

Μελέτη της χρήσης αποσταγμάτων επιλεγμένων φυτών ρίγανης στη διατροφή ψαριών με στόχο την μείωση του μικροβιακού φορτίου της τροφής τους (ζωοπλακτόν).

Μιχάλης Κ. Στεφανάκης, Γιώργος Τσικαλάς,
Ελευθέριος Τουλουπάκης, Λαζανάκη Μαρία,
Χαράλαμπος Ε. Κατερινόπουλος
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Βούτες,
Ηράκλειο 71003, Κρήτη, Ελλάδα

Δημήτριος Ζαραγκώτας, Δημήτριος Μπακρατσάς,
Ηλίας Αναστασόπουλος
Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων,
ΤΕΙ Θεσσαλίας,
Λάρισα 41110, Ελλάδα

Πάυλος Μακρίδης,
Ινστιτούτο Υδατοκαλλιέργειών
Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών
Ηράκλειο, Κρήτης, ΤΘ 2214, 71003 Ελλάδα

Χαρίκλεια Παπαϊωάννου, Βασίλειος
Παπασωτηρόπουλος,
Τμήμα Θερμοκηπιακών Καλλιέργειών, ΤΕΙ Μεσολογίου
(Αμαλιάδα)

Περίληψη-Αιθέρια έλαια των φυτών, *O. vulgare* subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart, *O. onites* L. και *O. marjorana* L., αναλύθηκαν ως προς τα συστατικά των αιθερίων ελαίων τους τα οποία προσδιορίστηκαν με χρήση αέριου χρωματογράφου συζευγμένου με φασματογράφο μάζας (GC/MS). Τα αιθέρια έλαιά τους εξετάστηκαν ως πιθανοί αντιβακτηριακοί παράγοντες και χρησιμοποιήθηκαν για την μείωση της δράσης των βακτηριακών στελεχών της ομάδας *Vibrio* και στην απολύμανση των ζωοπλακτονικών οργανισμών, στο τροχόζωο *Brachionus plicatilis* που χρησιμοποιείται ως ζωντανή τροφή σε ψάρια. Προκαταρκτικές μελέτες έγιναν και σε αγνά τσιπούρας (*Sparus aurata*) με σκοπό την μείωση του βακτηριακού τους φορτίου παρουσία των αιθερίων ελαίων.

Λέξεις κλειδιά—έλεγχος τροφής; *Origanum*; αιθέρια έλαια; υδατοκαλλιέργειες; αντιμικροβιακή δράση;

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η υδατοκαλλιέργεια στην Ελλάδα

Ο κλάδος της υδατοκαλλιέργειας έχει δείξει μια μεγάλη ανάπτυξη τις τελευταίες δύο δεκαετίες στην Ελλάδα. Η βιομηχανία διαθέτει ισχυρό εξαγωγικό προσανατολισμό. Το 85% της ελληνικής παραγωγής εξάγεται σε χώρες της Ε.Ε., στον Καναδά και τις Η.Π.Α. Στην Ελλάδα παράγονται περισσότεροι από 100.000 τόνοι ψαριών, αριθμός που αποτελεί τη μεγαλύτερη παραγωγή των ειδών αυτών στη ζώνη της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Στην Ελλάδα, υπάρχουν περισσότερες από 340 μονάδες εκτροφής και απασχολούνται περίπου 10.000 άτομα. Ο κύκλος εργασιών του συνόλου των πωλήσεων έφθασε 460 εκατομμύρια ευρώ το 2007. Αυτή η

υψηλή παραγωγή βασίζεται στην παραγωγή ιχθυδίων. Το 2007, 400 εκατομμύρια ιχθύδια παρήχθησαν στην Ελλάδα, κυρίως λαβράκι και τσιπούρα.

Παθογόνα των ψαριών και του ζωοπλακτόν

Τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των ψαριών είναι κρίσιμα για την επιβίωσή τους και η θνησιμότητά τους σε αυτά τα στάδια μπορεί να είναι αρκετά υψηλή. Εκτός από τη θνησιμότητα, αυτά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των προνυμφών των θαλασσιών ειδών είναι ζωτικής σημασίας για την ποιότητα των παραγόμενων νεαρών ψαριών (γόνου). Προνύμφες λαυρακιού και τσιπούρας πρέπει να τρέφονται κατά τις πρώτες εβδομάδες μετά την εκκόλαψή τους με ζωντανή τροφή, δηλαδή με ζωοπλακτονικούς οργανισμούς που καλλιεργούνται σε εκκολαπτήρια. Δύο τέτοιοι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται διεθνώς είναι τροχόζωα *Brachionus sp.* και αρτέμια, *Artemia sp.* Η καλλιέργεια αυτών των ζωοπλακτονικών οργανισμών απαιτεί την προσθήκη μεγάλων ποσοτήτων τροφής σε δεξαμενές καλλιέργειας. Η παρουσία μεγάλων ποσοτήτων οργανικού φορτίου στις δεξαμενές καλλιέργειας ενέχει τον κίνδυνο της ανάπτυξης ομοιοειδών βακτηρίων στις καλλιέργειες. Τα περισσότερα από αυτά τα βακτήρια ανήκουν στην ομάδα των *Vibrio*, και προκαλούν σημαντικό πρόβλημα στην εκτροφή των προνυμφών θαλασσιών ψαριών. Συνεπώς, είναι απαραίτητο να μειωθεί το βακτηριακό φορτίο της ζωντανής τροφής των ψαριών αυτών. Παρά το γεγονός ότι το ξέπλυμα με νερό της ζωντανής τροφής μειώνει τους αριθμούς των βακτηρίων σε μεγάλο βαθμό, η λύση αυτή δεν είναι

ικανοποιητική γιατί κάποια βακτήρια παραμένουν στη τροφή. Μιά άλλη λύση που ακολουθείται, η χρήση αντιβιοτικών, θα πρέπει να αποφεύγεται, γιατί ευνοεί την κυριαρχία των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών βακτηρίων και επίσης επιρραζίζει αρνητικά τη εικόνα του κλάδου της υδατοκαλλιέργειας στους καταναλωτές.

Εναλλακτικές στρατηγικές περιλαμβάνουν τη χρήση φυσικών προϊόντων στις βιομηχανικές διεργασίες η οποία θα βελτιώσει την εικόνα του κλάδου και θα την καταστήσει περισσότερο αποδεκτή από τους καταναλωτές.

