

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ «ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη δύο μεθόδων χορήγησης τροφής σε διαφορετικές συνθήκες
οξυγόνου στην εκτροφή της τσιπούρας (*Sparus aurata*)**

Τσουκάλη Παναγιώτα

Ηράκλειο 2023

**«Μελέτη δύο μεθόδων χορήγησης τροφής σε διαφορετικές συνθήκες οξυγόνου
στην εκτροφή της τσιπούρας (*Sparus aurata*)»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

- 1) Παναγιωτάκη Παναγιώτα, Καθηγήτρια - Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα.**
- 2) Παπαδάκης Ιωάννης, Δρ. Ερευνητής Β – Οντογένεση και Συμπεριφορά ιχθύων, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών Κρήτης, Μέλος.**
- 3) Γκολομάζου Ελένη, Καθηγήτρια – Ευζωία εκτρεφόμενων ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.**

Αφιέρωση
Στα παιδιά μου, το σύζυγό μου
και τη Μητέρα μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της εργασίας αυτής, Δρ. Παπαδάκη Ιωάννη για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος και τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, όσο και για τη πολύτιμη γνώση που μου μετέφερε. Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής αποτελούμενη από την καθηγήτρια και υπεύθυνη του Μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών Δρ. Παναγιωτάκη Π. και την Δρ. Γκολομάζου Ε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Μυλωνά που χάρη σε αυτόν ξεκίνησε η σκέψη να ξεκινήσω το Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών και στήριξε την προσπάθειά μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θέλω να εκφράσω στην συνεργάτη μου κα Κατσίκια Λυδία που ήταν δίπλα μου ένθερμη από την αρχή σε όλα όσα χρειάστηκα για να φέρω σε πέρας αυτή την εργασία και καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συνάδελφο Δρ. Μαστοράκη Μαρία για την πολύτιμη βοήθειά της στην παρούσα εργασία και τον Δρ. Σαμαρά Θανάση για την πολύτιμη βοήθεια. Ευχαριστώ όλους εκείνους, αγαπημένα αδέρφια και φίλους, που ήταν δίπλα μου με τη σκέψη τους.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ όμως ανήκει στα παιδιά μου για τη διαρκή κατανόηση και υπομονή, το σύζυγό μου για τη διαρκή του συμπαράσταση και τη μητέρα μου για την αμέριστη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Σας ευχαριστώ!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) αποτελεί ένα πολύ σημαντικό είδος στη Μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια που επιφέρει βιώσιμη ανάπτυξη στην οικονομία. Γνωρίζοντας ότι η τροφή αποτελεί πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη των ψαριών και παράλληλα καταλαμβάνει το μεγαλύτερο κόστος, η εφαρμογή της κατάλληλης μεθόδου σίτισης μπορεί μεγιστοποιήσει την ανάπτυξη των ψαριών με μεγαλύτερη απόδοση κέρδους. Παράλληλα τη διάρκεια της καλοκαιρινής περιόδου στις μονάδες εκτροφής παρουσιάζονται χαμηλά επίπεδα οξυγόνου σε συνδυασμό με τις ιχθυοπυκνότητες και τα ρεύματα νερού σε κάθε περιοχή. Όπως είναι γνωστό το οξυγόνο αποτελεί τον κυριότερο περιβαλλοντικό παράγοντα που επηρεάζει άμεσα την ανάπτυξη, τη συμπεριφορά και τη φυσιολογία των ψαριών.

Προκειμένου να μελετηθούν δύο διαφορετικοί μέθοδοι χορήγησης τροφής ως προς τη συμπεριφορά, την ανάπτυξη και τη φυσιολογία της τσιπούρας στα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου διενεργήθηκε η παρούσα μελέτη. Η μελέτη διενεργήθηκε στα Aqualabs στο Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών στα πλαίσια του προγράμματος «Διαχείριση οξυγόνου σε κλωβούς εκτροφής ιχθυοκαλλιέργειας για μεγιστοποίηση των παραγωγικών αποδόσεων», χρηματοδοτούμενο από το ΕΣΠΑ 2014-2020. Οι δύο μέθοδοι χορήγησης τροφής που μελετήθηκαν ήταν το τάισμα με το χέρι και η σίτιση με αυτόματες ταΐστρες αυτοχειρισμού self- feeder. Οι συνθήκες για τα επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου ήταν 60-80% και 40-60% σε πλήρως ελεγχόμενο σύστημα παροχής οξυγόνου, σε δεξαμενές κλειστών κυκλωμάτων (RAS). Τέσσερις συνθήκες δημιουργήθηκαν για να εξεταστούν οι δύο παράγοντες επίδρασης, με τρεις επαναλήψεις για την κάθε συνθήκη.

Η μέθοδος χορήγησης τροφής με ταΐστρες αυτοχειρισμού παρουσίασε την διαφορετική προτιμώμενη ποσότητα τροφής για κατανάλωση και ώρες προτίμησης ταΐσματος της τσιπούρας στα δύο επίπεδα οξυγόνου. Οι δύο διαφορετικοί μέθοδοι ταΐσματος έδειξαν διαφορετική επίδραση στην εναπόθεση λίπους στο ήπαρ, στο πάχος του εξωτερικού και εσωτερικού τοιχώματος του οπίσθιου τμήματος του εντέρου και στο ποσοστό ξηρής ουσίας στην ανάλυση σύσταση σώματος και για τα δύο επίπεδα οξυγόνου, χωρίς να επηρεάσουν την ανάπτυξη. Η μέθοδος με ταΐστρες αυτοχειρισμού είχε θετική επίδραση στο συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) και την απόδοση τροφής (feed efficiency) στα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Η μέθοδος ταΐσματος διαφοροποίησε το ποσοστό τέφρας ξηρής ουσίας στα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου.

Ο παράγοντας οξυγόνο επηρέασε τους δείκτες αύξησης, το μήκος εντέρου, την εναπόθεση λίπους στο ήπαρ, το πάχος του εσωτερικού τοιχώματος του μεσαίου εντέρου, το πάχος των δύο τοιχωμάτων του οπίσθιου εντέρου και το ποσοστό πρωτεΐνης στη σύσταση σώματος.

Λέξεις κλειδιά: τσιπούρα, μέθοδος ταΐσματος, επίπεδο οξυγόνου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1. Η τσιπούρα στο φυσικό περιβάλλον	10
1.2. Η τσιπούρα στη μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια και στην Ελλάδα	10
1.3. Υδατοκαλλιέργεια – υφιστάμενη κατάσταση	12
1.4. Δυσκολίες αυξημένης παραγωγής	13
1.5. Το οξυγόνο- κρίσιμος παράγοντας στην υδατοκαλλιέργεια	16
1.6. Μέθοδοι χορήγησης τροφής που χρησιμοποιούνται στην εκτροφή των ψαριών	17
1.6.1. Χορήγηση τροφής με το χέρι	17
1.6.2. Χορήγηση τροφής με τροφοδοτούμενες μηχανές	18
1.6.3. Χορήγηση τροφής με αυτοχειρισμό	19
1.7. Σκοπός της εργασίας	19
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
2.1. Πειραματικό υλικό	20
2.2. Πειραματικός σχεδιασμός	20
2.2.1. Κλειστά κυκλώματα εκτροφής (RAS)	21
2.2.2. Σύστημα παροχής και ελέγχου οξυγόνου	22
2.2.3. Θερμοκρασία	24
2.2.4. Φωτισμός	25
2.3. Μέθοδοι ταΐσματος	25
2.3.1. Μέθοδος ταΐσματος με το χέρι	25
2.3.2. Μέθοδος ταΐσματος με τη χρήση ταϊστών αυτοχειρισμού (self-feeder)	26
2.4. Τροφή σίτισης του πειραματικού πληθυσμού	28
2.5. Δειγματοληψίες	30
2.5.1. Έναρξη πειράματος	30
2.5.2. Ενδιάμεση δειγματοληψία	30
2.5.3. Τελική δειγματοληψία	31
2.6. Μέθοδος ιστολογικής επεξεργασίας	33
2.6.1. Παρατήρηση τομών στο μικροσκόπιο και λήψη φωτογραφιών	36
2.6.2. Ανάλυση εικόνας	37
2.7. Ανάλυση σύστασης σώματος	39
2.7.1. Μέτρηση ολικής ξηρής ουσίας	40
2.7.2. Μέτρηση τέφρας	40

2.7.3. Μέτρηση λίπους	41
2.7.4. Μέτρηση πρωτεΐνης	43
2.8 Στατιστική ανάλυση δεδομένων.....	44
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	45
3.1. Αποτελέσματα πειράματος αύξησης-Δείκτες.....	45
3.2. Αποτελέσματα σωματομετρικών χαρακτηριστικών	56
3.3 Αποτελέσματα ιστολογικών αναλύσεων	61
3.3.1. Αποτελέσματα ποσοστού λίπους στο ήπαρ.....	62
3.3.2. Αποτελέσματα ιστολογικών αναλύσεων στα βράγχια	65
3.3.3. Αποτελέσματα ιστολογικών αναλύσεων στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου..	68
3.3.4. Αποτελέσματα ιστολογικών αναλύσεων στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου...	73
3.4. Αποτελέσματα ανάλυσης σύστασης σώματος.....	79
3.5. Αποτελέσματα ανάλυσης συμπεριφοράς	86
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	92
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	94
6. ABSTRACT.....	103

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

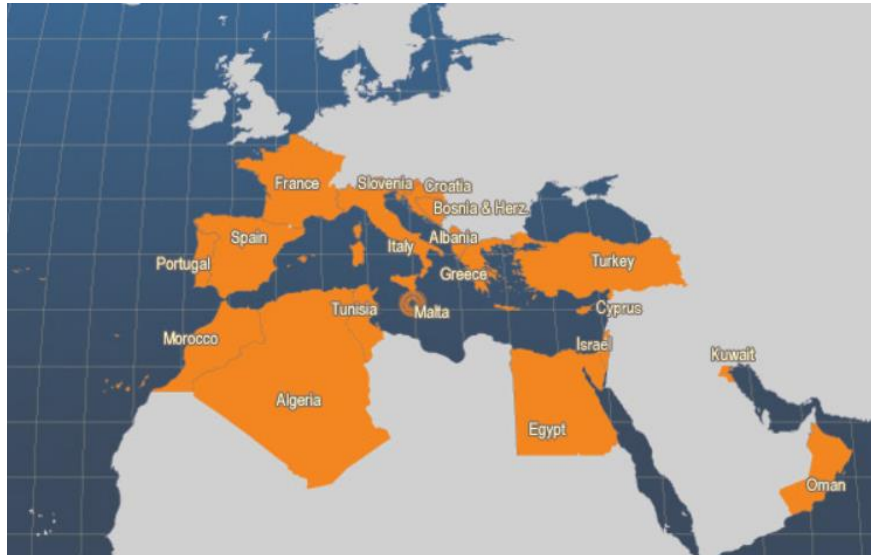
1.1. Η τσιπούρα στο φυσικό περιβάλλον

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) ανήκει στο βασίλειο των ζώων, στη συνομοταξία Χορδωτά, της ομοταξίας Ακτινοπτερυγίων της τάξης των Περκόμορφων, της οικογένειας σπαριδοειδών (Sparidae) και ανήκει στην υπόταξη των τελεόστεων ιχθύων. Είναι ένα είδος κοινό στη Μεσόγειο και στην ακτή του Ατλαντικού. Είναι ένα ψάρι ευρύαλο και ευρύθερμο και συναντάται τόσο σε βραχώδεις πυθμένες και στα λιβάδια ποσειδωνίας, όσο και σε εκβολές ποταμών και λιμνοθάλασσες. Έχει κυρτό προφίλ, οβάλ και ψηλό σώμα. Το μήκος που απαντάται συνήθως είναι τα 35 εκατοστά. Έχει ασημένιο χρώμα με μια χαρακτηριστική μαύρη κηλίδα στο τέλος του βραγχιακού επικαλύμματος. Χαρακτηριστικό του γνώρισμα είναι επίσης το χρυσό τόξο που ενώνει τα μάτια και της δόθηκε το όνομα «χρυσόφρυς». Είναι πρώτανδρο ερμαφρόδιτο είδος ψαριού και αναπαράγεται στο φυσικό περιβάλλον από Οκτώβρη έως Δεκέμβρη.

1.2. Η τσιπούρα στη μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια και στην Ελλάδα

Η τσιπούρα αποτελεί ένα κατεξοχήν είδος για καλλιέργεια, λόγω του γρήγορου ρυθμού ανάπτυξης ως εμπορεύσιμο είδος, της ευκολίας καλλιέργειας, της ζήτησης του στην αγορά και την υψηλή εμπορική τιμή (Barusco and Abbellan, 1999). Μπορεί να καλλιεργηθεί με διάφορους τρόπους σε παράκτιες λίμνες και λιμνοθάλασσες με εντατικές ή ημιεντατικές μεθόδους σε χερσαίες εγκαταστάσεις ή σε θαλάσσιους κλωβούς. Καλλιεργείται ως επί τω πλείστον στις μεσογειακές χώρες, όπου είναι

ευνοϊκές οι συνθήκες για καλλιέργεια σε κλωβούς. Στην εικόνα 1 απεικονίζεται η γεωγραφική κατανομή της εκτρεφόμενης τσιπούρας.

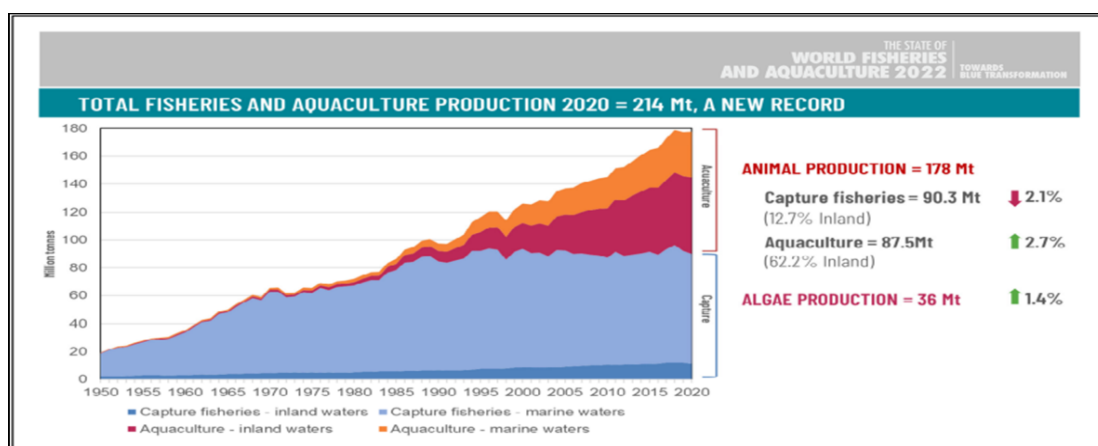


Εικόνα 1. Κύριες χώρες παραγωγής τσιπούρας (FAO 2020)

Η μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια το 2021 ανήλθε σε 628.034 τόνους, εκ των οποίων 325.615 τόνοι ήταν από καλλιέργεια τσιπούρας, παρουσιάζοντας αύξηση 8,4% σε σχέση με το 2020. Σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία της ΕΛΣΤΑΤ (Ελληνική στατιστική αρχή), το 2021, η παραγωγή τσιπούρας σημείωσε σημαντική αύξηση 7,7% στον όγκο της παραγωγής σε σχέση με το προηγούμενο έτος και έφτασε τους 67.058 τόνους. Η συνολική αξία κέρδους από την παραγωγή της τσιπούρας στην Ελλάδα παρουσίασε αύξηση 1,7%.

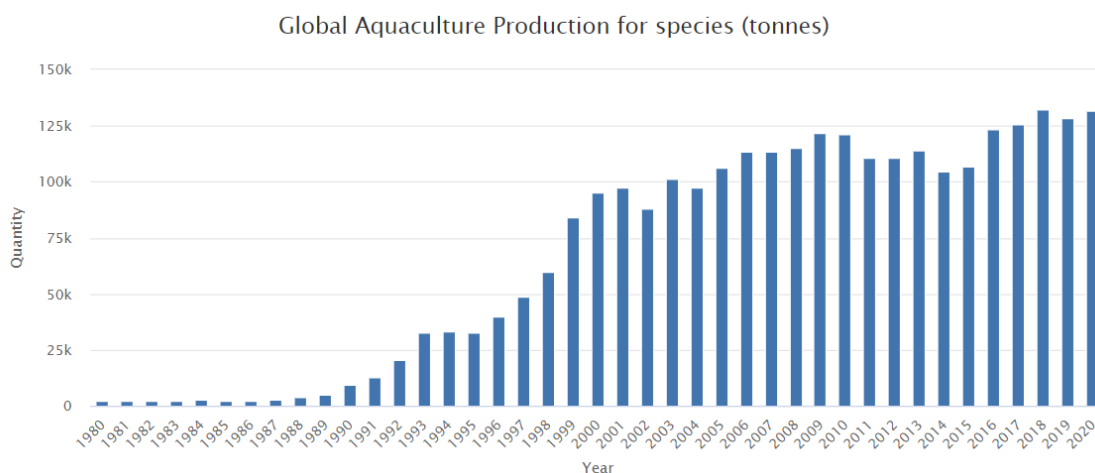
1.3. Υδατοκαλλιέργεια – υφιστάμενη κατάσταση

Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται όλο και μεγαλύτερη αύξηση και ζήτηση στα προϊόντα υδατοκαλλιέργειας, με σκοπό να καλυφθούν οι παγκόσμιες διατροφικές ανάγκες. Σύμφωνα με το ΣΕΘ (Σύνδεσμο Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών), ένα νέο ρεκόρ των 157 εκατομμύρια τόνων χρησιμοποιήθηκε για ανθρώπινη κατανάλωση, όπου τα προϊόντα υδατοκαλλιέργειας παρουσίασαν 2,7% αύξηση το 2020.



Σχήμα 1. Η συνολική παραγωγή αλιείας και υδατοκαλλιέργειας το 2020 (FAO, 2020)

Η υδατοκαλλιέργεια σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία, παρέχει ήδη περισσότερα αλιευτικά προϊόντα (57%) στην ανθρωπότητα από ότι η ελεύθερη αλιεία (FAO, 2020).



Σχήμα 2. Παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιέργειας (FAO, 2020)

Η Ελλάδα βρίσκεται στις δύο πρώτες χώρες παραγωγής ψαριών μεσογειακής υδατοκαλλιέργειας ως προς την αξία και τον όγκο παραγωγής υδατοκαλλιέργειας στην Ε.Ε. αντιπροσωπεύοντας το 25% της παραγωγής τους διεθνώς.



Εικόνα 2. Προσφορά και παραγωγή αλιευτικών προϊόντων στην Ελλάδα (ΣΕΘ, 2022)

1.4. Δυσκολίες αυξημένης παραγωγής

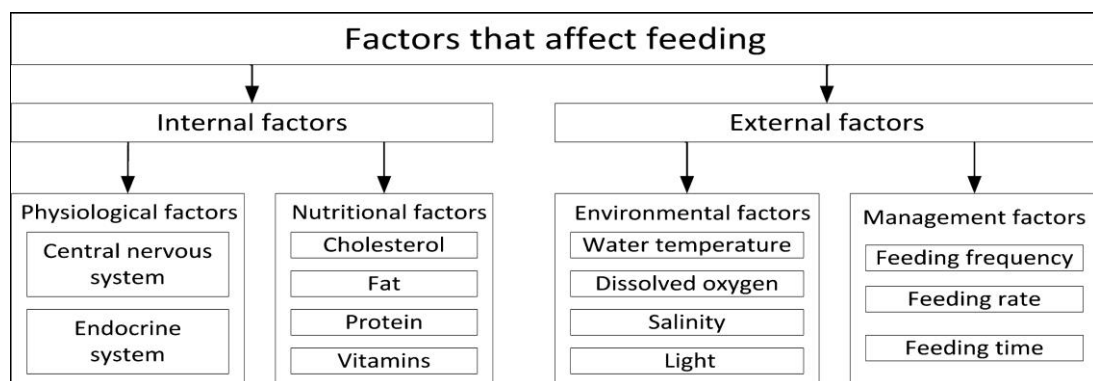
Στον τομέα των Υδατοκαλλιιεργειών υπήρχαν ανέκαθεν προβληματισμοί για την επίτευξη της μέγιστης παραγωγής με την καλύτερη ποιότητα και με το χαμηλότερο κόστος, καθώς επίσης παράγοντες που επηρεάζουν την βέλτιστη διαχείριση των εκτρεφόμενων οργανισμών για την ευζωία τους (FAWC, 1996) και το περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Σύμφωνα με τις «πέντε ελευθερίες» που διέπεται από αυτό, τα ψάρια θα πρέπει να είναι ελεύθερα από το αίσθημα της πείνας. Η σίτιση είναι σίγουρα ένας βασικός παράγοντας που επηρεάζει την κατάσταση ενός ζώου σε αιχμαλωσία, επειδή η τροφή πρέπει να είναι διαθέσιμη σε επαρκείς ποσότητες και με κατάλληλη σύνθεση για τη διατήρηση της υγείας και της φυσιολογικής συμπεριφοράς (Huntingford *et al.*, 2006). Η πίεση στη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας να υιοθετήσει ολοκληρωμένα μέτρα βιωσιμότητας κατά τη διάρκεια της τελευταίας 20ετίας, βελτίωσε την τεχνολογία και τη διαχείριση σε πολλές περιπτώσεις (Naylor *et al.*, 2021). Η συνεχής όμως επέκταση της υδατοκαλλιέργειας είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του κόστους των ζωοτροφών (Føre *et al.*, 2016).

Γνωρίζοντας ότι η τροφή καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του κόστους παραγωγής των εκτρεφόμενων ειδών στην υδατοκαλλιέργεια, το οποίο μπορεί να κυμανθεί από 30 έως 70% του συνολικού κόστους εκτροφής (de Verdal *et al.*, 2017), έχουν γίνει μεγάλες προσπάθειες για την αντικατάσταση των ιχθυαλεύρων ή μέρους αυτών στις ιχθυοτροφές, καθώς τα ιχθυαποθέματα μειώνονται συνεχώς με αποτέλεσμα την αύξηση τιμής της πρώτης ύλης (Tacon & Metian, 2008). Το υψηλό κόστος που σχετίζεται με τις διαδικασίες σίτισης και τη βελτιστοποίηση της αποδοτικότητας των ζωοτροφών και της υγείας των ψαριών είναι βασικές πτυχές για την οικονομική και περιβαλλοντική βιωσιμότητα των τον κύκλο παραγωγής (Busti *et al.*, 2020).

Η μείωση της απόδοσης τροφής αποτελεί μέγιστο στόχο στον τομέα της Υδατοκαλλιέργειας και αυτό δεν εξαρτάται μόνο από την ποιότητα και τη σύσταση της τροφής αλλά και από τη μέθοδο τροφοληψίας. Θα πρέπει λοιπόν να υιοθετηθούν πρακτικές σίτισης που να ελαχιστοποιούν τη σπατάλη ζωοτροφών, διότι εκτός των άλλων, η σπατάλη ζωοτροφών μπορεί να έχει πολύ σημαντικό αντίκτυπο στην παραγωγή απορριμμάτων στο περιβάλλον από την εκτροφή ψαριών (Cho *et al.*, 2001).

Στην υδατοκαλλιέργεια υπάρχουν παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα την ανάπτυξη και την ευημερία των εκτρεφόμενων ψαριών όπως η θερμοκρασία, η θολερότητα, οι υψηλές ιχθυοφορτίσεις και το διαλυμένο οξυγόνο (Sun *et al.*, 2016) και μπορεί να οδηγήσουν τα ψάρια σε μειωμένη τροφοληψία (Pichavant *et al.*, 2001, Leal *et al.*, 2011) και σε κατάσταση στρες, όπου αποτελεί τη βασική αιτία εμφάνισης πολλών παθολογικών προβλημάτων (Person-Le Ruyet and Le Bayon, 2009). Με αυτό τον τρόπο μπορεί να δημιουργηθεί υποβάθμιση στην ποιότητα του τελικού προϊόντος (Bagni *et al.*, 2007, Papaharisis *et al.*, 2019), ενώ παράλληλα μπορεί να επηρεαστεί η συμπεριφορά των ψαριών και να παρουσιάσουν εντονότερη επιθετική συμπεριφορά σε περιόδους περιορισμένης τροφοληψίας (Papadakis *et al.*, 2016).

Στο παρακάτω σχήμα (Σχ.3) βλέπουμε όλους τους παράγοντες που επηρεάζουν το τάισμα των ψαριών.



Σχήμα 3. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σίτιση (Zhou *et al.*, 2018)

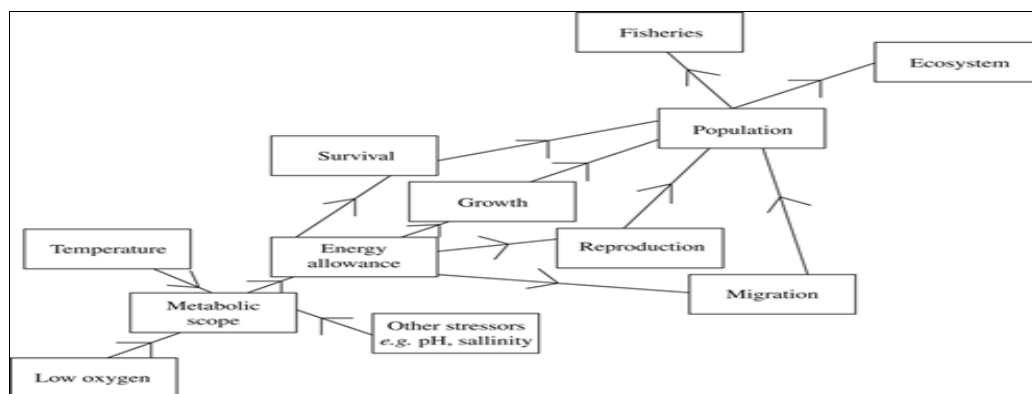
Όλοι οι προαναφερθέντες παράγοντες λαμβάνονται υπόψη από τους ερευνητές και παραγωγούς, καθώς οι νέες τάσεις στην ιχθυοκαλλιέργεια επικεντρώνονται σε στρατηγικές σίτισης και ανάπτυξης έξυπνων συστημάτων παρακολούθησης και σίτισης των ψαριών για την μεγιστοποίηση κέρδους και παραγωγής ενός ποιοτικού προϊόντος κάτω από τις καλύτερες συνθήκες ευζωίας.

1.5. Το οξυγόνο- κρίσιμος παράγοντας στην υδατοκαλλιέργεια

Το οξυγόνο αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα που μπορεί να επηρεάσει τα ψάρια στη σίτιση και την ευζωία τους. Τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου σε συνδυασμό με την αύξηση της θερμοκρασίας αποτελούν μια επικίνδυνη κατάσταση σε μια ιχθυοκαλλιέργεια, ενώ παράλληλα λόγω κλιματικής αλλαγής η θερμοκρασία μπορεί να θέσει νέες προκλήσεις για την αναπνοή (Pörtner *et al.*, 2017). Για τους θαλάσσιους οργανισμούς ως «υποξία» λέγεται η κατάσταση κατά την οποία υπάρχει έλλειψη O_2 (κάτω από 2-3 mg O_2 /lt) και ανοξία όταν υπάρχει πλήρης έλλειψη οξυγόνου (Farrell & Richards, 2009). Υπάρχει ένα επίπεδο οξυγόνου, η λεγόμενη «κρίσιμη συγκέντρωση οξυγόνου», κάτω από την οποία ο οργανισμός δεν μπορεί να ανταπεξέλθει ενεργειακά παρά μόνο για τις βασικές ανάγκες συντήρησης (Claireaux *et al.*, 2000, Claireaux and Chabot, 2016, Claireaux and Lagardère, 1999, Neill *et al.*, 1994).

Εντός των φυσιολογικών ορίων θερμοκρασίας για τα περισσότερα ψάρια (0 έως 40 °C), υπάρχει μια μείωση 10 και 20% στο διαλυμένο O_2 για κάθε αύξηση της

θερμοκρασίας κατά 10 °C. Στο παρακάτω σχήμα βλέπουμε πως επηρεάζεται το υδάτινο οικοσύστημα από τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες.



Σχήμα 4. Επίδραση παραγόντων στο υδάτινο οικοσύστημα (Townhill *et al.*, 2017).

1.6. Μέθοδοι χορήγησης τροφής που χρησιμοποιούνται στην εκτροφή των ψαριών

1.6.1. Χορήγηση τροφής με το χέρι

Η σίτιση στην υδατοκαλλιέργεια γίνεται εδώ και πολλά χρόνια με ανθρώπινο δυναμικό ταΐζοντας με το χέρι. Βασίζεται συνήθως σε πίνακες σίτισης που παρέχονται από τον κατασκευαστή της τροφής και συσχετίζουν τον ρυθμό σίτισης (σε g [feed]/ (g [BM] day)) με το (μέσο) μέγεθος των ψαριών και τη θερμοκρασία. Αυτοί οι πίνακες βασίζονται σε πειραματικές μελέτες σίτισης, μερικές από τις οποίες έχουν δημοσιευτεί. Η ανταπόκριση των ψαριών στο καθημερινό πρωτόκολλο σίτισης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις ειδικές διατροφικές συνήθειες για το είδος και την ανατομία του πεπτικού συστήματος (Gillanpejad *et al.*, 2019).

Παρόλα αυτά η εμπειρία του παραγωγού οδηγεί στην τελική απόφαση της χορηγούμενης ποσότητας τροφής, του αριθμού γευμάτων και την ώρα ταΐσματος ανάλογα με το είδος και τις συνθήκες εκτροφής.

