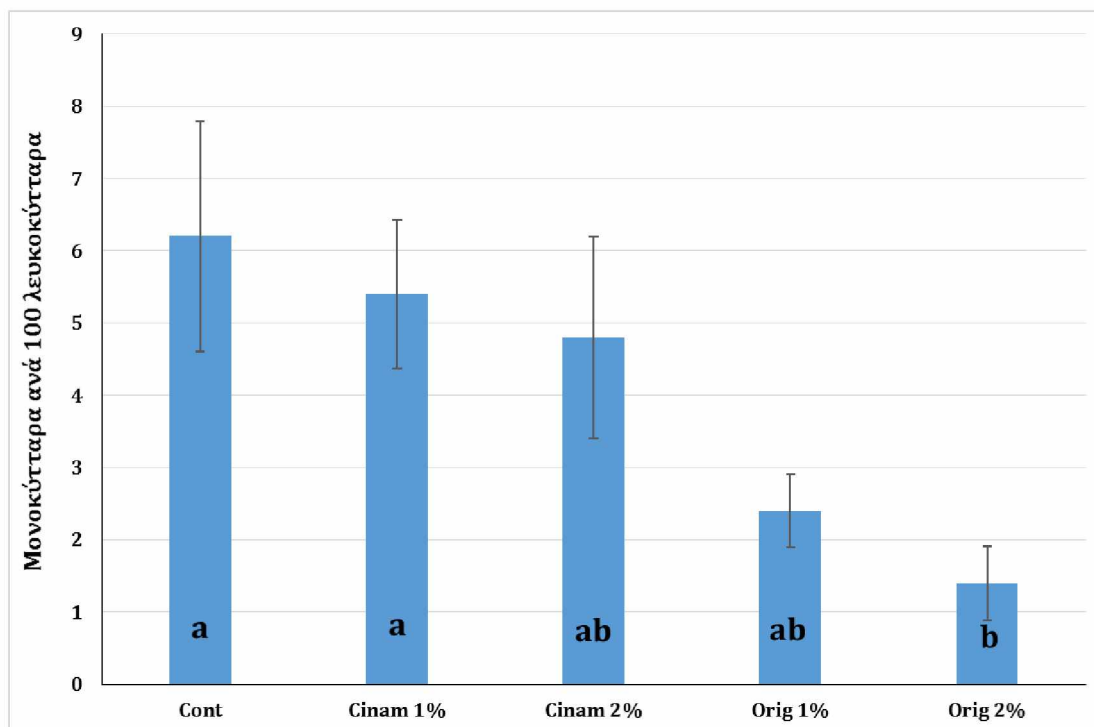
Εικόνα 16: Μέσοι και τυπικά σφάλματα του αριθμού των ηωσινόφιλων κυττάρων που αντιστοιχούν σε 100 λευκοκύτταρα, των ιχθυδίων της τσιπούρας που δέχθηκαν στην διαίτά τους αιθέρια έλαια κανέλας και ρίγανης σε συγκέντρωση 1 και 2%. Οι μέσοι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $\alpha=0,05$ ), σύμφωνα με την δοκιμασία SNK.

Σύμφωνα με τις συγκρίσεις των μέσων των πειραματικών μεταχειρίσεων διαπιστώνεται ότι η χορήγηση τροφής στα ιχθύδια της τσιπούρας εμπλουτισμένης με αιθέρια έλαια επιφέρει ελάττωση στον αριθμό των ηωσινόφιλων κυττάρων.

## VI. Αριθμός μονοκυττάρων ανά 100 λευκοκύτταρα

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν σαφή επίδραση της παρουσίας των αιθέριων ελαίων της κανέλας και της ρίγανης στον αριθμό των μονοκυττάρων λευκών αιμοσφαιρίων στον ιστό του αίματος της τσιπούρας ( $F=3,8$  με 4 και 20 BE,  $P=0,02$ ).

Στη παρακάτω εικόνα 17 παρουσιάζονται οι συγκρίσεις των μέσων των πέντε πειραματικών μεταχειρίσεων που αφορούν στον αριθμό των μονοκύτταρων λευκών αιμοσφαιρίων των ιχθυδίων της τσιπούρας που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Η στατιστική ανάλυση έγινε μετά από μετατροπή των προτύπων τιμών στις τετραγωνικές τους ρίζες και παρατίθεται στο παράρτημα της εργασίας.



Εικόνα 17: Μέσοι και τυπικά σφάλματα του αριθμού των μονοκυττάρων που αντιστοιχούν σε 100 λευκοκύτταρα, των ιχθυδίων της τσιπούρας που δέχθηκαν στην διαίτα τους αιθέρια έλαια κανέλας και ρίγανης σε συγκέντρωση 1 και 2%. Οι μέσοι που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $\alpha=0,05$ ), σύμφωνα με την δοκιμασία SNK.

Οι συγκρίσεις των μέσων φανερώνουν σαφή επίδραση της παρουσίας των αιθέριων ελαίων στην τροφή της τσιπούρας πάνω στον αριθμό των μονοκύτταρων λευκών αιμοσφαιρίων, καθώς η αύξηση στην χορηγούμενη δόση φαίνεται να επιφέρει ελάττωση του συγκεκριμένου αιματολογικού δείκτη, ενώ είναι σαφές ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης έχει μεγαλύτερη επίδραση στον αριθμό των μονοκύτταρων λευκών αιμοσφαιρίων σε σχέση με εκείνο της κανέλας.



