

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ιστολογική ανάλυση του ηπατοπαγκρέατος της τιλάπιας της
Μοζαμβίκης (*Oreochromis mossambicus*) σε δίαιτα με περίσσεια
σιδήρου και καλίου

Αδάμος Ιωάννης

ΒΟΛΟΣ 2024

**<<Ιστολογική ανάλυση του ηπατοπαγκρέατος της τιλάπιας τις
Μοζαμβίκης (*Oreochromis mossambicus*) σε δίαιτα με περίσσεια
σιδήρου και καλίου>>**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1. Παναγιώτης Βερίλλης,** Αναπληρωτής Καθηγητής, Μικροσκοπία και ανάλυση εικόνας στην ιστολογία και στους υδρόβιους οργανισμούς, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων.**
- 2. Καραπαναγιωτίδης Ιωάννης,** Αναπληρωτής Καθηγητής, Διατροφή Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος.**
- 3. Γκολομάζου Ελένη,** Αναπληρωτής Καθηγητής, Προστασία-Ευζωία Ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος.**

Στην οικογένεια μου και στους φίλους μου

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς όλους όσους με υποστήριξαν και με βοήθησαν κατά τη διάρκεια της συγγραφής αυτής της διατριβής.

Πρώτα από όλα, ευχαριστώ τον καθηγητή μου, κ. Παναγιώτη Βερίλλη, για την καθοδήγησή του, την εμπιστοσύνη του και τη συνεχή υποστήριξή του σε αυτό το έργο. Επίσης, εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες προς τους συναδέλφους μου που με βοήθησαν με τις συζητήσεις τις παρατηρήσεις τους και τις συμβουλές τους. Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη στήριξη, την κατανόηση και την ανεκτίμητη υποστήριξή τους κατά τη διάρκεια αυτής της πορείας.

Θέλω επίσης να εκφράσω εκ των προτέρων την ειλικρινή μου εκτίμηση προς τα αξιότιμα μέλη της επιτροπής, για τον χρόνο και την προσοχή που αφιέρωσαν στη διαβούλευση της εργασίας μου. Η προσεκτική τους ανάγνωση, οι πολύτιμες υποδείξεις και οι εύστοχες παρατηρήσεις τους αποτέλεσαν ουσιώδες μέρος της διαδικασίας και τους είμαι ευγνώμων για αυτή την πολύτιμη συνεισφορά.

Τέλος, εκφράζω τις ευχαριστίες μου προς όλους όσους συνέβαλαν με οποιονδήποτε τρόπο στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Περίληψη

Η τιλάπια τις Μοζαμβίκης (*Oreochromis mossambicus*) θεωρείται ένα από τα πιο σημαντικά είδη στον τομέα της υδατοκαλλιέργειας τόσο για την εμπορική της αξία όσο και για την διατροφική. Σε αυτό το πείραμα διερευνήθηκε η ιστολογία του ηπατοπαγκρέατος της τιλάπιας της Μοζαμβίκης (*Oreochromis mossambicus*), εστιάζοντας στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων και των λιποσταγονιδίων με σκοπό την εύρεση των επιδράσεων δύο πολύ σημαντικών θρεπτικών, του σιδήρου (Fe) και του καλίου (K), στο συγκεκριμένο όργανο. Πιο συγκεκριμένα, στο πείραμα συλλέχθηκαν 15 τιλάπιες οι οποίες συμμετείχαν σε πείραμα ενυδρείοπονίας όπου στο νερό συμπληρώνονταν είτε σιδήρος (F), είτε κάλιο και σίδηρος (FK), είτε τίποτα (C). Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι η επιφάνεια των ηπατοκυττάρων ήταν μεγαλύτερη στην F και στην FK σε σχέση με τον μάρτυρα. Όσο για τα λιποσταγονίδια, οι ιχθύες της μεταχείρισης σιδήρου F είχε τα μεγαλύτερα λιποσταγονίδια ενώ οι άλλες δυο, C και FK, είχαν στατιστικά μικρότερα λιποσταγονίδια.