Ρίγανη

Στην Ελλάδα η ρίγανη φυτρώνει άγρια και σχετικά πρόσφατα καλλιεργείται, σε περιοχές των Γρεβενών και της Κοζάνης. Υπάρχει μεγάλη γενετική ποικιλότητα αυτού του είδους [1]. Φυτά ρίγανης στην Ελλάδα έχει αποδειχθεί ότι έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά [2], γεγονός που σχετίζεται με τη δράση των φυτών αυτών έναντι διαφόρων φυτικών και ζωικών παθογόνων βακτηρίων [3]. Σε μελέτες για την ελληνική ρίγανη περισσότερα από 30 ενεργά συστατικά έχουν εντοπιστεί, συμπεριλαμβανομένων του ροσμαρινικού οξέως, της θυμόλης και της καρβακρόλης [4]. Διάφορες μελέτες αποδεικνύουν τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του ελαίου της ρίγανης [5], [6]. Στην αγορά, υπάρχει ήδη ένα προϊόν, με βάση το έλαιο της ρίγανης, το οποίο χρησιμοποιείται κατά γαστρεντερικών παθογόνων, που σκοτώνει τους μικροοργανισμούς όταν έρχεται σε επαφή με αυτούς, εντός του εντέρου γαριδών ή ψαριών [7]. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα, που να αφορούν την αποτελεσματικότητα του ελαίου της ρίγανης στη μείωση του αριθμού των παθογόνων βακτηρίων στη ζωντανή τροφή ψαριών, δηλαδή σε ζωντανούς ζωοπλακτονικούς οργανισμούς.

Τα υπόγεια ύδατα και η υπεράντλησή τους στη Θεσσαλία

Στη Θεσσαλία, η υπεράντληση των υπογείων υδάτων έχει δημιουργήσει σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα, όπως αλατότητα στις περιοχές Βελίκας και Αγιοκάμπου Λάρισας [8] καθώς και στην ανατολική πλευρά του Παγασητικού κόλπου, ενώ σε περιοχές του Θεσσαλικού κάμπου, Ριζόμυλος και Στεφανοβίκειο παρατηρείται διάβρωση του εδάφους. Για να αμβλυνθεί το πρόβλημα της υπεράντλησης και της ρύπανσης των υπογείων υδάτων μια σειρά από δράσεις πρέπει να υλοποιηθούν, συμπεριλαμβανομένων των νέων μεθόδων άρδευσης, της κατασκευής δεξαμενών για τη συλλογή των ομβρίων υδάτων, αλλά και της επιλογής καλλιεργειών με χαμηλότερες απαιτήσεις σε νερό και καλλιέργεια του εδάφους [8]. Πολλά αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά πληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις. Μεταξύ αυτών η ρίγανη έχει πρωταρχικό ρόλο, λόγω των πολλών εφαρμογών της στον τομέα της γεωργίας, της ιατρικής, της τεχνολογίας τροφίμων κλπ.

II. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Συλλογή σπόρων ρίγανης

Σπόροι ρίγανης συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδος και τελικά επιλέχθηκαν οι περιοχές Νάξος, Πήλιο, Αγραφα και Σίσες Ηρακλείου Κρήτης. Οι σπόροι παρουσίαζαν ποικιλομορφία ως προς το σχήμα τους, που ήταν περίπου σφαιρικό, αλλά κυρίως ως προς το χρώμα τους. Επίσης συγκεκριμένη γονότυποι ήταν πολύ παραγωγικοί σε σπόρο, ενώ άλλη είχαν μικρή απόδοση.

Sample	Date	Specie	Place of collection or purchasing	Geographical coordinates (altitude)
0	Oct 2012	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	Πήλιο, Ελλάδα	39°26'N 23°2'E (700m)
1	Aug 2012	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	εμπορικό δείγμα (Wartwick, UK)	-
2	Aug 2012	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	Αγραφα, Ελλάδα	39°8'N 21°38'E (700m)
3	Aug 2012	<i>O. marjorana</i>	εμπορικό δείγμα (Luijbeerd, NL)	-
4	Aug 2012	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	εμπορικό δείγμα (Wartwick, UK)	-
5	Oct 2012	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	Πήλιο, Ελλάδα	39°26'N 23°2'E (700m)
6	Oct 2012	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	Σίσες, Ελλάδα	35°22'N 24°28'E (500m)
7	Aug 2012	<i>O. onites</i>	Νάξος, Ελλάδα	37°5'N 25°28'E (700m)
8	Aug 2012	<i>O. onites</i>	Νάξος, Ελλάδα	37°5'N 25°28'E (700m)
9	Oct 2012	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	Αγραφα, Ελλάδα	39°8'N 21°38'E (700m)

Επιλογή φυτών με αυξημένη περιεκτικότητα σε αιθέρια έλαια

Αρχικά έγινε επιλογή των φυτών που αντέχουν σε χαμηλές θερμοκρασίες χρησιμοποιώντας μικροπιάτα [14], [15] και αυτό γιατί σε κάποιες περιπτώσεις έχει αναφερθεί ότι σε συγκεκριμένα είδη, τα φυτά που είναι ανθεκτικά σε χαμηλές θερμοκρασία έχουν και υψηλές συγκεντρώσεις φαινολικών [16],[17].

Επιλογή φυτών με αυξημένη περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες

Για την επιλογή φυτών με αυξημένη περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Folin, το οποίο αναφέρεται σε μονάδες γαλλικού οξέος *Gallie Acid Equivalence* (GAE). Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο δεν μετράει μόνο φαινολικές ουσίες, αλλά και κάθε αναγόμενη ουσία.