1.6.2. Χορήγηση τροφής με τροφοδοτούμενες μηχανές

Για εξοικονόμηση ενέργειας και ανθρώπινου δυναμικού, έχουν μπει σε εφαρμογή εδώ και πολλά χρόνια συστήματα τροφοδοσίας στα εκτρεφόμενα ψάρια, (Chang *et al.*, 2005, Velazquez and Martinez, 2005) όπου η συγκεκριμένη υπολογισμένη ποσότητα που θα δινόταν με το χέρι, δίνεται αυτόματα από ένα μηχάνημα την ορισμένη ώρα. Πλεονέκτημα αυτών των συστημάτων είναι επίσης ότι τα ψάρια δεν δέχονται την αρνητική επίπτωση στρες από την ανθρώπινη παρουσία. Παρόλα αυτά η διαχείριση απρόσμενων παραγόντων όπως μια ασθένεια, καταστάσεις στρες που ο πληθυσμός να μην είναι σε κατάσταση για την αναμενόμενη κατανάλωση τροφής οδηγεί στην υπερτροφοδοσία, με αποτέλεσμα τη σπατάλη τροφών και τη μείωση κέρδους, ενώ παράλληλα ο εκτρεφόμενος πληθυσμός μπορεί να οδηγηθεί σε μειωμένη τροφοληψία λόγω λανθασμένης εκτίμησης και να επιφέρει αρνητικούς συντελεστές αύξησης (Ang & Petrell, 1998, Kimura *et al.* 2020). Τεχνικές αναγνώρισης συμπεριφοράς τροφοδοσίας των ψαριών έχουν αναπτυχθεί ραγδαία και βασίζονται στην τεχνολογία όρασης του υπολογιστή και στην ακουστική (Li *et al.*, 2020). Έχουν επίσης αναπτυχθεί συστήματα τροφοδοσίας βασισμένα σε αλγόριθμους και μαθηματικά μοντέλα (Lee *et al.*, 2013). Ωστόσο, τα μαθηματικά μοντέλα δεν είναι τόσο έξυπνα για να μπορούν να λάβουν υπόψη τους παράγοντες που μπορεί να επηρεάσει την όρεξη των ψαριών (Zhou *et al.*, 2018). Ένα σωστά ανεπτυγμένο σύστημα τροφοδοσίας θα μπορούσε να επιφέρει οικονομικά κέρδη και ανάπτυξη στη βιομηχανία Υδατοκαλλιέργειας (Yeoh *et al.*, 2010).

1.6.3. Χορήγηση τροφής με αυτοχειρισμό

Η μηχανή τροφοδοσίας κατά απαίτηση έχει αναδειχθεί ως πιθανή εναλλακτική λύση. Αυτά τα συστήματα περιέχουν συνήθως έναν αισθητήρα που καταγράφει και ανταποκρίνεται στην κατάσταση σίτισης των ψαριών και τα ταΐζει όταν ενεργοποιούνται (Yukinori *et al.*, 2016). Αυτά τα συστήματα έχουν τη δυνατότητα να επιτρέπουν αποτελεσματική, αυτόματη σίτιση με βάση τη ζήτηση, αλλά ανάλογα με το είδος μπορεί να υπάρξουν κυρίαρχα άτομα που μπορούν να εμποδίσουν άλλα πεινασμένα ψάρια να πλησιάσουν τον τροφοδότη. Είναι μια μέθοδος κατάλληλη μόνο για εκπαιδευμένα ψάρια, καθώς τα μη εκπαιδευμένα ψάρια δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν αυτή τη μηχανή τροφοδοσίας (Covès *et al.*, 2006). Με τα συστήματα αυτοτροφοδοσίας, βάσει μελέτης, τα ψάρια έδειξαν την ικανότητα να επιλέξουν μακροθρεπτικά συστατικά και να συνθέσουν τη δική τους ισορροπημένη διατροφή (Aranda *et al.*, 2000).

1.7. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετήσει δύο μεθόδους χορήγησης τροφής σε δύο διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου ως προς την αύξηση, τη συμπεριφορά, τη φυσιολογία και την ανάλυση σύστασης σώματος στην τσιπούρας.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματικό υλικό

Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν άτομα του είδους *Sparus aurata* (τσιπούρα), τα οποία προέρχονταν από γεννήτορες της εταιρείας Forkys στη Σητεία και αποτέλεσαν τον εκτρεφόμενο γόνο έως 2gr στις εγκαταστάσεις εκκολαπτηρίου και προπάχυνσης της εταιρείας. Ο αρχικός γόνος μεταφέρθηκε στις εγκαταστάσεις των Aqualabs στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. στις 21-4-2021. Τα ιχθύδια παρέμειναν και εκτράφηκαν μέχρι το επιθυμητό μέσο βάρος των 100gr στις πειραματικές εγκαταστάσεις του τμήματος Συμπεριφοράς-Διατροφής έως τις 12-11-2021, όπου έγινε η έναρξη του πειράματος. Το νερό στο οποίο έγινε η εκτροφή τους προερχόταν από γεωτρήσεις, με αλατότητα 34‰ και σταθερή θερμοκρασία 19°C. Έγινε σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας στους 23°C μέχρι την έναρξη του πειράματος.

2.2. Πειραματικός σχεδιασμός

Δημιουργήθηκαν τέσσερις συνθήκες εκτροφής, με τρεις επαναλήψεις για την κάθε μία, συνολικά δώδεκα δεξαμενές όγκου 500lt η κάθε μία. Σε κάθε δεξαμενή τοποθετήθηκαν είκοσι τρία (23) ψάρια. Οι δύο συνθήκες είχαν επίπεδα 60-80% διαλυμένου οξυγόνου και οι άλλες δύο συνθήκες είχαν 40-60% διαλυμένου οξυγόνου στο νερό εκτροφής. Ο πληθυσμός των ψαριών στις τρεις δεξαμενές για την κάθε

συνθήκη οξυγόνου σιτίστηκε με τη μέθοδο ταΐσματος με το χέρι, ενώ οι άλλες τρεις δεξαμενές για την κάθε συνθήκη σιτίστηκε με τη χρήση ταΐστρον αυτοχειρισμού self-feeder. Η πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε για 83 ημέρες.

2.2.1. Κλειστά κυκλώματα εκτροφής (RAS)

Κάθε πειραματική συνθήκη, αποτελούμενη από τρεις δεξαμενές εκτροφής, υποστηριζόταν από κλειστό σύστημα εκτροφής ψαριών (RAS). Κάθε κλειστό κύκλωμα περιελάμβανε το μηχανικό φίλτρο, το οποίο κατακρατούσε όλα τα στερεά υπολείμματα και την δεξαμενή καθίζησης όγκου 500lt όπου βρίσκονταν μετά την απορροή των τριών δεξαμενών. Στη συνέχεια μεσολαβούσε αντλία 1 hp/φ40m³/h, όπου οδηγούσε το νερό σε κυλινδρική δεξαμενή όγκου 800lt όπου βρισκόταν το βιολογικό φίλτρο και γινόντουσαν οι διαδικασίες της νιτροποίησης και απονιτροποίησης. Έπειτα μέσω του PVC δικτύου το ανακυκλοφορούμενο νερό επέστρεφε στις δεξαμενές εκτροφής. Σε εβδομαδιαία βάση με τη χρήση test kit sera γινόντουσαν μετρήσεις αμμωνίου NH₄ για τον προσδιορισμό της ποσότητας NH₃-N και μετρήσεις νιτρωδών NO₂ στο νερό των πειραματικών πληθυσμών. Οι ποσότητες τοξικής αμμωνίας και για τα τέσσερα κλειστά κυκλώματα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος ήταν <0,001 mg/l και οι τιμές των νιτρωδών κυμάνθηκαν από 0-2mg/l. Οι ανανεώσεις νερού μέσα στη δεξαμενή ήταν σταθερά 4% ανά ώρα, ενώ η ανανέωση νερού μετά τη δεξαμενή εκτροφής κυμάνθηκε από 2-8% /ώρα, ανάλογα με τις μετρούμενες τιμές αμμωνίας και νιτρωδών. Οι παροχές του νερού ανακυκλοφορίας ήταν ίδιες για όλες τις συνθήκες, κυμάνθηκαν 40-60% ανά ώρα και αποτέλεσαν βασική σταθερή συνθήκη για την αρχική οξυγόνωση του νερού.

2.2.2. Σύστημα παροχής και ελέγχου οξυγόνου

Η πειραματική διαδικασία εκτελέστηκε στην πειραματική εγκατάσταση του τμήματος Συμπεριφοράς ιχθύων, αποτελούμενο από δώδεκα δεξαμενές οι οποίες ήταν εξοπλισμένες με ένα πλήρως ελεγχόμενο σύστημα οξυγόνου (SENECT).

Σε κάθε δεξαμενή τοποθετήθηκε ένας οπτικός αισθητήρας οξυγόνου, όπου έπαιρνε μετρήσεις του κορεσμού του οξυγόνου και της θερμοκρασίας και αναγράφονταν στον κεντρικό πίνακα ελέγχου (controller). Ένα αισθητήριο για μέτρηση pH, ήταν τοποθετημένο σε κάθε κλειστό κύκλωμα εκτροφής. Τρεις πίνακες ελέγχου υποστήριζαν τις δώδεκα πειραματικές δεξαμενές για τα οπτικά αισθητήρια και τις αντίστοιχες ηλεκτροβάνες αερίων, καθώς επίσης και τα αισθητήρια pH.

Το δίκτυο παροχής οξυγόνου ήταν πλήρως εγκατεστημένο με ειδικά κανάλια παροχής οξυγόνου που κατέληγαν σε κάθε δεξαμενή ξεχωριστά και μέσω ειδικής πέτρας οξυγόνου γινόταν η διάχυσή του (Εικ.1). Η παροχή του οξυγόνου πραγματοποιήθηκε μέσω ειδικών εγκεκριμένων φιαλών οξυγόνου, εφοπλισμένες με μανόμετρο οξυγόνου, όπου τροφοδοτούσαν το δίκτυο διανομής του οξυγόνου.



Εικόνα 3. Σύστημα οξυγόνωσης πειραματικών δεξαμενών 500lt

Με το συγκεκριμένο σύστημα οξυγόνου υπήρχε η δυνατότητα να οριστούν τα επιθυμητά επίπεδα οξυγόνου από τον πίνακα ελέγχου (Εικ.2) για κάθε δεξαμενή και να

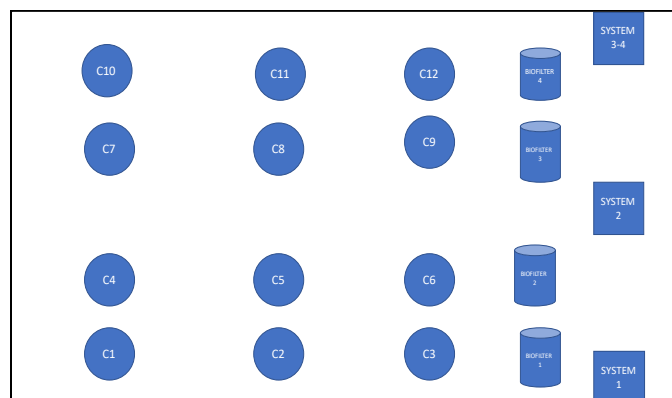
ρυθμίζεται η επιθυμητή πίεση οξυγόνου, οπότε υπήρχε μεγάλη ακρίβεια στα επιθυμητά επίπεδα οξυγόνου.



Εικόνα 4. Πίνακας ελέγχου συστήματος οξυγόνου

Οι προγραμματισμοί, ρυθμίσεις και έλεγχος των μετρήσεων μπορούσαν να γίνουν επίσης μέσω ηλεκτρονικής εφαρμογής.

Στο παρακάτω σχήμα (Σχημ.1) απεικονίζεται η διάταξη των πειραματικών δεξαμενών εκτροφής στα αντίστοιχα κλειστά κυκλώματα, υποστηριζόμενες από το σύστημα οξυγόνωσης.



Σχήμα 5. Πειραματική εγκατάσταση

2.2.3. Θερμοκρασία

Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας 26,5°C, προσπαθώντας σε συνδυασμό με το φωτισμό να υπάρξει προσομοίωση των συνθηκών με το φυσικό περιβάλλον κατά τη διάρκεια της εποχής του καλοκαιριού. Η αρχική θερμοκρασία του νερού ήταν 19°C και η θέρμανση και διατήρηση της θερμοκρασίας επιτεύχθηκε με τη χρήση τεσσάρων μηχανημάτων θέρμανσης (MGC-V5W/D2N1). Τα μηχανήματα είχαν ως σχεδιασμό την θέρμανση κεντρικής δεξαμενής γλυκού νερού και την πορεία αυτού μέσω αντλίας σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες, οι οποίοι ήταν τοποθετημένοι στο κλειστό κύκλωμα εκτροφής. Έτσι με αυτό τον τρόπο το νερό των εκτρεφόμενων ψαριών θερμαινόταν χωρίς να περνάει άμεσα μέσα από κάποιο μηχάνημα θέρμανσης.

Για τον έλεγχο και τη ρύθμιση της θερμοκρασίας υπήρχαν τέσσερις πίνακες ελέγχου (panel), ένα ανά κλειστό κύκλωμα και με τη χρήση ηλεκτροβάνας για υγρά γινόταν η επίτευξη της επιθυμητής θερμοκρασίας.

2.2.4. Φωτισμός

Ο φωτισμός των πειραματικών δεξαμενών έγινε με τη χρήση led φωτισμού για κάθε δεξαμενή. Η διάρκεια φωτισμού ήταν 13 ώρες φως : 11 ώρες σκοτάδι και η ένταση φωτός ήταν ρυθμιζόμενη από ηλεκτρονικό σύστημα και προσομοιωμένη με τη διακύμανση έντασης φωτός κατά τη διάρκεια της καλοκαιρινής περιόδου στο φυσικό περιβάλλον.

2.3. Μέθοδοι ταΐσματος

Οι μέθοδοι ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα ήταν δύο. Ο πρώτος ήταν το τάισμα με το χέρι (hand feeding) και ο δεύτερος ήταν με τη χρήση ταϊστών αυτοχειρισμού (self-feeder). Ο πειραματικός πληθυσμός σιτίστηκε επτά ημέρες την εβδομάδα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

2.3.1. Μέθοδος ταΐσματος με το χέρι

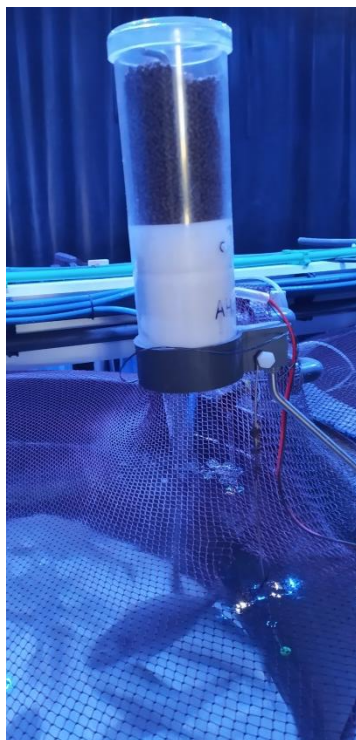
Η μέθοδος ταΐσματος με το χέρι εφαρμόστηκε στις δύο συνθήκες του πειραματικού σχεδιασμού από τις τέσσερις, μία σε επίπεδο οξυγόνου 60-80% και μία για επίπεδο οξυγόνου 40-60%. Το τάισμα έγινε μέχρι κορεσμού της όρεξης των ψαριών (at libitum). Πραγματοποιήθηκαν δύο ταΐσματα ανά ημέρα με ενδιάμεσο κενό τις επτά ώρες. Οι ώρες ταΐσματος ήταν 8:00π.μ. και 15:00μ.μ. Καθημερινά ζυγιζόταν η ποσότητα του κάθε ταΐσματος για την κάθε δεξαμενή.

2.3.2. Μέθοδος ταΐσματος με τη χρήση ταΐστρών αυτοχειρισμού (self-feeder)

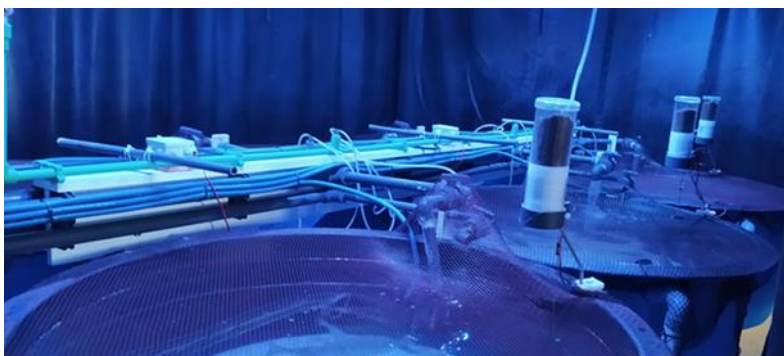
Η μέθοδος ταΐσματος με τη χρήση ταΐστρών αυτοχειρισμού (self-feeder) εφαρμόστηκε στις άλλες δύο συνθήκες του πειραματικού σχεδιασμού από τις τέσσερις, μία σε επίπεδο οξυγόνου 60-80% και μία για επίπεδο οξυγόνου 40-60%. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν έξι ταΐστρες αυτοχειρισμού (self-feeder).

Οι ταΐστρες αυτοχειρισμού (self-feeder) είναι ταΐστρες, όπου τοποθετείται η ποσότητα της τροφής και μέσω ενός κινούμενου μοχλού που υπάρχει βυθισμένος στη στήλη του νερού, τα ψάρια τον κινούν όταν τα ίδια το επιθυμούν και συγκεκριμένη ποσότητα τροφής απελευθερώνεται στη δεξαμενή. Έτσι με αυτό τον τρόπο τα ψάρια καταναλώνουν την ποσότητα που ζητούν από την ταΐστρα, ανάλογα με την ποσότητα των χτυπημάτων και την ώρα που αυτά το επιθυμούν.

Οι ταΐστρες αυτοχειρισμού (self-feeder) κατασκευάστηκαν σε πειραματική κλίμακα και είχαν ως μέγιστη χωρητικότητα 500gr τροφής. Ήταν ηλεκτρικά υποβοηθούμενες έτσι ώστε σε κάθε χτύπημα να μπορεί να ενεργοποιείται ένας περιστρεφόμενος εσωτερικός μηχανισμός και να απελευθερώνεται η τροφή μέσω ειδικής ρυθμιζόμενης εγκοπής. Η ποσότητα τροφής για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ανά ενεργοποίηση ήταν 12 pellet περίπου με μέσο βάρος 0,03gr και μέγεθος 3mm και με σταθερό άνοιγμα παροχής της τροφής καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Οι ταΐστρες συμπληρώνονταν με τροφή όταν ήταν απαραίτητο και καταγραφόταν η ποσότητα.



Εικόνα 5. Ταΐστρα αυτοχειρισμού (self-feeder)

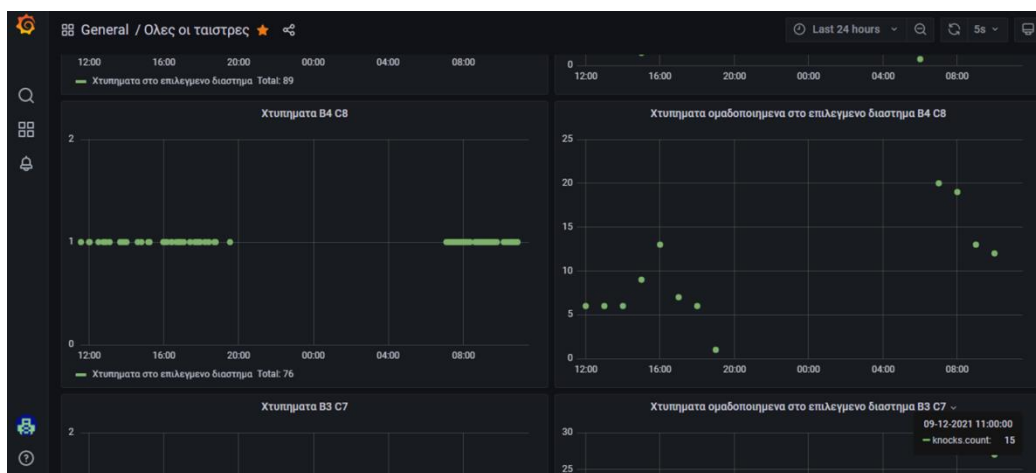


Εικόνα 6. Συνθήκη ταΐσματος με ταΐστρες αυτοχειρισμού

Όλες οι ταΐστρες είχαν ένα κεντρικό ηλεκτρικό πίνακα όπου υπήρχε δυνατότητα ενεργοποίησης και επιλογής χρονοδιακόπτη. Σε αυτή την πειραματική διαδικασία ο χρόνος λειτουργίας ορίστηκε να είναι από τις 6:00π.μ. έως τις 8:00μ.μ. Με αυτό τον

τρόπο αποφεύχθηκε η τυχαία ενεργοποίηση τους κατά τη διάρκεια της νύχτας, λόγω της ενδεχόμενης κίνησης των ψαριών.

Ο αριθμός των ενεργοποιήσεων της κάθε ταΐστρας αναγραφόταν σε ηλεκτρονικό σύστημα παρακολούθησης ανά ώρα για όλη τη διάρκεια της μέρας και συγκεντρώθηκαν στοιχεία για όλη τη διάρκεια του πειράματος.



Εικόνα 7. Ηλεκτρονική καταγραφή και απεικόνιση ενεργοποιήσεων των ταϊστρών

Στην παραπάνω εικόνα (Εικ.7) παρουσιάζεται η ηλεκτρονική καταγραφή και η απεικόνιση του αριθμού και της ώρας των ενεργοποιήσεων των ταϊστρών αυτοχειρισμού.

2.4. Τροφή σίτισης του πειραματικού πληθυσμού

Η τροφή η οποία χρησιμοποιήθηκε για όλες τις συνθήκες της πειραματικής διαδικασίας στα άτομα τσιπούρα *Sparus aurata* ήταν τροφή μεγέθους 3mm (Smart-ΠΙΔΑ Α.Ε.). Τα συστατικά της τροφής ήταν ιχθυάλευρο, γλουτένη αραβοσίτου,

ιχθυέλαιο, σιτάρι, άλευρο ηλιόσπορου, άλευρο σίτου, Δις (Διυδρογονοφωσφορικό) ασβέστιο.

Πίνακας 1. Χημική σύσταση της τροφής Smart 3.0 - ΙΡΙΔΑ Α.Ε.

Χημική σύσταση Smart 3.0 ΙΡΙΔΑ Α.Ε.	
Ολικές αζωτούχες ενώσεις	46%
Ολικές λιπαρές ουσίες	18%
Ολικές ινώδεις ουσίες	1,5%
Ολική τέφρα	10,3%
Υγρασία	8,5%
Φώσφορος	1,33%
Ασβέστιο	2,3%
Νάτριο	0,3%
Ιχνοστοιχεία	
Οξείδιο ψευδαργύρου	81mg
Οξείδιο μαγγανίου	75mg
Θεικός χαλκός	11mg
Ανθρακικός σίδηρος	385mg
Ιωδικό ασβέστιο	7.5mg
Τεχνολογικές πρόσθετες ύλες: κιτρικό οξύ, λεκιθίνη	
Αντιοξειδωτικά BHT, BHA, Γαλλικός προπυλεστέρας	
Πρόσθετες ύλες βιταμινών Α, D ₃ , Ε, C, χλωριούχος χολίνη	

Στον παραπάνω πίνακα (Πιν.1). αναγράφεται αναλυτικά η χημική σύσταση της τροφής Smart 3.0 από την εταιρεία ΙΡΙΔΑ Α.Ε. που χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική εκτροφή.

2.5. Δειγματοληψίες

Οι δειγματοληψίες που περιγράφονται αφορούν την αρχική δειγματοληψία κατά την έναρξη του πειράματος, μία ενδιάμεση δειγματοληψία και την τελική δειγματοληψία κατά τη λήξη της πειραματικής διαδικασίας.

2.5.1. Έναρξη πειράματος

Η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε στις 12-11-2021 με την τοποθέτηση 23 ψαριών σε κάθε δεξαμενή (x12 δεξαμενές). Ο αρχικός πληθυσμός stock αναισθητοποιήθηκε τμηματικά με φαινοξυαιθανόλη 0,25mg/lit και επιλέχθηκαν ψάρια με το επιθυμητό μέσο βάρος 95gr. Μετρήθηκε το ατομικό βάρος και ολικό μήκος (total length) του αρχικών πειραματικών ατόμων τσιπούρας (*Sparus aurata*).

Κρατήθηκαν αρχικά δείγματα ιστών από πέντε άτομα για ιστολογικές αναλύσεις και επτά ολόκληρα άτομα για αναλύσεις σύστασης σώματος.

2.5.2. Ενδιάμεση δειγματοληψία

Η ενδιάμεση δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 13-1-2022, μετά από 59 ημέρες εκτέλεσης της πειραματικής διαδικασίας με σκοπό τη λήψη στοιχείων για παρακολούθηση της αύξησης. Το χρονικό διάστημα των 59 ημερών από τις συνολικά

83 επιλέχθηκε με σκοπό την καλύτερη προσαρμογή των ψαριών στη μέθοδο ταΐσματος με τις ταΐστρες αυτοχειρισμού και την αποφυγή αλλαγής της συμπεριφοράς τους.

Τα ψάρια αναισθητοποιήθηκαν και μεταφέρθηκαν τμηματικά για ζύγιση ατομικού βάρους, χωρίς να αλλάξουν οι συνθήκες οξυγόνου στην οποία βρισκόντουσαν. Έπειτα τα ψάρια επέστρεφαν στην αρχική τους δεξαμενή και συνεχίστηκε η διαδικασία στις συνθήκες όπου βρισκόταν η κάθε δεξαμενή.

2.5.3. Τελική δειγματοληψία

Η τελική δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 7-2-2022, έπειτα από συνολικά 83 ημέρες εκτέλεσης της πειραματικής διαδικασίας. Περιλάμβανε τις εξής διαδικασίες:

- Τη διαδικασία ζύγισης των ατομικών βαρών και μέτρησης του ατομικού ολικού μήκους,
- Τη δειγματοληψία σωματομετρικών χαρακτηριστικών
- Τη δειγματοληψία ιστών για μετέπειτα ιστολογικές αναλύσεις
- Τη δειγματοληψία ολόκληρων ατόμων για μετέπειτα ανάλυση σύστασης σώματος
- Την αιμοληψία για μετέπειτα βιοχημικές αναλύσεις αίματος

2.5.3.1 Διαδικασία ζύγισης – μέτρησης μήκους – Δείκτες αύξησης

Τα ψάρια αναισθητοποιήθηκαν με την ίδια διαδικασία και ζυγίστηκαν ένα προς ένα ανά δεξαμενή και συνθήκη τα ατομικά τους βάρη (gr) και μετρήθηκε το ολικό τους μήκος (cm). Υπολογίστηκε επίσης η συνολική ποσότητα τροφής (gr) που καταναλώθηκε (Total food consumption).

Έπειτα από τη συγκέντρωση όλων αυτών των στοιχείων υπολογίστηκαν ανά δεξαμενή τα παρακάτω στοιχεία με τη χρήση των αντίστοιχων τύπων:

- Βιομάζα = άθροισμα των ατομικών βαρών
- Μέσο βάρος (Mean weight) MW = άθροισμα ατομικών βαρών / αριθμό ατόμων
- Μέσο μήκος (Mean length) = άθροισμα μέσων μηκών / αριθμό ατόμων
- Δείκτης ευρωστίας Kc = 100 x (βάρος ψαριού / μήκος ψαριού³)
- Ημερήσιος ρυθμός κατανάλωσης τροφής (Daily feed consumption)

$$DFC = \text{Συνολική ποσότητα που καταναλώθηκε} * 100 / ((\text{βιομάζα τελική} + \text{βιομάζα αρχική}) * \text{ημέρες κατανάλωσης})$$

- Ειδικός ρυθμός αύξησης (Specific Growth Rate)
- Δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής (Feed Conversion Rate)
- Αύξηση % (Growth %)

$$SGR = [\ln(\text{Τελικό βάρος}) - \ln(\text{Αρχικό βάρος})] * 100 / \text{χρόνο σε ημέρες}$$

$$FCR = (\text{γραμμάρια ξηρής τροφής}) / \text{αύξηση σε υγρό βάρος}$$

$$G\% = (((\text{Μέσο βάρος τελικό} - \text{Μέσο βάρος αρχικό}) / \text{Μέσο βάρος αρχικό}) * 100) / \text{ημέρες ταΐσματος}$$

- Κέρδος βάρους % (Gain weight %)
- Απόδοση τροφής (Feed efficiency)

$$\text{Gain weight \%} = \text{Βάρος που κερδήθηκε} ((\text{Τελική βιομάζα} - \text{Αρχική βιομάζα}) / \text{Αρχική βιομάζα}) * 100$$

$$\text{Feed Efficiency} = \text{Βάρος που κερδήθηκε} (\text{Τελική βιομάζα} - \text{Αρχική βιομάζα}) / \text{Τροφή που καταναλώθηκε}$$

2.5.3.2 Σωματομετρικά χαρακτηριστικά

Κατά τη διάρκεια της τελικής δειγματοληψίας πάρθηκαν δείγματα τριών ψαριών από κάθε δεξαμενή και μετρήθηκε το ατομικό βάρος (gr), ολικό μήκος (cm),

βάρος σπλάχνων (gr), βάρος συκωτιού (gr), βάρος περισπλαχνικού λίπους (gr) και μήκος εντέρου (cm).