Λέξεις κλειδιά: ιστολογία, ηπατοπάγκρεας, κάλιο, σίδηρος

Πίνακας περιεχομένων

Περιεχόμενα

1.Εισαγωγή	1
1.1) Γενικά χαρακτηριστικά	1
1.2) Ιστορική αναδρομή	5
1.3) Διατροφή	5
1.4) Τρόποι διαφορετικής εκτροφής τιλάπιας	7
1.5) Σίδηρος	8
1.6) Κάλιο	11
1.7) Ιστολογία ηπατοπαγκρέατος	12
1.8) Οικονομική αποτίμηση του είδους	13
2) Μέθοδοι και υλικά	14
2.1) Συλλογή δειγμάτων	14
2.2) Μονιμοποίηση	14
2.3) Ιστοκινέτα	15
2.4) Διαύγεια και εμποτισμός	16
2.5) Έγκλιση	16
2.6) Κόψιμο τομών	17
2.8) Επικάλυψη τομών	19
2.9) Παρατήρηση δειγμάτων	20
2.10) Στατιστική ανάλυση	21
3) Αποτελέσματα-Συζήτηση	23
3.1) Αποτελέσματα	23
3.2) Συζήτηση	31
4) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	36
5) Βιβλιογραφία	37
6) Abstract	41

1.Εισαγωγή

1.1) Γενικά χαρακτηριστικά

Η Τιλάπια της Μοζαμβίκης (*Oreochromis mossambicus* (Peters 1852) (εικόνα 1) είναι ένα από τα πιο γνωστά είδη της οικογένειας Cichlidae, αμέσως μετά από την Τιλάπια του Νείλου (*Oreochromis niloticus*). Είναι ένα αβλαβές είδος για τον άνθρωπο και αποτελεί ένα από τα πιο εμπορικά είδη παγκοσμίως, κυρίως στις περιοχές της Αφρικής και της Ασίας. Επίσης, φημίζεται για την προσαρμοστικότητά της σε ένα ευρύ φάσμα αλατότητας, κάτι που την καθιστά χρήσιμη ως δείκτη ωσμωρυθμιστικών μηχανισμών. Επιπλέον, χρησιμοποιείται για τοξικολογικές έρευνες με σκοπό τη διερεύνηση συσσώρευσης μετάλλων και μεταλλικών νανοσωματιδίων. (Chinnadurai 2022; Villarreal et al. 2014)

Η πλήρης συστηματική κατάταξη του είδους είναι η εξής:

- Βασίλειο: Animalia
- Συνομοταξία: Chordota
- Υποσυνομοταξία: Vertebrata
- Ανθυποσυνομοταξία: Gnathostomata
- Ομοταξία: Osteichthyes
- Υπομοταξία: Actinopterygii
- Υπέρταξη: Teleostei
- Τάξη: Cichliformes
- Υπόταξη: Labroidei
- Οικογένεια: Cichlidae
- Γένος: *Oreochromis*
- Είδος : *Oreochromis mosambicus*