Μετά και τη δοκιμή με Folin τα δείγματα χωρίστηκαν σε κατηγορίες ανάλογα με τη περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ουσίες και ταξινομήθηκαν όπως παρακάτω (περιλαμβάνονται μόνο τα δείγματα που επιλέχθηκαν για περαιτέρω αναλύσεις)

ΠΟΛΥ ΧΑΜΗΛΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ

- 2312A'C3 ΝΑΞΟΣ *Origanum onites*

ΧΑΜΗΛΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ

- CG19 Εμπορικό δείγμα (UK) *Origanum vulgare subsp. hirtum*
- 14 Εμπορικό δείγμα (Holland) *Origanum marjorana*

ΜΕΣΑΙΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ

- 2312ΔD10 ΝΑΞΟΣ *Origanum onites*
- CG5 Εμπορικό δείγμα (UK) *Origanum vulgare subsp. hirtum*
- 1A4 ΑΓΡΑΦΑ *Origanum vulgare subsp. hirtum*

ΠΟΛΥ ΥΨΗΛΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ

- 1003 EE3 ΣΙΣΕΣ *Origanum vulgare subsp. hirtum*
- 2912AF7 ΠΗΛΙΟ *Origanum vulgare subsp. hirtum*

9. Αγραφα 1 *Origanum vulgare subsp. hirtum*
10. 2912AF7 ΠΗΛΙΟ *Origanum vulgare subsp. hirtum* (2° δείγμα από τον ίδιο γονότυπο)

Παραγωγή κλώνων επιλεγμένων φυτών ρίγανης

Δοκιμάστηκαν δύο μέθοδοι πολλαπλασιασμού των φυτών της ρίγανης που επιλέχθηκαν. Ο ένας ήταν με μοσχεύματα και ο άλλος με μικροπολλαπλασιασμό. Ορισμένοι γονότυποι ανταποκρίνονταν και στις δύο μεθόδους και άλλοι ήταν δυσκολότερο να πολλαπλασιασθούν.

Σημειώνεται ότι κατά την καλλιέργεια των φυτών ρίγανης στο ΤΕΙ Λάρισας, παρουσιάστηκε μεγάλη παραλακτικότητα τόσο σε πολλά μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, όσο και στο τρόπο ανάπτυξης τους, πλαγιόκλαδες /ορθόκλαδες αλλά και στην ανθεκτικότητά τους έναντι παθογόνων, όπως το ωίδιο.

Παραλαβή αιθέριων ελαίων με υδροαπόσταξη

Τα αιθέρια έλαια παραλήφθηκαν με υδροαπόσταξη σε συσκευή τύπου Clevenger, σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Hellenic Pharmacopoeia (1989) [18]. Η διαδικασία της απόσταξης διήρκεσε 3 ώρες. Το αιθέριο έλαιο συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 4°C μέχρι την ανάλυση. Τα δείγματα ξηράθηκαν με άνυδρο θειικό νάτριο (Merk). Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές.

Παραλαβή αιθέριων ελαίων με μικρο-υδροαπόσταξη

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε στις περιπτώσεις που η δρόγη του δείγματος μας ήταν λιγότερη από 5 g. Η διαδικασία της απόσταξης διήρκεσε 2 ώρες. Το αιθέριο έλαιο, το οποίο συγκεντρώθηκε σε σφαιρική φιάλη μαζί με νερό, λόγω τις ελάχιστης ποσότητας του, διαχωρίστηκε μετά το τέλος της απόσταξης με εκχύλιση σε οργανικό διαλύτη.

Τα αιθέρια έλαια παραλήφθηκαν σε 2 mL πεντανίου (GC grade) και διηθήθηκαν μέσω άνυδρου θειικού νατρίου προκειμένου να αφυδατωθούν. Στη συνέχεια το κάθε δείγμα συμπυκνώθηκε με απόσταξη υπό κενό μέχρι όγκου 1 mL, και το υπόλοιπο του διαλύτη απομακρύνθηκε με ρεύμα Ar. Τα παραλαμβανόμενα αιθέρια έλαια διατηρήθηκαν στους 4°C, μέχρι να αναλυθούν. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές.

Προσδιορισμός πτητικών συστατικών με αέρια χρωματογραφία- φασματοσκοπία μάζας (GC-MS)

Η ανάλυση και ο προσδιορισμός των συστατικών των αιθέριων ελαίων έγινε με αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματογράφο μάζας. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε το αδρανές αέριο ήλιο (1.0 mL min⁻¹). Ο ενέσιμος όγκος ήταν 1 μL. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της θερμοπρογραμματιζόμενης χρωματογραφίας. Για την ανίχνευση των ουσιών χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον βάσεις δεδομένων, όπως η NIST21 (21.250 διαφορετικά συστατικά) NIST107 (107.866) και PMW_TOX2 (4.367) [19].

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών βασίστηκε στον ολικό αριθμό θραυσμάτων (total ion count) των

μεταβολιτών, όπως αυτά ανιχνεύτηκαν από το φασματογράφο μάζας. Η ταυτοποίηση των χημικών συστατικών έγινε με βάση το χρόνο κατακράτησης κάθε συστατικού (Retention Time-R.T) σε σχέση με τους χρόνους παρακράτησης πρότυπων ενώσεων και τη μελέτη των φασμάτων μάζας, και των δεδομένων της βιβλιογραφίας (Adams, 2007), [20] καθώς και με τον υπολογισμό των συντελεστών RI (retention indices) σύμφωνα με τους Van den Dool & Kratz (1963),[21] σε σχέση με τους χρόνους παρακράτησης πρότυπων υδρογονανθράκων (C₈-C₂₄). Επίσης, όπου κρίθηκε αναγκαίο έγινε συγχρωματογράφιση με πρότυπες ουσίες.

Βακτηριακά στελέχη της ομάδας *Vibrio*.

Για τον έλεγχο της αντιβακτηριακής δράσης χρησιμοποιήθηκαν πέντε βακτηριακά στελέχη της ομάδας *Vibrio*. Τα βακτηριακά στελέχη ήταν τα ακόλουθα: α) *Listonella (Vibrio) anguillarum* CECT 522, και β) *Vibrio splendidus* DMC-1 τα οποία προήλθαν από συλλογές. Τα βακτηριακά στελέχη γ) *V. harveyi* και δ) *EKKO-6 (V. alginolyticus)* απομονώθηκαν από τον Δρ. Καθάριο Παντελή. Ακολούθως, το βακτηριακό στέλεχος ε) *ART-3 (Vibrio sp.)* απομονώθηκε από ναύπλιους *Artemia* από τον Δρ. Μακρίδη Παύλο. Τα τρία τελευταία στελέχη απομονώθηκαν στις εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών.