Από αυτές τις μετρήσεις υπολογίστηκε ο σπλαγνοσωματικός δείκτης (visceral somatic index), το ποσοστό λίπους % στα σπλάγχνα, ο ηπατοσωματικός δείκτης (hepatosomatic index) και η αναλογία μήκους εντέρου με τους παρακάτω τύπους:

- Ηπατοσωματικός δείκτης (HSI)

$$\text{HSI} = (\text{βάρος ήπατος} / \text{βάρος σώματος}) \times 100$$

- Σπλαγνοσωματικός δείκτης (VSI)

$$\text{VSI} = (\text{βάρος σπλάχνων} / \text{βάρος σώματος}) \times 100$$

- Ποσοστό λίπους στα σπλάγχνα % (Fat %)

$$\text{fat \%} = \text{Ποσότητα λίπους στα σπλάγχνα} / \text{Βάρος ψαριού}$$

- Αναλογία μήκους εντέρου (gut length)

$$\text{gut length} = \text{Μήκος εντέρου} / \text{Μήκος ψαριού}$$

2.6. Μέθοδος ιστολογικής επεξεργασίας

Από κάθε δεξαμενή πάρθηκαν δείγματα ιστών ήπατος, βραγχίων, πρόσθιου-μεσαίου τμήματος εντέρου και οπίσθιου-τελικού εντέρου από τρία ψάρια από κάθε δεξαμενή. Πάρθηκαν οι μετρήσεις βάρους σώματος και ολικού μήκους για τα αντίστοιχα δείγματα. Αποτέλεσαν τα ίδια άτομα δειγμάτων με τα άτομα που υπολογίστηκαν τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά. Οι ιστοί παρελήφθησαν από τα άτομα απευθείας μετά την αναισθητοποίησή τους με ανατομικά εργαλεία και μεταφέρθηκαν σε μπουκαλάκια όγκου 7 ml σε υγρό συντηρητικό διάλυμα φορμόλης

και γλουταραλδεύδης (4F:1G) για τη μονιμοποίησή τους. Τα δείγματα με αυτόν τον τρόπο παρέμειναν και συντηρήθηκαν μέχρι να αρχίσει η διαδικασία επεξεργασίας τους.

Όταν ξεκίνησε η διαδικασία επεξεργασίας των δειγμάτων, αφαιρέθηκε το διάλυμα φορμόλης και τα δείγματα αρχικά ξεπλύθηκαν και ενυδατώθηκαν με απιονισμένο νερό για 1 ώρα. Στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία αφυδάτωσης, η οποία έγινε με σταδιακή μετάβασή τους σε διαλύματα αιθανόλης 70%, 80% και 99,6% για 1 ώρα ανά διάλυμα. Παρέμειναν overnight στο διάλυμα αιθανόλης 99,6%.

Την επόμενη ημέρα ακολούθησε η διαδικασία της σταδιακής μετάβασης σε ρητίνη. Αρχικά τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε μπουκαλάκια με διάλυμα 50% ρητίνης με αιθανόλη (1:1) και μετά από μία ώρα αφαιρέθηκε το υπάρχον διάλυμα και προστέθηκε διάλυμα αυτούσιας ρητίνης (Technovit 7100, Heraus Kulzer). Οι ιστοί παρέμειναν overnight στο διάλυμα ρητίνης ώστε να διεισδύσει η ρητίνη σε όλο το τμήμα του ιστού.

Μετά τη διαδικασία της μονιμοποίησης και της αφυδάτωσης ακολουθεί η διαδικασία της σκλήνωσης, όπου οι ιστοί εγκλείονται σε ειδικές θήκες με ένα σκληρό μέσο που αποτελείται από ρητίνη και σκληρυντικό (Technovit 7100, Kulzer technique), για να μπορέσουν να δημιουργηθούν οι τομές. 24 ώρες μετά τη στερεοποίηση του μίγματος, τοποθετούνται ειδικά πλαστικά μπλοκ για την εφαρμογή κόλλας (Technovit 3040, Kulzer) και την απόσπαση τους ολοκληρωτικά από τις αρχικές θήκες.

Ακολούθησε η διαδικασία κοπής των ιστολογικών τομών με τη χρήση μικροτόμου (RM2245, Leica), στο ίδιο εργαστήριο. Η μικροτόμος περιλαμβάνει βραγχίονα όπου τοποθετείται το μπλοκ με το δείγμα, κινείται με χειροκίνητο μοχλό και με τη βοήθεια μεταλλικής λεπίδας (Technovit Histoblade) δημιουργούνται οι τομές. Το πάχος των τομών ήταν 4mm, οι οποίες στη συνέχεια μεταφέρονταν με λαβίδα σε

θερμαινόμενο λουτρό για να ανοίξουν και να προσκολληθούν στην αντικειμενοφόρο πλάκα (slight). Σε κάθε αντικειμενοφόρο τοποθετήθηκαν 3-5 τομές, ανάλογα με το μέγεθος του μπλοκ που είχε τοποθετηθεί αρχικά ο ιστός. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές έμειναν και στέγνωσαν σε ειδικό στατώ μέχρι την επόμενη ημέρα.

Την επόμενη ημέρα ακολούθησε η διαδικασία της χρώσης των ιστολογικών τομών. Η χρώση γίνεται με σκοπό να χρωματιστούν οι ιστοί για να επιτευχθεί η παρατήρησή τους, διότι αρχικά είναι άχρωμοι. Η επιλογή της κατάλληλης χρώσης βοηθά να γίνουν εμφανείς διάφορες δομές, κυτταρική λειτουργία ή παθολογικά ευρήματα.

Για την συγκεκριμένη ιστολογική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δύο χρώσεις, η μπλε του μεθυλενίου (polychrome I) με σκοπό την ανάδειξη των πυρήνων των κυττάρων και η φουξίνη (polychrome II) για την ανάδειξη του κυτταροπλάσματος. Το διάλυμα Polychrome II αραιώθηκε 1:3.5 για τη διαδικασία χρώσης. Η διαδικασία χρώσης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Bennett, Wyrick, Lee, and McNeil (1976).

Αρχικά έγινε η παρασκευή των συγκεκριμένων διαλυμάτων με τη σύσταση που αναγράφεται στον Πίνακα 2. και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία ψυγείου 4°C.

Πίνακας 2. Σύσταση διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τη χρώση των ιστών

Polychrome I	Polychrome II
0,325gr Μπλε του μεθυλενίου	0,5gr βασική φουξίνη
0,05gr Azure 2	250ml απιονισμένο νερό
25ml γλυκερόλη	
25ml μεθανόλη	
200ml απιονισμένο νερό	

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές ιστών τοποθετήθηκαν σε μία μεταλλική θήκη ανά 25 τεμάχια και εμβάπτιστηκαν στις χρώσεις και εκπλύθηκαν με τη βοήθεια μιας ειδικής βάσης αποτελούμενη από δοχεία εμβάπτισης. Αρχικά οι τομές παρέμειναν στο δοχείο με τη χρώση Polychrome I για 2' και 20'', μεταφέρθηκαν στα επόμενα τρία δοχεία εκπλύσεων με απιονισμένο νερό για 1' την κάθε φορά και έπειτα μεταφέρθηκαν στο δοχείο με Polychrome II για 1'. Επαναλήφθηκε για τρεις φορές η έκπλυση με απιονισμένο νερό και στο τέλος οι επιχρωμένες αντικειμενοφόροι τοποθετήθηκαν σε δίσκους και παρέμειναν στην απαγωγό εστία για 24 ώρες για να στεγνώσουν.

Ακολούθησε η διαδικασία εφαρμογής της καλυπτρίδας με χρήση ειδικής κόλλας. Μετά από τρεις μέρες αφού στέγνωσαν, καθαρίστηκαν τα υπολείμματα κόλλας και έτσι το υλικό ήταν έτοιμο για την παρατήρηση στο μικροσκόπιο και τη λήψη φωτογραφιών.

2.6.1. Παρατήρηση τομών στο μικροσκόπιο και λήψη φωτογραφιών

Για την παρατήρηση των τομών χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο ZEISS Axiolab 5 σε όλες τις μεγεθύνσεις φακών x5, x10, x40 και στην μεγέθυνση x100 χρησιμοποιήθηκε λάδι μικροσκοπίου. Η λήψη φωτογραφιών έγινε με τη βοήθεια προσαρμοσμένης κάμερας Jenoptik Gryphax στο μικροσκόπιο. Το μικροσκόπιο με την ενσωματωμένη κάμερα ήταν συνδεδεμένα σε κεντρικό ηλεκτρονικό υπολογιστή, όπου ήταν εγκατεστημένο το πρόγραμμα Gryphax με τη βοήθεια του οποίου πραγματοποιήθηκαν οι επιθυμητές φωτογραφίες και αποθηκεύτηκαν στον επιθυμητό φάκελο εργασίας.

Για την ιστολογική ανάλυση των δειγμάτων επιλέχθηκαν 3-4 τομές και ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία :

- Για τον προσδιορισμό ποσοστού λίπους στο συκώτι παρελήφθησαν 6 φωτογραφίες από κάθε ψάρι στην x100 μεγέθυνση
- Για την μέτρηση των εντερικών λαχνών στο πρόσθιο και το οπίσθιο έντερο παρελήφθησαν 4 φωτογραφίες στην x5 μεγέθυνση για το κάθε ψάρι και για τους δύο ιστούς αντίστοιχα
- Για τη μέτρηση τους πάχους των δύο στιβάδων, εξωτερικό (external) και εσωτερικό (internal) του τοιχώματος του πρόσθιου και οπίσθιου εντέρου, καθώς επίσης για τη μέτρηση των καλυκοειδών κυττάρων (goblet cells), παρελήφθησαν 2 φωτογραφίες στην x10 μεγέθυνση για κάθε ιστό σε κάθε ψάρι.
- Για τη μέτρηση μήκους των πρωτογενών και δευτερογενών βραγχιακών ελασμάτων παρελήφθησαν 3 φωτογραφίες από κάθε ψάρι στην x40 μεγέθυνση

2.6.2. Ανάλυση εικόνας

Για την ανάλυση εικόνας χρησιμοποιήθηκε το ανοιχτού κώδικα λογισμικό Image J. Χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός τρόπος σε κάθε είδος ιστού, βασισμένος στο σκοπό της μέτρησης. Για την ποσοτικοποίηση της εναπόθεσης λίπους στο ήπαρ εφαρμόστηκε η μέθοδος Papadakis et al. (2009). Συγκεκριμένα υπολογίστηκε η αναλογία της εναπόθεσης λίπους σε έκταση (pixel) σε σχέση με την συνολική επιφάνεια σε pixel της εικόνας. Με τη χρήση δύο εφαρμογών macro και ένα Threshold πραγματοποιήθηκε η διαφοροποίηση του λιπώδους ιστού και η μέτρηση του συγκεκριμένου εμβαδού. Στη συνέχεια τα στοιχεία μεταφέρονταν σε υπολογιστικό φύλλο excel και υπολογιζόταν η ποσοστιαία τιμή.

Η μέτρηση του μήκους των λαχνών των ιστών του πρόσθιου και οπίσθιου εντέρου έγινε με τη βοήθεια συνεχόμενης γραμμής (freehand line) στο image J με χειροκίνητη διαδικασία ακολουθίας της περιμέτρου σε αρχικά ορισμένο τμήμα εντέρου. Τα στοιχεία μεταφέρθηκαν σε υπολογιστικό φύλλο excel και υπολογίστηκε η αναλογία μήκους λαχνών σε μm .

Η μέτρηση της επιφάνειας των βραγχιικών ελασμάτων έγινε μετρώντας στο image j την αναλογία πρωτογενών και δευτερογενών ελασμάτων (οι μετρήσεις στα δευτερογενή ελάσματα ήταν από την μια πλευρά του αντίστοιχου πρωτογενούς ελάσματος). Παράλληλα έγινε οπτική παρατήρηση.

Η μέτρηση των δύο στιβάδων των ιστών του πρόσθιου και οπίσθιου τμήματος του εντέρου έγινε στο image J με τη χρήση χειροκίνητων ευθείων γραμμών αναγράφοντας τα δεδομένα των μετρήσεων σε pixel. Ακολουθούσε η μεταφορά των δεδομένων σε υπολογιστικό φύλλο Excel και ο υπολογισμός σε μm .

Ο αριθμός των καλυκοειδών κυττάρων (goblet cells) πραγματοποιήθηκε σε αρχικά ορισμένο μήκος (pixel) σε τμήμα ιστού εντέρου. Μετρήθηκαν με τη βοήθεια επιλεγμένης εντολής στο image j αριθμημένης μέτρησης. Τα αποτελέσματα μεταφέρθηκαν σε υπολογιστικό φύλλο Excel και υπολογίστηκε η αναλογία καλυκοειδών κυττάρων σε Pixel και υπολογίστηκε η μετατροπή σε μm .

Οι μετατροπή pixel σε μm έγινε βάσει μέτρησης της κλίμακας στο μικροσκόπιο για τις μεγεθύνσεις x5, x10, x40, όπως προκύπτουν από τις αντιστοιχίες του παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3. Αντιστοιχία μm σε pixel

100 μm	Μεγέθυνση στο μικροσκόπιο	Μήκος (pixel)
	x5	208.4 pixel
	x10	424.47 pixel
	x40	1669.23 pixel

2.7. Ανάλυση σύστασης σώματος

Τα δείγματα που πάρθηκαν για την ανάλυση σύστασης σώματος, θανατώθηκαν με υπερδοσολογία αναισθητικού 0,8 mg/lit, και αποθηκεύτηκαν ολόκληρα σε αεροστεγή συσκευασία σε σακουλάκια τροφίμων των ψαριών και διατηρήθηκαν στην κατάψυξη στους -10°C . Τα παγωμένα ψάρια κόπηκαν σε κομμάτια, χρησιμοποιώντας ένα μικρό πριόνι, ώστε να γίνεται ευκολότερη η ομογενοποίησή τους και ομογενοποιήθηκαν σε ομογενοποιητή Grindomix GM200 (Retsch). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς ουροσυλλέκτες όγκου 100ml. Στη συνέχεια έγινε η λυοφιλίωσή τους σε λυοφιλιοποιητή (Telstar Cryodos) στους -50°C με -80°C σε κενό για 3 ημέρες (με τη χρήση αντλίας αέρα Varian DS 102). Μετά τη λυοφιλίωση τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν ξανά, με τη χρήση ομογενοποιητή Grindomix GM00, ώστε να γίνουν σχεδόν σκόνη. Από αυτά τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν οι διαδικασίες αναλύσεων για τον προσδιορισμό ποσοστού ολικής ξηρής ουσίας, λίπους, πρωτεΐνης, τέφρας και ενέργειας.

Για τον προσδιορισμό της ολικής ξηρής ουσίας του υγρού δείγματος για κάθε ψάρι, έγινε λήψη ενός μικρού ομογενοποιημένου δείγματος πριν τη λυοφιλίωση.

2.7.1. Μέτρηση ολικής ξηρής ουσίας

Για να υπολογιστεί το ποσοστό της ολικής ξηρής ουσίας, μετρήθηκε αρχικά η υγρασία. Για τη μέτρηση της υγρασίας χρησιμοποιήθηκαν:

Πορσελάνινα κυπελάκια, κλίβανος ξήρανσης (Termarks Series TS 8000) και ζυγαριά ακριβείας (KERN ABJ 220-4M).

Οι πορσελάνες επωάστηκαν στους 90°C για μια ώρα ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία και ζυγίστηκαν. Κατόπιν προστέθηκε περίπου 0,1 g δείγμα υγρού ομογενοποιημένου σώματος και τοποθετήθηκαν στους 90°C για 4 ώρες (Εικόνα 9). Μετά το πέρας των 4 ωρών ζυγίζονταν ανά 20 λεπτά μέχρι το βάρος να παραμείνει σταθερό ή να αρχίσει να αυξάνεται. Η υγρασία στο δείγμα υπολογίστηκε από τον παρακάτω τύπο:

Υγρασία (%) = $[(B-\Gamma) / (B-A)] \times 100$ όπου:

A = βάρος πορσελάνης

B = βάρος πορσελάνης μαζί με το δείγμα

Γ = βάρος πορσελάνης μαζί με το δείγμα μετά την απομάκρυνση της υγρασίας (AOAC 1991)

Ολική ξηρή ουσία % = 100 % - Υγρασία %

2.7.2. Μέτρηση τέφρας

Για τη μέτρηση τέφρας χρησιμοποιήθηκαν πορσελάνινα κυπελάκια, κλίβανος (Heraeus M110, Heraeus Instruments), ζυγαριά ακριβείας (KERN ABJ 220-4M)

Οι πορσελάνες επωάστηκαν στους 90°C για μια ώρα ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία και ζυγίστηκαν. Έπειτα προστέθηκε περίπου 1g δείγμα και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 700°C για 7 ώρες. Μετά τη διάρκεια των 7 ωρών ο κλίβανος έμεινε

κλειστός μέχρι την επόμενη μέρα ώστε να κρυώσει. Την επόμενη μέρα οι πορσελάνες ζυγίστηκαν. Η τέφρα του δείγματος υπολογίστηκε από τον παρακάτω τύπο:

Τέφρα (%) = $[(\Gamma - A) / (B - A)] \times 100$ όπου:

A = βάρος πορσελάνης

B = βάρος πορσελάνης μαζί με το δείγμα

Γ = βάρος πορσελάνης μαζί με την τέφρα (AOAC 1991)

2.7.3. Μέτρηση λίπους

Για τη μέτρηση λίπους χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες Pasteur και γυάλινες πιπέττες των 25 ml με πουάρ, σωλήνες φυγοκέντρησης 50 ml (falcon tubes), φίλτρα whatman νούμερο 1 (Διαμέτρου 90 mm και 11 μm διάμετρος πόρου) και νούμερο 4 (διαμέτρου 125 mm και 20-25 μm διάμετρο πόρου), φιάλη διήθησης και φίλτρο Buchner Απαγωγός (Virkus LABCO), ζυγαριά ακριβείας (KERN ABJ 220-4M), αναδευτήρας δονητικής ανάδευσης (Vortex Heidolph Reax top), αντλία διήθησης (Diaphragm Vacuum Pump, Vacuubrand GmbH + CO KG), φυγόκετρος (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments/Germany), περιστροφικός εξατμιστήρας (Heidolph LABOROTA 4000) με ενσωματωμένο ψύκτη (Julabo F32), φλάσκες για τον περιστροφικό εξατμιστήρα, φιάλη αερίου αζώτου, γυάλινο χωνί, χλωροφόρμιο, μεθανόλη, βουτυλοϋδροξυτολουόλιο (BHT - 2,5-di-tert-butyl-p-Cresol) και ένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο ($\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Τα λιπίδια απομονώθηκαν με τη μέθοδο εκχύλισης Folch τροποποιημένη (Folch et al. 1957).

Ζυγίστηκε περίπου 1g δείγματος και τοποθετήθηκε σε σωλήνες φυγοκέντρησης. Προστέθηκε διάλυμα χλωροφορμίου – μεθανόλης – BHT (χλωροφόρμιο: μεθανόλη = 2:1 + 0,01% w/v BHT) σε αναλογία 15:1 (διαλύτης: δείγμα). Στη συνέχεια αναδεύτηκε

και παρέμεινε στους 4°C για 30 λεπτά ώστε να γίνει η εκχύλιση. Με τη χρήση αντλίας έγινε η διήθηση σε φίλτρο whatman νούμερο 1, τοποθετημένο μέσα σε φίλτρο Buchner και ξεπλύθηκε με χλωροφόρμιο ώστε να επιτευχθεί ανάκτηση της υγρής φάσης που περιέχει τα λιπίδια. Το ακατέργαστο εκχύλισμα περιέχει το σύνολο των λιπιδίων (crude extract) αλλά και μη λιπιδικές επιμολύνσεις (non-lipid contaminants). Για την απομάκρυνση των μη λιπιδικών επιμολύνσεων ακολουθήθηκε πλύση με 0.2 v/v υδατικό διάλυμα 0,017% w/v Cl_2Mg , ανάδευση και προσθήκη αερίου αζώτου ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπιδίων. Με αυτό τον τρόπο δημιουργήθηκαν 2 φάσεις. Στην επάνω υδατική φάση βρίσκονταν οι μη λιπιδικές επιμολύνσεις και στην κάτω φάση το χλωροφόρμιο με τα λιπίδια. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (2.000 rpm για 10 λεπτά) επιτεύχθηκε ο πλήρης διαχωρισμός των δυο φάσεων. Μετά τη φυγοκέντρηση, προστέθηκε με πιπέτα Pasteur διάλυμα χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού (3:48:47 v/v/v) ώστε να διασφαλιστεί η πλήρης αφαίρεση των λιπιδίων από την πάνω φάση. Αφαιρέθηκε η πάνω φάση με πιπέτα Pasteur, προστέθηκε ξανά το διάλυμα χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού και αφαιρέθηκε η πάνω φάση που είχε δημιουργηθεί. Οι φλάσκες του περιστροφικού εξατμιστήρα ζυγίστηκαν και χρησιμοποιώντας ένα γυάλινο χωνί κι ένα φίλτρο whatman νούμερο 4, τα περιεχόμενα των σωλήνων φυγοκέντρησης μεταφέρθηκαν μέσα στην κάθε φλάσκα. Έπειτα οι φλάσκες τοποθετήθηκαν στον περιστροφικό εξατμιστήρα (στους 40°C στις 30 rpm) και ακολουθήθηκε η εξάτμιση του μίγματος διαλυτών για την απομόνωση των λιπιδίων.

Όταν ολοκληρώθηκε η διαδικασία της εξάτμισης, οι φλάσκες ζυγίστηκαν, και αφού περάσανε κάτω από συνεχή ροή αερίου αζώτου, ζυγίστηκαν ξανά. Η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου το βάρος της φλάσκας παρέμεινε σταθερό ή άρχισε να αυξάνεται. Το λίπος στο δείγμα υπολογίστηκε από τον παρακάτω τύπο:

Λίπος (%) = $[(\Gamma - B) / A] \times 100$ όπου:

A = βάρος δείγματος

B = βάρος άδειας φλάσκας

Γ = βάρος φλάσκας μαζί με το λίπος

2.7.4. Μέτρηση πρωτεΐνης

Για τη μέτρηση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα του αναλυτή αζώτου (Leco FP-528). Χρησιμοποιήθηκαν φύλλα αλουμινίου που δεν περιέχουν άζωτο, άλευρο σόγιας, φιάλη ηλίου (He), φιάλη οξυγόνου (O₂), φιάλη συμπιεσμένου αέρα, ζυγαριά ακριβείας (KERN ABJ 220-4M) και ηλεκτρονικός υπολογιστής.

Η μέθοδος όπου έγινε η διαδικασία μέτρησης της πρωτεΐνης βασίζεται στη μέθοδο Dumas, κατά την οποία τα δείγματα καίγονται σε υψηλές θερμοκρασίες (700-1.000°C) με είσοδο καθαρού οξυγόνου. Όλες οι οργανικές ενώσεις στο δείγμα μετατρέπονται με την καύση σε CO₂. Τα συστατικά που παράγονται από την καύση περιλαμβάνουν επίσης N₂ και οξείδια του αζώτου. Τα οξείδια του αζώτου ανάγονται σε άζωτο (N₂) σε μια στήλη χαλκού σε θερμοκρασία 600°C. Το συνολικό άζωτο συμπεριλαμβανομένων των νιτρικών και νιτρωδών αλάτων μεταφέρεται με αέριο ήλιο και ποσοτικοποιείται μέσω ενός αέριου χρωματογράφου που βρίσκεται μέσα στον αναλυτή αζώτου. Η βαθμονόμηση του αναλυτή αζώτου γίνεται με άλευρο σόγιας που έχει συγκεκριμένο ποσοστό αζώτου. Οι περισσότερες πρωτεΐνες περιέχουν 16% αζώτου, έτσι το ολικό άζωτο μετατρέπεται σε ποσοστό πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας το συντελεστή μετατροπής 6,25 (100/16 = 6,25) (Chang 2010).

Ζυγίστηκαν περίπου 0,1g δείγματος και τοποθετήθηκαν σε αλουμινένιο φύλλο. Στη συνέχεια το φύλλο έγινε σφαιρίδιο και τοποθετήθηκε μέσα στον αναλυτή αζώτου.

Ο αναλυτής αζώτου μέτρησε mg N₂ και τα μετέτρεψε σε ποσοστό αζώτου στο δείγμα και πολλαπλασιάζοντας το ποσοστό αζώτου με 6,25 υπολογίστηκε το ποσοστό πρωτεΐνης.

2.7.5 Μέτρηση ενέργειας

Ο υπολογισμός της ενέργειας της ξηρής ουσίας έγινε με τη χρήση τύπων. Εφόσον υπολογίστηκε το λίπος, η πρωτεΐνη και η τέφρα υπολογίστηκαν οι ελεύθερες αζώτου εκχυλισματικές ουσίες (NFE) και έπειτα η ενέργεια, σύμφωνα με τους Martinez-Llorens et al. (2012).

$$\text{NFE (\%)} = 100 - \% \text{ πρωτεΐνης} - \% \text{ λίπους} - \% \text{ τέφρας}$$

$$\text{Ενέργεια (MJ/kg)} = (23,9 * \% \text{ πρωτεΐνης} + 39,8 * \% \text{ λίπους} + 17 * \% \text{ NFE}) / 100$$

2.8 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Τα δεδομένα για όλα τα αποτελέσματα για όλες τις διαδικασίες επεξεργάστηκαν σε Microsoft excel, 2010. Ακολούθησε η εισαγωγή διαγραμμάτων και στη συνέχεια τα δεδομένα μεταφέρθηκαν στο πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Sigma stat 3, όπου έγινε η σύγκριση δεδομένων. Χρησιμοποιήθηκε η Two Way Anova Analysis, λόγω του ότι στην πειραματική διαδικασία οι παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν δύο: ο παράγοντας “μέθοδος ταΐσματος” και ο παράγοντας “οξυγόνο”. Για την ανάδειξη των στατιστικών διαφορών χρησιμοποιήθηκε το Tukey Test και το επίπεδο σημαντικότητας που επιλέχθηκε ήταν πάνω από 95% (P<0.05)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Αποτελέσματα πειράματος αύξησης-Δείκτες

Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις μετά την τελική δειγματοληψία και οι δείκτες αύξησης.

Πίνακας 4. Αποτελέσματα μετρήσεων πειράματος αύξησης-Δείκτες

Μέθοδος ταΐσματος	Τάισμα με χέρι	Ταΐστρες αυτοχειρισμού	Τάισμα με χέρι	Ταΐστρες αυτοχειρισμού
Επίπεδο οξυγόνου	60-80%	60-80%	40-60%	40-60%
Αρχικό βάρος (g)	95,60 ± 0,44	97,00 ± 0,75	97,47 ± 0,40	97,77 ± 0,45
Αρχικό μήκος	18,17±0,08	18,18±0,07	18,39±0,14	18,37±0,03
Τελικό βάρος (g)	298,7 ± 0,94*	300,4 ± 12,05*	269,5 ± 10,21	266,6 ± 12,21
Τελικό μήκος	25,45±0,08*	25,39±0,38*	24,8±0,57	24,9±0,29
Δείκτης ευρωστίας (Kc)	1,81±0,18*	1,84 ± 0,26*	1,75 ± 0,14	1,75 ± 0,16
Συνολική ποσότητα τροφής (g)	6012,66±98,67*	6262,077±561.9*	5050,57±361,55	4578,81±308,13
Κέρδος βάρους	4671,73±24,42*	4678,67±291,74*	3957,48±243,72	3882.39±271,47
Συντελεστής μετατρεψιμότητας (FCR)	1,29±0,02*	1,34±0,06*	1,28±0,07 ^a	1,18±0,01 ^b
Ειδικός ρυθμός αύξησης (SGR)	1,37±0,01*	1,36±0,06*	1,22±0,05	1,21±0,05
Απόδοση τροφής (feed efficiency)	0,78±0,01*	0,75±0,03*	0,78±0,04 ^{a*}	0,85±0,01 ^b
Ποσότητα τροφής% (DFC)	1,6±0,03*	1,65±0,11*	1,43±0,06	1,31±0,06
Αύξηση% (G%)	2,56±0,02*	2,53±0,17*	2,13±0,14	2,08±0,14
Κέρδος βάρους% (gain weighth)	212,44±1,82*	209,77±14,44*	176,53±11,59	172,59±11,35

Παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.001$) στην αύξηση των ψαριών ως προς το τελικό τους βάρος, το δείκτη ευρωστίας, την κατανάλωση τροφής, τον ειδικό ρυθμό αύξησης (SGR), το ποσοστό αύξησης (G%), το κέρδος βάρους (gain weight) στα δύο διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου και στις δύο μεθοδολογίες ταΐσματος, παρουσιάζοντας θετική επίδραση στο επίπεδο οξυγόνου 60-80%.

Επίσης παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.013$) στο συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής (FCR) και την απόδοση της τροφής (feed efficiency) ($p=0.009$) μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων οξυγόνου 60-80% και 40-60% (ως προς τον παράγοντα οξυγόνου στο σύνολο των τιμών και για τις δύο μεθόδους ταΐσματος) με θετικά αποτελέσματα στο επίπεδο οξυγόνου 60-80%.

Αναλυτικότερα υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.003$) στο FCR μεταξύ των δύο επιπέδων οξυγόνου όταν τα ψάρια σιτίστηκαν με τις ταΐστρες αυτοχειρισμού, παρουσιάζοντας καλύτερα αποτελέσματα με τις ταΐστρες αυτοχειρισμού, ενώ δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.791$) όταν τα ψάρια σιτίστηκαν με το χέρι. Παράλληλα η απόδοση της τροφής παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.002$) μεταξύ των δύο επιπέδων οξυγόνου όταν τα ψάρια σιτίστηκαν με ταΐστρες αυτοχειρισμού, ενώ δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά όταν τα ψάρια σιτίστηκαν με το χέρι ($p=0.737$).

Υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στο FCR ($p=0.024$) στην αλληλεπίδραση δύο παραγόντων (μέθοδος ταΐσματος και επίπεδο οξυγόνου) και στην απόδοση τροφής ($p=0.018$). Η μέθοδος ταΐσματος ως παράγοντας, και στις δυο συνθήκες οξυγόνου δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά στην αύξηση των ψαριών (ως σύνολο τιμών). Συγκεκριμένα όμως παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.032$) στη μετατρεψιμότητα της τροφής (FCR) με τη μέθοδο ταΐσματος με ταΐστρες αυτοχειρισμού στο χαμηλό επίπεδο οξυγόνου 40-60%, παρουσιάζοντας καλύτερη μετατρεψιμότητα τροφής με τα self feeder, ενώ δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.216$) στο FCR με τη χρήση μεθόδου ταΐσματος με το χέρι στο επίπεδο οξυγόνου 60-80%. Επίσης η απόδοση τροφής παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.020$) με τη μέθοδο ταΐσματος με ταΐστρες

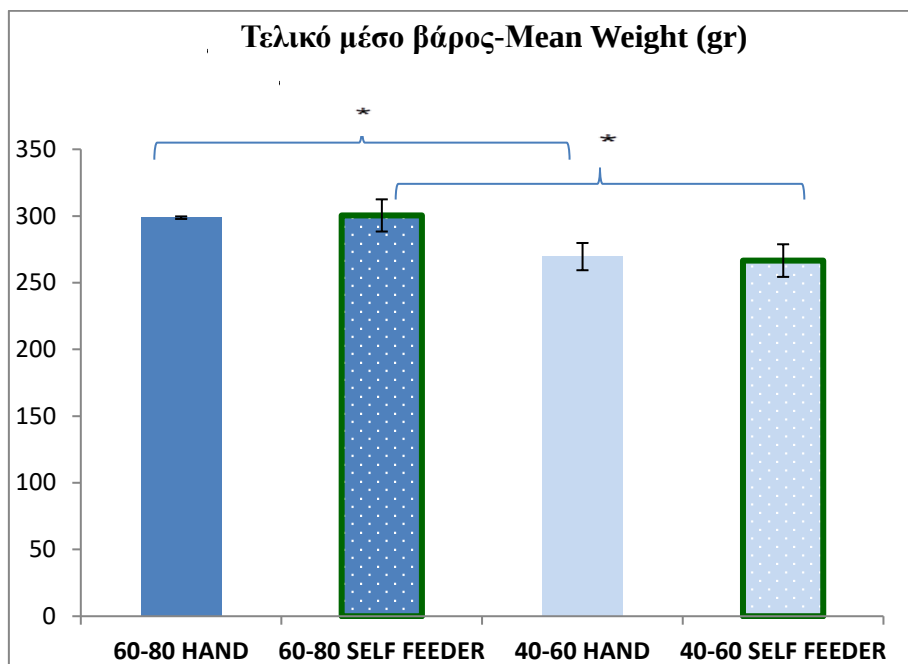
αυτοχειρισμού στο χαμηλό επίπεδο οξυγόνου 40-60%, παρουσιάζοντας καλύτερα αποτελέσματα με τις ταΐστρες αυτοχειρισμού ενώ δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.227$) όταν τα ψάρια σιτίστηκαν με το χέρι.

Στην παρούσα μελέτη εμφανίστηκε ξεκάθαρη διαφοροποίηση των παραγωγικών δεικτών σε σχέση με το επίπεδο του O_2 . Τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με τους Araújo-Luna *et al.* (2018), οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση διαφορετικών επιπέδων οξυγόνου 40-60%, 60-80%, 80-100% με διαφορετικές ιχθυοπυκνότητες 5, 10 και 20 Kg/m^3 αντίστοιχα. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι δεν παρατηρήθηκε σχέση μεταξύ της πυκνότητας και της φυσιολογίας των ψαριών και ο SGR (Specific Growth Rate, ειδικός ρυθμός αύξησης) παρουσίασε αύξηση με την αύξηση των επιπέδων O_2 , ενώ παρουσιάστηκε μείωση του FCR (Feed conversion ratio, δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής) με τη μείωση των επιπέδων οξυγόνου.

Επιπρόσθετα οι Martos-Sitcha *et al.* (2017) απέδειξαν σε μελέτη ότι η τσιπούρα είναι ευρυοξικό ψάρι και ότι αυτό βασίζεται στην ικανότητα του μιτοχονδριακού μηχανισμού να αναπροσαρμόζεται για να αντιμετωπίσει το μειωμένο μεταβολικό ρυθμό. Επίσης στους 28 °C η τσιπούρα έχει την ικανότητα να διαχειριστεί τη χαμηλότερη κατανάλωση του οξυγόνου και να επιδώσει μεγαλύτερη αύξηση λόγω αυξημένου μεταβολισμού, αλλά αυτό απαιτεί μεγαλύτερο οικονομικό κόστος (Requena, A., *et al.*, 1997).

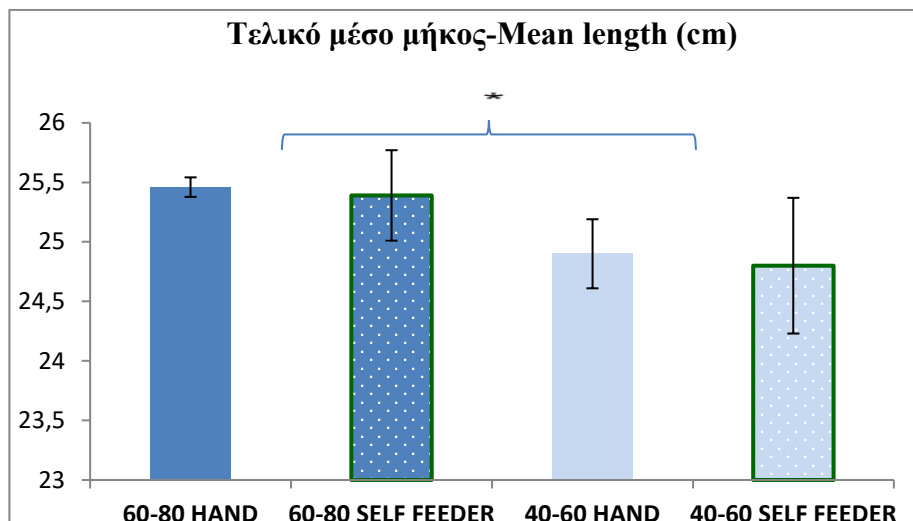
Σε πρόσφατη μελέτη αποδείχτηκε ότι η τσιπούρα παρουσίασε μειωμένη ανάπτυξη και υψηλότερη λειτουργία αναερόβιου μεταβολισμού σε επίπεδα 40% O_2 σε σύγκριση με το 80% ενώ παράλληλα φάνηκε να είναι πιο ανθεκτική σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου στους βιοχημικούς δείκτες σε σύγκριση με το λαβράκι (Samaras *et al.*, 2022).

Ο Kilpatrick (1991) απέδειξε ότι το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) είχε μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης με τη χρήση των self-feeder από ότι όταν ταΐζονταν με το χέρι, όπου τα αποτελέσματα αυτά είναι σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της τσιπούρας στην παρούσα μελέτη.



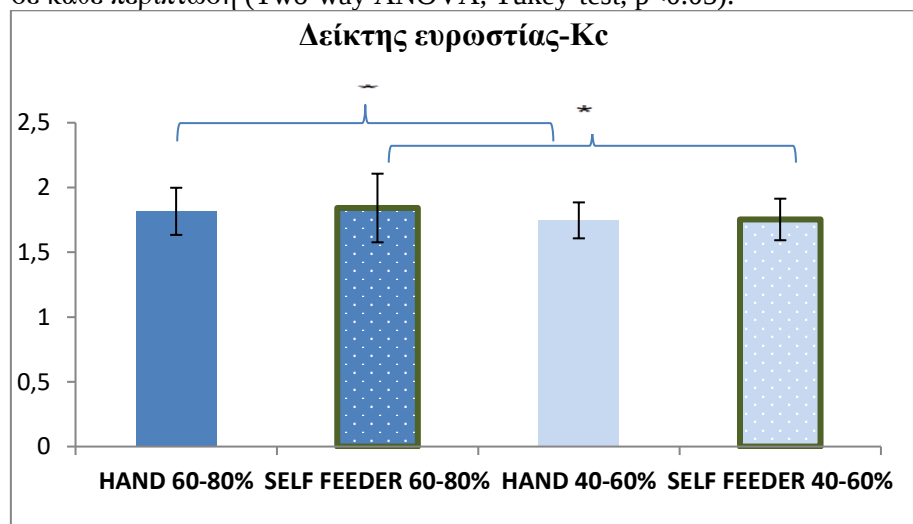
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.915, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P<0.001
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.697, μη σημαντικό

Σχήμα 6. Παρουσιάζεται η διακύμανση του Μέσου βάρους σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπεδο O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



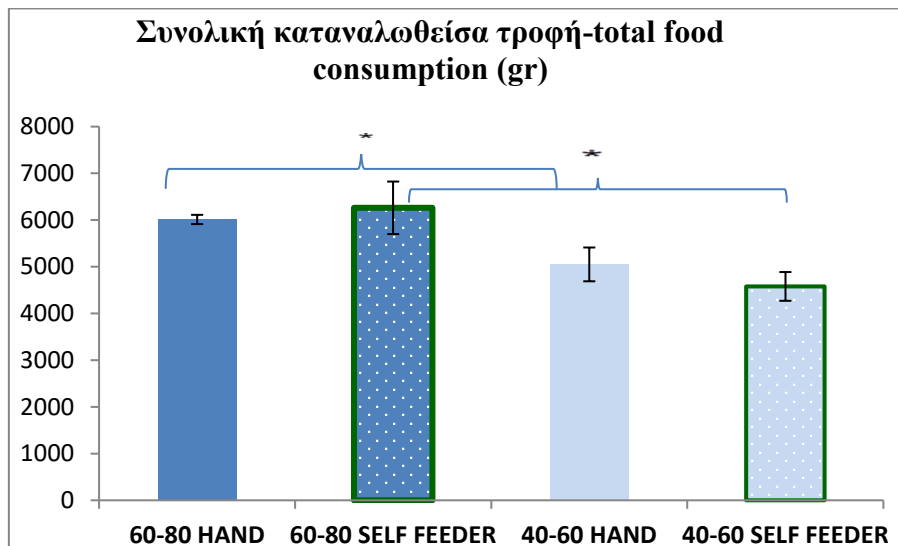
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.706, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P=0,029
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.931, μη σημαντικό

Σχήμα 7. Παρουσιάζεται η διακύμανση του Μέσου μήκους σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπεδο O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



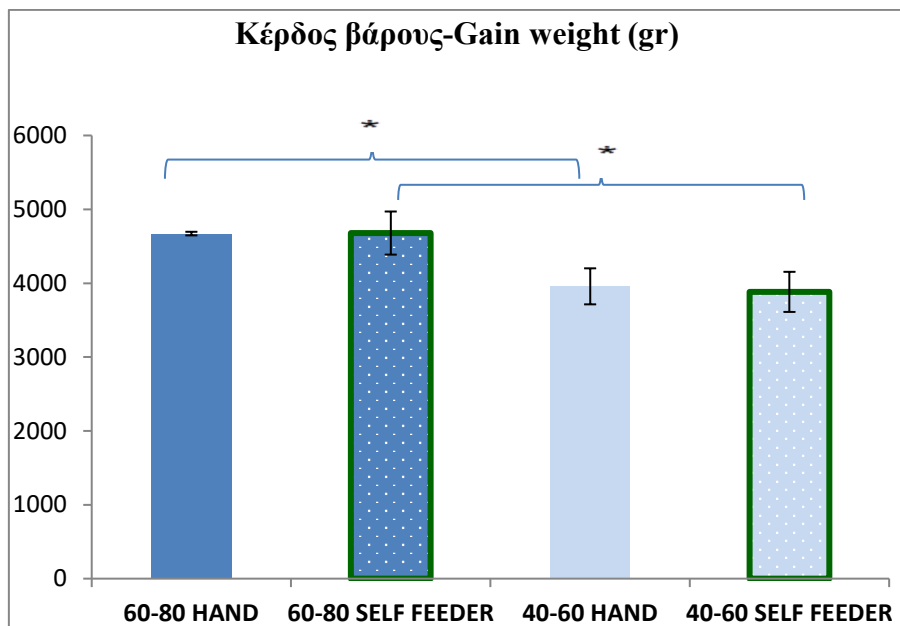
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.479, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P<0,001
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0,686, μη σημαντικό

Σχήμα 8. Παρουσιάζεται η διακύμανση του δείκτη ευρωστίας (Kc) σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπεδο O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



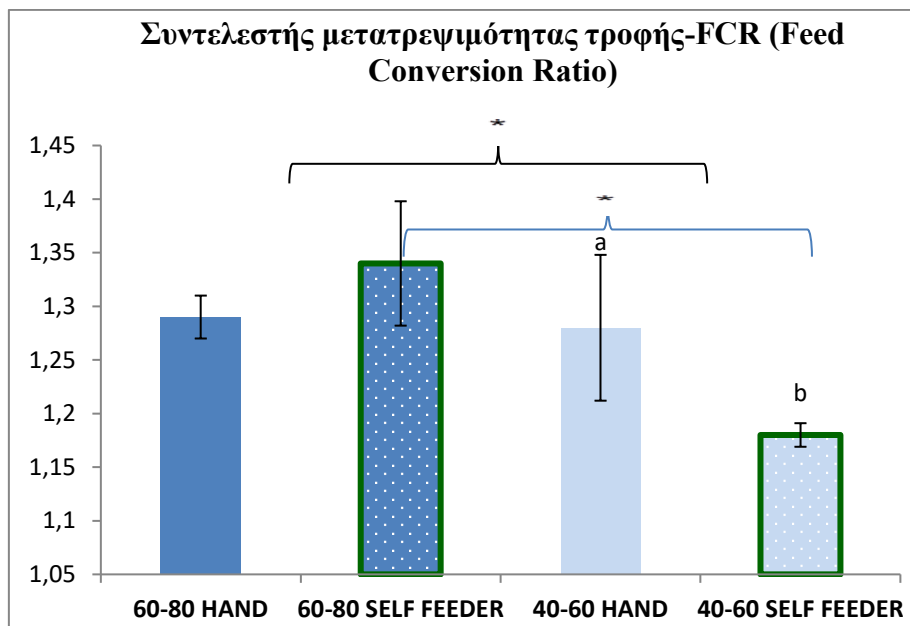
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.618, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P<0.001
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.131, μη σημαντικό

Σχήμα 9. Παρουσιάζεται η διακύμανση της συνολικής ποσότητας τροφής που καταναλώθηκε σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπεδο O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



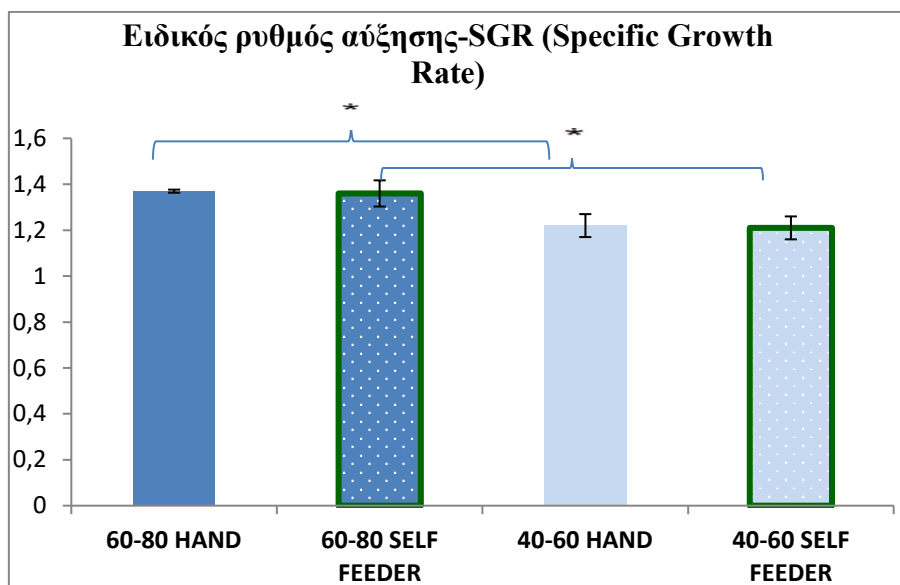
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.807, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P<0.001
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.769, μη σημαντικό

Σχήμα 10. Παρουσιάζεται η διακύμανση του Βάρους που κερδήθηκε σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπεδο O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



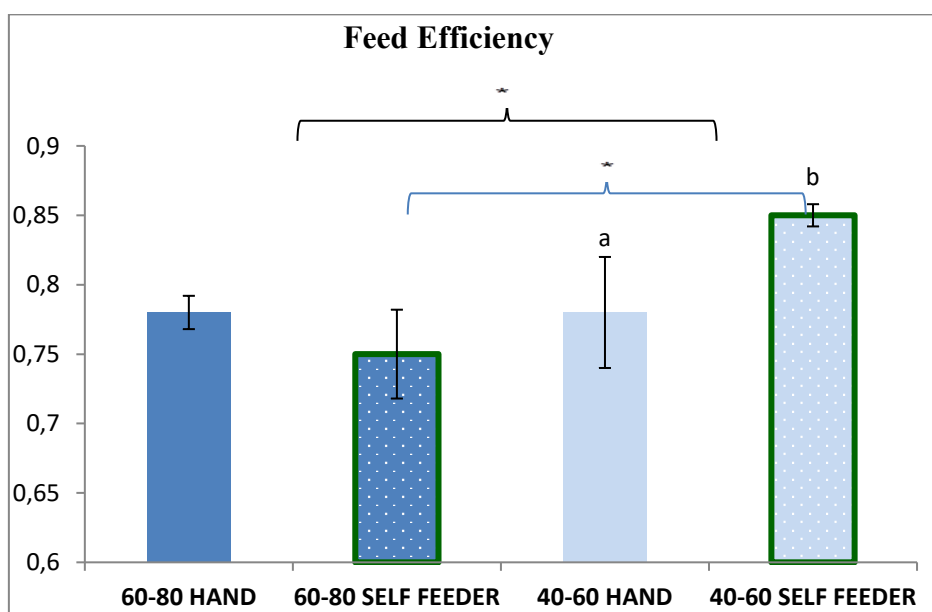
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταισίματος	P=0.403, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.013
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.024

Σχήμα 11. Παρουσιάζεται η διακύμανση του Συντελεστή μετατροπής της τροφής FCR (Feed Conversion Ratio) σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταισίματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπεδο O₂ για κάθε μεθοδολογία ταισίματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



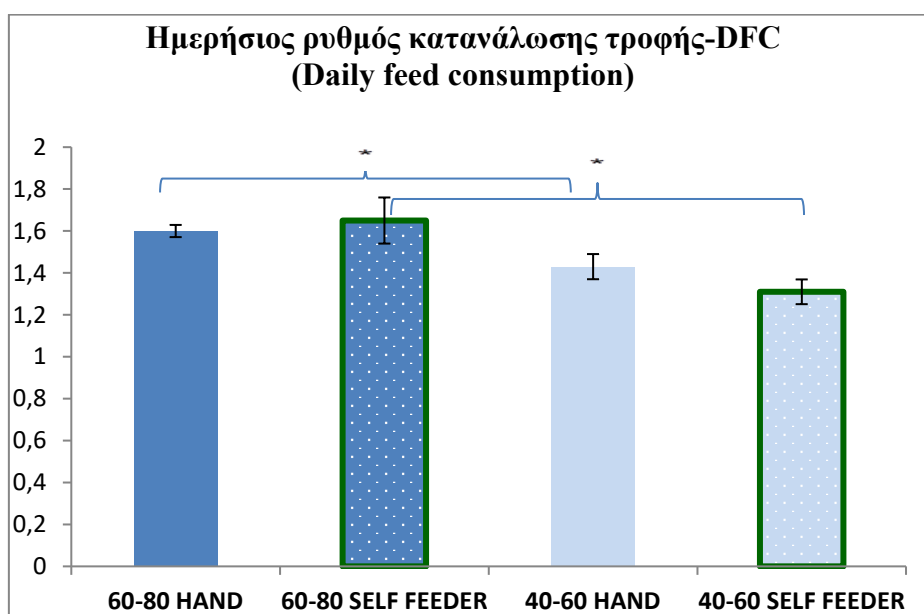
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος τείσματος	P=0.600, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P<0.001
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.912, μη σημαντικό

Σχήμα 12. Παρουσιάζεται η διακύμανση του Ειδικού Ρυθμού Αύξησης SGR (Specific Growth Rate) σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία τείσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπεδο O₂ για κάθε μεθοδολογία τείσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



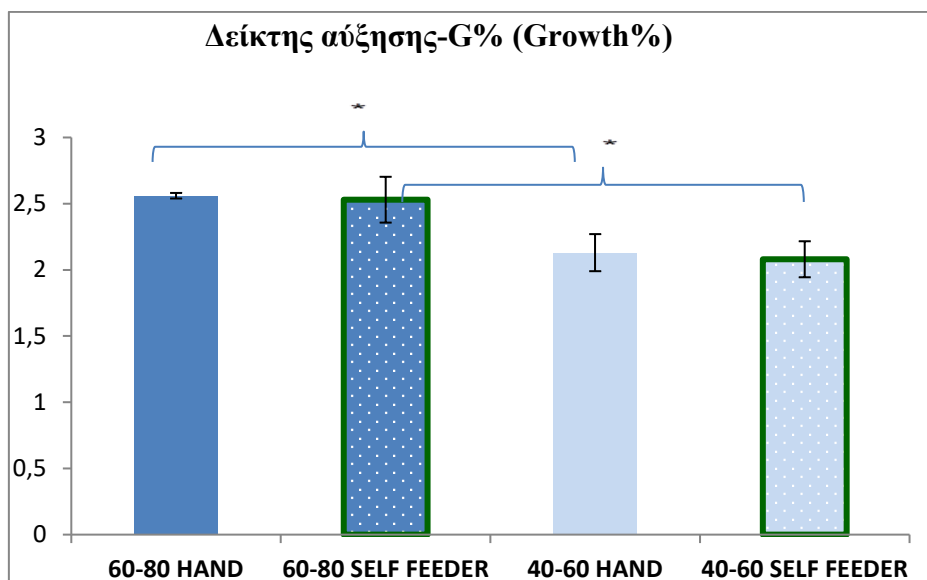
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.292, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.009
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.018

Σχήμα 13. Παρουσιάζεται η διακύμανση του Δείκτη απόδοσης της τροφής (Feed Efficiency) σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπεδο O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



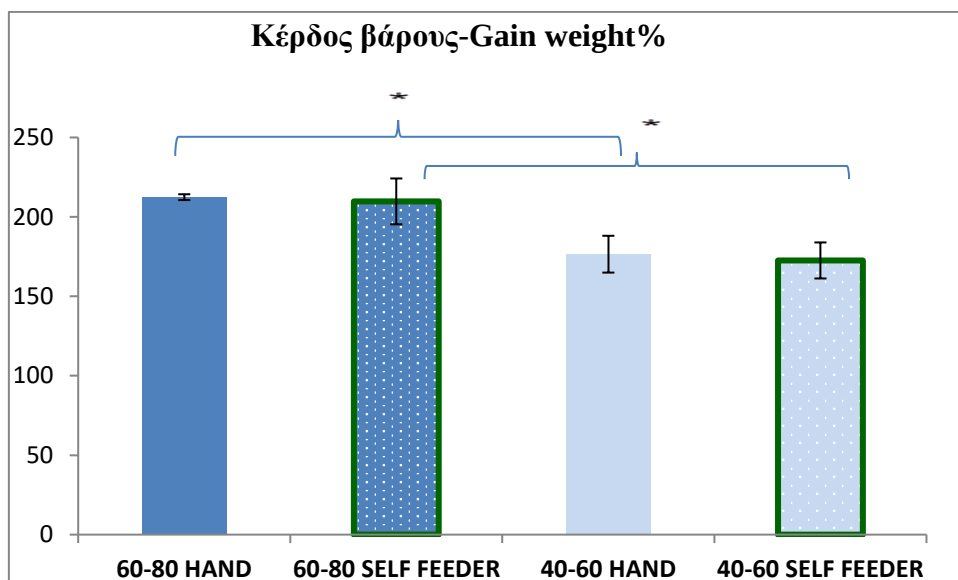
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.419, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P<0.001
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.065, μη σημαντικό

Σχήμα 14. Παρουσιάζεται η διακύμανση του Κατανάλωσης τροφής ανά ημέρα (Daily feed consumption) σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπεδο O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.609, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P<0.001
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.923, μη σημαντικό

Σχήμα 15. Παρουσιάζεται η διακύμανση του ποσοστού αύξησης (Growth%) σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.614, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P<0.001
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.922, μη σημαντικό

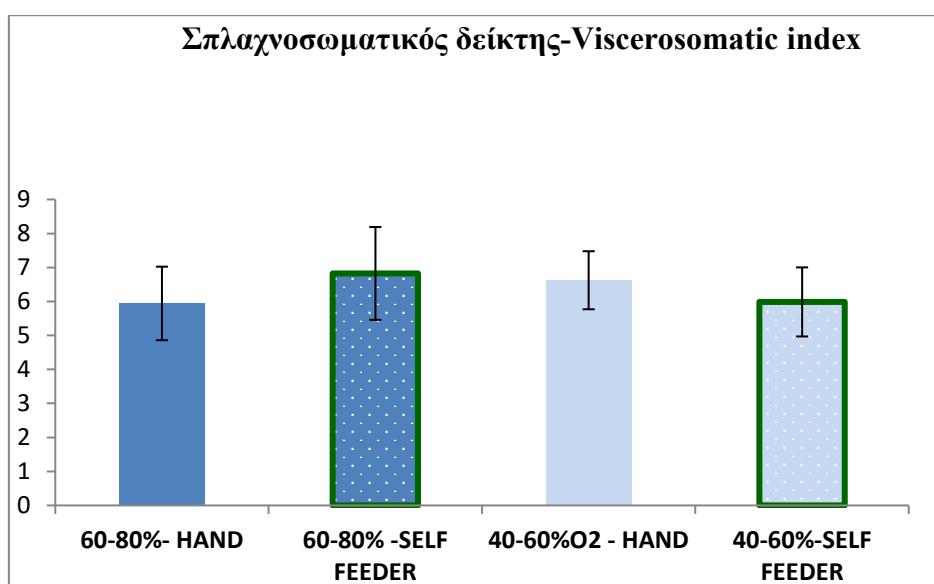
Σχήμα 16. Παρουσιάζεται η διακύμανση του ποσοστού βάρους που κερδήθηκε (Gain weight %) σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπεδο O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).

3.2. Αποτελέσματα σωματομετρικών χαρακτηριστικών

Στον παρακάτω πίνακα (πιν.5) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τους δείκτες στα σωματομετρικά χαρακτηριστικά της τσιπούρας με δύο διαφορετικές μεθόδους ταΐσματος σε δύο διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου.

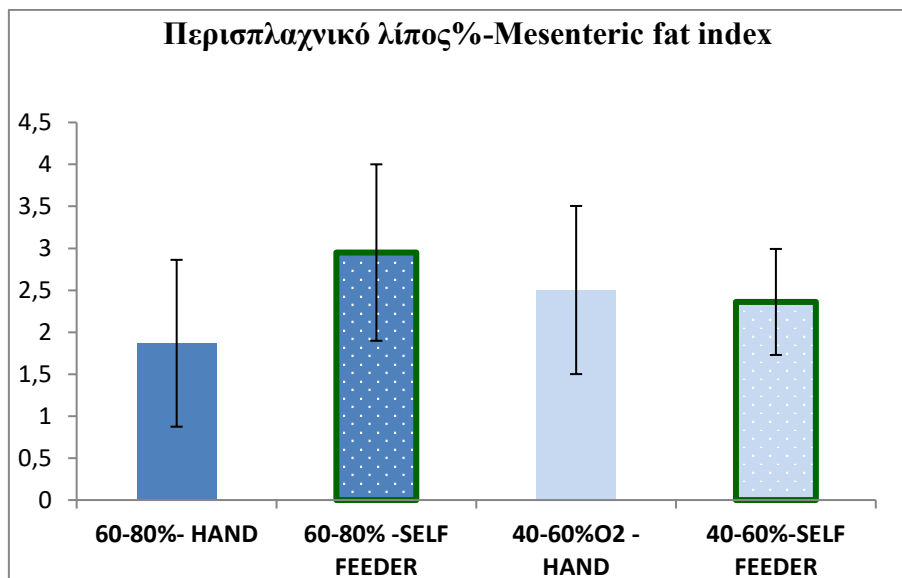
Πίνακας 5. Αποτελέσματα σωματομετρικών χαρακτηριστικών

Μέθοδος ταΐσματος	Τάισμα με χέρι	Ταΐστρες αυτοχειρισμού	Τάισμα με χέρι	Ταΐστρες αυτοχειρισμού
Επίπεδο οξυγόνου	60-80%	60-80%	40-60%	40-60%
Σπλαγνοσωματικός δείκτης (VSI)	5,94±1,08	6,82±1,36	6,62±0,85	5,99±1,01
Περισπλαχνικό λίπος %	1,87±0,99	2,95±1,05	2,50±1,00	2,50±1,00
Ηπατοσωματικός δείκτης (HSI)	1,03±0,16	1,22±0,20	1,07±0,18	1,07±0,18
Μήκος εντέρου (gut length)	1,64±0,22*	1,71±0,28*	1,36±0,30	1,25±0,33



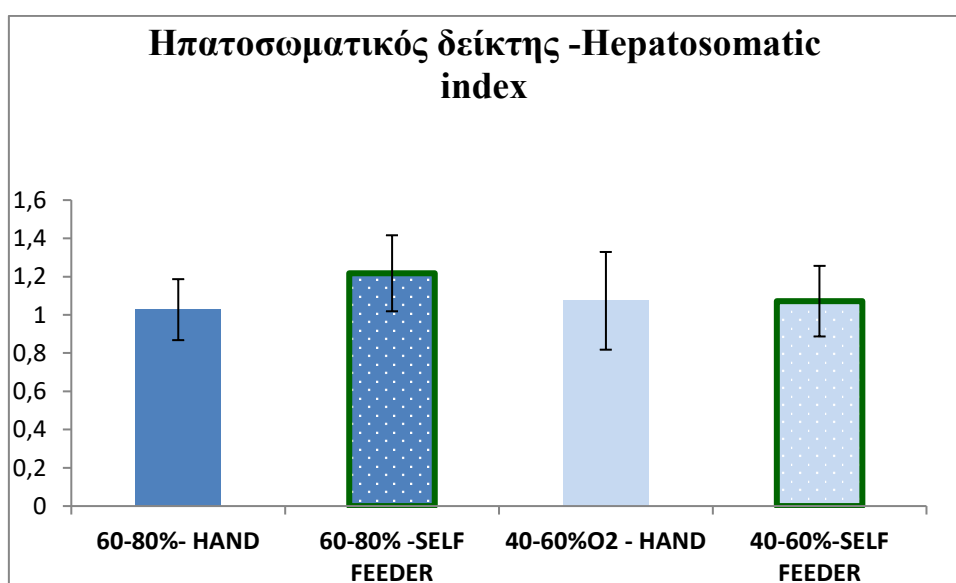
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.740, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.832, μη σημαντικό
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.045

Σχήμα 17. Παρουσιάζεται η διακύμανση του σπλαγνοσωματικού δείκτη (viscerosomatic index) σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπεδο O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



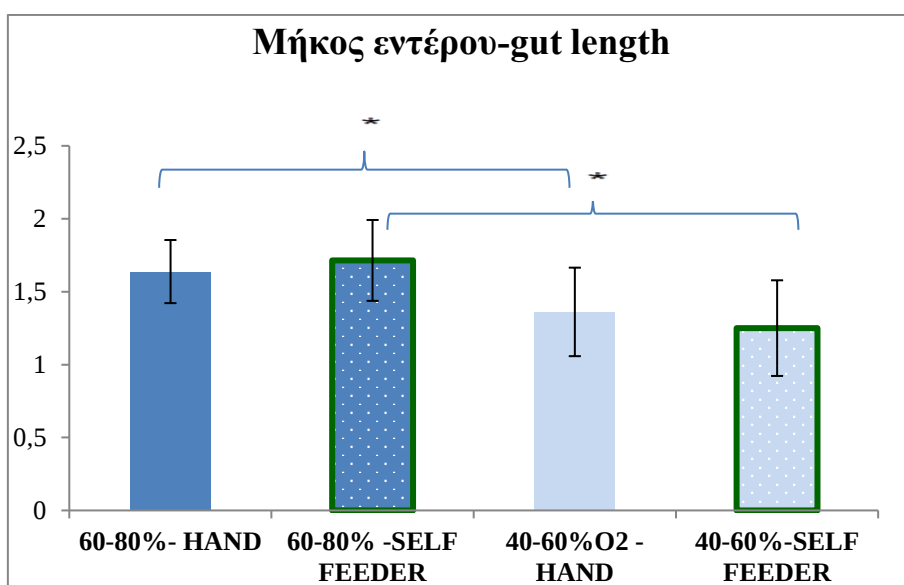
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.142, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.942, μη σημαντικό
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.058, μη σημαντικό

Σχήμα 18. Παρουσιάζεται η διακύμανση του δείκτη περισπλαχνικού λίπους (mesenteric fat index) σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπεδο O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.173, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.466, μη σημαντικό
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.165, μη σημαντικό

Σχήμα 19. Παρουσιάζεται η διακύμανση του ηπατοσωματικού δείκτη (Hepatosomatic index) σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπεδο O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.856, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P<0.001
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.329, μη σημαντικό

Σχήμα 20. Παρουσιάζεται η διακύμανση της αναλογίας μήκους εντέρου (gut length) σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπεδο O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).