Η Τιλάπια τις Μοζαμβίκης προέρχεται από τα ποταμιά της κεντρικής, νότιας και ανατολικής Αφρικής. Μια από τις βασικές δυσκολίες για την αναγνώριση του είδους είναι η ικανότητα της να διασταυρώνεται με συγγενικά είδη και έτσι αρκετές φορές διαφέρει σε χρωματισμό και μέγεθος. Το ουραίο πτερύγιο φέρει κόκκινο περιθώριο στα ενήλικα ψαριά και χαρακτηρίζεται ως στρογγυλεμένο ενώ το ραχιαίο πτερύγιο ξεκινάει από το ύψος των βραγχίων και εκτείνεται μέχρι και λίγο πριν το ουραίο. Τα άτομα του είδους μπορούν να φτάσουν σε μήκος μέχρι και τα 39 εκατοστά, σε βάρος τα 2 κιλά και έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να ζήσουν μέχρι και 10 χρόνια με μέσο προσδόκιμο ζωής τα 7 χρόνια. Η Τιλάπια τις Μοζαμβίκης φέρει στο ραχιαίο πτερύγιο της 15-18 σκληρές ακτίνες και 10-13 μαλακές. Ακόμη έχει 28-31 σπονδύλους, μακρύ ρύγχος, το οποίο στα ενήλικα αρσενικά είναι πιο μυτερό λόγω των σαγονιών τους και φέρει μεγάλα λέπια στο μέτωπο της. Τα δόντια του φάρυγγα της είναι σχετικά λεπτά σε σύγκριση με άλλα είδη ιχθύων. Επιπλέον, το ουραίο πτερύγιο της παρουσιάζει σχήμα που θυμίζει εγκοπτόμενο, χωρίς εμφανή κλίμακα στις ακτίνες του (El-Sayed & Abdel-Fattah M, 2020)(fishbase). Τα αρσενικά μεγαλώνουν με μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης από ότι τα θηλυκά. Όταν η Τιλάπια τις Μοζαμβίκης φτάσει σε μέγεθος 7-15 εκατοστά (7-10 εκατοστά σε δυσμενείς συνθήκες διαβίωσης), το οποίο επιτυγχάνεται στον δεύτερο μηνά της ζωής τους, γίνονται σεξουαλικά ώριμα. Όσον αφορά το χρωματισμό της Τιλάπιας τα σεξουαλικά ανώριμα αρσενικά και θηλυκά μοιάζουν έχοντας έναν ασημή χρωματισμό και φέρουν 2 με 5 κηλίδες οι οποίες είναι κάθετες ως προς την ράχη της (El-Sayed et al, 2020)(Barry Butler et al. 2007). Ωστόσο, σε περιοχές με διαταραγμένους οικοτόπους μπορεί να παρατηρηθεί διαταραχή στην ανάπτυξή τους και να ωριμάσουν σε πολύ μικρότερα μεγέθη. Σε μια έρευνα όπου συλλέχθηκαν 50 τιλάπιες από πέντε διαφορετικές τοποθεσίες στη βόρεια Αυστραλία, συμπεριλαμβανομένων μιας σειράς από τέσσερις ρηχές ευτροφικές λιμνοθάλασσες στο

Paradise Palms, ενός τμήματος ενός τροποποιημένου αγωγού στην παραλία Kewarra, περιοχών με χαμηλή ροή στον ποταμό Mulgrave, καθώς και στα φράγματα Tinaroo Falls και Herberton, οι ιχθύες βρέθηκαν να είναι μήκους 10,6 εκατοστά και σεξουαλικά ώριμοι (Dj et al. 2012). Κατά την ενηλικίωση τα αρσενικά αποκτούν έναν πιο σκούρο χρωματισμό, η κεφαλή φέρει μαύρο χρωματισμό με λευκά κάτω μέρη και τα περιθώρια των ραχιαίων πτερυγίων και του ουραίου πτερυγίου φέρουν κόκκινους χρωματισμούς. (Fitzsimmons 2019).



Εικόνα 1. Φωτογραφική απεικόνιση της Τιλάπιας της Μοζαμβίκης (*Oreochromis mossambicus*) https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Oreochromis_mossambicus.JPG

Η Τιλάπια τις Μοζαμβίκης ενδημεί κυρίως στον ποταμό Ζαμβέζη και πιο συγκεκριμένα στο νότιο-ανατολικό τμήμα του έως και τον κόλπο του Αλγκόα. Επίσης εμφανίζεται νότια στον ποταμό Brak στο ανατολικό ακρωτήριο και στο Transvaal στο σύστημα Limpopo (El-Sayed 2020). Προτιμάει στάσιμα νερά όπως λίμνες, ρέματα, ποταμιά και λιμνοθάλασσές με μικρή ταχύτητα νερού.