Προσδιορισμός ανάπτυξης

Τα βακτηριακά στελέχη αποθηκεύτηκαν σε πλαστικά μικροσφαιρίδια στους -80 °C. Ο προσδιορισμός της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών έγινε με εμβολιασμό σε υγρό θρεπτικό μέσο TSBS σε όγκο των 5 mL. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες δωματίου (20-22°C), με τη βοήθεια έκκεντρο αναδευτήρα και ταχύτητα ανάδευσης 120 στροφές min⁻¹. Ακολούθησε μια διαδικασία 8 διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων (1:10-1:10⁸) με μέσο αραιώσης, 80% θαλασσινό νερό και 20% απιονισμένο, φιλτραρισμένο και αποστειρωμένο νερό. Σε τριβλία Petri με στερεό θρεπτικό μέσο TSAS απλώθηκαν 50 μL από τις αραιώσεις (1:10⁵-1:10⁸). Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Με βάση τον αριθμό των αποικιών, υπολογίστηκε το CFU (Colony Forming Unit) mL⁻¹, δηλαδή, ο αριθμός των αποικιών που σχηματίζονται ανά μονάδα όγκου του κάθε στελέχους.

Επίδραση αντιβακτηριακής δράσης των αιθέριων ελαίων στα βακτηριακά στελέχη

Κάθε βακτηριακό στέλεχος εμβολιάστηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο TSBS (5 mL) για 24 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου (22°C), σε έκκεντρο αναδευτήρα και ταχύτητα ανάδευσης 120 στροφές min⁻¹. Κατόπιν 50 μL από αραιωμένα δείγματα απλώθηκαν σε τριβλία Petri με στερεό θρεπτικό μέσο TSAS. Ποσότητα 2 μL από κάθε δείγμα αιθέριου ελαίου τοποθετήθηκε σε χάρτινα δισκία, διαμέτρου 3 mm στο κέντρο της επιφάνειας των τριβλίων.

Ταυτόχρονα, προσδιορίστηκε η ανασταλτική δράση τριών κύριων συστατικών των αιθερίων ελαίων της θυμόλης, της καρβακρόλης και του γ-τερπινενίου, καθώς και το αντιβιοτικό 0/129 (2,4-διάμινο-6,7-δισοπρόπυλοπτεριδίνη) και ένας

αρνητικός μάρτυρας. Η αναστολή ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών με την χρήση των αιθέρων ελαίων πραγματοποιήθηκε με δυο επαναλήψεις, για κάθε χειρισμό.

Επίδραση αιθέρων ελαίων στην πληθυσμιακή πυκνότητα των τροχόζων

Σύμφωνα με τα προκαταρκτικά πειράματα, τα τροχόζωα, παρουσίασαν καλύτερη επιβίωση σε διαλύματα αιθέρων ελαίων των δειγμάτων 0, 3 και 8, σε συγκεντρώσεις των 10 και 20 ppm. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις για τα *in vivo* πειράματα.

Τα αιθέρια έλαια αραιώθηκαν σε διαλυτή DMSO (1:1000) και εν συνέχεια προστέθηκε η ανάλογη ποσότητα ενδιάμεσου διαλύματος (1 μ L, 2 μ L) ώστε να επιτευχθεί η τελική συγκέντρωση των 10 και 20 ppm, αντίστοιχα. Παράλληλα, υπήρξαν δύο χειρισμοί κατά τους οποίους τα τροχόζωα επώαστηκαν σε αραιωμένο θαλασσινό νερό (25 ppt), μάρτυρα και σε DMSO (1 ppt) χωρίς την προσθήκη του αιθέρου ελαίου.

Τα τροχόζωα (50 άτομα mL^{-1}) επώαστηκαν σε όγκο 30 mL, και τοποθετήθηκαν σε έκκεντρο αναδευτήρα, με ταχύτητα ανάδευσης 120 στροφές min^{-1} για 24 ώρες. Λήφθηκαν δείγματα σε 0, 4 και 24 ώρες μετά την εκκίνηση του πειράματος για τη μέτρηση της πυκνότητας των τροχόζων. Ο έλεγχος της επιβίωσης των τροχόζων πραγματοποιούνταν σε στερεοσκόπιο μετρώντας την πυκνότητα των τροχόζων.

Επίδραση αιθέρων ελαίων στην κολυμβητική ταχύτητα των τροχόζων

Παράλληλα, από τις καλλιέργειες στο κυρίως πείραμα ελέγχθηκε και η ταχύτητα της κολυμβητικής ικανότητας των τροχόζων σε στερεοσκόπιο μετρώντας την ταχύτητα τους (20 σταγόνες των 50 μ L). Ο έλεγχος της ταχύτητας πραγματοποιήθηκε στη συγκέντρωση των 10 ppm στο χρονικό διάστημα ενός εικοσιτετραώρου. Οι παραπάνω χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε τρεις επαναλήψεις.

Επίδραση των αιθέρων ελαίων στο μικροβιακό φορτίο των τροχόζων

Για την μείωση του μικροβιακού φορτίου που φέρουν τα τροχόζωα, πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές δειγματοληψίες. Χρησιμοποιήθηκαν δύο στερεά θρεπτικά μέσα: το μέσο TSAS που αντανακλά το συνολικό αριθμό καλλιεργήσιμων βακτηρίων στο δείγμα και το θρεπτικό TCBS που αποτελεί επιλεκτικό μέσο για την ανάπτυξη βακτηρίων της ομάδας *Vibrio*.

Από τις παραπάνω καλλιέργειες των τροχόζων λήφθηκε ένα υποδείγμα 10 mL, το οποίο τοποθετήθηκε σε δίχτυ μεγέθους 50 μ m και ξεπλύθηκε με 50 mL θαλασσινό νερό (25 ppt), αφού είχε υποστεί διήθηση και αποστείρωση. Εν συνέχεια τα τροχόζωα μεταφέρθηκαν σε 10 mL αποστειρωμένου και διηθημένου θαλασσινού νερού (25 ppt). Από τα παραπάνω υποδείγματα, 2 mL ομογενοποιήθηκαν σε γυάλινους ομογενοποιητές.