Η μέθοδος ταΐσματος δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα σωματομετρικά χαρακτηριστικά στα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου. Ο ηπατοσωματικός δείκτης και το περισπλαχνικό λίπος δεν επηρεάστηκαν από τη μεθοδολογία ταΐσματος, ούτε από το επίπεδο οξυγόνου. Το μήκος εντέρου παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,001$) στα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου και με τις δυο μεθόδους ταΐσματος παρουσιάζοντας μεγαλύτερες τιμές στο επίπεδο οξυγόνου 60-80%. Πιο συγκεκριμένα το μήκος εντέρου παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p = 0.047$) στα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου, όταν τα ψάρια σιτίστηκαν με το χέρι και ($p = 0.002$) στα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου όταν σιτίστηκαν με ταΐστρες αυτοχειρισμού, δείχνοντας θετική επίδραση στο επίπεδο οξυγόνου 60-80%. Το μήκος του εντέρου αυξομειώνεται αναλογικά του βάρους σώματος του ψαριού (Kramer, D. L. *et al.*, 1995), οπότε δικαιολογημένα παρατηρήθηκε η διαφορά μήκους εντέρου στα δύο διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου. Ο σπλαγνοσωματικός δείκτης παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p = 0.045$) στην αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων, της μεθόδου ταΐσματος και του επιπέδου οξυγόνου.

Σύμφωνα με μελέτη, η καθημερινή στρατηγική σίτισης, όσον αφορά τον χρόνο και τη συχνότητα, ρυθμίζει το πρότυπο διέλευσης και τη χρήση των θρεπτικών ουσιών στο έντερο (Gillannejad *et al.*, 2019). Οι Busti, S. *et al* (2020) μελέτησαν τη συχνότητα σίτισης στην τσιπούρα με ένα, δύο και τρία ταΐσματα ημερησίως και δεν απέδειξαν καμία διαφοροποίηση στο σπλαγνοσωματικού δείκτη, ηπατοσωματικό δίκτη και περισπλαχνικό λίπος. Ομοίως και στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), οι Liu, F. G., & Liao, I. C. (1999) μελέτησαν τη συχνότητα σίτισης και απέδειξαν ότι ο σπλαγνοσωματικός δείκτης δεν επηρεάστηκε από τη συχνότητα σίτισης. Οι Gan, L. *et al.* (2013) απέδειξαν ότι ο ηπατοσωματικός δείκτης, σπλαγνοσωματικός δείκτης και το

περισπλαχνικό λίπος στον κυπρίνο grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου σε σχέση με τα υψηλά επίπεδα οξυγόνου.

3.3 Αποτελέσματα ιστολογικών αναλύσεων

Στον παρακάτω πίνακα (πιν.6) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ιστολογικών αναλύσεων στο ήπαρ, τα βράγχια, το πρόσθιο και το οπίσθιο τμήμα του εντέρου της τσιπούρας με τη χρήση δύο μεθόδων χορήγησης τροφής σε δύο διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα ιστολογικών αναλύσεων

Μέθοδος ταΐσματος		Τάισμα με χέρι	Ταΐστρες αυτοχειρι-σμού	Τάισμα με χέρι	Ταΐστρες αυτοχειρι-σμού
Επίπεδο οξυγόνου		60-80%	60-80%	40-60%	40-60%
Ιστός	Μέτρη-ση				
Ήπαρ	Λίπος%	39.28±6.94 ^{a*}	44.76±5.91 ^{b*}	22.07±3.78 ^a	47.61±4.73 ^b
Βράγχια	Βραγχι-ακά ελάσματα	0.53±0.11	0.43±0.10	0.44±0.07	0.42±0.12
Πρόσθιο τμήμα εντέρου	Μήκος εντερι-κών λαχνών	3.81±0.75	3.87±0.17	3.46±0.62	3.78±0.32
	Καλυ-κωειδή κύτταρα	4.82±0.84	3.74±0.71	3.06±0.44	2.97±0.47
	Εξωτε-ρικό τοίχωμα (μm)	224.11±20.86	210.58±26.02	191.61±18.75	198.72±24.67
	Εσωτε-ρικό τοίχωμα (μm)	294.13±78.81*	309.55±27.57*	281.67±27.57	292.12±36.27
Οπίσθιο τμήμα εντέρου	Μήκος λαχνών	4.45±0,22	4.58±0,41	4.08±0.60	4.18±0.68
	Καλυ-κωειδή κύτταρα	4.41±0.69	5.5±1.35	4.19±1.76	3.64±1.28
	Εξωτε-ρικό τοίχωμα (μm)	400.23±65.10 ^{a*}	596.18±33.51 ^{b*}	345.88±33.12 ^a	503.97±154.46 ^b
	Εσωτε-ρικό τοίχωμα (μm)	369.16±16.07 ^{a*}	558.01±102.4 ^{b*}	307.56±19.54 ^a	400.83±153.46 ^b

3.3.1. Αποτελέσματα ποσοστού λίπους στο ήπαρ

Παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.001$) στην εναπόθεση λιπώδη ιστού στο ήπαρ τόσο στον τρόπο ταΐσματος, όσο και στα διαφορετικά επίπεδα

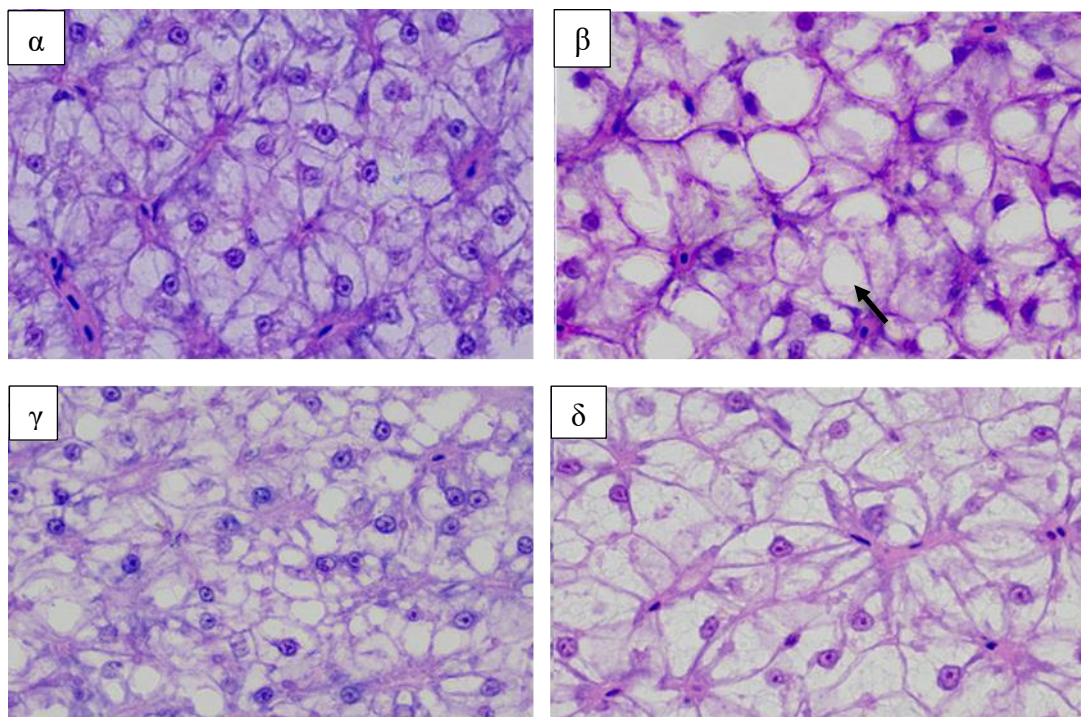
οξυγόνου ως σύνολο τιμών. Στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρξε στην αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων ($p < 0.001$).

Συγκεκριμένα ο τρόπος ταΐσματος στη συνθήκη 60-80% παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά στην εναπόθεση λίπους στο ήπαρ ($p = 0.042$), παρουσιάζοντας υψηλότερες τιμές στη μέθοδο χορήγησης τροφής με ταΐστρες αυτοχειρισμού και στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.001$) στη συνθήκη 40-60%, παρουσιάζοντας μεγαλύτερο ποσοστό στη μέθοδο χορήγησης τροφής με ταΐστρες αυτοχειρισμού. Στο επίπεδο οξυγόνου 60-80% η μέθοδος χορήγησης τροφής με ταιστρες αυτοχειρισμού εμφάνισε στους ιστούς του ήπαρ εικόνες στεάτωσης, με διογκωμένα ηπατοκύτταρα και αυξημένη συγκέντρωση λίπους γύρω από αυτά, γεγονός που υποδηλώνει μια παθολογική κατάσταση. Οι Spisni, E. et al. (1998) περιέγραψαν τη στεάτωση ως ηπατική αλλοίωση λόγω υπερβολικής πρόσληψης λιπιδίων που υπερβαίνει τον κορεσμό και συσσωρεύει σταγονίδια λιπιδίων. Παρόμοια εναπόθεση ηπατικών λιπιδίων λόγω υπερβολικής θερμιδικής πρόσληψης έχει περιγραφεί και για άλλα σπονδυλωτά όπως τα πουλερικά (Stake, P. E. et al., 1981)

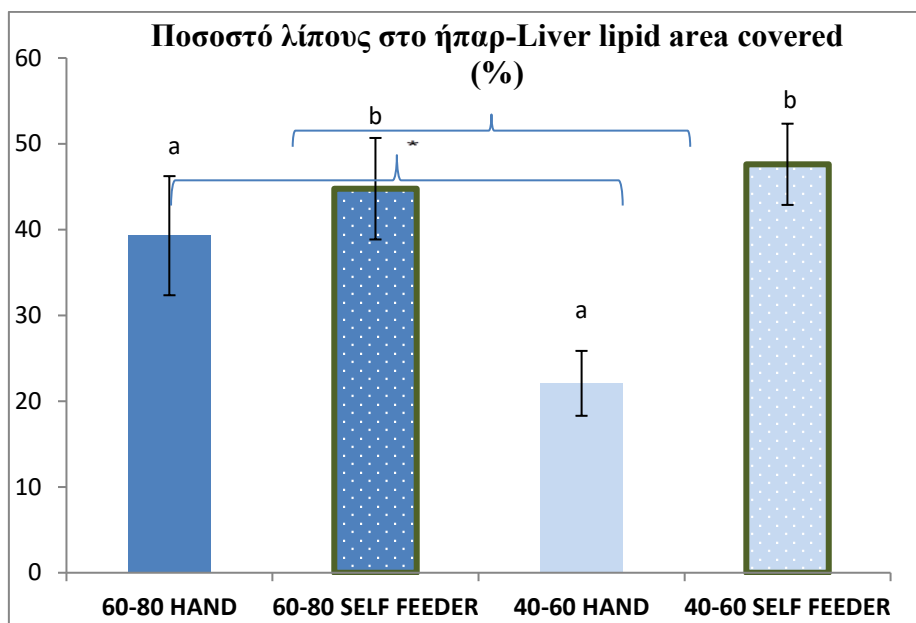
Το ποσοστό λίπους στο ήπαρ παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.001$) στα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου όταν σιτίστηκαν με το χέρι, παρουσιάζοντας υψηλότερες τιμές στο υψηλό επίπεδο οξυγόνου, ενώ δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p = 0.279$) όταν σιτίστηκαν με τις ταΐστρες αυτοχειρισμού.

Το ήπαρ είναι ένα από τα πιο σημαντικά όργανα στη μεταβολική λειτουργία, την ανοσολογική άμυνα και τις λειτουργίες απέκκρισης (Z Lu et al., 2020, D. Ma et al., 2020). Παίζει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των υδατανθράκων καθιστώντας το μια κύρια επιλογή για τη διερεύνηση του μεταβολισμού

των θρεπτικών συστατικών. Σύμφωνα με μελέτη που έγινε στην τσιπούρα φάνηκε να έχει υψηλή αντοχή στα διατροφικά επίπεδα και προτιμάει να συσσωρεύει λίπος στο συκώτι(L Wang *et al*, 2019). Οι Basto-Silva (2022) μελέτησαν την επίδραση του αριθμού των γευμάτων στην τσιπούρα και απέδειξαν ότι το ένα γεύμα έναντι των δύο αυξάνει τη γλυκόλυση και τη λιπογένεση και ότι με τα δύο γεύματα η τσιπούρα αυξάνει την ανάπτυξή της πιο πολύ με αποτέλεσμα να υπάρχει οικονομικό κέρδος. Σε παρατεταμένη διάρκεια χαμηλών επιπέδων οξυγόνου στην τσιπούρα, έχει αποδειχτεί ότι ο μεταβολισμός των λιπιδίων αυξάνεται προκειμένου να διευκολυνθεί ο μεταβολισμός της αερόβιας ενέργειας (Naya-Català *et al*, 2021).



Εικόνα 8 (α) Τομή ήπαρ (x100) στη συνθήκη 60-80% hand feeding
(β) Τομή ήπαρ (x100) στη συνθήκη 60-80% self feeder
(γ) Τομή ήπαρ (x100) στη συνθήκη 40-60% hand feeding
(δ) Τομή ήπαρ (x100) στη συνθήκη 40-60% self feeder



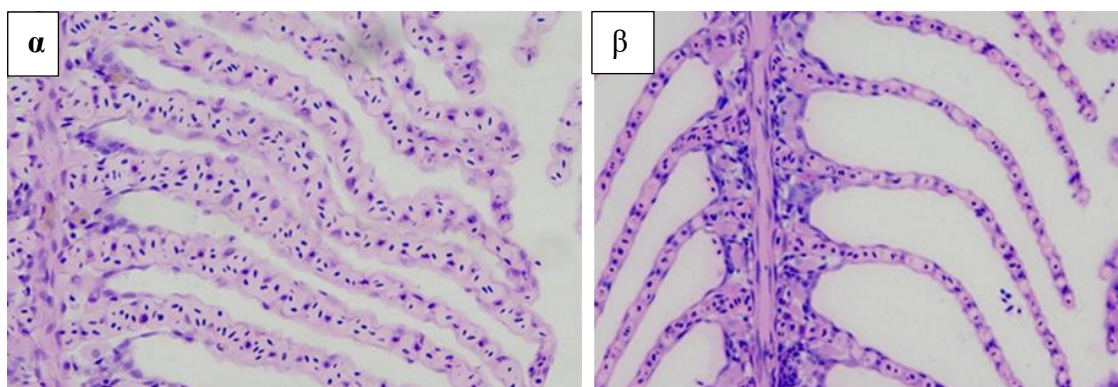
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P<0.001
Επίπεδο οξυγόνου	P<0.001
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P<0.001

Σχήμα 21. Παρουσιάζεται η διακύμανση του ποσοστού % λίπους σε περιοχές ήπατος σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).

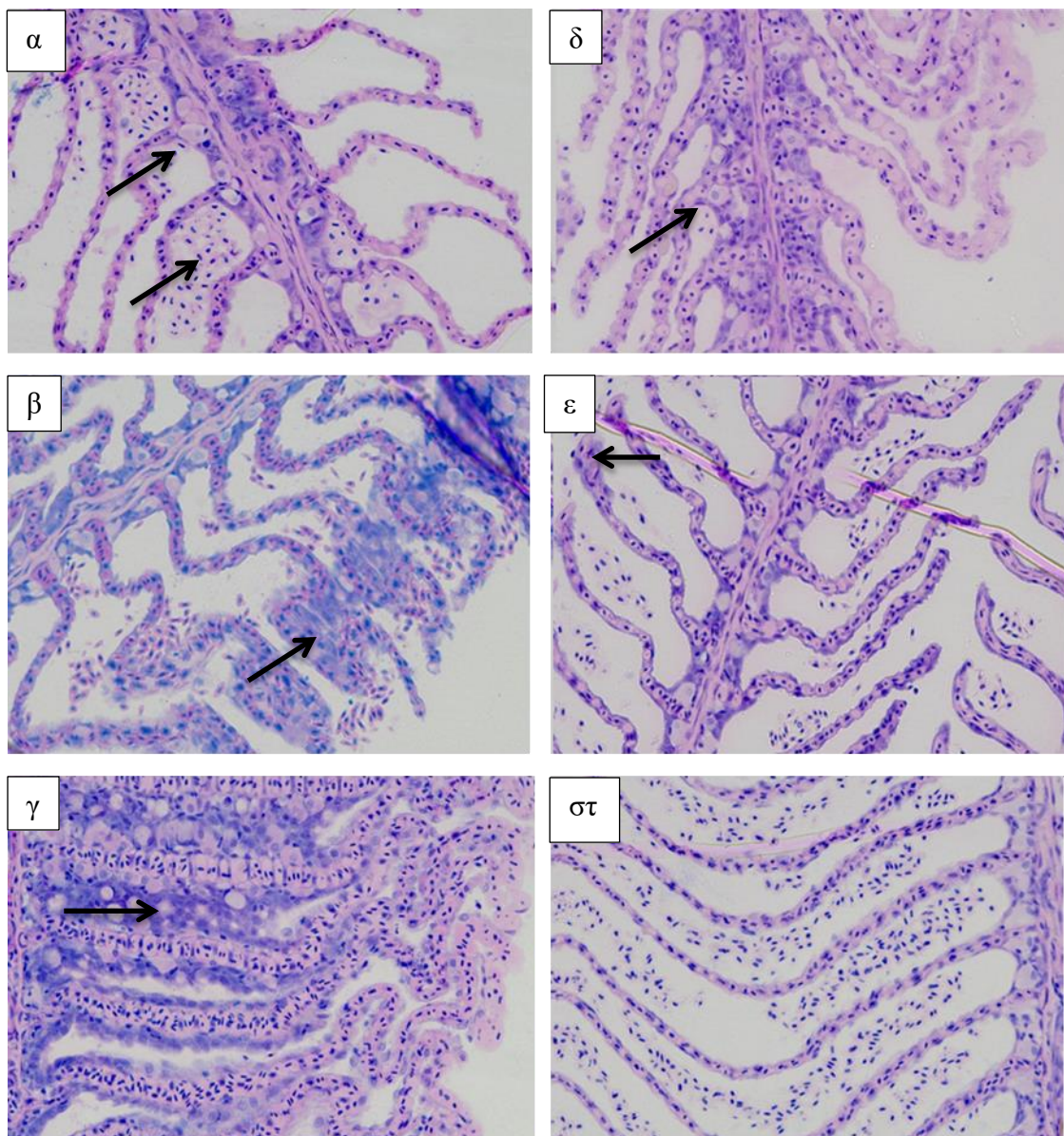
3.3.2. Αποτελέσματα ιστολογικών αναλύσεων στα βράγχια

Τα βραγχιακά ελάσματα είναι το σημείο όπου γίνεται η ανταλλαγή των αερίων για την αναπνευστική λειτουργία των τελεόστεων ιχθύων. Η επιφάνεια των βραγχιακών ελασμάτων καθώς επίσης και το πάχος τους μπορούν να επηρεαστούν από τις συνθήκες εκτροφής και κυρίως από το διαλυμένο οξυγόνο. Παρόλα αυτά τα ψάρια μπορούν να προσαρμοστούν σε συνθήκες υποξίας αλλάζοντας τη μορφολογία των βραγχίων (Blank *et al.* 2014). Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να

επηρεάσουν άμεσα την υγεία των βραγχίων, ενώ παράλληλα διατροφικοί παράγοντες μπορούν να βελτιώσουν την κατάσταση της υγείας τους (Chen X. *et. al*, 2023). Οι μετρήσεις της αναλογίας πρωτογενών και δευτερογενών ελασμάτων δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε ως προς τον παράγοντα οξυγόνο ($p=0.115$), ούτε ως προς τη μεθοδολογία ταΐσματος ($p=0.097$). Από οπτικές παρατηρήσεις υπήρξαν εικόνες υπερπλασίας, οιδήματος και παρουσία chloride cells στα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου σε σύγκριση με τα υψηλότερα επίπεδα οξυγόνου. Αντίστοιχες παρατηρήσεις έγιναν σε μελέτη των Araújo-Luna *et al.* (2018), όπου παρατηρήθηκαν δομικές βλάβες στα βράγχια σε επίπεδα οξυγόνου 40-60% σε σχέση με επίπεδα 60-80% και 80-100% O₂. Παράλληλα η μεθοδολογία ταΐσματος φάνηκε να επηρεάζει οπτικά την γενική εικόνα των βραγχίων και στα δυο επίπεδα οξυγόνου με καλύτερα αποτελέσματα στις συνθήκες ταΐσματος με ταΐστρες αυτοχειρισμού. Στις εικόνες 9,10 απεικονίζονται φωτογραφίες από ιστολογικές τομές των βραγχιικών ελασμάτων με τις δύο διαφορετικές μεθόδους χορήγησης τροφής σε δύο επίπεδα οξυγόνου.

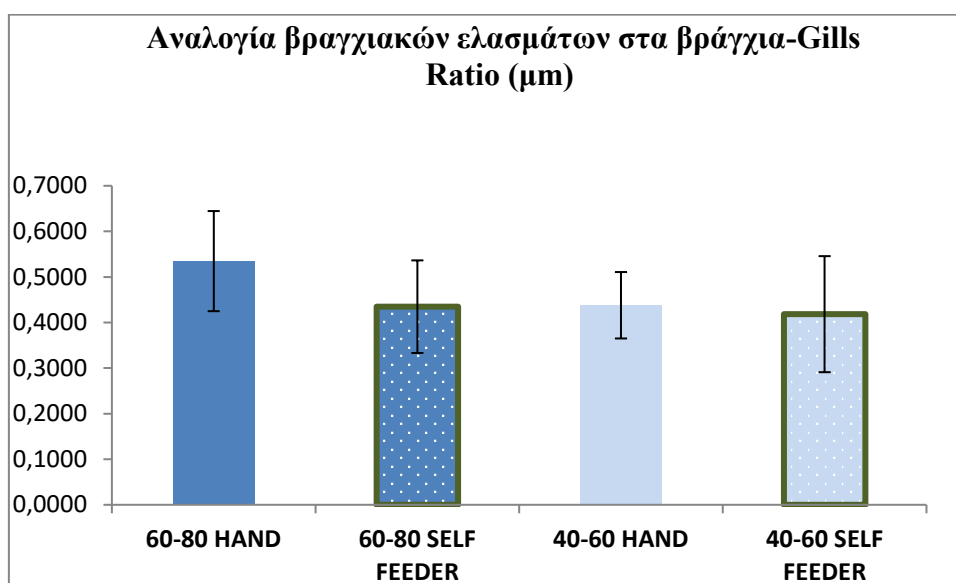


Εικόνα 9(α) Βραγχιακά ελάσματα τσιπούρας στη συνθήκη 60-80% hand feeding
(β) Βραγχιακά ελάσματα τσιπούρας συνθήκη 60-80% self feeder



Εικόνα 10(α,β,γ) Βραγχιακά ελάσματα στη 40-60% hand feeding (x40)
(δ,ε,στ) Βραγχιακά ελάσματα στη 40-60% self feeder feeding (x40)

10(α) chloride cells, 10 (β,ε)οίδημα, 11(α,γ) υπερπλασία



Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.097, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.115, μη σημαντικό
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.258, μη σημαντικό

Σχήμα 22. Παρουσιάζεται η διακύμανση της αναλογίας των βραγχιακών ελασμάτων σε μm σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O_2 και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O_2 που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων O_2 για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, $p < 0.05$).

3.3.3. Αποτελέσματα ιστολογικών αναλύσεων στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου

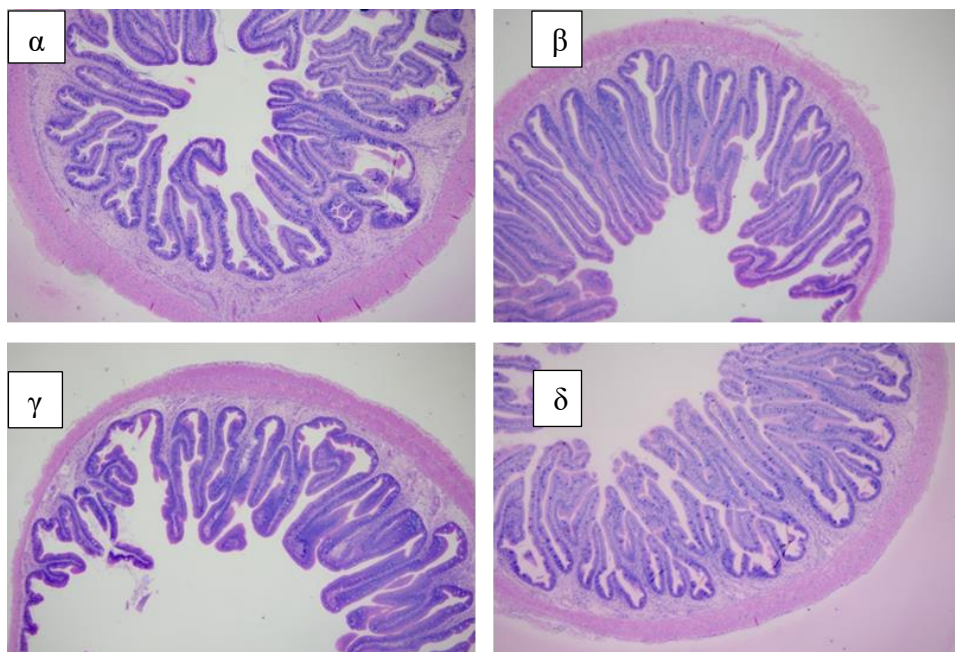
Στον ιστό του πρόσθιου εντέρου δεν παρουσιάστηκαν στατιστικές διαφορές στο μήκος των εντερικών λαχνών και την ποσότητα των καλυκοειδών κυττάρων στα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου και τη μεθοδολογία ταΐσματος.

Όσον αφορά το πάχος του τοιχώματος του πρόσθιου εντέρου, το πάχος του εξωτερικού τοιχώματος δεν παρουσίασε στατιστικές διαφορές τόσο στα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου, όσο και στη μεθοδολογία ταΐσματος. Το πάχος του εσωτερικού τοιχώματος του πρόσθιου εντέρου παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά στα δυο

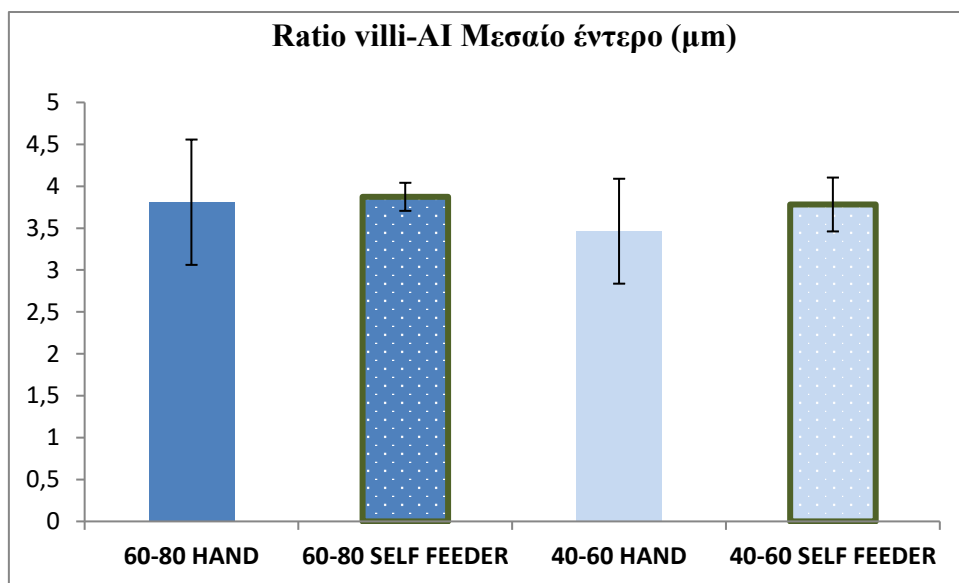
επίπεδα οξυγόνου ($P=0.003$) και για τις δυο μεθόδους ταΐσματος. Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικές διαφορές στο πάχος του πρόσθιου εντέρου στις διαφορετικές μεθόδους ταΐσματος.