#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η χρήση των φυτικών εκχυλισμάτων και ιδιαίτερα η προσθήκη αιθέριων ελαίων στην διατροφή των ιχθύων είναι ένα πολύ επίκαιρο πεδίο έρευνας στις σύγχρονες υδατοκαλλιέργειες, καθώς είναι βιοαποικοδομήσιμες φυσικής προέλευσης ουσίες, ενώ τους αναγνωρίζονται και πολλές ενδιαφέρουσες ιδιότητες όπως αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές δράσεις. Στη παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η επίδραση της χορήγησης αιθέριου ελαίου κανέλας και ριγάνης σε αιματολογικούς δείκτες που σχετίζονται με τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα λευκά αιμοσφαίρια της τσιπούρας.

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης, φαίνεται ότι η χρήση αιθέριου ελαίου κανέλας και ριγάνης σε ποσότητες 1 και 2 % κατά βάρος στη χορηγούμενη δίαιτα των ιχθυδίων της τσιπούρας δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στους αιματολογικούς δείκτες που αφορούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια, όπως ο δείκτης RBC (αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων ανά μονάδα όγκου του αίματος) και ο αιματοκρίτης (ποσοστό κατ' όγκο των ερυθρών αιμοσφαιρίων) (εικόνες 9 και 10). Οι τιμές του RBC και του αιματοκρίτη που προσδιορίστηκαν στην παρούσα εργασία ήταν ανάλογες με τις αντίστοιχες τιμές που αναφέρονται και από άλλους ερευνητές για το είδος *Sparus aurata* (Fazio et al, 2013, 2018).

Όσον αφορά τους αιματολογικούς δείκτες των λευκών αιμοσφαιρίων της τσιπούρας, η επίδραση των αιθέριων ελαίων ήταν πιο διακριτή. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση σε κάθε κατηγορία λευκών αιμοσφαιρίων (εικόνες 11, 12, 13 και 14), γεγονός που προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην αναλογία τους σε σύγκριση με τα ιχθυύδια μάρτυρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη των αιθέριων ελαίων στην τροφή επέφερε σημαντική αύξηση στην αναλογία των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων. Μεγαλύτερες τιμές παρουσίασαν οι μεταχειρίσεις με κανέλα 2% και με ριγανέλαιο 1 ή 2 %.

Με δεδομένο ότι οι μετρήσεις των λευκών αιμοσφαιρίων αφορούσαν ουσιαστικά εκατοστιαίες αναλογίες, η αύξηση στο ποσοστό των ουδετερόφιλων είχε επακόλουθο την μείωση του ποσοστού των λεμφοκυττάρων, ηωσινόφιλων και μονοκύτταρων λευκών αιμοσφαιρίων. Η μείωση αυτή δεν αφορά το πλήθος των κυττάρων αλλά αποδίδεται σε μεταβολή της αναλογίας μεταξύ των λευκών αιμοσφαιρίων. Αν λάβουμε υπόψη τα δεδομένα του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων, σε συνδυασμό με την απουσία διαφοράς στις τιμές του αιματοκρίτη των ιχθυδίων, καταλήγουμε στο



συμπέρασμα ότι η επίδραση των αιθέριων ελαίων στους αιματολογικούς δείκτες των λευκών αιμοσφαιρίων μπορεί να αποδοθεί σε αύξησή του απόλυτου αριθμού τους και κυρίως στην αύξηση των ουδετερόφιλων κυττάρων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω μπορούμε να θεωρήσουμε ότι η χρήση των αιθέριων ελαίων της κανέλας και ιδιαίτερα της ρίγανης στην διατροφή των ιχθυδίων της τσιπούρας, προκαλεί την αντίδραση του ανοσοποιητικού μηχανισμού τους μέσω της αύξησης του πλήθους των λευκών αιμοσφαιρίων και ιδιαίτερα των ουδετερόφιλων κυττάρων. Τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα λευκά αιμοσφαίρια εμπλέκονται άμεσα με τον αντιβακτηριακό αμυντικό μηχανισμό των ιχθύων (Harikrishnan, et.al. 2010), που περιλαμβάνει την φαγοκυττάρωση και την αναπνευστική έκρηξη (respiratory burst). Καταπολεμούν τις βακτηριακές μολύνσεις κυρίως με την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS-reactive oxygen species), όπως είναι τα υπεροξειδία, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, η υδροξυλική ρίζα κ.ά., κατά τη διάρκεια μιας αναπνευστικής έκρηξης. Επιπλέον, τα ουδετερόφιλα διαθέτουν μυελοϋπεροξειδάση στα κυτταροπλασματικά τους κοκκία, τα οποία παρουσία ιόντων αλογόνων και υπεροξειδάσης καταστέλλουν τα βακτήρια με αλογονώσεις του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Εκτός από τα παραπάνω, αυτά τα κύτταρα έχουν λυσοζύμες και άλλα υδρολυτικά ένζυμα στα λυσοσώματά τους (Uribe et.al. 2011). Ομοίως, τα μακροφάγα μπορούν να παράγουν μονοξειδίο του αζώτου σε θηλαστικά και μπορούν να είναι εξίσου ισχυροί αντιμικροβιακοί παράγοντες με τα υπεροξυνιτρικά και τις υδροξυλομάδες.