Πλέον, η διάδοσή του σε παγκόσμιο επίπεδο οφείλεται στην οικονομική εκμετάλλευση από τον άνθρωπο. Η εκτροφή αυτού του είδους είναι ευνοϊκή εξαιτίας της ευκολίας της και επιπλέον, είναι προτιμητέα από πολλούς επιστήμονες για ερευνητικούς σκοπούς, όπως η βιοανάλυση για τη δημιουργία τοξικολογικών δεδομένων για τα μέταλλα του νερού. Επιπλέον, λόγω της υψηλής ευαισθησίας τους σε παθήσεις όπως η ιχθυοπάθεια, χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της επικινδυνότητας των υδάτων στη νότια Αφρική (Mashifane & Moyo 2014)(fishbase). Παρότι είναι ευρίαλο είδος με τιμές αλατότητας που μπορούν να φτάσουν και 120rpm δεν είναι είδος που θα το εντοπίσουμε στην ανοιχτή θάλασσα πόσο μάλλον και στις εκβολές ενός ποταμού. Το ιδανικό υπόστρωμα για την Τιλάπια της Μοζαμβίκης θα πρέπει να έχει πλούσια βλάστηση με μακροφύκη και διάφορα είδη υδρόβιων φυτικών οργανισμών ή λασπώδεις πυθμένες (Fitzsimmons 2019).

Η βέλτιστη θερμοκρασία για το συγκεκριμένο είδος κυμαίνεται μεταξύ 17-33 °C, ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης στο οποίο βρίσκεται (Philippart et al. 1982). Για παράδειγμα, τα νεαρά ιχθίδια, από το στάδιο του αβγού μέχρι την ενηλικίωσή τους, έχουν μικρότερο εύρος ανοχής στη θερμοκρασία, περίπου 25-33°C (Fitzsimmons 2019). Σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, η Τιλάπια της Μοζαμβίκης μπορεί να επιβιώσει σε θερμοκρασίες από 8-42°C, ωστόσο, όσο περισσότερο απέχει η θερμοκρασία από τα φυσιολογικά όρια, τόσο μειώνονται οι πιθανότητες επιβίωσης του είδους (Philippart, 1982).

Η Τιλάπια της Μοζαμβίκης αναδεικνύεται ως το πιο παρατηρούμενο είδος σε διαταραγμένους οικοτόπους, λόγω της αξιοσημείωτης ανθεκτικότητάς της, όπως είναι η ανεκτικότητά της σε αστικές αποχετεύσεις. Η αποκατάσταση αυτών των υποβαθμισμένων περιοχών, μέσω δράσεων όπως η δενδροφύτευση και η βελτίωση της

ποιότητας των υδάτων, μπορεί να επιτρέψει στα ιθαγενή ψάρια να επανεγκατασταθούν σε αυτά τα οικοσυστήματα και ενδεχομένως να μειώσει τον αριθμό των παρασίτων που επικρατούν (B. R. Allanson 1971).

1.2) Ιστορική αναδρομή

Η εκτροφή της Τιλάπιας της Μοζαμβίκης ξεκίνησε το 1930, με πρώτο επίκεντρο τις εβραϊκές κοινότητες. Το είδος *Oreochromis*, που εκτράφη σε ευρεία κλίμακα, έγινε πρωτοπόρος σε αυτό τον τομέα. Έως το 1950, είχε επικρατήσει στις αγορές υδατοκαλλιέργειας σε διάφορες περιοχές της Ασίας. Οι τιλάπιες αναδεικνύονται ως σημαντική πηγή υδατοκαλλιέργειας, χάρη στην ευκολία με την οποία μπορούν να εκτραφούν σε αιχμαλωσία και στην ικανότητά τους να προσαρμόζονται σε μεγάλη ποικιλία υδάτινων συνθηκών (Fitzsimmons 2019, Philippart, 1982).

1.3) Διατροφή

Η Τιλάπια της Μοζαμβίκης είναι ένα παμφάγο είδος που κυρίως προτιμά φυτικούς μικροοργανισμούς, όπως το φυτοπλαγκτόν. Τα νεαρά ιχθύδια έχουν αυξημένη προτίμηση για ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς, ενώ καθώς ενηλικιώνονται προτιμούν περισσότερο το φυτοπλαγκτόν. Σε μια έρευνα στη λίμνη Borna, παρατηρήθηκε ότι τα νεαρά ιχθύδια Τιλάπιας τρέφονταν κυρίως με τροχοφόρα (35%), κωπήποδα (30%) και χλωροφύκη (20%). Ωστόσο, στα ενήλικα, τα ποσοστά διαφοροποιούνται, καθώς η κύρια πηγή τροφής τους είναι τα χλωροφύκη (40%) και τα διάτομα (30%). Και στα δύο στάδια παρατηρήθηκε μικρή κατανάλωση υδρόβιων εντόμων, περίπου 5% (Sakhare and Jetithor 2016).