Στα ψάρια τα επιθηλιακά κύτταρα είναι απαραίτητα για την ανοσία του εντερικού βλενογόνου, η οποία είναι ζωτικής σημασίας. Τα καλυκωειδή κύτταρα έχουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του εντέρου καθώς παράγουν βλέννα και εκκρίνουν αντιμικροβιακές πρωτεϊνικές ουσίες κυτοκινών που διεγείρουν την τοπική ανοσία του εντέρου (Knorr & Newberry, 2018). Συνήθως η βελτιωμένη εντερική λειτουργία σχετίζεται με τις βέλτιστες συνθήκες εκτροφής (θερμοκρασία, διαλυμένο οξυγόνο, επίπεδο αμμωνίας και πυκνότητα εκτροφής) (Daewood & Koshio, 2016).

Σε μελέτη που έγινε σε νεαρά ιχθύδια τσιπούρας αποδείχτηκε ότι η τσιπούρα μπορεί να ρυθμίσει το ωριαίο προφίλ της πεπτικής λειτουργίας για να προσαρμοστεί στις αλλαγές της συχνότητας σίτισης και παράλληλα υπήρξε μια δραστηριότητα πρωτεολυτικών ενζύμων η οποία εξαρτιόταν από τη διαθεσιμότητα της τροφής μέσα στο έντερο (Gilannejad *et al.*, 2021). Στην εικόνα 11 απεικονίζονται φωτογραφίες από ιστολογικές τομές σε πρόσθιο τμήμα εντέρου.



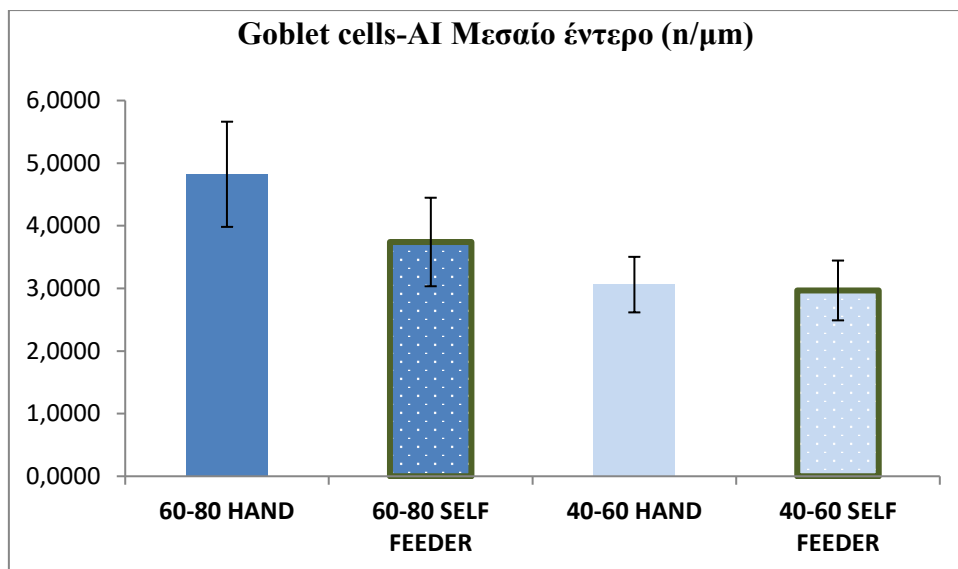
Εικόνα 11(α) Ιστός πρόσθιου τμήματος εντέρου στη συνθήκη 60-80% hand feeding (x5)
(β) Ιστός πρόσθιου τμήματος εντέρου στη συνθήκη 60-80% self feeder (x5)
(γ) Ιστός πρόσθιου τμήματος εντέρου στη συνθήκη 40-60% hand feeding (x5)
(δ) Ιστός πρόσθιου τμήματος εντέρου στη συνθήκη 40-60% self feeder (x5)



Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταισίματος	P=0.489, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.431, μη σημαντικό
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.645, μη σημαντικό

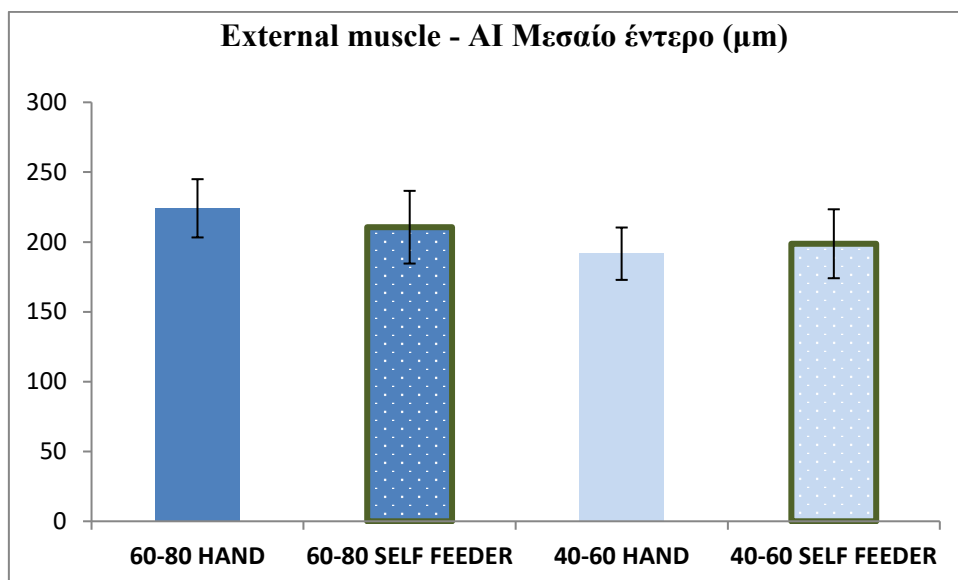
Σχήμα 23. Παρουσιάζεται η διακύμανση της αναλογίας του μήκους των εντερικών λαχνών στο μεσαίο έντερο σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογίας ταισίματος που

χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



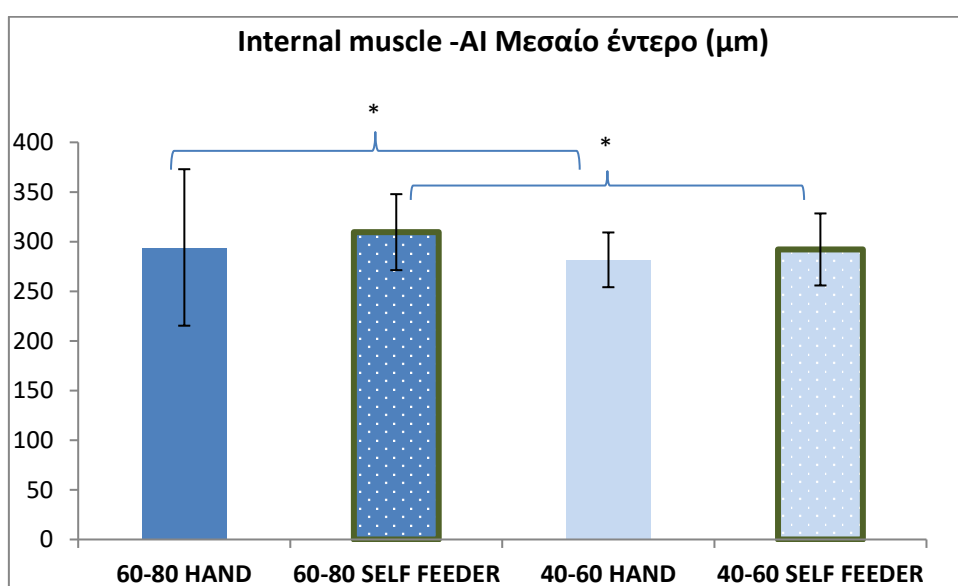
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.462, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.061, μη σημαντικό
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.255, μη σημαντικό

Σχήμα 24. Παρουσιάζεται η διακύμανση της αναλογίας των goblet cells στο μεσαίο έντερο σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος τείσματος	P=0.736, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.054, μη σημαντικό
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.406, μη σημαντικό

Σχήμα 25. Παρουσιάζεται η διακύμανση του πάχους του εξωτερικού τοιχώματος στο μεσαίο έντερο σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O_2 και την μεθοδολογία τείσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O_2 που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων O_2 για κάθε μεθοδολογία τείσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, $p < 0.05$).



Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.286, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.003
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.845, μη σημαντικό

Σχήμα 26. Παρουσιάζεται η διακύμανση του πάχους του εσωτερικού τοιχώματος στο μεσαίο έντερο σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).

3.3.4. Αποτελέσματα ιστολογικών αναλύσεων στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου

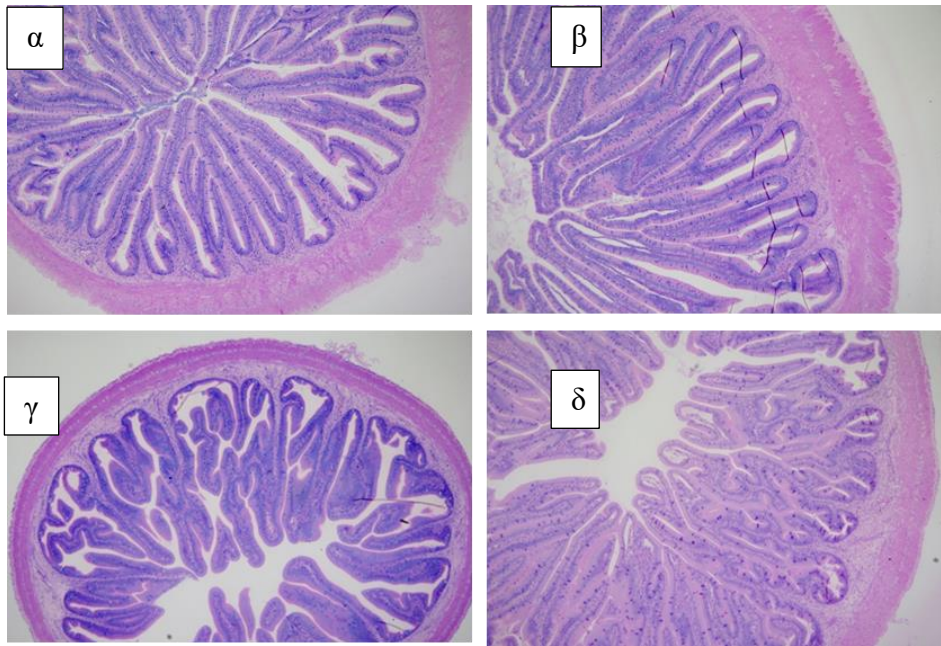
Στο μήκος των λαχνών του οπίσθιου εντέρου δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p=0.728) ως προς τη μέθοδο ταΐσματος, καθώς επίσης ως προς το επίπεδο οξυγόνου (p=0.130). Επίσης ο αριθμός των καλυκωειδών κυττάρων δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές (p=0.725) ως προς τη μέθοδο ταΐσματος, ούτε και ως προς τα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου (p=0.094).

Το πάχος του εξωτερικού τοιχώματος του οπίσθιου τμήματος του εντέρου παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.001) στις διαφορετικές μεθόδους ταΐσματος και στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.044) στα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου. Συγκεκριμένα το πάχος του εσωτερικού τοιχώματος του οπίσθιου τμήματος του εντέρου παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.001) στις διαφορετικές μεθόδους ταΐσματος, παρουσιάζοντας αυξημένες τιμές στη μέθοδο χορήγησης τροφής με ταΐστρες αυτοχειρισμού και στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.008) στα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου, παρουσιάζοντας καλύτερα αποτελέσματα στο υψηλό επίπεδο οξυγόνου. Σε αντίθεση με μελέτη για τη συχνότητα σίτισης στο *Micropterus salmoides* οι Wang, Y., (2020) απέδειξαν ότι τα δύο ταΐσματα έναντι των τριών ή τεσσάρων είχαν μεγαλύτερο πάχος εντέρου καθιστώντας αποδοτικότερη την

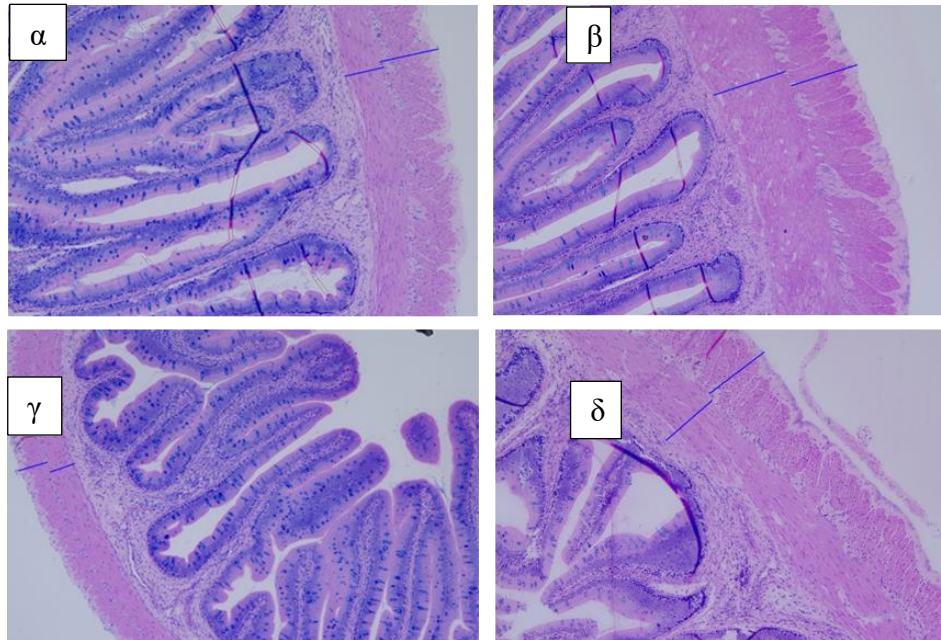
απορρόφηση θρεπτικών συστατικών και αύξηση των ψαριών. Οι Yang, E. et al., (2021) μελέτησαν τη δομή του εντέρου στο cobia (*Rachycentron canadum*) σε συνθήκες υποξίας για 28 ημέρες και βρήκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένες τιμές του πάχους του εντέρου.

Έχει αποδειχτεί ότι ο χρόνος και η συχνότητα ταΐσματος επηρεάζει το πρότυπο διέλευσης και τη χρήση θρεπτικών ουσιών στο έντερο της τσιπούρας (Gilannejad *et al.*, 2019). Έτσι, παρόλο που η τσιπούρα φαίνεται ικανή να μεγιστοποιήσει τη χρήση της τροφής ανεξάρτητα από τον αριθμό των γευμάτων, η ποσότητα της πεψίνης μειώθηκε σε ψάρια που λάμβαναν περισσότερα από ένα γεύμα ανά ημέρα και έτσι αποδείχτηκε ότι η παροχή της ποσότητας σε δύο γεύματα επέτρεψε την καλύτερη και παρατεταμένη γαστρική πέψη, η οποία είχε θετική επίδραση στην ανάπτυξη (Busti *et al.*, 2020).

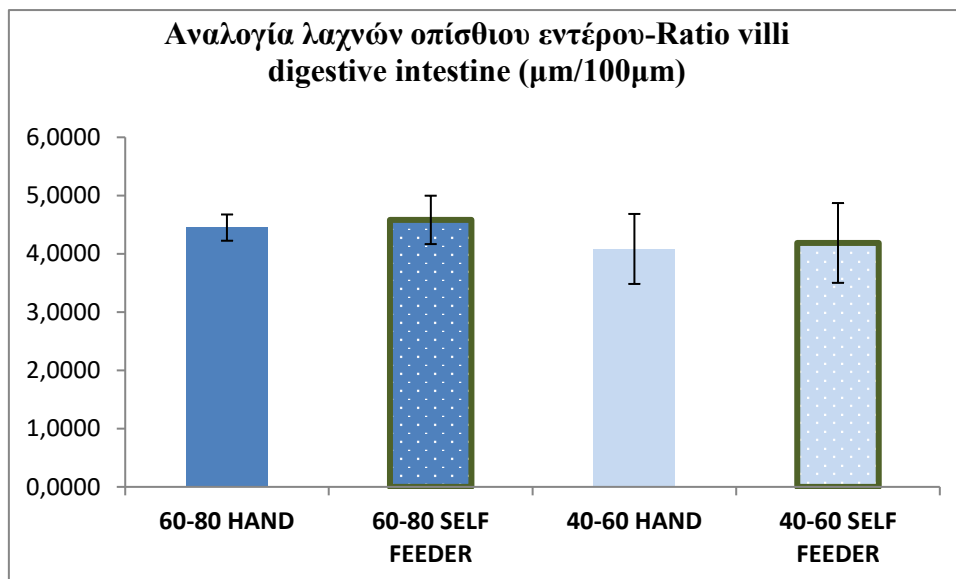
Μελέτες που έγιναν στη συχνότητα σίτισης της τσιπούρας έδειξαν ότι το περιοδικό τάισμα οδήγησε σε αυξημένη δραστηριότητα των ψαριών από αυτά που τρέφονταν τυχαία και παράλληλα επηρεάστηκε ο μεταβολισμός, η πέψη, η γλυκόζη του αίματος, το γαστρικό PH, η αμυλάση και τα πεπτικά ένζυμα πρωτεάσης (Montoya *et al.*, 2010). Στην εικόνα 12 απεικονίζονται φωτογραφίες από ιστολογικές τομές σε οπίσθιο τμήμα εντέρου και στην εικόνα 13 απεικονίζονται σε μεγαλύτερη μεγέθυνση τα τοιχώματα του εντέρου της τσιπούρας στις δύο μεθόδους χορήγησης τροφής στα δύο επίπεδα οξυγόνου.



Εικόνα 12(α). Ιστός οπίσθιου τμήματος εντέρου στη συνθήκη 60-80% hand feeding (x5)
(β) Ιστός οπίσθιου τμήματος εντέρου στη συνθήκη 60-80% self feeder (x5)
(γ) Ιστός οπίσθιου τμήματος εντέρου στη συνθήκη 40-60% hand feeding (x5)
(δ) Ιστός οπίσθιου τμήματος εντέρου στη συνθήκη 40-60% self feeder (x5)

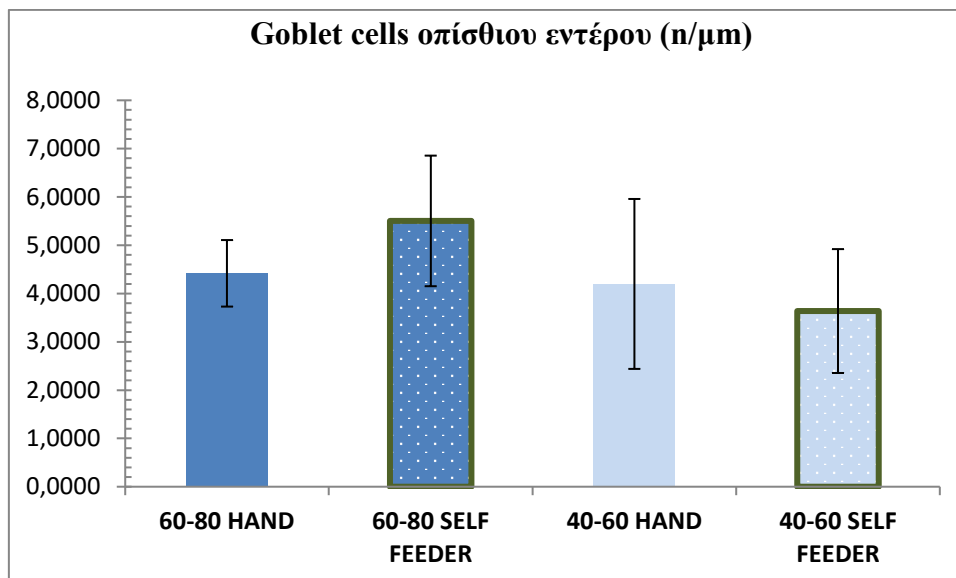


Εικόνα 13α. Ιστός οπίσθιου τμήματος εντέρου στη συνθήκη 60-80% hand feeding (x10)
(β) Ιστός οπίσθιου τμήματος εντέρου στη συνθήκη 60-80% self feeder (x10)
(γ) Ιστός οπίσθιου τμήματος εντέρου στη συνθήκη 40-60% hand feeding (x10)
(δ) Ιστός οπίσθιου τμήματος εντέρου στη συνθήκη 40-60% self feeder (x10)



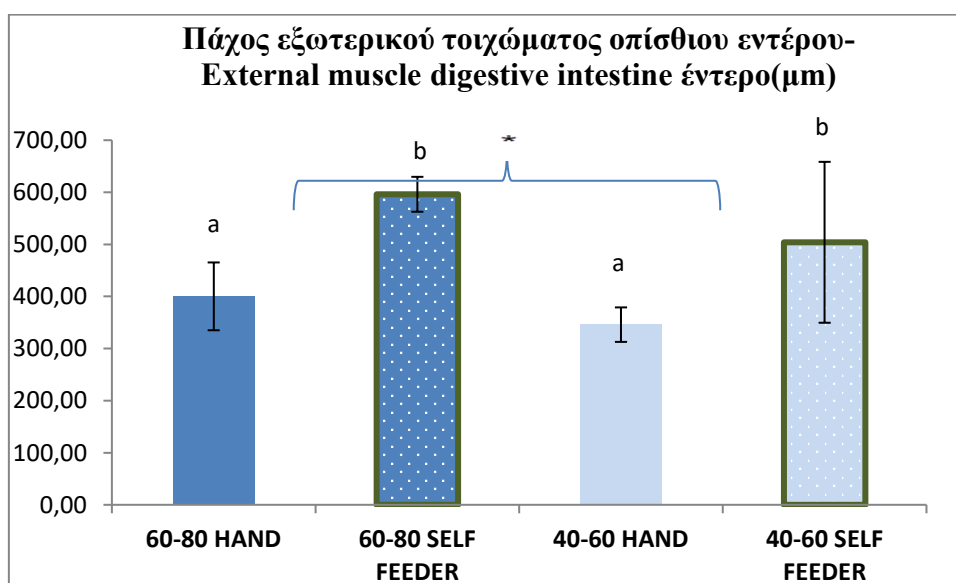
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταισίματος	P=0.728, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.130, μη σημαντικό
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.905, μη σημαντικό

Σχήμα 27. Παρουσιάζεται η διακύμανση του μήκους των εντερικών λαχνών στο οπίσθιο έντερο σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O_2 και την μεθοδολογία ταισίματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O_2 που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων O_2 για κάθε μεθοδολογία ταισίματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, $p < 0.05$).



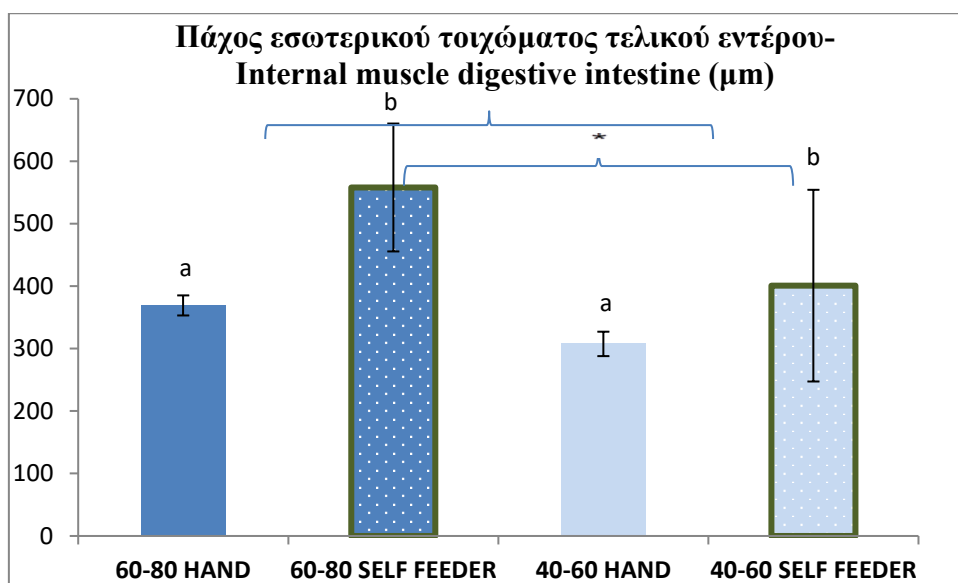
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.725, μη σημαντικό
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.094, μη σημαντικό
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.070, μη σημαντικό

Σχήμα 28. Παρουσιάζεται η διακύμανση του αριθμού των καλκοειδών κυττάρων (goblet cells) στο οπίσθιο έντερο σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος τείσματος	P<0.001
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.044
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.646, μη σημαντικό

Σχήμα 29. Παρουσιάζεται η διακύμανση του πάχους του εξωτερικού τοιχώματος στο τελικό έντερο σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία τείσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπεδο O₂ για κάθε μεθοδολογία τείσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος τείσματος	P<0.001
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.008
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.313, μη σημαντικό

Σχήμα 30. Παρουσιάζεται η διακύμανση του πάχους του εσωτερικού τοιχώματος στο τελικό έντερο σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία τείσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επίπεδο O₂ για κάθε μεθοδολογία τείσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).

3.4. Αποτελέσματα ανάλυσης σύστασης σώματος

Στον παρακάτω πίνακα (πιν.7) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση σύστασης σώματος με τις διαφορετικές μεθόδους χορήγησης τροφής στα δύο επίπεδα οξυγόνου.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα αναλύσεων σύστασης σώματος σε ξηρή ουσία (dry matter)

Μέθοδος ταΐσματος		Τάισμα με χέρι	Ταΐστρες αυτοχειρισμού	Τάισμα με χέρι	Ταΐστρες αυτοχειρισμού
Επίπεδο οξυγόνου	Αρχικά δείγματα	60-80%	60-80%	40-60%	40-60%
ΟΛΙΚΗ ΞΗΡΗ ΟΥΣΙΑ%	36.46±1.66	39.87±2.29 ^a	42.79±1.75 ^b	39.80±1.15 ^a	41.45±0.87 ^b
ΛΙΠΟΣ%	34.73±1.84	40.68±2.46	42.60±2.19	41.35±2.62	41.54±1.10
ΠΡΩΤΕΪΝΗ%	50.36±1.89	44.44±1.93*	43.64±1.98*	46.06±1.91	44.70±1.13
ΤΕΦΡΑ%	11.67±0.58	9.23±0.56	8.67±0.76	9.68±0.96 ^a	8.62±0.76 ^b
ΕΝΕΡΓΕΙΑ	27.34±0.42	27.77±0.5	28.25±0.48	27.96±0.63	28.09±0.29

Στην ανάλυση σύστασης σώματος σε ξηρή ουσία, η ολική ξηρή ουσία παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,001$) ως προς τον τρόπο ταΐσματος και στα δύο επίπεδα οξυγόνου, παρουσιάζοντας μεγαλύτερο ποσοστό με τη μέθοδο ταϊστών αυτοχειρισμού (Σχ.31). Στο λίπος της ξηρής ουσίας δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον διαφορετικό τρόπο ταΐσματος ($p = 0.111$) σε κανένα επίπεδο οξυγόνου και δεν παρουσίασε στατιστική διαφορά ($p = 0.788$) ως προς τα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου (Σχ.32). Η πρωτεΐνη ξηρής ουσίας δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p = 0.076$) ως προς τον τρόπο ταΐσματος, αλλά παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά στα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου ως παράγοντας στο σύνολο των τιμών, παρουσιάζοντας μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεΐνης στη σύσταση σώματος στο χαμηλό επίπεδο οξυγόνου 40-60% (Σχ.33).

Είναι γνωστό ότι τα ψάρια είναι σε θέση να ρυθμίζουν την ημερήσια πρόσληψη τροφής με βάση τις θρεπτικές και ενεργειακές τους απαιτήσεις (Kaushik & Medale

1994). Τα ψάρια μπαίνουν στη διαδικασία να θρέψουν τον εαυτό τους την προτιμώμενη ώρα τους (Boujard *et al.* 1996, Heilman & Spieler, 1999) και σύμφωνα με τις διατροφικές τους απαιτήσεις και με τη σίτιση ζήτησης (Sánchez-Vázquez *et al.* 1998, 1999, Yamamoto *et al.* 2000). Οι Yilmaz *et al.* (2011) μελέτησαν τη συχνότητα τροφοδοσίας της τσιπούρας και συμπέραναν ότι η αναλογία της πρωτεΐνης μειώθηκε εμφανέστατα όταν τα ψάρια τρέφονταν πιο συχνά, αποτέλεσμα που δεν παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη. Σε μελέτη στην τσιπούρα ως προς την ανάλυση σύστασης σώματος σε σχέση με τη συχνότητα σίτισης (Busti, S *et al.*, 2020) δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όταν αυτά σιτίστηκαν με ένα, δύο ή τρία ταΐσματα. Σε διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου στην τιλάπια (*Oreochromis niloticus*) αποδείχτηκε ότι το ποσοστό πρωτεΐνης και λίπους μειώθηκε στα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου και το ποσοστό τέφρας μειώθηκε στα υψηλά επίπεδα οξυγόνου (Abdel-Tawwab, M., *et al.*, 2015).