Αν και υπάρχουν αρκετές αναφορές για την χρήση των αιθέριων ελαίων στις ιχθυοκαλλιέργειες (Sutili et.al., 2018), μελέτες που αφορούν την επίδραση των αιθέριων ελαίων της ρίγανης και της κανέλας σε αιματολογικές παραμέτρους των ιχθύων είναι σχετικά περιορισμένες.

Στην ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) και στον οξύρρυγχο της Κασπίας (*Huso huso*), η προσθήκη θυμόλης και καρβακρόλης (κύρια συστατικά του ριγανέλαιου) σε ποσότητες 1, 2, και 3 ‰ (g/kg) στην τροφή τους, δεν είχε σημαντική επίδραση στον αιματοκρίτη, στους δείκτες του πλήθους των ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων (RBC και WRC) και στο ποσοστό των μονοκύτταρων λευκών αιμοσφαιρίων, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση στο ποσοστό των Λεμφοκυττάρων και ελάττωση του ποσοστού των ουδετερόφιλων (Ahmadifar et al, 2011, Ahmadifar, et al,

2014). Στην παρούσα εργασία το ριγανέλαιο είχε αντίθετα αποτελέσματα στα λευκά αιμοσφαίρια της τσιπούρας. Όπως εκτέθηκε προηγούμενα, διαπιστώθηκε αύξηση στο ποσοστό των ουδετερόφιλων και ελάττωση στα ποσοστά των λεμφοκυττάρων και μονοκύτταρων λευκών αιμοσφαιρίων της τσιπούρας.

Επίσης στην ιριδίζουσα πέστροφα η προσθήκη αιθανολικού εκχυλίσματος ρίγανης σε αναλογία 1 % στην τροφή, δεν προκάλεσε διαφοροποίηση των αιματολογικών δεικτών ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων, είχε όμως θετική επίδραση στους ανοσοποιητικούς μηχανισμούς του αίματος, όπως η αναπνευστική έκρηξη, η φαγοκυττάρωση και η δραστηριότητα της λυσοζύμης (Pourmoghim, et al., 2015).

Όσον αφορά το αιθέριο έλαιο της κανέλας, αναφέρεται ότι η προσθήκη του σε ποσότητες 0,05, 0,1, 0,15 και 0,2% μαζί με σκόνη κανέλας σε αναλογίες 0,5, 1, 1,5, και 2% για την αντιμετώπιση υποξικού στρες στην Τιλάπια (*Oreochromis niloticus*) δεν είχε σημαντική επίδραση στον αιματοκρίτη των ιχθύων (Santos et al., 2016). Αντίθετα αναφέρεται ότι η προσθήκη κινναμέλαιου σε αναλογία 1, 2 και 4 % στην τροφή της ιριδίζουσας πέστροφας είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του αιματοκρίτη και του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων των ιχθύων (Kesbiç, 2019)

Σύμφωνα με τα προηγούμενα εντεθέντα, η προσθήκη αιθέριων ελαίων στο διαιτολόγιο των ιχθύων εκτροφής για την βελτίωση της ανάπτυξής τους ή την ευζωία τους και την προστασία τους από μικροβιακές μολύνσεις, έχει διαφορετικό αντίκτυπο στους αιματολογικούς τους δείκτες. Η επίδραση των αιθέριων ελαίων φαίνεται ότι δεν είναι κάτι συγκεκριμένο αλλά η εμφάνιση, η ένταση και το είδος της, εξαρτώνται από το είδος του αιθέριου ελαίου, από την ποσότητα που αυτό περιλαμβάνεται στο διαιτολόγιο των ιχθύων και από το είδος των ιχθύων. Κατά συνέπεια η χρήση του ριγανέλαιου και του κινναμέλαιου ως πρόσθετα της δίαιτας στις τσιπούρες εκτροφής χρειάζεται παραπέρα μελέτη για τον προσδιορισμό της κατάλληλης αναλογίας πρόσμιξης όπου θα μεγιστοποιούνται τα οφέλη και θα περιορίζονται οι δυσμενείς επιδράσεις τους.

## 5. ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ashley PJ, 2007. Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science* 104:199- 235.

Allan P., Bilkei G., (2005). Oregano improves reproductive performance of sows. *Theriogenology*, 63: 716–721.

Ayyanar, M. and Ignacimuthu, S. (2011) Ethnobotanical survey of medicinal plants commonly used by Kani tribals in Tirunelveli hills of Western Ghats, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 851–864.

Bakkali F. (2008). Biological effects of essential oils-a review. In: *Food and chemical toxicology an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 46 (2): 446 - 475.

Banskota, A.H., Tezuka, Y., Le Tran, Q. and Kadota, S. (2003) Chemical constituents and biological activities of Vietnamese medicinal plants. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3, 227–248

Banthorpe D.V., (1994). Terpenoids. In *Natural products: their chemistry and biological significance* Eds J Mann, RS Davidson, JB Hobbs, DV Banthorpe and JB Harborne Longman Scientific and Technical, Harlow. pp 289-359

Barton B.A. and Iwama G.K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual review of fish diseases*: 3-26.

Baser, K. H.; (2010). *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* / K. Hüsnü Can Baser, Gerhard Buchbauer. ISBN 978-1-4200-6315-8. Universitat Wien, Austria.