Παράλληλα υπολογίστηκε ο αριθμός των τροχόζων που ομογενοποιήθηκε. Έτσι σε κάθε δείγμα μετρήθηκε ο αριθμός των τροχόζων ανά μονάδα όγκου με την χρήση στερεοσκοπίου από το εκάστοτε δείγμα. Τα ομογενοποιημένα τροχόζωα μετά από διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (1:10, 1:100 και 1:1000) και με μέσο αραιώσεως 80% θαλασσινό νερό και 20% απιονισμένο νερό μετά από διήθηση και αποστείρωση, απλώθηκαν (50 μ L) σε τριβλία Petri με δυο επαναλήψεις και στα δυο στερεά θρεπτικά μέσα, (TSAS και TCBS). Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένες συνθήκες και τα τριβλία Petri αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου (20-22 °C). Ο έλεγχος για τον πληθυσμό των βακτηρίων (αποικίες) διαπιστώθηκε στα τριβλία Petri. Πραγματοποιήθηκε η καταμέτρηση των αποικιών, σε τρεις μετρήσεις για τον εκάστοτε χειρισμό, στο διάστημα μιας εβδομάδας. Με βάση τον αριθμό των αποικιών υπολογίστηκε το CFU του κάθε στελέχους.

Απολύμανση αυγών

Πραγματοποιήθηκαν *in vivo* πειράματα κατά τα οποία ελέγχθηκε η απολύμανση των αυγών τσιπούρας (*S. aurata*).

Επίδραση των αιθέρων ελαίων στο μικροβιακό φορτίο των αυγών

Χρησιμοποιήθηκαν τα αιθέρια έλαια των δειγμάτων 0 και 3. Η επίδραση των αιθέρων ελαίων στα αυγά της τσιπούρας διερευνήθηκε με επώαση, στις συγκεντρώσεις 100, 200, 300 και 400 ppm για δέκα λεπτά. Τα αιθέρια έλαια αραιώθηκαν σε διαλυτή DMSO σε συγκέντρωση 1 ppt. Εν συνέχεια προστέθηκε η ανάλογη ποσότητα αυτού του ενδιάμεσου διαλύματος στα πειραματικά διαλύματα. Τα αυγά επώαστηκαν σε δοχεία όγκου 100 mL, με τελικό όγκο 30 mL. Το μέσο εκτροφής των αυγών ήταν θαλασσινό νερό (35 ppt), μετά από αποστείρωση και διήθηση, που περιλάμβανε την ανάλογη ποσότητα από την εκάστοτε συγκέντρωση του ενδιάμεσου διαλύματος. Εκτός από τους πειραματικούς χειρισμούς, υπήρξαν και δύο χειρισμοί, κατά τους οποίους τα αυγά επώαστηκαν σε θαλασσινό νερό (35 ppt) μάρτυρα και σε DMSO (1 ppt) χωρίς την προσθήκη αιθέρων ελαίων. Πραγματοποιήθηκαν δυο επαναλήψεις για κάθε χειρισμό και όλο το πείραμα επαναλήφθηκε εις διπλούν.

Όσον αφορά τις μικροβιολογικές δειγματοληψίες, χρησιμοποιήθηκε το στερεό θρεπτικό μέσο TSAS. Το θρεπτικό μέσο μετά την αποστείρωση τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία 50 °C, ώστε να διατηρηθεί σε υγρή μορφή.

Με την πάροδο δέκα λεπτών στο κάθε πείραμα τα αυγά ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο και διηθημένο θαλασσινό νερό (35 ppt) και τοποθετήθηκε μια ελάχιστη ποσότητα αυγών (20 έως 50) από το εκάστοτε δείγμα σε τριβλία Petri. Ταυτόχρονα συμπληρώθηκε με περίπου 15 mL υγρό TSAS (50 °C). Με την στερεοποίηση του θρεπτικού μέσου TSAS, τα τριβλία Petri επώαστηκαν σε, ψυχόμενο επωαστήρα $T=16,5-17$ °C για επτά ημέρες. Η ανωτέρω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε τρία τριβλία Petri για κάθε επανάληψη. Για να διαπιστωθεί

ενδεχόμενη μείωση του μικροβιακού φορτίου των αυγών, γινόνταν καταγραφή των αποικιών στα τριβλία Petri.

Δείγμα Απόσταξης	Εποχή Συγκομιδής	Αιθέριο Έλαιο % (mg.100 ⁻¹ g ξ.β)
oil 0	Οκτώβριος 2007	1,40±0,2
oil 1	Αύγουστος 2006	3,25±0,3
oil 2	Αύγουστος 2006	3,56±0,3
oil 4	Αύγουστος 2006	4,08±0,0
oil 5	Οκτώβριος 2007	2,36±0,2
oil 6	Οκτώβριος 2007	3,09±0,3
oil 9	Νοέμβριος 2007	1,69±0,0

Έλεγχος εκκόλαψης αυγών τσιπούρας

Για την επιβίωση και εκκόλαψη των αυγών χρησιμοποιήθηκαν πιάτα καλλιέργειας ιστού, όπου σε κάθε κυλινδρική υποδοχή προστέθηκε 1 mL αποστειρωμένου διηθημένου θαλασσινού νερού (35ppt), θερμοκρασίας (T=16,5 °C) με σκοπό να μην υπάρξει μεταβολή θερμοκρασίας από την δεξαμενή (αρχική προέλευση), στην πειραματική καλλιέργεια δεδομένου ότι τα αυγά είναι πολύ ευαίσθητα σε απότομες μεταβολές της θερμοκρασίας. Κάθε πιάτο καλλιέργειας ιστού είχε 24 κυλινδρικές υποδοχές όπου τοποθετήθηκαν από ένα έως δυο αυγά. Τα πιάτα διατηρήθηκαν στο ψυγείο σε θερμοκρασία (T=16,5 °C). Τα αυγά εκκολάφθηκαν από την τρίτη ημέρα για όλους τους χειρισμούς. Έγινε καταμέτρηση ζωντανών αυγών, ζωντανών ιχθυονυμφών αλλά και των αντίστοιχων νεκρών αυγών και νυμφών, κατά την διάρκεια του πειράματος. Η καταμέτρηση των παραπάνω χειρισμών στα πιάτα πραγματοποιούνταν καθημερινώς για μια εβδομάδα, με την χρήση στερεοσκοπίου.