Η τέφρα ξηρής ουσίας παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.004$) ως προς τον τρόπο ταΐσματος στα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου (Σχ.34). Συγκεκριμένα παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.007$) στον τρόπο ταΐσματος στο χαμηλό επίπεδο οξυγόνου 40-60%, με μεγαλύτερο ποσοστό με τη μέθοδο ταΐσματος με το χέρι, αλλά δεν παρουσίασε στατιστική διαφορά ($p=0.141$) στο υψηλότερο επίπεδο οξυγόνου 60-80%.

Η τέφρα είναι ο περίσσιος σκελετός του δείγματος και αποτελείται από ιχνοστοιχεία. Αποτελέσματα έρευνας έδειξαν ότι η τσιπούρα προσπαθεί να ανταπεξέλθει σε συνθήκες υποξίας εμφανίζοντας μεγαλύτερη αφομοίωση των μετάλλων Zn και Mn στα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (McNicholl *et al.*, 2021), καθώς

όπως είναι γνωστό αυτά τα μέταλλα αυξάνουν τον αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Chen *et al.*, 2017)

Η ενέργεια δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.074$) ως προς τον τρόπο ταΐσματος στα δύο επίπεδα οξυγόνου, καθώς επίσης δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.936$) ως προς το επίπεδο οξυγόνου στις δύο μεθοδολογίες ταΐσματος (Σχ.35). Στον παρακάτω πίνακα (Πίν.8) βλέπουμε πως έχει ταϊστεί η τσιπούρα με βάση τους ρυθμούς κατανάλωσης οξυγόνου και την απαίτηση σε ενέργεια για συντήρηση σε αντίστοιχη θερμοκρασία. Η τσιπούρα έχει ταϊστεί σε αυτή τη μελέτη με βιοενεργά μαθηματικά μοντέλα (DEB), όπου φάνηκε να έχει μια καλή προσομοίωση, παρόλο που χρειάζεται επιπλέον έρευνα (Serpa *et al.*, 2013)

Πίνακας 8. Ρυθμοί κατανάλωσης οξυγόνου και η απαίτηση ενέργειας για συντήρηση σε σχέση με τη θερμοκρασία Serpa, D *et al.*, (2013)

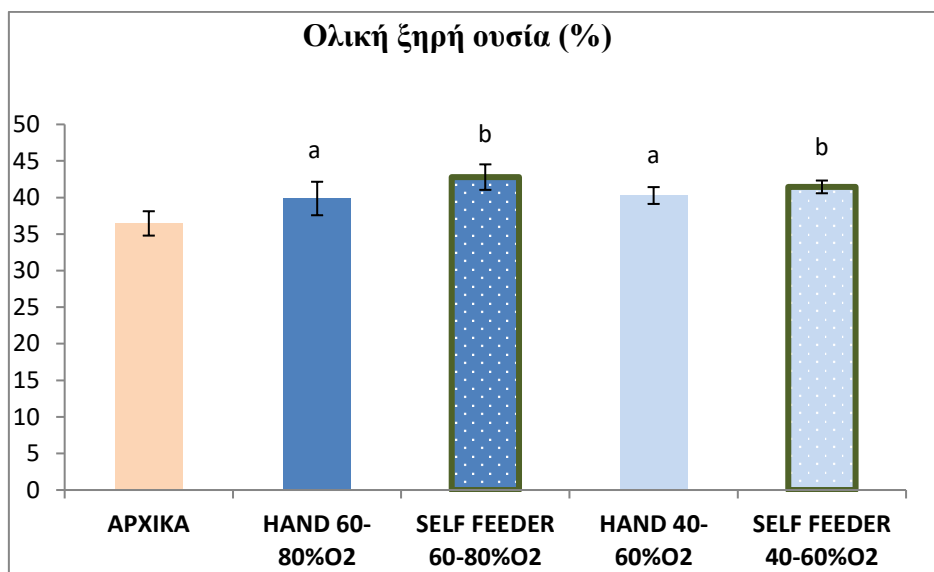
Η σίτιση αποτελεί ένα βασικό παράγοντα που επηρεάζει την κατάσταση ενός ζώου σε αιχμαλωσία, επειδή η τροφή πρέπει να είναι διαθέσιμη σε επαρκείς ποσότητες και με κατάλληλη σύνθεση για τη διατήρηση της υγείας και της φυσιολογικής συμπεριφοράς (Huntingford *et al.*, 2006). Οι μέθοδοι σίτισης που χρησιμοποιούνται στην ιχθυοκαλλιέργεια μπορεί να επηρεάσουν το επίπεδο ανταγωνισμού για

Θερμοκρασία (°C)	Ρυθμός κατανάλωσης O ₂ (mg O ₂ g ⁻¹ d ⁻¹)	Απαίτηση ενέργειας για συντήρηση ανά όγκο (Pm) (j cm ⁻³ d ⁻¹)
16	0.070±0.002	24.0±1.2
21	0.110±0.005	34.9±2.3
23.5	0.115±0.002	37.7±0.7
26	0.125±0.030	34.1±10.6

τροφοληψία μεταξύ των ψαριών, το οποίο μπορεί κατά συνέπεια να επηρεάσει τη συμπεριφορά, την αποτελεσματικότητα σίτισης και την ανάπτυξη (Thorpe and Cho, 1995, Cutts *et al.*, 1998).

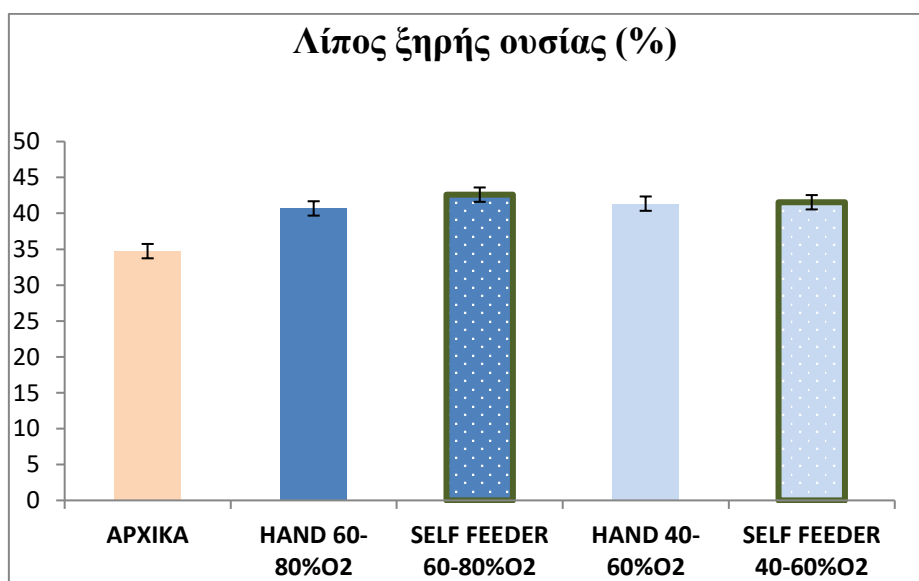
Οι Oh, S. Y., & Maran, B. V. (2015) μελέτησαν τη συχνότητα σίτισης στο (*Oplegnathus fasciatus*) και δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στην ανάλυση σύστασης σώματος στην υγρασία και την πρωτεΐνη. Παρατηρήθηκε όμως υψηλότερο ποσοστό τέφρας, λίπους και ενέργειας όταν αυτά ταΐστηκαν με ένα γεύμα έναντι των δύο, τριών και τεσσάρων γευμάτων, ενώ δεν υπήρξαν διαφορές σε λίπος και ενέργεια ανάμεσα στα δύο, τρία και τέσσερα ταΐσματα τη μέρα. Αντιθέτως σε μελέτη στην τιλάπια (*Oreochromis niloticus*) για τη συχνότητα σίτισης με ένα έως πέντε ταΐσματα ημερησίως παρατηρήθηκε ότι δεν επηρεάστηκε η υγρασία, η πρωτεΐνη και η τέφρα στη σύσταση σώματος αλλά το ποσοστό λίπους ήταν εμφανέστερα μεγαλύτερο όταν ταΐστηκαν τέσσερα ή πέντε ταΐσματα έναντι τους ενός ή δύο ταΐσμάτων τη μέρα (Daudpota, A. *et al.*, 2016).

Σε μελέτη με διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου στην τιλάπια (*Oreochromis niloticus*) παρουσιάστηκαν εμφανείς μειωμένες τιμές στα ποσοστά πρωτεΐνης και λίπους στη σύσταση σώματος στα μειωμένα επίπεδα οξυγόνου σε αντίθεση με το ποσοστό τέφρας που μειώθηκε με την αύξηση του διαλυμένου οξυγόνου (Abdel-Tawwab, M., *et al.*, 2015).



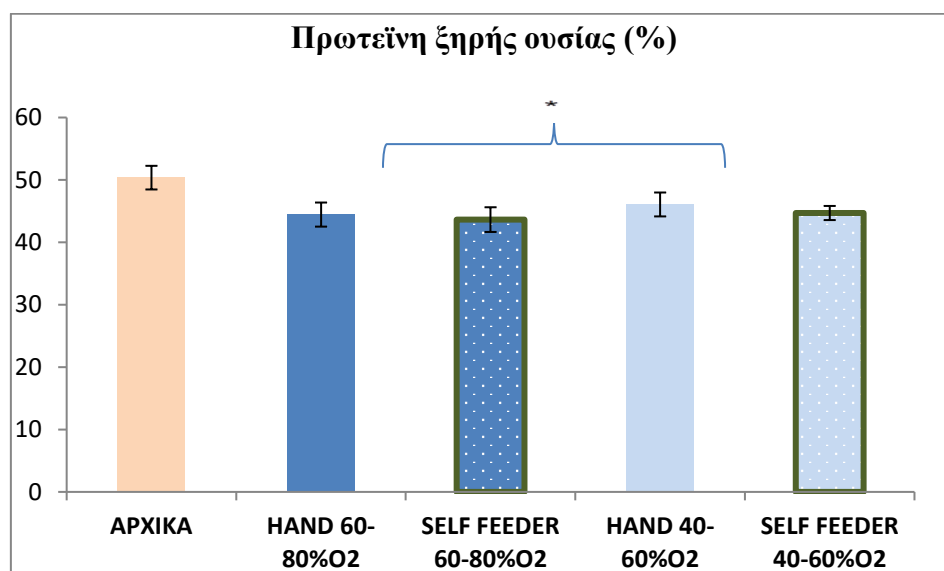
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P<0.001
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.212, μη σημαντικό
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.257, μη σημαντικό

Σχήμα 31. Παρουσιάζεται η διακύμανση της ξηρής ουσίας σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



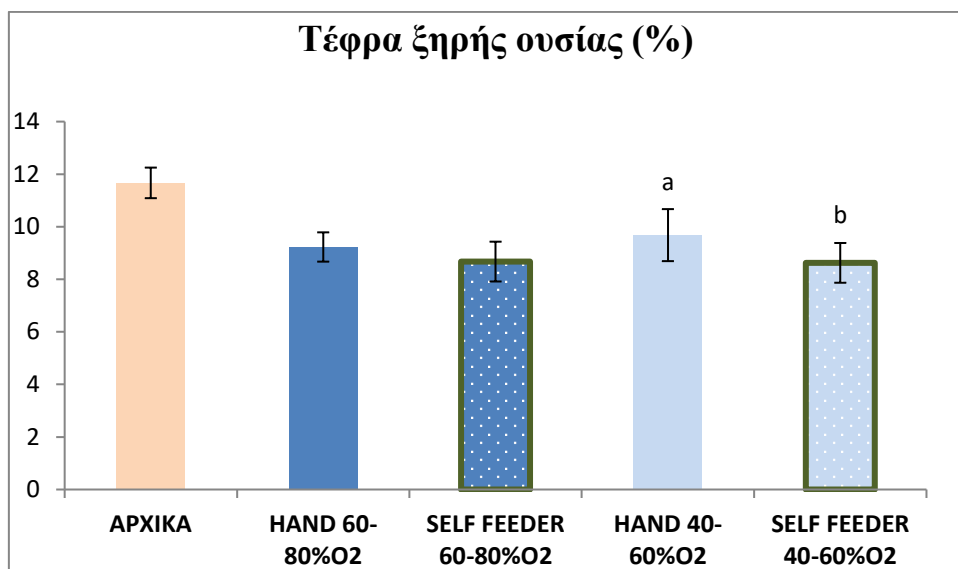
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.155
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.788
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.242

Σχήμα 32. Παρουσιάζεται η διακύμανση του ποσοστού λίπους της ξηρής ουσίας σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



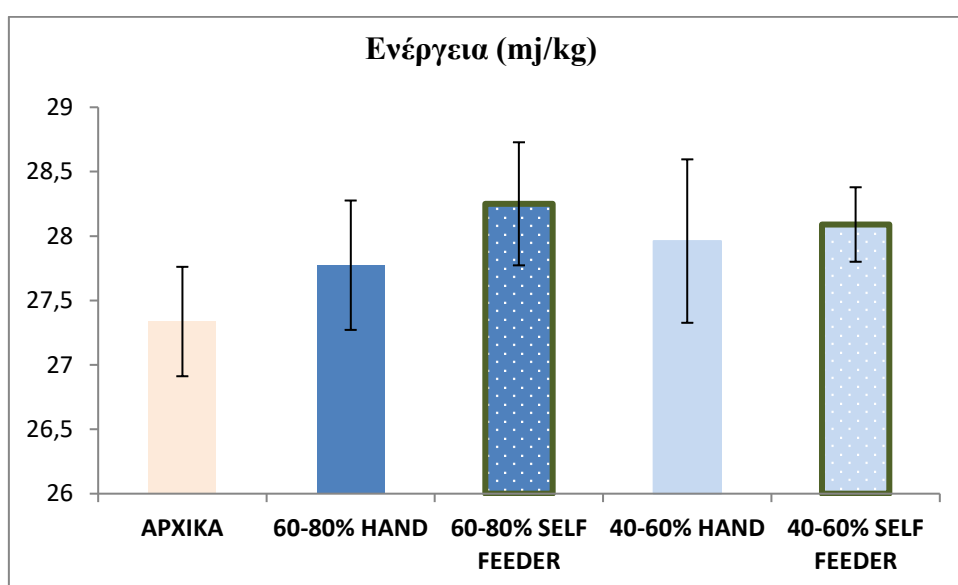
Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.076
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.031
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.637

Σχήμα 33. Παρουσιάζεται η διακύμανση του ποσοστού πρωτεΐνης της ξηρής ουσίας σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).



Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.004
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.444
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.343

Σχήμα 34. Παρουσιάζεται η διακύμανση του ποσοστού τέφρας της ξηρής ουσίας σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05)

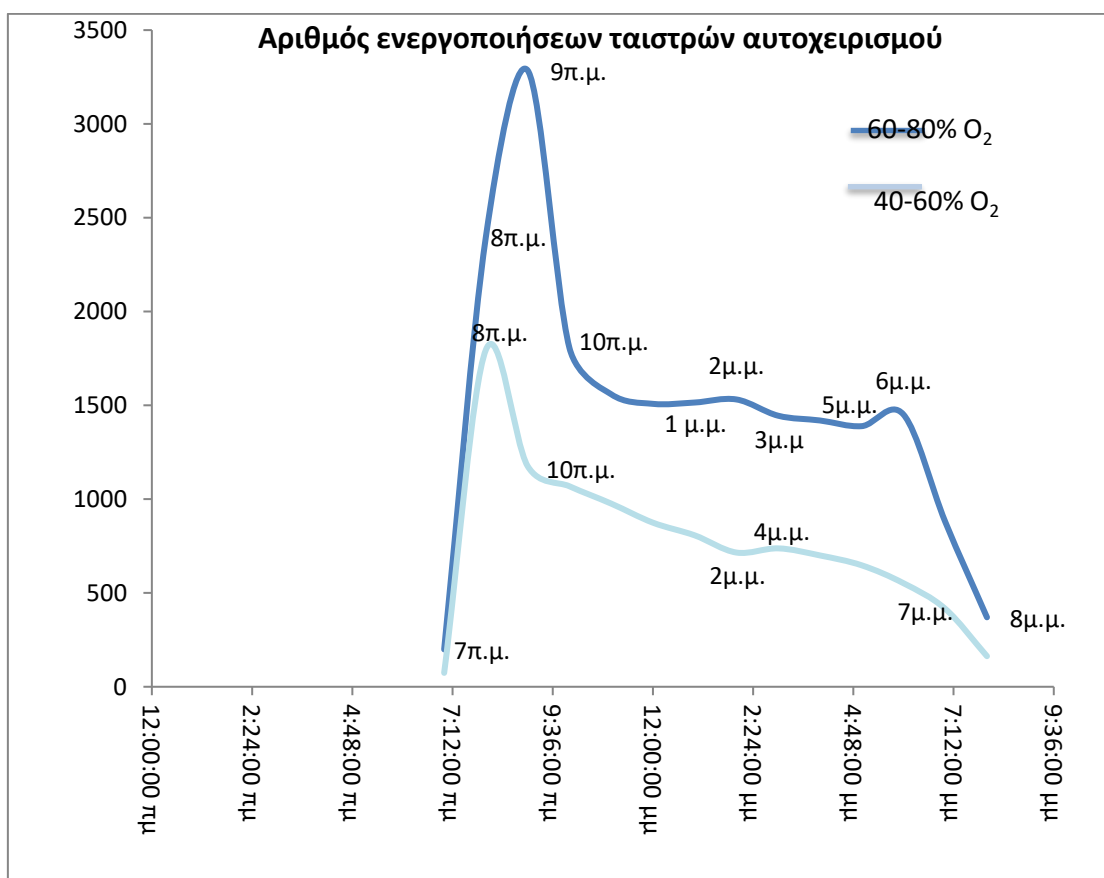


Ανάλυση διακύμανσης κατά δύο παράγοντες	
Τρόπος ταΐσματος	P=0.074
Επίπεδο οξυγόνου	P=0.936
Αλληλεπίδραση δύο παραγόντων	P=0.296

Σχήμα 35. Παρουσιάζεται η διακύμανση του ποσοστού ενέργειας της ολικής ξηρής ουσίας σε σχέση με τα διαφορετικά επίπεδα του O₂ και την μεθοδολογία ταΐσματος που χρησιμοποιήθηκε. Στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεθοδολογιών για το κάθε επίπεδο O₂ που χρησιμοποιήθηκε περιγράφονται με τους λατινικούς έκθετες a,b. Αντίστοιχα στην περίπτωση που υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων O₂ για κάθε μεθοδολογία ταΐσματος περιγράφονται με αστερίσκο (*). Στον πίνακα εμφανίζεται το p-value σε κάθε περίπτωση (Two-way ANOVA, Tukey-test, p<0.05).

3.5. Αποτελέσματα ανάλυσης συμπεριφοράς

Στο σχήμα 36 παρουσιάζεται το πρότυπο διατροφικής συμπεριφοράς με τη μέθοδο ταΐσματος με ταΐστρες αυτοχειρισμού self feeder σε διαφορετικά επίπεδα O₂. Οι τιμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο από τις τρεις δεξαμενές του συνόλου των χτυπημάτων καθόλη την πειραματική περίοδο καθόλη τη διάρκεια της ημέρας. Παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,003) στον ημερήσιο αριθμό των ενεργοποιήσεων των ταϊστρών στα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου, παρουσιάζοντας αυξημένη δραστηριότητα στα υψηλά επίπεδα οξυγόνου 60-80%.



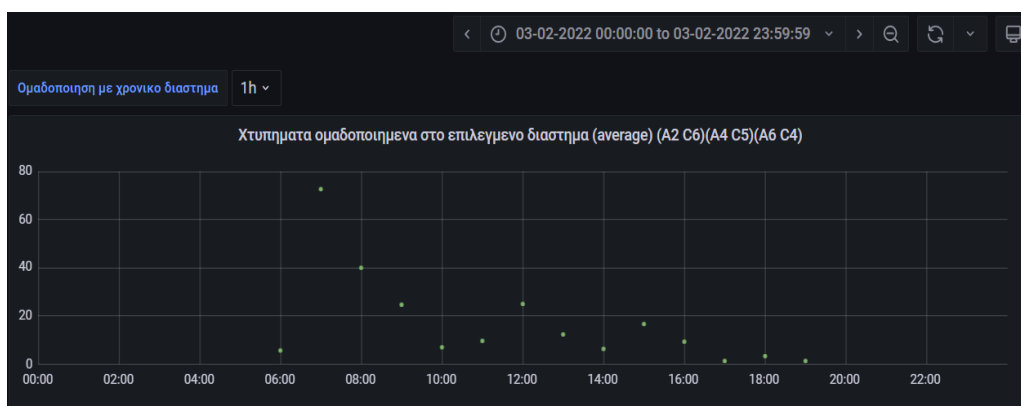
Σχήμα 36. Συνολικός αριθμός ενεργοποιήσεων των ταϊστρών αυτοχειρισμού

Παρατηρήθηκε ότι τα ψάρια είχαν έντονη δραστηριότητα με το πρώτο φως της ημέρας και στα δύο επίπεδα οξυγόνου. Οπτικά φαινόταν ότι τα ψάρια πριν ξεκινήσουν να σιτίζονται στα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου 40-60% είχαν πολύ μεγαλύτερη δραστηριότητα, αλλά παρόλα αυτά η όρεξή τους για τροφή μειωνόταν πιο γρήγορα σε μικρότερο χρονικό διάστημα και σε κατανάλωση τροφής από ότι στα υψηλότερα επίπεδα οξυγόνου 60-80%. Ο αριθμός των ενεργοποιήσεων αυξανόταν με τη μέγιστη ενεργοποίηση τρεις ώρες μετά την έναρξη της δραστηριότητας για το υψηλό επίπεδο οξυγόνου, ενώ στα χαμηλό επίπεδο οξυγόνου η δραστηριότητα κορυφώθηκε μία ώρα μετά την πρώτη ενεργοποίηση και μετά ακολούθησε πτώση για διάστημα μιας ώρας.

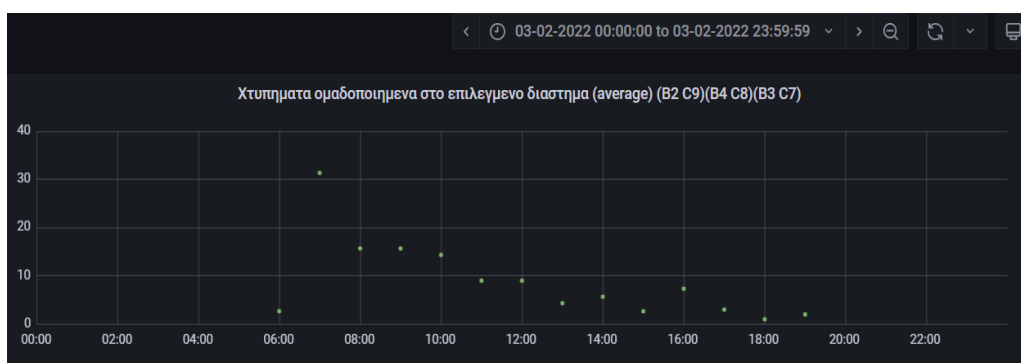
Για το υψηλό επίπεδο οξυγόνου, δύο ώρες μετά την σταθεροποίηση της πτώσης οι ενεργοποιήσεις έμειναν σταθερές για δύο ώρες και μετά παρουσιάστηκε μια μικρή αύξηση των ενεργοποιήσεων δύο φορές διάρκεια, μια ώρα η καθεμία στις 13:00 και στις 17:00. Έπειτα ακολουθούσε έντονη πτώση μέχρι να νυχτώσει. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με παρόμοια μελέτη που έγινε στην τσιπούρα με σύστημα σίτισης κατά απαίτηση, το οποίο βρισκόταν σε ενεργοποίηση τρεις φορές τη μέρα (Velázquez, M., *et al.*, 2006), ενώ δεν συμφωνούν με αντίστοιχη μελέτη των Velázquez, M., *et al.*, (2004) όπου έδειξαν ότι η τσιπούρα κατά τη διάρκεια του Ιουλίου προτιμούσε να τρώει τις μεσημεριανές ώρες σε φυσική διακύμανση θερμοκρασίας 22,5-24°C.

Για το χαμηλό επίπεδο οξυγόνου ακολούθησε μία πτωτική ενεργοποίηση από τις 10:00 έως τις 14:00. Από τις 14:00 έως τις 16:00 παρουσιάστηκε αυξημένη δραστηριότητα και έπειτα ακολούθησε πτωτική πορεία μέχρι τις 20:00.

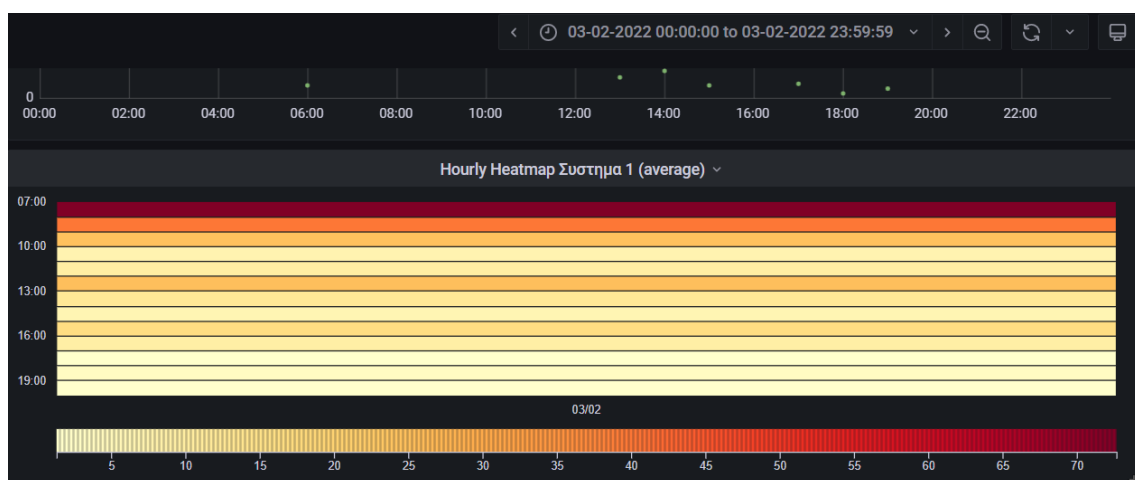
Στη μέθοδο ταΐσματος με το χέρι η ποσότητα τροφής για το επίπεδο οξυγόνου 60-80% ήταν 1,6% του συνολικού σωματικού βάρους και για το επίπεδο οξυγόνου 40-60% ήταν 1,43%. Η καταναλωθείσα ποσότητα τροφής υπολογίστηκε ότι το 60% αποτέλεσε το πρώτο τάισμα και το υπόλοιπο 40% το δεύτερο τάισμα. Τα ποσοστά τροφοληψίας για τη μέθοδο ταΐσματος με τις ταΐστρες αυτοχειρισμού ήταν 1,65% για το επίπεδο 60-80% και 1,31% για το επίπεδο 40-60%. Στις εικόνες 14,15,16 και 17 απεικονίζονται οι ενεργοποιήσεις των ταιστρών αυτοχειρισμού self feeder στα δύο επίπεδα οξυγόνου, κατά τη διάρκεια μια ημέρας.



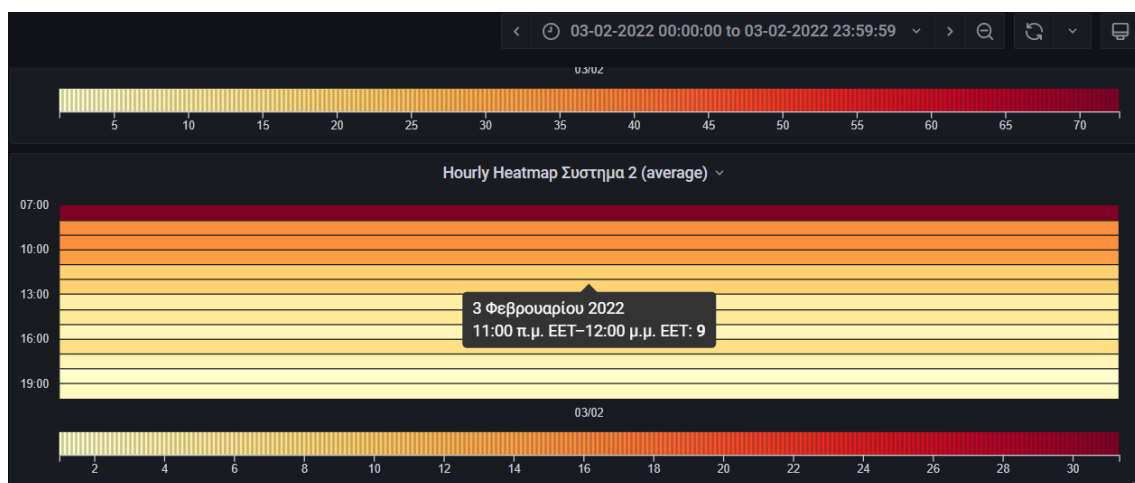
Εικόνα 14. Παρουσιάζεται ο αριθμός ενεργοποιήσεων στη συνθήκη 60-80% O₂ τη διάρκεια της μέρας μέσω του συστήματος Grafana



Εικόνα 15. Παρουσιάζεται ο αριθμός των ενεργοποιήσεων στη συνθήκη 40-60% O₂ τη διάρκεια της μέρας μέσω του συστήματος Grafana



Εικόνα 16. Παρουσιάζεται χρωματική απεικόνιση (heatmap) των ενεργοποιήσεων στη συνθήκη 60-80% O₂ τη διάρκεια μιας μέρας μέσω του συστήματος Grafana



Εικόνα 17. Παρουσιάζεται χρωματική απεικόνιση (heatmap) των ενεργοποιήσεων στη συνθήκη 40-60% O₂ τη διάρκεια μιας μέρας μέσω του συστήματος Grafana

Οι μηχανές αυτοτροφοδοσίας self-feeder, έχουν παρουσιάσει μεγαλύτερο ενδιαφέρον, καθώς δίνεται η ευκαιρία στα ψάρια να επιλέξουν μόνα τους την ποσότητα τροφής και τον ημερήσιο ρυθμό ταΐσματος (Kentouri et al., 1994). Η σίτιση με ζήτηση έχει αποδειχθεί χρήσιμη για την παραγωγή τσιπούρας (Paspatis et al., 2000, Sánchez-Muros et al., 2003), και τη μελέτη της συμπεριφοράς τους στη διατροφή (Velázquez et al., 2004). Οι Paspatis et al. 2000 απέδειξαν ότι υπάρχει μια κληρονομική επίδραση

στην τσιπούρα από το γονιδίωμα των γονέων, που συνδέεται άμεσα με την έκφραση σίτισης και τη δραστηριότητα διατροφής της.