Benchaar C., Petit H.V., Berthiaume R., Guellet D.R., Chiquette J., Chouinard P.Y., (2007). Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial 141 populations, milk production and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *J. Dairy Sci.*, 90: 886-897.

- Berger, Ralf Günter (Ed.) (2007). *Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. ISBN 978-3-540-49338-9. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Bondad-Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., et al. (2005) Disease and health management in Asian aquaculture. From Science to Solutions, plenary lectures presented at the 20th Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 132, 249–272.
- Botsoglou A., Grigoropoulou S.H., Botsoglou E., Govaris A., Papageorgiou G. (2003). The effects of dietary oregano essential oil and [alpha]-tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Science*, 65: 1193–1200.
- Burt S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* (94): 223-253.
- Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C., (2006). Plant extracts affect in vivo rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.*, 89:761-771
- Broom, D.M. and Johnson, K.G. (1993). *Stress and animal welfare*, London ; New York, Chapman and Hall.
- Bruneton J., (1999). *Pharmacology, phytochemistry, medicinal plants: essential oils*. 2nd ed. Lavoisier Publishing, New York, pp.461-780.
- Cabello, F.C. (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8, 1137–1144.
- Calixto, J.B. (2005) Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 131–134.
- Chen M.S., (2008). Inducible direct plant defense insect herbivores: A review. *Insect Science*, 15: 101-114.
- Conha C., Hu S., and Holmberg O., (1996). The proliferative responses of cow stripping milk and blood lymphocytes to pokeweed mitogen and ginseng in vitro. *Vet. Res.* 27: 107-115.

- Davis, K.B., Griffin, B.R. and Gray, W.L. (2002) Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection. *Aquaculture*, 214, 55–66.
- Diouf, B., Rioux, P., Blier, P. U. and Rajotte, D. (2000). Use of brook char (*Salvelinus fontinalis*) physiological responses to stress as a teaching exercise. *Advances in Physiology Education*, 23:18-23.
- Dogan, D., Can, C., 2011a. Endocrine disruption and altered biochemical indices in male *Oncorhynchus mykiss* in response to dimethoate. *Pestic. Biochem. Physiol.* 99, 157-161.
- Dogan, D., Can, C., 2011b. Haematological, biochemical and behavioral responses of *Oncorhynchus mykiss* to dimethoate. *Fish. Physiol. Biochem.* 37, 951-958.
- Dogan, D., Can, C., Kocyigit, A., Dikilitas, M., Taskin, A., Bilinc, H., 2011. Dimethoate induced oxidative stress and DNA damage in *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere* 84, 39-46.
- Duncan, I. J. H. (2006). The changing concept of animal sentience. *Applied Animal Behavior Science*, 100:11-19.
- E. Ahmadifar, B. Falahatkar, R. Akrami. Effects of dietary thymol-carvacrol on growth performance, hematological parameters and tissue composition of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Appl. Ichthyol.*, 27 (2011), pp. 1057-1060.
- E. Ahmadifar, M. Razeghi Mansour, A. Keramat Amirkolaie, M. Fadaei Rayeni. Growth efficiency, survival and haematological changes in great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juveniles fed diets supplemented with different levels of thymol-carvacrol. *Animal Feed Science and Technology* 198 (2014) 304–308.
- Enan E., (2001). Incitcidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 130:325-337.
- Erkan, N., Tosun, S. Y., Ülusoy, S., & Uretener, G. (2010). The use of thyme and laurel essential oil treatments to extend the shelf life of bluefish (*Pomatomus saltatrix*) during storage in ice. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. doi:10.1007/s00003-010-0587-x. in press.

F.J. Sutili, D.M. Gatlin, B.M. Heinzmann, B. Baldisserotto. Plant essential oils as fish diet additives: benefits on fish health and stability in feed. *Rev. Aquac.*, 10 (3) (2018), pp. 716-726.

Fazio, F., V. Ferrantelli, G. Piccione, C. Saoca, M. Levanti, M. Mucciardi: Biochemical and hematological parameters in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758) and Gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) in relation to temperature. *Vet. arhiv* 88, 397-411, 2018.

Fazio, F.; Marafioti, S.; Filiciotto, F.; Buscaino, G.; Panzera, M.; Faggio, C. Blood hemogram profiles of farmed onshore and offshore gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from Sicily, Italy. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 2013, 13, 415–422.

Fijan, N. (2002). Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. *Journal of Fish Biology*, 60(4), 999e1014.

Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology*, 19, 156–164.

Forwood, J.M., Harris, J.O. and Deveney, M.R. (2013) Efficacy of current and alternative bath treatments for *Lepidotrema bidyana* infecting silver perch, *Bidyamus bidyamus*. *Aquaculture*, 416–417, 65–71.

Galloway, T., Handy, R., 2003. Immunotoxicities of organophosphorus pesticides. *Ecotoxicology* 12, 345-363.

Giannenas I., Skoufos J., Giannakopoulos C., Wiemann M., Gortzi O., Lalas S., and Kyriazakis I., (2011). Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 94 :5569–5577.

Gostner, J.M., Wrulich, O.A., Jenny, M., Fuchs, D. and Ueberall, F. (2012) An update on the strategies in multicomponent activity monitoring within the phytopharmaceutical field. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 18.

Greathead H., (2003). Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62:279-290.