Μια μέση διατροφή τις Τιλάπιας σε μια ιχθυοκαλλιέργεια περιέχει υψηλά ποσοστά πρωτεϊνών και υδατανθράκων. Η πρωτεΐνη αποτελεί την πιο ακριβή διατροφική πηγή για τις υδατοκαλλιέργειες, καθώς καταλαμβάνει το 50% του συνολικού κόστους της τροφής. Πιο συγκεκριμένα, η Τιλάπια της Μοζαμβίκης χρειάζεται ολοένα και λιγότερη πρωτεΐνη στην τροφή της όσο αυξάνεται σε βάρος. Τα ιχθύδια χρειάζονται την καλύτερη ποιότητα τροφής και υψηλή περιεκτικότητα πρωτεΐνης που φτάνει το 50%. Όταν φτάσουν σε βάρος 0,5-1g τότε η ποσότητα πέφτει στα 40% και για τιλάπιες άνω των 6g η πρωτεΐνη φτάνει στα κατώτερα όρια για την μέγιστη ανάπτυξη της τιλάπιας που φτάνει το 30-35% της συνολικής τροφής. Και στα 3 προηγούμενα στάδια η κυρίαρχη πηγή πρωτεΐνης ήταν το ιχθυάλευρο το οποίο αναμιγνύεται με διάφορα φυτικά άλευρα όπως το σογιάλευρο (El-Sayed.2020) (Rodjaroen et al. 2020) (Gauthier D.P. Konnert. 2022).

Αν και η ελάχιστη ανάγκη σε λιπαρά στη διατροφή της τιλάπιας είναι 5%, βελτιωμένη ανάπτυξη και αποδοτικότητα χρησιμοποίησης πρωτεΐνης έχουν παρατηρηθεί σε διατροφές με 10-15% λιπαρά. Τόσο τα n-3 όσο και τα n-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) έχουν αποδειχθεί απαραίτητα για τη μέγιστη ανάπτυξη της υβριδικής τιλάπιας (*O. niloticus* x *O. aureus*). Για την τιλάπια του Νείλου, η ποσοτική ανάγκη για το n-6 (PUFA) είναι περίπου 0,5-1,0%. Σε αντίθεση με τα είδη θαλάσσιων ψαριών, η τιλάπια φαίνεται να μην έχει ανάγκη για n-3 υψηλά ακόρεστα λιπαρά οξέα (HUFAs) όπως η EPA (20:5n-3) και η DHA (22:6n-3), και η ανάγκη της για n-3 λιπαρά οξέα μπορεί να ικανοποιηθεί με λινολενικό οξύ (18:3n-3). Η κατανάλωση λιπαρών οξέων από την τιλάπια της Μοζαμβίκης επιφέρει οφέλη για την υγεία των καταναλωτών, καθώς αποτελεί πηγή πολύτιμων θρεπτικών ουσιών. Οι προτιμώμενες πηγές λιπαρών οξέων για την τιλάπια είναι κυρίως φυτικές, όπως η σόγια και το λινέλαιο, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι προάγουν την ταχύτερη ανάπτυξή της σε

σύγκριση με το ιχθυέλαιο (Ng & Chong 2004). Παρόμοια αποτελέσματα είχε μια ερευνά για την Τιλάπια του Νείλου (*Oreochromis niloticus*) όπου εκτρέφονταν με ιχθυέλαιο και παρατηρήθηκε ότι είχαν μικρότερη ανάπτυξη σε σχέση με το σογιέλαιο (Lim et al. 2011, Chen et al. 2013).