Σύμφωνα με τους παραπάνω χειρισμούς, όσον αφορά την επίδραση των αιθέριων ελαίων στην συμπεριφορά απολύμανσης των αυγών, υπολογίστηκε το ποσοστό εκκόλαψης, την ημέρα που εκκολάφθηκαν τα αυγά, αλλά και το ποσοστό επιβίωσης στο τέλος του πειράματος. Η ανωτέρω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένες συνθήκες και πραγματοποιήθηκαν δυο επαναλήψεις για κάθε χειρισμό.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αιθέριο Έλαιο

Η απόδοση σε αιθέριο έλαιο εξαρτάται από την εποχή συγκομιδής. Υψηλότερες αποδόσεις προσδιορίστηκαν σε περιεκτικότητα αιθέριων ελαίων τους θερινούς μήνες. Το είδος *O. vulgare* subsp. *hirtum* υπερέρχει σε περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο έναντι του είδους *O. onites*, ενώ το εμπορικό δείγμα του είδους *O. marjorana* περιείχε χαμηλό ποσοστό σε περιεκτικότητα αιθέριου ελαίου. Επίσης ανιχνεύθηκαν υψηλά ποσοστά φαινολικών ουσιών και στα τρία είδη αρωματικών φυτών που μελετήθηκαν. Στο είδος *O. vulgare* subsp. *hirtum*, διαπιστώθηκαν υψηλά ποσοστά καρβακρόλης 73,83-85,52% κατά τους θερινούς μήνες, εν αντιθέσει με την περίοδο που το φυτό εισέρχεται στο νέο βιολογικό κύκλο ζωής, κατά την οποία ανιχνεύθηκαν υψηλά ποσοστά θυμόλης 55,3-72,43%. Στο είδος *O. onites*, διαπιστώθηκαν παραπλήσια ποσοστά φαινολικών ουσιών, 46,65- 34,62% καρβακρόλης και 34,62-20,21%

θυμόλης. Τέλος, το είδος *O. marjorana*, παρουσίασε υψηλά ποσοστά φαινολικών ουσιών σε συνδυασμό με αυξημένα ποσοστά μονοτερπενίων, και αυτό μας επιτρέπει να διαπιστώσουμε ότι ανήκει στο χημειότυπο καρβακρόλης 63,24% και θυμόλης 11,03% που περιέχει το π-κυμένιο 5,03% και το γ-τερπινένιο 3,75% σε σχετικά μεγάλα ποσοστά.

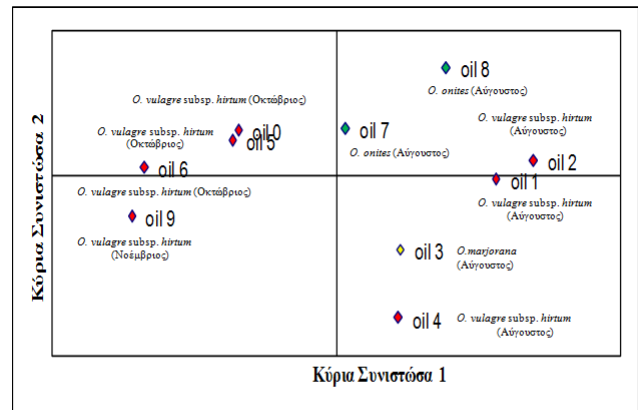
Περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο της δρόγης της ρίγανης (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα) (n=3)

Περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο της δρόγης της ρίγανης (*Origanum onites* L.) (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα) (n=3)

Δείγμα Απόσταξης	Εποχή Συγκομιδής	Αιθέριο Έλαιο % (mg.100 ⁻¹ g ξ.β)
oil 7	Αύγουστος 2006	1,97±0,1
oil 8	Αύγουστος 2006	0,72±0,0

Περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο της δρόγης της ρίγανης (*Origanum marjorana* L.) (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα) (n=3)

Δείγμα Απόσταξης	Εποχή Συγκομιδής	Αιθέριο Έλαιο % (mg.100 ⁻¹ g ξ.β)
δείγμα 3	Αύγουστος 2006	2,79±0,45

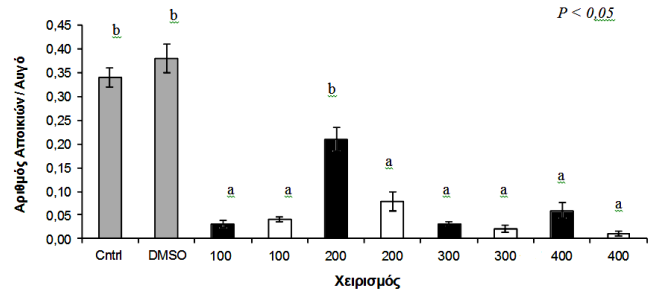


Ανάλυση κύριων συστασιών με βάση την χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων των ειδών του γένους *Origanum*. Οι άξονες εκφράζουν ποσοστό της συνολικής μεταβλητότητας των δεδομένων και οι μήνες εντός παρενθέσεων εκφράζουν την περίοδο συγκομιδής.

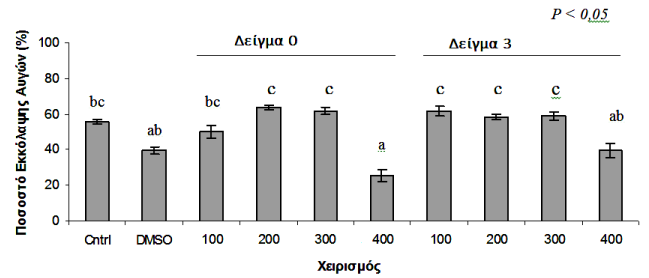
Αντιβακτηριακή δράση αιθέριων ελαίων

Η αντιβακτηριακή δράση των αιθέριων ελαίων της ρίγανης εξαρτάται από το είδος του αρωματικού φυτού και την ποιοτική σύσταση του. Τα αιθέρια έλαια, τόσο της ρίγανης όσο και της μαντζουράνας είχαν καλύτερη αντιβακτηριακή συμπεριφορά από το αντιβιοτικό vibriostat 0/129 (2,4-διάμινο-6,7-δισοπρόπυλοπτεριδίνη) έναντι των βακτηριακών στελεχών της ομάδας *Vibrio*. Από τα κύρια συστατικά του