- Grigorakis K. (2007). Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it : A review. *Aquaculture* 272, p.p. 55-75
- Hamid A., Aiyelaagbe O., Usman A., (2011), Essential oils: its medicinal and pharmacological uses, *International Journal of Current Research*, Vol. 33, Issue, 2, 86-98
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S. (2010). Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol*, 28: 354-361.
- Holmes C.A., (2007). IENICA European Summary Report 2000-2005.
- Hoareau, L. and DaSilva, E.J. (1999) Medicinal plants: a re-emerging health aid. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2, 56–70.
- Iguchi, K., Ogawa, K., Nagae, M. and Ito, F. (2003) The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture*, 220, 515–523.
- Isman M.B., (2006). Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45-66.
- Ivanovski, O., Kulkeaw, K., Nakagawa, M., Sasaki, T., Mizuochi, C., Horio, Y., et al. (2009). Characterization of kidney marrow in zebrafish (*Danio rerio*) by using a new surgical technique. *Contributions of Macedonian Academy of Sciences & Arts*, 30(30), 71-80.
- Iwama G.K, Pickering A.D., Sumpter J.P. and Schreck C.B. (1997). Fish stress and health in aquaculture. Cambridge University Press, UK. pp 278.
- Kesbiç, O.S., 2019. Effects of The Cinnamon Oil (*Cinnamomum verum*) on Growth Performance and Blood Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(2): 370-376.
- Kiley-Worthington, M. (1989). Ecological, ethological and ethically sound environments for animals: Toward symbiosis. *Journal of agricultural ethics*, 2:323-347.

- Kondera, E., 2011. Haematopoiesis in the head kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.): a morphological study. *Fish Physiol. Biochem.* 37, 355–362.
- Li XW, Li J, Werff H. Cinnamomum Schaeffer. In: Wu ZY, Hong DY (editors), *Flora of China*, Beijing: Science Publishing Company; Missouri Botanical Garden Press. 2008, 166-187.
- Malandrakis, E. E., Kavouras, M., Kassimatis, D., Dadali, O., Chatzipli, C., Golomazou, E., ... & Panagiotaki, P. (2014). Fish welfare: Stress evaluation using alkaline comet assay.
- Martinez, R., Souza, M., 2002. Acute effects of nitrite on regulation in two neotropical fish species. *Comp. Biochem. Physiol. A* 133, 151-160.
- Mejlholm O and Dalgaard, P (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. In: *Letters in Applied Microbiology*, pp. 27-31.
- Milligan, C.L. (1997). The role of cortisol in amino acid mobilization and metabolism following exhaustive exercise in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Fish Physiology and Biochemistry*, 16:119-128
- Miranda, C.D. and Zemelman, R. (2002) Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Science of the Total Environment*, 293, 207–218.
- Namkung H., Li M., Gong J., Yu H., Cottrill M., Lange C.F.M. (2004). Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 84, 4: 697–704.
- Narra, M.R., 2016. Single and cartel effect of pesticides on biochemical and haematological status of *Clarias batrachus*: a Long-term monitoring. *Chemosphere* 144, 966-974.
- Pasnik, D.J., Evans, J.J., Panangala, V.S., Klesius, P.H., Shelby, R.A. and Shoemaker, C.A. (2005) Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. *Journal of Fish Diseases*, 28, 205–212.



Petrovska, B.B. (2012) Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Review*, 6, 1–5.

Pickering, A.D.(1993).Growth and Stress in Fish Production. *Aquaculture*, 111:51-63

Pourmoghim H.; Haghghi M., Rohan, M.S., 2015. Effect of Dietary inclusion of *Origanum vulgare* extract on nonspecific immune responses and Hematological Parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.*, Vol 4 [3]: 33-39.

Ranasinghe P., Pigera S., Premakumara GA Sirimal, Priyadarshani Galappaththy Godwin R Constantine and Prasad Katulanda (2013).Godwin R Constantine<sup>3</sup> and Prasad Katulanda Medicinal properties of ‘true’ cinnamon(*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. Ranasinghe et al. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13:275.

Rao YR, Paul SC, Dutta PK. Major constituents of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*. *Indian perfume*, 32, 1988, 86-89.

Rico, A., Phu, T.M., Satapornvanit, K., et al. (2013) Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture*, 412–413, 231–243.

Romero Ormazábal, J.M., Feijóo, C.G. and Navarrete Wallace, P.A. (2012) Antibiotics in aquaculture use, abuse and alternatives, in *Health and Environment in Aquaculture* (eds E.D. Carvalho, J.S. David and R.J. Silva), InTech, Croatia, p. 159.

Ross L.G. and Ross B. (1999). Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals. *Institute of Aquaculture, University of Stirling*. (58): 145-155.

Sakai, M. (1999) Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172, 63–92.

Santos WM, Brito TS, Prado SA, Oliveira CG, Paula AC, Melo DC, Ribeiro P., 2016. Cinnamon (*Cinnamomum* sp.) inclusion in diets for Nile tilapia submitted to acute hypoxic stress. *Fish and Shellfish Immunology* 54: 551–555.