Οι υδατάνθρακες είναι η πιο φτηνή και η πιο ευρέως διαθέσιμη πηγή ενέργειας για όλους τους οργανισμούς. Η Τιλάπια μπορεί να αξιοποιήσει στο βέλτιστο τροφές με μεγάλα ποσοστά υδατανθράκων που μπορεί να φτάσουν μέχρι 40% του συνόλου της τροφής. Συνηθέστερες δοσολογίες είναι περίπου 35-40%. Οι πιο χρησιμοποιούμενες τροφές για υδατάνθρακες είναι το σιτάρι, το ρύζι και το καλαμπόκι (Anderson et al. 1984).

1.4) Τρόποι διαφορετικής εκτροφής τιλάπιας

Η τιλάπια της Μοζαμβίκης όπως και οι άλλες τιλάπιες εκτρέφονται με πολλούς τρόπους, οι πιο διαδεδομένοι τρόποι είναι οι πολυκαλλιέργειες και οι ολοκληρωμένες καλλιέργειες. Οι κύριες δομές οι οποίες χρησιμοποιούνται είναι οι τεχνητές λίμνες, οι κλειστές δεξαμενές και η πιο διαδεδομένη και οικονομική είναι μια κατασκευή από σχοινιά που ονομάζεται Hapa. Τα Hapa χρησιμοποιούνται κυρίως σε λίμνες και σε ποτάμια με χαμηλή ροή ενώ δεν χρησιμοποιούνται στην ανοιχτή θάλασσα διότι είναι μικρές κατασκευές και δεν είναι ανθεκτικές σε ισχυρά ρεύματα (El-Sayed 2020).

Όσον αφορά τους τρόπους εκτροφής, αρχικά έχουμε τις πολυκαλλιέργειες, οι οποίες περιλαμβάνουν την εκτροφή δύο ή περισσότερων ειδών με διαφορετικές διατροφικές συμπεριφορές, συνήθειες και οικολογικές απαιτήσεις, με σκοπό την αποτελεσματικότερη αύξηση της παραγωγής στην υδατοκαλλιέργεια (New et al. 2000, Wang and Lu. 2016). Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η πολυκαλλιέργεια του κοινού κυπρίνου (*Cyprinus carpio*) με την τιλάπια, η οποία είναι αρκετά διάσημη στο Ισραήλ.

Η μονοκαλλιέργεια τιλάπιας και κυπρίνου συνήθως έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση και την αποσύνθεση της οργανικής ύλης, που οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της αμμωνίας και των νιτρωδών στην περιοχή εκτροφής. Όταν αυτά τα δύο είδη εκτρέφονται μαζί τότε έχει παρατηρηθεί ότι η συσσώρευση αμμωνίας νιτρωδών και οργανικής ύλης είναι μειωμένη. Αυτό προκαλείται επειδή ο κυπρίνος αναδύει την λάσπη με αποτέλεσμα η οργανική ύλη να αξιοποιείται πιο αποδοτικά. Η ανάδευση κάνει επίσης τα θρεπτικά συστατικά πιο διαθέσιμα για μακροφύκη, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως τροφή για ψάρια. Η υψηλότερη φωτοσύνθεση οδηγεί επίσης σε αυξημένη οξυγόνωση, pH και μειωμένη νιτροποίηση (El-Sayed 2020, Hisano et al. 2019).

Οι ολοκληρωμένες υδατοκαλλιέργειες είναι μια τεχνική που συνδυάζει την υδατοκαλλιέργεια με την καλλιέργεια φυτών και την εκτροφή οικόσιτων ζώων. Ο συγκεκριμένος τρόπος εκτροφής προσπαθεί να αξιοποιήσει στο βέλτιστο τους διαθέσιμους πόρους και τα απόβλητα για να αναπτύξει την παραγωγή. Κατατάσσεται στα ημιεντατικά συστήματα εκτροφής των οποίων το κύριο πλεονέκτημα είναι ότι χρειάζεται μικρή εξωτερική παρέμβαση, όπως τροφή, για να μπορέσει να συντηρηθεί διότι αξιοποιεί τους ήδη υπάρχοντες πόρους. Αυτή η πρακτική είναι αρκετά διαδεδομένη κυρίως στις ασιατικές περιοχές με κύριο παραγωγό την Κίνα. (El-Sayed 2020).