Από συγκριτική μελέτη στρατηγικών μεθόδων σίτισης που έγινε σε κλειστά κυκλώματα εκτροφής με ιχθύδια τσιπούρας, φάνηκε ότι τα ποσοστά απέκκρισης αμμωνίας ήταν υψηλότερα με τη στρατηγική χειροκίνητης σίτισης σε σχέση με τη στρατηγική αυτόματης ζήτησης, ενώ παράλληλα υπήρξε σημαντικά μεγαλύτερος ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου όταν η τροφή διανεμόταν από τροφοδότες αυτόματης ζήτησης, προφανώς λόγω της υψηλότερης πρόσληψης τροφής και της αυξημένης κατανάλωσης ενέργειας (Godoy-Olmos *et al.*, 2022).

Η τσιπούρα παρατηρήθηκε ότι μπορεί πολύ εύκολα να χρησιμοποιήσει συστήματα αυτοτροφοδότησης και να επιλέξει μια δίαιτα με τα περισσότερα γεύματα χρησιμοποιώντας αισθητήρια οσφρητικά ή γευστικά (Puchol, S., *et al.*, 2022). Παρόλο του ότι η τσιπούρα ανταποκρίνεται εύκολα να χειριστεί τα αυτοτροφοδοτούμενα συστήματα, υπάρχουν αναφορές ότι υπήρξε βελτιωμένη ανάπτυξη όταν ταΐστηκαν με το χέρι από ότι με τα self-feeder (Arechavala-Lopez *et al.*, 2020) σε διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής, που σημαίνει και διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου. Βρέθηκε λοιπόν μικρότερος χρόνος απόκρισης της τσιπούρας με χειροκίνητο τάισμα σε σύγκριση με τα ψάρια αυτοτροφοληψίας, οπότε ενισχύεται η ιδέα του χειροκίνητου ταΐσματος ως την καλύτερη στρατηγική για την κάλυψη των ενεργειακών απαιτήσεων της τσιπούρας σε συνθήκες εκτροφής. Ωστόσο, οι Herrera *et al.* (2014) βρήκαν μια έντονη ατομική διακύμανση στον ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου που υποδηλώνει ότι κάθε άτομο τσιπούρας αντιδρούσε διαφορετικά όταν βρισκόταν σε συνθήκες περιορισμού, διότι τα άτομα που αναλαμβάνουν κινδύνους είναι πιο δραστήρια και καταναλώνουν περισσότερο οξυγόνο σε σύγκριση με τα άτομα που αποφεύγουν τον

κίνδυνο. Οι Yilmaz *et al.* (2011) μελέτησαν τη συχνότητα τροφοδοσίας της τσιπούρας και συμπέραναν ότι μπορεί να επηρεάσει την κατανάλωση του οξυγόνου, παρατηρώντας μεγαλύτερη κατανάλωση οξυγόνου στις ομάδες ψαριών που δεν τρέφονταν συχνά και με επαρκή ποσότητα τροφής και αυτό ίσως να οφείλεται στην αυξημένη δραστηριότητα των ψαριών για αναζήτηση τροφής.

Οι σχέσεις μεταξύ συμπεριφορικών και φυσιολογικών μεταβλητών είναι σημαντικές, υποδηλώνοντας την ύπαρξη διαφορετικών μορφών αντιμετώπισης στην τσιπούρα (Herrera *et al.*, 2014).

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μέθοδος χορήγησης τροφής επηρέασε την τσιπούρα με διαφορετικό τρόπο στα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου. Στο επίπεδο οξυγόνου 60-80% η μέθοδος χορήγησης τροφής επηρέασε

- την εναπόθεση λίπους στο συκώτι και το πάχος των τοιχωμάτων του οπίσθιου εντέρου παρουσιάζοντας αυξημένες τιμές με τη χρήση self feeder. Επίσης η σίτιση με self feeder στο επίπεδο οξυγόνου 60-80%
- μείωσε την υγρασία της σύστασης σώματος στην τσιπούρα
- Οι δείκτες αύξησης δεν επηρεάστηκαν από τη διαφορετική μέθοδο χορήγησης τροφής στο επίπεδο οξυγόνου 60-80% στην τσίπυρα.

Στο επίπεδο οξυγόνου 40-60% η μέθοδος χορήγησης τροφής επηρέασε

- το συντελεστή μετατρεψιμότητας (FCR) και την απόδοση τροφής (feed efficiency), με θετική επίδραση στην τσιπούρα από τη σίτιση με ταΐστρες αυτοχειρισμού.
- Παράλληλα η διαφορετική μέθοδος ταΐσματος στο επίπεδο οξυγόνου 40-60% διαφοροποίησε την εναπόθεση λίπους στο συκώτι,
- την εικόνα των βραγχίων και το πάχος των τοιχωμάτων του οπίσθιου τμήματος του εντέρου, παρουσιάζοντας θετική επίδραση με τη χρήση ταϊστών αυτοχειρισμού.
- Η σίτιση με self feeder μείωσε την υγρασία και το ποσοστό τέφρας στη σύσταση σώματος.

Τα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου επηρέασαν τη συμπεριφορά, την τροφοληψία, την αύξηση, την φυσιολογία και τη σύσταση σώματος της τσιπούρας και με τις δύο

μεθόδους χορήγησης τροφής. Επιπλέον μελέτη θα ήταν χρήσιμη για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου χορήγησης της τροφής στα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνου, έτσι ώστε η εκτροφή της τσιπούρας να αποδώσει μεγαλύτερο κέρδος σε όγκο παραγωγής, αξία και ποιότητα τελικού προϊόντος στην αγορά.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdel-Tawwab, M., Hagra, A. E., Elbaghdady, H. A. M., & Monier, M. N. (2015). Effects of dissolved oxygen and fish size on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): growth performance, whole-body composition, and innate immunity. *Aquaculture International*, 23, 1261-1274.
- Ang K. P., Petrell R. J. (1998). Pellet wastage, and subsurface and surface feeding behaviours associated with different feeding systems in sea cage farming of salmonids. *Aquacultural engineering* 18:95-115.
- Aranda, A., Sánchez-Vázquez, F. J., Zamora, S., & Madrid, J. A. (2000). Self-design of fish diets by means of self-feeders: validation of procedures. *Journal of physiology and biochemistry*, 56(3), 155-166.
- Araújo-Luna, R., Ribeiro, L., Bergheim, A., & Pousão-Ferreira, P. (2018). The impact of different rearing condition on gilthead seabream welfare: dissolved oxygen levels and stocking densities. *Aquaculture Research*, 49(12), 3845-3855.
- Arechavala-Lopez, P., Nazzaro-Alvarez, J., Jardí-Pons, A., Reig, L., Carella, F., Carrassón, M., & Roque, A. (2020). Linking stocking densities and feeding strategies with social and individual stress responses on gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Physiology & behavior*, 213, 112723
- Azzaydi, M., Martinez, F. J., Zamora, S., Sánchez-Vázquez, F. J., & Madrid, J. A. (1999). Effect of meal size modulation on growth performance and feeding rhythms in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture*, 170(3-4), 253-266.
- Bagni, M., Civitareale, C., Priori, A., Ballerini, A., Finoia, M., Brambilla, G., & Marino, G. (2007). Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 263(1-4), 52-60.
- Basto-Silva, C., Enes, P., Oliva-Teles, A., Capilla, E., & Guerreiro, I. (2022). Dietary protein/carbohydrate ratio and feeding frequency affect feed utilization, intermediary metabolism, and economic efficiency of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 554, 738182.

- Basurco, B. (1999). Finfish species diversification in the context of Mediterranean marine fish farming development. *Marine Finfish Species Diversification: Current Situation and Prospects in Mediterranean Aquaculture*, 24, 9-25.
- Bennett, H. S., Wyrick, A. D., Lee, S. W., & McNeil, J. H. (1976). Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Stain technology*, 51(2), 71-97.
- Blank, T., & Burggren, W. (2014). Hypoxia-induced developmental plasticity of the gills and air-breathing organ of *Trichopodus trichopterus*. *Journal of Fish Biology*, 84(3), 808-826.
- Boujard, T., Jourdan, M., Kentouri, M., & Divanach, P. (1996). Diel feeding activity and the effect of time-restricted self-feeding on growth and feed conversion in European sea bass. *Aquaculture*, 139(1-2), 117-127.
- Brauner, C. J., & Richards, J. G. (2020). Physiological performance in aquaculture: Using physiology to help define optimal conditions for growth and environmental tolerance. In *Fish physiology* (Vol. 38, pp. 83-121). Academic Press.
- Busti, S., Bonaldo, A., Dondi, F., Cavallini, D., Yúfera, M., Gilannejad, N., .. & Parma, L. (2020). Effects of different feeding frequencies on growth, feed utilisation, digestive enzyme activities and plasma biochemistry of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with different fishmeal and fish oil dietary levels. *Aquaculture*, 529, 735616.
- Chen, X., Liu, S., Ding, Q., Teame, T., Yang, Y., Ran, C., .. & Zhou, Z. (2023). Research advances in the structure, function, and regulation of the gill barrier in teleost fish. *Water Biology and Security*, 100139.
- Chen, Y. H., Shiu, J. R., Ho, C. L., & Jeng, S. S. (2017). Zinc as a signal to stimulate red blood cell formation in fish. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 138.
- Cho, C. Y., & Bureau, D. P. (2001). A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquaculture research*, 32, 349-360.

- Claireaux, G., & Chabot, D. (2016). Responses by fishes to environmental hypoxia: integration through Fry's concept of aerobic metabolic scope. *Journal of Fish Biology*, 88(1), 232-251.
- Claireaux, G., & Lagardère, J. P. (1999). Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. *Journal of Sea Research*, 42(2), 157-168.
- Claireaux, G., Webber, D. M., Lagardère, J. P., & Kerr, S. R. (2000). Influence of water temperature and oxygenation on the aerobic metabolic scope of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Sea Research*, 44(3-4), 257-265.
- Covès, D., Beauchaud, M., Attia, J., Dutto, G., Bouchut, C., & Begout, M. L. (2006). Long-term monitoring of individual fish triggering activity on a self-feeding system: An example using European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 253(1-4), 385-392.
- Cutts, C. J., Metcalfe, N. B., & Taylor, A. C. (1998). Aggression and growth depression in juvenile Atlantic salmon: the consequences of individual variation in standard metabolic rate. *Journal of Fish Biology*, 52(5), 1026-1037.
- Daudpota, A. M., Abbas, G., Kalhor, I. B., Shah, S. S. A., Kalhor, H., Hafeez-ur-Rehman, M., & Ghaffar, A. (2016). Effect of feeding frequency on growth performance, feed utilization and body composition of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) reared in low salinity water. *Pakistan Journal of Zoology*, 48(1).
- Dawood, M. A., & Koshio, S. (2016). Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review. *Aquaculture*, 454, 243-251.
- De Verdal, H., Komen, H., Quillet, E., Chatain, B., Allal, F., Benzie, J. A., & Vandeputte, M. (2018). Improving feed efficiency in fish using selective breeding: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 833-851.
- Dominguez, D., Sehnine, Z., Castro, P., Zamorano, M. J., Robaina, L., Fontanillas, R., .. & Izquierdo, M. (2020). Dietary manganese levels for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fingerlings fed diets high in plant ingredients. *Aquaculture*, 529, 735614.

- Farrell, A. P., & Richards, J. G. (2009). Defining hypoxia: an integrative synthesis of the responses of fish to hypoxia. In *Fish physiology* (Vol. 27, pp. 487-503). Academic Press.
- Gamperl, A. K., Ajiboye, O. O., Zanuzzo, F. S., Sandrelli, R. M., Ellen de Fátima, C. P., & Beemelmans, A. (2020). The impacts of increasing temperature and moderate hypoxia on the production characteristics, cardiac morphology and haematology of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 519, 734874.
- Gan, L., Liu, Y. J., Tian, L. X., Yue, Y. R., Yang, H. J., Liu, F. J., ... & Liang, G. Y. (2013). Effects of dissolved oxygen and dietary lysine levels on growth performance, feed conversion ratio and body composition of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Aquaculture Nutrition*, 19(6), 860-869.
- Gilannejad, N., Moyano, F. J., Martínez-Rodríguez, G., & Yúfera, M. (2021). The digestive function of gilthead seabream juveniles in relation to feeding frequency. *Aquaculture*, 531, 735867.
- Gilannejad, N., Silva, T., Martínez-Rodríguez, G., & Yúfera, M. (2019). Effect of feeding time and frequency on gut transit and feed digestibility in two fish species with different feeding behaviours, gilthead seabream and Senegalese sole. *Aquaculture*, 513, 734438.
- Gilannejad, N., Silva, T., Martínez-Rodríguez, G., & Yúfera, M. (2019). Effect of feeding time and frequency on gut transit and feed digestibility in two fish species with different feeding behaviours, gilthead seabream and Senegalese sole. *Aquaculture*, 513, 734438.
- Gilannejad, N., Silva, T., Martínez-Rodríguez, G., & Yúfera, M. (2019). Effect of feeding time and frequency on gut transit and feed digestibility in two fish species with different feeding behaviours, gilthead seabream and Senegalese sole. *Aquaculture*, 513, 734438.
- Godoy-Olmos, S., Jauralde, I., Monge-Ortiz, R., Milián-Sorribes, M. C., Jover-Cerdá, M., Tomás-Vidal, A., & Martínez-Llorens, S. (2022). Influence of diet and feeding strategy on the performance of nitrifying trickling filter, oxygen consumption and ammonia excretion of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) raised in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture International*, 30(2), 581-606.

- Heilman, M. J., & Spieler, R. E. (1999). The daily feeding rhythm to demand feeders and the effects of timed meal-feeding on the growth of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. *Aquaculture*, 180(1-2), 53-64.
- Herrera, M., Castanheira, M. F., Conceição, L. E., & Martins, C. I. (2014). Linking risk taking and the behavioral and metabolic responses to confinement stress in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Applied Animal Behaviour Science*, 155, 101-108.
- Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V. A., Kadri, S., Pottinger, T. G., Sandøe, P., & Turnbull, J. F. (2006). Current issues in fish welfare. *Journal of fish biology*, 68(2), 332-372..
- Ibarz, A., Fernández-Borràs, J., Blasco, J., Gallardo, M. A., & Sánchez, J. (2003). Oxygen consumption and feeding rates of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) reveal lack of acclimation to cold. *Fish Physiology and Biochemistry*, 29(4), 313-321.
- Kaushik, S. J., & Médale, F. (1994). Energy requirements, utilization and dietary supply to salmonids. *Aquaculture*, 124(1-4), 81-97.
- Kilpatric (1991). An investigation into the effects of ration size on the growth performance of hand fed sea bass juveniles *Dicentrarchus labrax* comparing the results obtained to a demand-feeding strategy. M.Sc. Thesis, St. Andrew's University (1991), p. 36
- Kimura, R., Kawaguchi, S., & Sugitani, S. (2020). Automatic feeding control system for fish. In *Fish farming technology* (pp. 217-225). CRC Press.
- Knoop, K. A., & Newberry, R. D. (2018). Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. *Mucosal immunology*, 11(6), 1551-1557.
- Kramer, D. L., & Bryant, M. J. (1995). Intestine length in the fishes of a tropical stream: 2. Relationships to diet—the long and short of a convoluted issue. *Environmental biology of fishes*, 42, 129-141.
- Li, D., Wang, Z., Wu, S., Miao, Z., Du, L., & Duan, Y. (2020). Automatic recognition methods of fish feeding behavior in aquaculture: a review. *Aquaculture*, 528, 735508.

- Liu, F. G., & Liao, I. C. (1999). Effect of feeding regimen on the food consumption, growth, and body composition in hybrid striped bass *Morone saxatilis* × *M. chrysops*. *Fisheries science*, 65(4), 513-519.
- Lu, Z., Huang, W., Wang, S., Shan, X., Ji, C., & Wu, H. (2020). Liver transcriptome analysis reveals the molecular responses to low-salinity in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Aquaculture*, 517, 734827.
- Martínez-Llorens, S., Baeza-Ariño, R., Nogales-Mérida, S., Jover-Cerdá, M., & Tomás-Vidal, A. (2012). Carob seed germ meal as a partial substitute in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Amino acid retention, digestibility, gut and liver histology. *Aquaculture*, 338, 124-133.
- Martos-Sitcha, J. A., Bermejo-Nogales, A., Calduch-Giner, J. A., & Pérez-Sánchez, J. (2017). Gene expression profiling of whole blood cells supports a more efficient mitochondrial respiration in hypoxia-challenged gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Frontiers in zoology*, 14(1), 1-12.
- Mayer, P., Estruch, V. D., & Jover, M. (2012). A two-stage growth model for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) based on the thermal growth coefficient. *Aquaculture*, 358, 6-13.
- McNicholl, C., Oberhaensli, F., Taylor, A., Holmerin, I., Swarzenski, P. W., & Metian, M. (2021). Deoxygenation reduces growth rates and increases assimilation of essential trace metals in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Environmental Pollution*, 288, 117786.
- Montoya, A., López-Olmeda, J. F., Yúfera, M., Sánchez-Muros, M. J., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2010). Feeding time synchronises daily rhythms of behaviour and digestive physiology in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 306(1-4), 315-321.
- Naya-Català, F., Martos-Sitcha, J. A., de Las Heras, V., Simó-Mirabet, P., Calduch-Giner, J. À., & Pérez-Sánchez, J. (2021). Targeting the mild-hypoxia driving force for metabolic and muscle transcriptional reprogramming of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Biology*, 10(5), 416.
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Buschmann, A. H., Bush, S. R., Cao, L., Klinger, D. H., .. & Troell, M. (2021). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, 591(7851), 551-563.

- Neill, W. H., Miller, J. M., Van Der Veer, H. W., & WINEMILLER, K. O. (1994). Ecophysiology of marine fish recruitment: a conceptual framework for understanding interannual variability. *Netherlands Journal of Sea Research*, 32(2), 135-152.
- Oh, S. Y., & Maran, B. V. (2015). Feeding frequency influences growth, feed consumption and body composition of juvenile rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture international*, 23, 175-184.
- Papadakis, I. E., Zaiss, M. M., Kyriakou, Y., Georgiou, G., Divanach, P., & Mylonas, C. C. (2009). Histological evaluation of the elimination of *Artemia* nauplii from larval rearing protocols on the digestive system ontogeny of shi drum (*Umbrina cirrosa* L.). *Aquaculture*, 286(1-2), 45-52.
- Papadakis, V. M., Glaropoulos, A., Alvanopoulou, M., & Kentouri, M. (2016). A behavioural approach of dominance establishment in tank-held sea bream (*Sparus aurata* L.) under different feeding conditions. *Aquaculture Research*, 47(12), 4015-4023.
- Papaharisis, L., Tsironi, T., Dimitroglou, A., Taoukis, P., & Pavlidis, M. (2019). Stress assessment, quality indicators and shelf life of three aquaculture important marine fish, in relation to harvest practices, water temperature and slaughter method. *Aquaculture Research*, 50(9), 2608-2620.
- Paspatis, M., Maragoudaki, D., & Kentouri, M. (2000). Self-feeding activity patterns in gilthead sea bream (*Sparus aurata*), red porgy (*Pagrus pagrus*) and their reciprocal hybrids. *Aquaculture*, 190(3-4), 389-401.
- Person-Le Ruyet, J., & Le Bayon, N. (2009). Effects of temperature, stocking density and farming conditions on fin damage in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources*, 22(3), 349-362.
- Pichavant, K., Person-Le-Ruyet, J., Bayon, N. L., Severe, A., Roux, A. L., & Boeuf, G. (2001). Comparative effects of long-term hypoxia on growth, feeding and oxygen consumption in juvenile turbot and European sea bass. *Journal of Fish Biology*, 59(4), 875-883.
- Pörtner, H. O., Bock, C., & Mark, F. C. (2017). Oxygen-and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology. *Journal of Experimental Biology*, 220(15), 2685-2696.

- Puchol, S., Leal, E., Angotzi, R., Rosel, J., Morais, S., & Cerdá-Reverter, J. M. (2022). Dietary discrimination using a dual-choice self-feeding system in seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 559, 738449.
- Requena, A., Fernandez-Borras, J., & Planas, J. (1997). The effects of a temperature rise on oxygen consumption and energy budget in gilthead sea bream. *Aquaculture International*, 5(5), 415-426
- Samaras, A., Tsoukali, P., Katsika, L., Pavlidis, M., & Papadakis, I. E. (2022). Chronic impact of exposure to low dissolved oxygen on the physiology of *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* and its effects on the acute stress response. *Aquaculture*, 738830.
- Sanchez-Muros, M. J., Corchete, V., Suarez, M. D., Cardenete, G., Gomez-Milan, E., & De la Higuera, M. (2003). Effect of feeding method and protein source on *Sparus aurata* feeding patterns. *Aquaculture*, 224(1-4), 89-103.
- Serpa, D., Ferreira, P. P., Ferreira, H., da Fonseca, L. C., Dinis, M. T., & Duarte, P. (2013). Modelling the growth of white seabream (*Diplodus sargus*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) in semi-intensive earth production ponds using the Dynamic Energy Budget approach. *Journal of sea research*, 76, 135-145.
- Sitjà-Bobadilla, A., Mingarro, M., Pujalte, M. J., Garay, E., Alvarez-Pellitero, P., & Pérez-Sánchez, J. (2003). Immunological and pathological status of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) under different long-term feeding regimes. *Aquaculture*, 220(1-4), 707-724.
- Stake, P. E., Fredrickson, T. N., & Bourdeau, C. A. (1981). Induction of fatty liver-hemorrhagic syndrome in laying hens by exogenous β -estradiol. *Avian diseases*, 410-422.
- Spisni, E., Tugnoli, M., Ponticelli, A., Mordenti, T., & Tomasi, V. (1998). Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. *Journal of Fish Diseases*, 21(3), 177-184.
- Tacon, A. G., & Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285(1-4), 146-158.

- Thetmeyer, H., Waller, U., Black, K. D., Inselmann, S., & Rosenthal, H. (1999). Growth of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under hypoxic and oscillating oxygen conditions. *Aquaculture*, 174(3-4), 355-367.
- Thorpe, J. E., & Cho, C. Y. (1995). Minimising waste through bioenergetically and behaviourally based feeding strategies. *Water Science and Technology*, 31(10), 29-40.
- Velázquez, M., Zamora, S., & Martínez, F. J. (2004). Influence of environmental conditions on demand-feeding behaviour of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Applied Ichthyology*, 20(6), 536-541.
- Velázquez, M., Zamora, S., & Martínez, F. J. (2006). Effect of different feeding strategies on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) demand-feeding behaviour and nutritional utilization of the diet. *Aquaculture Nutrition*, 12(6), 403-409.
- Wang, L., Zhang, W., Gladstone, S., Ng, W. K., Zhang, J., & Shao, Q. (2019). Effects of isoenergetic diets with varying protein and lipid levels on the growth, feed utilization, metabolic enzymes activities, antioxidative status and serum biochemical parameters of black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*). *Aquaculture*, 513, 734397.
- Wang, Y., Xie, S., Nie, Z., Li, Q., Sun, Y., Shao, N., ... & Xu, G. (2020). Optimum feeding frequency of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) reared in in-pond raceway recirculating culture system. *Fish physiology and biochemistry*, 46, 2197-2212.
- Yamamoto, T., Shima, T., Furuita, H., & Suzuki, N. (2002). Influence of feeding diets with and without fish meal by hand and by self-feeders on feed intake, growth and nutrient utilization of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 214(1-4), 289-305.
- Yang, E. J., Zhang, J. D., Yang, L. T., Amenyogbe, E., Wang, W. Z., Huang, J. S., & Chen, G. (2021). Effects of hypoxia stress on digestive enzyme activities, intestinal structure and the expression of tight junction proteins coding genes in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture Research*, 52(11), 5630-5641.

- Yeoh, S. J., Taip, F. S., Endan, J., Talib, R. A., & Mazlina, M. S. (2010). Development of automatic feeding machine for aquaculture industry. *Pertanika J. Sci. & Technol*, 18(1), 105-110.
- Yilmaz, H. A., & Eroldogan, O. T. (2011). Combined effects of cycled starvation and feeding frequency on growth and oxygen consumption of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(4), 522-529.
- Yukinori, N., Hiroaki, I., Seiji, S., & Masatoshi, I. (2016). Reconstruction of cellular shape deformation through contraction of cortex actomyosin. *Protistology*, 10(2), 53-53.
- Zhou, C., Xu, D., Lin, K., Sun, C., & Yang, X. (2018). Intelligent feeding control methods in aquaculture with an emphasis on fish: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 975-993.

Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

https://www.researchgate.net/figure/The-Five-Freedoms-of-Animal-Welfare-FAWC-1996-and-the-indicators-used-to-assess_tbl1_271069082
<https://www.fgm.com.gr/>
<https://www.fao.org/fishery/en/global-search?q=index.htm&lang=en>
<https://www.fao.org/fishery/en/facp/grc?lang=en>
<https://www.fao.org/countryprofiles/index?iso3=GRC>

6. ABSTRACT

Gilthead seabream (*Sparus aurata*) is one of the most important fish in the Mediterranean aquaculture that brings out sustainable growth in the economy. Getting known that feed takes the biggest place in the total cost of culture, a good feeding regime could compromise the efficiency in growth of fish in addition with a profitable cost. During summer in aquaculture farms, cultured fish that already are cultured in high densities as cause of high demand, dissolved oxygen level is decreased. As it is known dissolved oxygen is one of the most interesting factor that affects growth, behavior and physiology of fish.

This project aimed to study two different feeding regimes under different oxygen saturation in Seabream, investigating fish behavior, growth performance, physiology and final product of Seabream. The experiment was conducted in Aqualabs facilities of the Institute of Marine Research (Heraklion, Greece). Hand feeding and automatic self feeder system in demand were studied in 60-80% and 40-60% ranges of dissolved oxygen. Four treatments in triplicate groups were conducted under recirculation system (RAS), full controlled by oxygen system.

Feeding requirement in quantity and time of preference were observed in Seabream. Different feeding regimes affected the percentage of lipid area in liver, the external and internal thickness of digestive intestine and the dry matter of whole body analysis in both oxygen saturation ranges, without affecting the growth performance. Self feeder feeding had a positive effect in feed conversion ratio (FCR) and feed efficiency under low oxygen saturation range. Feeding regime differsified the dry matter of ash under low oxygen saturation range.

Oxygen factor affected growth indices, gut length, lipid area covered, internal thickness of anterior intestine, internal and external thickness of digestive intestine and the protein percentage in whole body analysis in Seabream.

Keywords: seabream, feeding regime, oxygen saturation range

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις πειραματικές δεξαμενές του τμήματος Συμπεριφοράς Ιχθύων στις εγκαταστάσεις του τμήματος Υδατοκαλλιεργειών Aqualabs του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών (Ι.ΘΑ.Β.Β.ΥΚ) στο Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) στις Γούρνες Ηρακλείου Κρήτης, στο πλαίσιο του προγράμματος «Διαχείριση οξυγόνου σε κλωβούς εκτροφής ιχθυοκαλλιέργειας για μεγιστοποίηση των παραγωγικών αποδόσεων» και χρηματοδοτήθηκε από το ΕΣΠΑ 2014-20.

Το σύστημα οξυγόνου αποτέλεσε χρηματοδοτούμενο εξοπλισμό για το ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. και εγκαταστάθηκε από την εταιρεία Stavras, με έδρα την Κύπρο για να υποστηρίξει τις ανάγκες του προγράμματος.

Οι ταΐστρες αυτοχειρισμού (self feeder) αποτέλεσαν εμπνευσμένη ιδέα του Δρ. Παπαδάκη Ιωάννη στο πρόγραμμα «Διαχείριση οξυγόνου σε κλωβούς εκτροφής ιχθυοκαλλιέργειας για μεγιστοποίηση των παραγωγικών αποδόσεων». Σχεδιάστηκε και εκτελέστηκε κατασκευαστικά από τον εξωτερικό συνεργάτη κ. Πιπεράκη Γιώργο σε συνεργασία με τον εργαζόμενο κ. Βασιλάκη Μανώλη για την ηλεκτρονική υποστήριξη και προγραμματισμό του συστήματος.

Η διαδικασία της ιστολογικής επεξεργασίας δειγμάτων διενεργήθηκε στο εργαστήριο Αναπαραγωγής και Φυσιολογίας του τμήματος Γεννητόρων με υπεύθυνο τον Δρ. Μυλωνά Κωνσταντίνο και επιβλέπων της εργασίας τον Δρ. Παπαδάκη Ιωάννη.

Η διαδικασία παρατήρησης ιστολογικών τομών στο μικροσκόπιο, φωτογράφισης και ανάλυσης εικόνας πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Οντογένεσης και Συμπεριφοράς Ιχθύων με υπεύθυνο εργαστηρίου και επιβλέπων τον Δρ. Παπαδάκη Ιωάννη.

Όλες οι διαδικασίες ανάλυσης σύστασης σώματος πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Διατροφής & Βιοχημείας με υπεύθυνο τον Δρ. Χατζηφώτη Σταύρο και επιβλέπουσες την Δρ. Μαστοράκη Μαρία και Phd Κατσίκι Λυδία.

Ο αρχικός γόνος αποτέλεσε χορηγία της εταιρίας Forkys στη Σητεία προς το ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Μεταφέρθηκε με τη βοήθεια του εργαζόμενου στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. κ. Σεκέρη Νίκο και προσωπικής συμμετοχής.

Οι εικόνες στις οποίες δεν αναφέρεται πηγή, προέρχονται από προσωπικό αρχείο.