- Senanayake Upali M, Terence H Lee, Ronald BH Wills. Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils. Journal of agricultural and food chemistry, 26, 1978, 822-824.
- Seyfried, E.E., Newton, R.J., Iv, K.F.R., Pedersen, J.A. and McMahon, K.D. (2010) Occurrence of tetracycline resistance genes in aquaculture facilities with varying use of oxytetracycline. Microbial Ecology, 59, 799–807.
- Simitzis P.E., Bizelis J.A., Fegeros K., Deligeorgis S.G., (2007). Effect of dietary oregano oil supplementation on sheep milk characteristics. Animal science review, (37): 69-78.
- Srivastava, J., Chandra, H., Nautiyal, A.R. and Kalra, S.J.S. (2014) Antimicrobial resistance (AMR) and plant-derived antimicrobials (PDAs) as an alternative drug line to control infections. 3 Biotech, 4, 451–460.
- Steflitsch, W. and Steflitsch, M. (2008) Clinical aromatherapy. J. Men's Health, 5, 74-85.
- Umeda, N., Nibe, H., Hara, T. and Hirazawa, N. (2006) Effects of various treatments on hatching of eggs and viability of oncomiracidia of the monogenean *Pseudodactylogyrus anguillae* and *Pseudodactylogyrus bini*. Aquaculture, 253, 148–153.
- Urdang G., (1948). The origin and development of the essential oil industry. In the essential oils Ed E Guenther. Van Nostrand Reinhold Company, New York. pp 3-13
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R. and Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. Vet Medicina, 10: 486-503.
- Variyar P S & Bandyopadhyay C. On some chemical aspects of *Cinnamomum zeylanicum*. Pafai J. 10 (4), 1989, 35-38.
- Vijayan, M. M., Pereira, C., Grau, E. G. and Iwama, G. K. (1997). Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: The role of cortisol. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology Toxicology and Endocrinology, 116:89-95

Yang, S., Yan, T., Zhao, L. L., Fu, H. M., Xiao, Q., Pu, S., et al. (2015). Morphogenesis of blood cell lineages in Ya-fish (*Schizothorax prenanti*). Chinese Journal of Zoology, 50(2), 231-242.

Yuan, S. B., Zhu, A., Jiang, L., & Chai, X. (2011). Observations on the developments of blood cells in *Nibeia japonica*. Journal of Fisheries of China, 9, 1-11.

Zheng Z.L. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). In: Aquaculture. Elsevier B.V. 292 (3-4): 214-218.

Zigger D., (2001). Helathier pigs on diet with garlic and cinnamon. Feedtech, 5, 8/9: 17. [http://www.allaboutfeed.net/allabouts/id935-3370/application\\_in\\_pig\\_diets.html](http://www.allaboutfeed.net/allabouts/id935-3370/application_in_pig_diets.html) (20. 11. 2013).

Zygadlo JA, Juliani HR Jr (2000) Bioactivity of essential oil components. Curr Top Phytochem 3:203–214

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βουρλιώτη –Αράπη Φιλιά (2010). Μελέτη των αιθέριων ελαίων του γένους *Juniperus* της ελληνικής γλωρίδας: χημική σύσταση και βιοδραστικότητα. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κάπελος Κ., (2011). Διερεύνηση των δυνατοτήτων της χρησιμοποίησης προβιοτικών στη διατροφή της τσιπούρας. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών Τμήμα Ζωικής Παραγωγής και Ιχθυοκαλλιεργειών.

Καραφέρης Ι. (2013). Ουσίες φυσικής προέλευσης με αναισθητικές ιδιότητες. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κλαουδάτος Δ., Κλαουδάτος Σ.(2012). «Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφές υδρόβιων ζωικών οργανισμών» Εκδόσεις ΠΡΟΠΟΜΠΟΣ.

Μενεξές Γ., Κουτσός Θ. 2016. Σπουδαιότητα και ιδιότητες του συντελεστή παραλλακτικότητας (coefficient of variation - CV). 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο

Γενετικής Βελτίωσης Φυτών με θέμα «Η συμβολή της βελτίωσης των φυτών στην έξοδο από την οικονομική κρίση», 28-30 Σεπτεμβρίου 2016, Φλώρινα

Παπουτσόγλου Σ.Ε. (2008) Διατροφή ιχθύων. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα

Τσαντήλας Η., Γαλάτος Α.Δ., Αθανασοπούλου Φ. (2005). Χρήση αναισθητικών ουσιών σε ψάρια ιχθυοκαλλιέργειών. Περιοδικό Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρίας, 56:130-137

Χώτος Γ., Ρογδάκης Ι. (2010). «Υδατοκαλλιέργειες ευρύαλων ψαριών Λαβράκι & Τσιπούρα τεχνικές της αναπαραγωγής και πάχυνσης» Εκδόσεις ΙΩΝ

<http://www.grammos-sa.gr/el/tsipoura.html>

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ:

Για την στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που αφορούν τους αιματολογικούς δείκτες ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία.

Αρχικά σε κάθε μεταβλητή υπολογίσθηκαν οι μέσοι όροι ( $\bar{Y}$ ) και οι τυπικές αποκλίσεις (s) των αρχικών παρατηρήσεων που αφορούσαν την κάθε μία από τις πέντε μεταχειρίσεις που εκτέθηκαν τα ιχθυΐδια της τσιπούρας στην παρούσα εργασία.