1,5) Σίδηρος

Ο σίδηρος είναι ένα από τα βασικά μικροθρεπτικά συστατικά σε όλα τα ανώτερα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών, όσον αφορά την επίδραση του στις λειτουργίες στην άμυνα του οργανισμού και στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς αποτελεί δομικό συστατικό του κυτοχρώματος των ενζύμων, της αιμοσφαιρίνης. Ακόμη συμβάλλει στη ρύθμιση πολλών ζωτικών φυσιολογικών διεργασιών, όπως η

μεταφορά οξυγόνου, οι αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων, η γονιδιακή ρύθμιση, καθώς και η κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση μέσω μιας σειράς διεργασιών (Waldvogel-Abramowski et al. 2014)(Gatlin 2003). Όσον αφορά τους ιχθύες και γενικότερα όλους τους υδάτινους οργανισμούς ο σίδηρος συμβάλλει στην αντιβακτηριακή άμυνα του οργανισμού, στην χορήγηση των φαρμάκων, στην αναπαραγωγή των ιχθύων, στην αποκατάσταση της ρύπανσης των υδάτων και ακόμα λειτουργεί σαν βιοαισθητήρας (Rashk et al. 2022).

Οι ιχθύες λαμβάνουν το σίδηρο από το περιβάλλον με δυο τρόπους, είτε από το νερό απορροφώντας το διαλυμένο σίδηρο μέσω της βραγχιακής μεμβράνης, είτε από την τροφή (Watanabe et al. 1997). Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης διαλυμένου σιδήρου στο νερό και της μικρής επιφάνειας που καλύπτουν τα βράχια σε σχέση με το μήκος των ιχθύων η τροφή θεωρείται η κύρια πηγή πρόσληψης σιδήρου. Γενικότερα σε όλα τα τελεόστεα μια κατά προσέγγιση ποσότητα σιδήρου στην τροφή είναι 30-200mg για κάθε κιλό ξηράς τροφής (Watanabe et al. 1997).

Όσον αφορά την αντιβακτηριακή τους δράση μελέτες έχουν δείξει ότι τα νανοσωματίδια σιδήρου έχουν αντιβακτηριδιακά αποτελέσματα ενάντια πολλών gram αρνητικών όπως το Κολοβακτηρίδιο (*Escherichia coli*) και gram θετικών βακτηρίων όπως ο σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus aureus*). Η κύρια αιτία της αντιβακτηριακής δράσης είναι η διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία προκαλείται από την αλληλεπίδραση μεταξύ της βακτηριακής μεμβράνης και των νανοσωματιδίων σιδήρου, οδηγώντας σε βλάβες που μπορεί να επιφέρουν τον θάνατο των βακτηρίων (Radini et al. 2018).

Επίσης ο σίδηρος και πιο συγκεκριμένα ο νανο-σίδηρος βοηθά στην καταπολέμηση της υδάτινης ρύπανσης, η οποία αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες

απειλές για το υδάτινο σύστημα και για τις υδατοκαλλιέργειες (Ahmad et al. 2022). Γενικότερα η νανο-αποκατάσταση των υδάτων είναι μια φιλική προς το περιβάλλον διαδικασία η οποία μειώνει τον χρόνο που χρειάζεται να καθαριστεί μια μολυσματική περιοχή από μικροβιακούς, οργανικούς, θερμικούς, μικροσκοπικούς και ανόργανους οργανισμούς. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει την επεξεργασία των λημμάτων, από τα οποία απομακρύνονται ο φώσφορος, το αμμωνιακό άζωτο, το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο, καθώς και τα βαρέα μέταλλα (Ahmad et al. 2022) (Sundaria et al. 2019).