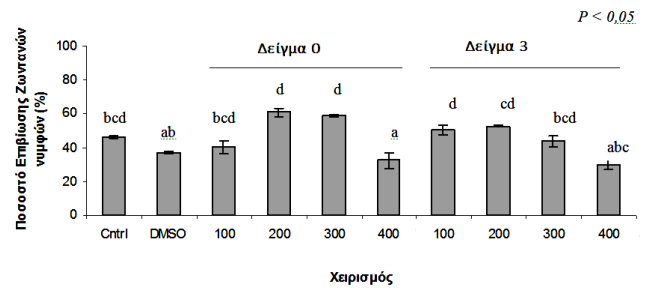
αιθέριου ελαίου, η καρβακρόλη εμφάνισε την μέγιστη αντιβακτηριακή δράση στα βακτηριακά στελέχη, μεταξύ των διαφόρων πειραματικών χειρισμών. Η συμπεριφορά του κάθε βακτηριακού στελέχους εξαρτάται από την πυκνότητα του. Η επώαση των τροχοζών στο υδάτινο διάλυμα των αιθέρων ελαίων οδήγησε σε μείωση του συνολικού αριθμού των βακτηρίων ενώ η κολυμβητική ταχύτητα τους δεν επηρεάστηκε. Η επιβίωση τους σε όλα τα είδη της ρίγανης δεν εμποδίστηκε από τα αιθέρια έλαια με εξαίρεση το αιθέριο έλαιο της μαντζουράνας, όπου σε συγκέντρωση 20 ppm προκλήθηκε τοξικότητα στα τροχοζώα. Το πιο αποδοτικό αιθέριο έλαιο για την απολύμανση των τροχοζών προέρχεται από τα είδος *O. onites* δείγμα 8. Όλα τα αιθέρια έλαια ελάττωσαν τον αριθμό των *Vibrio* ανά τροχοζώο. Η απολύμανση ήταν επιτυχής στις συγκεντρώσεις των 10 και 20 ppm. Επομένως, τα τροχοζώα μπορούν επιτυχώς να απολυμάνονται με αιθέρια έλαια ρίγανης σε συγκέντρωση 10 ppm για 4 ώρες. Η επώαση των αυγών σε υδάτινο διάλυμα των αιθέρων ελαίων συνέβαλε στη μείωση του συνολικού αριθμού των βακτηρίων. Το αιθέριο έλαιο της μαντζουράνας δείγμα 3 ήταν το ισχυρότερο στην απολύμανση των αυγών τσιπούρας. Η απολύμανση πραγματοποιήθηκε με επιτυχία στα 100, 200 και 300 ppm. Επομένως, η χρήση διαλύματος αιθέριου ελαίου σε συγκέντρωση 100 ppm κρίνεται επαρκής. Τα δέκα λεπτά, αποδείχτηκαν αρκετά στην μείωση του μικροβιακού φορτίου των αυγών. Η υπερβολική συγκέντρωση διαλύματος αιθέρων ελαίων, 400 ppm, δημιούργησε τοξικότητα στα αυγά της τσιπούρας.



Αριθμός αποικιών ανά αυγό τσιπούρας με την χρήση αιθέρων ελαίων ρίγανης και μαντζουράνας (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα) στις συγκεντρώσεις 100, 200, 300 και 400 ppm (cntrl: μάρτυρας) (n=3). Οι χειρισμοί με διαφορετικό γράμμα στον εκθέτη είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικοί ($P < 0,05$). Με γκρι χρώμα φαίνονται οι μάρτυρες, με μαύρο το δείγμα 0 (ρίγανη) και λευκό το δείγμα 3 (μαντζουράνα).



Ποσοστό εκκόλλησης αυγών με επώαση σε αιθέρια έλαια ρίγανης και μαντζουράνας (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα) την πρώτη μέρα της εκκόλλησης στις συγκεντρώσεις των 100, 200, 300 και 400 ppm. (cntrl: μάρτυρας, δείγμα 0: ρίγανη, δείγμα 3: μαντζουράνα) (n=2). Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα στον εκθέτη είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικοί ($P < 0,05$).

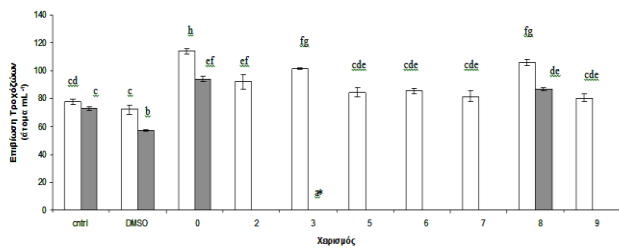


Ποσοστό επιβίωσης ζωντανών νυμφών με επώαση σε αιθέρια έλαια ρίγανης και μαντζουράνας (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα) την τελευταία μέρα της εκκόλλησης στις συγκεντρώσεις των 100, 200, 300 και 400 ppm. (cntrl: μάρτυρας, δείγμα 0: ρίγανη, δείγμα 3: μαντζουράνα) (n=2). Οι χειρισμοί με διαφορετικό γράμμα στον εκθέτη είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικοί ($P < 0,05$).

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε μια χώρα όπως η Ελλάδα, που εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τουρισμό, οι υδατοκαλλιέργειες πρέπει να υποστηρίζονται από φιλικές προς το περιβάλλον μεθόδους. Προς την κατεύθυνση αυτή κινείται η συγκεκριμένη μελέτη, τα πρώτα αποτελέσματα της οποίας δείχνουν ότι ο στόχος να δημιουργηθεί ένα προϊόν, που θα έχει σαν βάση του το ριγανέλαιο και θα αντικαταστήσει τη χρήση αντιβιοτικών σε καλλιέργειες τροχοζών και *Artemia* φαίνεται ότι είναι εφικτός.

Προτείνονται πειράματα σε μεγαλύτερη κλίμακα, και στη συνέχεια πειράματα σε κλωβούς, προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα ανάπτυξης και παρασκευής ενός προϊόντος που θα βοηθήσει το κλάδο των υδατοκαλλιεργειών γενικά και ιδιαίτερα όσες εταιρίες δραστηριοποιούνται στη βιολογική



Επίδραση των αιθέρων ελαίων (control: μάρτυρας, DMSO, δείγμα 0, δείγμα 2, δείγμα 5, δείγμα 6, δείγμα 9: αιθέρια έλαια ρίγανης *O. vulgare* subsp. *hirtum*, δείγμα 7- δείγμα 8: αιθέρια έλαια ρίγανης *O. onites*, δείγμα 3 αιθέριο έλαιο μαντζουράνας), στην επιβίωση των τροχοζών (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα) στις συγκεντρώσεις των 10 και 20 ppm (10 ppm: άσπρο γράμμα, 20 ppm: σκιασμένο) κατά τη διάρκεια ενός εικοσιτετράωρου (n=2). Οι χειρισμοί με διαφορετικό γράμμα στον εκθέτη είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικοί ($P < 0,01$).