Από τις τιμές αυτές υπολογίσθηκε ο συντελεστής παραλλακτικότητας (CV%) της κάθε μεταχείρισης μέσα σε κάθε μεταβλητή (αιματολογικοί δείκτες).

$$CV = \frac{s}{\bar{Y}} \times 100$$

Πολύ υψηλές τιμές του συντελεστή παραλλακτικότητας, δηλώνουν μη κανονικότητα των δεδομένων και την πιθανή ύπαρξη ακραίων τιμών (outliers).

Στην περίπτωση που ο CV ήταν μεγάλος, γινόταν μετατροπή των αρχικών τιμών στις τετραγωνικές του ρίζες (square root transformation).

Ο έλεγχος των ακραίων τιμών έγινε μέσω της διατεταρτιμοριακής (Interquartile) μεθόδου του Tukey, οι οποίες εξαιρέθηκαν από την παραπέρα στατιστική αξιολόγηση.

### I. Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων ανά μονάδα όγκου του αίματος (RBC).

Πίνακας I.1. Μέσοι όροι ( $\bar{Y}$ ), τυπικές αποκλίσεις (StDev) και συντελεστές παραλλακτικότητας (CV) του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων ανά μονάδα όγκου του αίματος – (RBC) ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ). (n: αριθμός παρατηρήσεων / μεταχείριση)

	Control	Cin 1%	Cin 2%	Orig 1%	Orig 2%
$\bar{Y}$	3,82	3,8	3,73	3,23	2,12
StDev	0,993	1,433	0,853	0,653	0,503
CV	25,99	37,72	22,9	20,18	23,78
n	5	4(*)	4(**)	3(*)	3(*)

(\*): Απώλεια παρατηρήσεων λόγω λανθασμένων χειρισμών

(\*\*): Εξάιρεση ακραίας τιμής (outlier)

Πίνακας II.2. Ανάλυση της διασποράς των τιμών RBC των ιχθυΐδιων της τσιπούρας που εκτεθήκαν σε δύο συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου κανέλας και ρίγανης.

Προέλευση διακύμανσης	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο Τετράγωνο	F (πειράματος)	τιμή-P	κριτήριο F
Επεμβάσεις	6,94643	4	1,736607	1,781	0,189 (ns)	3,112
Υπόλοιπο	13,64883	14	0,974917			
Σύνολο	20,59526	18				

Γενικός Μέσος:  $\bar{Y}_{..} = 3,43$

$$CV_{\text{πειρ}} = \frac{\sqrt{MSE}}{\bar{Y}_{..}} = \frac{\sqrt{1,736}}{3,43} \times 100 = 28,75 \%$$

LSD= 1,73

### III. Αιματοκρίτης

Πίνακας III.1. Μέσοι όροι, τυπικές αποκλίσεις και συντελεστές παραλλακτικότητας των τιμών αιματοκρίτη (n=5 επαναλήψεις).

	Control	Cin 1%	Cin 2%	Orig 1%	Orig 2%
$\bar{Y}$	37,2	40,2	42,6	45,6	33,4
StDev	5,40	10,03	12,78	5,03	12,60
CV	14,52	24,96	29,99	11,03	37,73

Πίνακας III.2. Ανάλυση της διασποράς των τιμών αιματοκρίτη των ιχθυδίων της τσιπούρας που εκτεθήκαν σε δύο συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου κανέλας και ρίγανης.

Προέλευση διακύμανσης	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο Τετράγωνο	F (πειράματος)	τιμή-P	κριτήριο F
Επεμβάσεις	446,8	4	111,7	1,17	0,35 (ns)	2,866
Υπόλοιπο	1909,2	20	95,46			
Σύνολο	2356	24				

$\bar{Y}_{..} = 39,8$

$$CV_{\text{πειρ}} = \frac{\sqrt{95,46}}{39,8} \times 100 = 24,54 \%$$

### IV. Αριθμός ουδετερόφιλων αιμοσφαιρίων ανά 100 λευκοκύτταρα

Πίνακας IV.1. Μέσοι όροι, τυπικές αποκλίσεις και συντελεστές παραλλακτικότητας των παρατηρήσεων του αριθμού των ουδετερόφιλων αιμοσφαιρίων που αντιστοιχούν σε 100 λευκοκύτταρα (n=5 επαναλήψεις).

	Control	Cin 1%	Cin 2%	Orig 1%	Orig 2%
$\bar{Y}$	18	31,8	49	50	50,8
StDev	3,39	6,53	5,24	15,21	13,22
CV	18,84	20,55	10,70	30,43	26,02

Πίνακας II.2. Ανάλυση της διασποράς του αριθμού των ουδετερόφιλων αιμοσφαιρίων ανά 100 λευκοκύτταρα στα ιχθύδια της τσιπούρας που εκτεθήκαν σε δύο συγκεντρώσεις αιθέριου

ελαίου κανέλας και ρίγανης (μετά από μετατροπή των αρχικών τιμών στις τετραγωνικές τους ρίζες).

Προέλευση διακόμανσης	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο Τετράγωνο	F (πειράματος)	τιμή-P	κριτήριο F
Επεμβάσεις	4244,24	4	1061,06	10,87	<0,001(*)	2,87
Υπόλοιπο	1951,6	20	97,58			
Σύνολο	6195,84	24				

$\bar{Y}.. = 39,9$

CVπειρ = 24,74 %

LSD= 13,03

## V. Αριθμός λεμφοκυττάρων ανά 100 λευκοκύτταρα

Πίνακας V.1. Μέσοι, τυπικές αποκλίσεις και συντελεστές παραλλακτικότητας των παρατηρήσεων του αριθμού των λεμφοκυττάρων που αντιστοιχούν σε 100 λευκοκύτταρα (n=5 επαναλήψεις).