* Στη συγκέντρωση των 20 ppm στο δείγμα 3 παρατηρήθηκε 100% θνησιμότητα τροχοζών, με αποτέλεσμα η επιβίωση να έχει μηδενική τιμή.

παραγωγή ψαριών, να αντιμετωπίσουν το πρόβλημα της παρουσίας βακτηριακών μολύνσεων στις καλλιέργειες ζωοπλακτονικών οργανισμών.

Εφ' όσον εντοπιστούν κατάλληλες αγορές για το προϊόν, οι παραγωγοί θα έχουν τη δυνατότητα να καλλιεργήσουν συγκεκριμένους γονοτύπους φυτών ρίγανης, επιλεγμένους για τα συστατικά του ριγανελαίου τους. Καλλιεργώντας πολλαπλασιαστικό υλικό που έχει αναπαραχθεί αγενώς, αντί των φυτών που καλλιεργούνται από σπόρο, θα επιτρέψει στους γεωργούς να τυποποιήσουν τις γεωργικές πρακτικές τους και να παράγουν ένα προϊόν σταθερά υψηλής ποιότητας.

Η μοριακή ταυτοποίηση των επιλεγμένων κλώνων ρίγανης θα συμβάλει προς αυτή τη κατεύθυνση ενώ η αξιολόγηση της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των δειγμάτων μας, που θα γίνει με RAPD ανάλυση [13] και με ανάλυση μοριακών δεικτών SSR, θα μας επιτρέψει να γνωρίζουμε σε ποιές περιοχές να αναζητήσουμε νέους γονοτύπους σε περίπτωση που αλλάξουν οι απαιτήσεις της εγχώριας και διεθνούς αγοράς.

Παράλληλα θα δοθεί η δυνατότητα ενίσχυσης της εγχώριας βιομηχανίας παραγωγής ριγανελαίου, που βασίζεται στην καλλιέργεια ρίγανης, ενός φυτού που ευδοκμεί στη χώρα μας, με ελάχιστες απαιτήσεις καλλιέργειας και ελάχιστες απαιτήσεις σε νερό, ώστε να περιοριστεί ο κίνδυνος διάβρωσης του εδάφους, σε πολλές περιοχές της χώρας μας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: ΑΡΧΙΜΗΔΗΣ ΙΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

[1] Vokou D. et. al. (1993). Geographic Variation of Greek Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) Essential Oils. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21:287-295.

[2] Kokkini, S. et. al. (1993). The Hybrid *Origanum* × *intercedens* from the Island of Nisyros (SE Greece) and its Parental Taxa; Comparative Study of Essential Oils and Distribution. *Biochemica/Systematics and Ecology*, 21: 397-403.

[3] Sivropoulou A. et. al. (1996) Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 44:1202-1205

[4] Kokkini, S. et. al. (2004). Essential Oil Composition of Greek (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) and Turkish (*O. onites*) Oregano :a Tool for Their Distinction. *J. Essent. Oil Res.*, 16:334-338.

[5] Burt SA and Reinders RD. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol.* 36:162-7.

[6] Dorman HJ and Deans SG (2000).Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.*88:308-16.

[7] Claire Yew, Y.C. (2008). Improving aquaculture production through better health and disease prevention the natural way. *Feed technology update.* Vo.3. Iss.1

[8] Pateras, D., et.al. (2000). Estimation of the potential risk of salinization and sodification using poor quality irrigation water in the basin of the former Karla Lake. 3rd Int. Cong. of European Society of Soil Conservation (ESSC), Valencia, Spain, p.79 (abstracts)

[9] “Method for screening plant for tolerance to abiotic stresses”. Patent Granted Number 1004332. Greek Patent Office. Inventors: Elias Anastassopoulos and Nikolas Panopoulos, 5/9/2003.

[10] E. Anastassopoulos (2007) Towards a microplate technology platform for plant breeding. Technology, application and validation of plant cryopreservation. Florence, May 10-12, 2007. Book of abstracts Pg.39.

[11] Pennycooke, J.C. (2005).Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in *petunia* (*Petunia* × *hybrida*). *Environmental and Experimental Botany* 53: 225-232.

[12] Liu Mei-Qin et. al. (2007). Cold acclimation induced accumulation of phenolic compounds and freezing tolerance in *Ammopiptanthus mongolicus*. *For. Stud. China*, 9: 203–207

[13] A. Katsiotis et. al. (2009) Phylogenetic relationships in *Origanum* spp. based on rDNA sequences and intra-genetic variation of Greek *O. vulgare* subsp. *hirtum* revealed by RAPD. *Scientia Horticulturae* 121: 103–108.

[14] “Method for screening plant for tolerance to abiotic stresses”. Patent Granted Number 1004332. Greek Patent Office. Inventors: Elias Anastassopoulos and Nikolas Panopoulos, 5/9/2003.

[15] E. Anastassopoulos (2007) Towards a microplate technology platform for plant breeding. Technology, application and validation of plant cryopreservation. Florence, May 10-12, 2007. Book of abstracts Pg.39.

[16] Pennycooke, J.C. (2005).Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in *petunia* (*Petunia* × *hybrida*). *Environmental and Experimental Botany* 53: 225-232.

[17] Liu Mei-Qin et. al. (2007). Cold acclimation induced accumulation of phenolic compounds and freezing tolerance in *Ammopiptanthus mongolicus*. *For. Stud. China*, 9: 203–207

[18] Hellenic Pharmacopoeia, Ed.; IV: Athens, 1989, 191-193.

[19] Massada, Y. Analysis of essential oil by gas chromatography and spectrometry; John Wiley & Sons: New York, 1976.

[20] Adams, R. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry; 4th Ed.; Allured Books: Carol Stream, 2007.

[21] Van Den Dool, H., & Dec. Kratz, P. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11, 463-471.

[22] Stefanakis M.K, Touloupakis E., Anastassopoulos E., Ghanotakis D., Katerinopoulos H.E., Makridis P. (2013). Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control* 34:539-546.

[23] Stefanakis M.K, Anastassopoulos E., Katerinopoulos H.E., Makridis P. Use of essential oils extracted from three *Origanum* species for disinfection of cultured rotifers (*Brachionus plicatilis*) (2013). *Aquaculture Research*. DOI:10.1111/are.12137.