	Control	Cin 1%	Cin 2%	Orig 1%	Orig 2%
$\bar{Y}$	66,8	58,4	35,2	43,8	45,6
StDev	5,67	8,62	13,29	14,01	13,46
CV	8,49	14,76	37,76	31,98	29,53

Πίνακας V.2. Ανάλυση της διασποράς του αριθμού των λεμφοκυττάρων ανά 100 λευκοκύτταρα στα ιχθύδια της τσιπούρας που εκτεθήκαν σε δύο συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου κανέλας και ρίγανης.

Προέλευση διακόμανσης	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο Τετράγωνο	F (πειράματος)	τιμή-P	κριτήριο F
Επεμβάσεις	3148,16	4	787,04	5,95	0,0025(*)	2,86
Υπόλοιπο	2642,8	20	132,14			
Σύνολο	5790,96	24				

$\bar{Y}.. = 49,96$

CVπειρ = 23,0 %

LSD= 15,16

## VI. Αριθμός ηωσινόφιλων κυττάρων ανά 100 λευκοκύτταρα

Πίνακας VI.1. Μέσοι, τυπικές αποκλίσεις και συντελεστές παραλλακτικότητας των παρατηρήσεων του αριθμού των ηωσινόφιλων κυττάρων που αντιστοιχούν σε 100 λευκοκύτταρα (n=5 επαναλήψεις).

	Control	Cin 1%	Cin 2%	Orig 1%	Orig 2%
$\bar{Y}$	9	4,8	11,2	4	2,2
StDev	2	2,39	11,90	2,55	1,30
CV	22,22	49,74	106,28	63,74	59,26

Η ανάλυση της διασποράς έγινε μετά από μετατροπή των αρχικών τιμών στις αντίστοιχες τετραγωνικές ρίζες, λόγω των μεγάλων τιμών των συντελεστών παραλλακτικότητας. Από την ανάλυση αυτή εξαιρέθηκε η μεγαλύτερη τιμή της επέμβασης Cin 2%, καθώς κρίθηκε ως ακραία μετά από έλεγχο με την διατεταρτιμοριακή μέθοδο.

Πίνακας VI.2. Ανάλυση της διασποράς του αριθμού των ηωσινόφιλων κυττάρων ανά 100 λευκοκύτταρα στα ιχθύδια της τσιπούρας που εκτεθήκαν σε δύο συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου κανέλας και ρίγανης (μετά από μετατροπή των αρχικών τιμών στις τετραγωνικές τους ρίζες).

Προέλευση διακύμανσης	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο Τετράγωνο	F (πειράματος)	τιμή-P	κριτήριο F
Επεμβάσεις	6,58	4	1,645	6,24	0,002(*)	2,89
Υπόλοιπο	5,01	19	0,264			
Σύνολο	11,59	23				

$$\bar{Y}_{..} = 2,16$$

$$CV_{\text{πειρ}} = 23,73 \%$$

$$LSD = 0,76$$

## VII. Αριθμός μονοκυττάρων ανά 100 λευκοκύτταρα

Πίνακας VII.1. Μέσοι, τυπικές αποκλίσεις και συντελεστές παραλλακτικότητας των παρατηρήσεων του αριθμού των μονοκυττάρων που αντιστοιχούν σε 100 λευκοκύτταρα (n=5 επαναλήψεις).

	Control	Cin 1%	Cin 2%	Orig 1%	Orig 2%
$\bar{Y}$	6,2	5,4	4,8	2,4	1,4
StDev	3,56	2,30	3,11	1,14	1,14
CV	57,48	42,63	64,88	47,51	81,44

Λόγω των μεγάλων τιμών των συντελεστών παραλλακτικότητας, η ανάλυση της διασποράς των τιμών της μεταβλητής αυτής έγινε μετά από μετατροπή των αρχικών τιμών στις αντίστοιχες τετραγωνικές ρίζες. Λόγω της παρουσίας στις πρωτότυπες παρατηρήσεις μηδενικών τιμών η μετατροπή έγινε σύμφωνα με την σχέση :  $\bar{Y}_{ij} = \sqrt{Y_{ij} + 0,5}$



Πίνακας VII.2. Ανάλυση της διασποράς του αριθμού των μονοκυττάρων ανά 100 λευκοκύτταρα στα ιχθύδια της τσιπούρας που εκτεθήκαν σε δύο συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου κανέλας και ρίγανης (μετά από μετατροπή των αρχικών τιμών στις τετραγωνικές τους ρίζες).

<i>Προέλευση διακύμανσης</i>	<i>Άθροισμα τετραγώνων</i>	<i>Βαθμοί ελευθερίας</i>	<i>Μέσο Τετράγωνο</i>	<i>F (πειράματος)</i>	<i>τιμή-P</i>	<i>κριτήριο F</i>
Επεμβάσεις	5,04	4	1,26	3,8	0,02 (*)	2,866
Υπόλοιπο	6,63	20	0,33			
Σύνολο	11,67	24				

$\bar{Y}.. = 2,02$

CVπειρ = 28,52 %

LSD= 0,76