Τα νανοσωματίδια σιδήρου, επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά στη χορήγηση φαρμάκων. Πιο συγκεκριμένα, ο μαγνήτης, το υπερμαγνητικό οξύδιο του σιδηρού και ο μαγεμήτης έχουν δοκιμαστεί και αποδείχθηκαν αποτελεσματικά στοιχεία για την χορήγηση φαρμάκων στους θαλάσσιους οργανισμούς. Η επιφάνεια αυτών των νανοσωματιδίων μπορεί να τροποποιηθεί αποτελεσματικά για την προσκόλληση διαφορετικών βιομορίων (Piccinetti et al. 2014) (Mahmoudi et al. 2011). Λόγω της αυξημένης χρήσης των αντιβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες έχουν παρατηρηθεί αρκετά προβλήματα όπως τοξικότητα και συσσώρευση υπολειμμάτων των αντιβιοτικών στα όργανα και βακτηριακή αντίσταση στους ιχθύς. Για παράδειγμα, η οξυτετρακυκλίνη, ένα αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται ευρέως στις υδατοκαλλιέργειες, παρατηρείται ότι το 70%-80% του αντιβιοτικού παραμένει άθικτο στους ιχθύς. Αυτό παρατηρείται κυρίως στους ιστούς, όπως το έντερο το δέρμα και το ήπαρ (Yonar 2012) (Alexis et al. 2002). Έτσι με την χρήση νανο-σιδήρου μπορούμε να βελτιώσουμε την χορήγηση φαρμάκων ελαττώνοντας τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις και αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα του (Rashk et al. 2022).

1.6) Κάλιο

Το κάλιο είναι ζωτικής σημασίας στοιχείο για την διατροφή των ζώων και των φυτών. Παίζει καθοριστικό ρολό για την λειτουργία των νευρώνων, επιδρά στις ενζυμικές διαδικασίες και επηρεάζει την ισορροπία οξέος-βάσης των ζώων. Ακόμη στα φυτά συμμετέχει στην ωσμωρύθμιση και εμπλέκεται στον ενεργειακό μεταβολισμό τους. Παρόλα τα θετικά του καλίου σε περίπτωση υπερδοσολογίας μπορεί να δημιουργήσει αρνητικές επιπτώσεις στους οργανισμούς, όπως υπερβολική σιελόρροια, μυϊκό τρεμούλιασμα, κατάρρευση και μέχρι και θάνατο σε ποσοστό 50% σε αυγά σαλιγκαριού (Wenzel et al.2021).

Τα συμπληρώματα καλίου αποτελούνται κυρίως από οργανικά οξέα και τα άλατα τους διότι έχουν δείξει ότι είναι ευεργετικά για τους ιχθύες. Το διμυρμηγικό κάλιο (KDF) είναι μια από τις πιο γνωστές πηγές καλίου και έχει παρατηρηθεί ότι βοηθάει στην ανάπτυξη της ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) και της τιλάπιας (*Oreochromis* sp.). Ακόμα το διμυρμηγικό κάλιο (KDF) χρησιμοποιείται από το πεπτικό σύστημα των ιχθύων για να διατηρήσει στοιχεία όπως το ασβέστιο, το μαγνήσιο, ο σίδηρος και ο ψευδάργυρος. Σε περίπτωση που το ιόν καλίου δεν μπορεί να απορροφηθεί, μπορεί να αποβληθεί μέσω των λημμάτων. Σε συστήματα υδροπονίας, αυτό μπορεί να έχει ευεργετικές επιπτώσεις στα φυτά, βελτιώνοντας έτσι το ρυθμό ανάπτυξής τους. Ακόμη το KDF έχει αντιμικροβιακή δράση και ικανότητα βελτίωσης της πεψίνης η οποία βοηθάει στην πεπτικότητα των πρωτεϊνών και των αμινοξέων (Siqwepu et al. 2020).

Τέλος, ένα συμπλήρωμα αποτελεί το χλωριούχο κάλιο (KCL) το οποίο πλέον χρησιμοποιείται κυρίως για μελέτες στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών. Αποτελεί μια διαιτητική πηγή καλίου και βοηθά στην ακριβή εύρεση της ποσότητας καλίου που χρειάζεται ένας ιχθύς, αλλά και τα αντίστοιχα για τις γαρίδες (Siqwepu et al. 2020).

1.7) Ιστολογία ηπατοπαγκρέατος

Το πεπτικό σύστημα της τιλάπιας μοιάζει αρκετά με αυτό των παμφάγων ιχθύων, δηλαδή έχει ένα μεσαίου μεγέθους στόμαχο και μεγάλο έντερο που φτάνει και έξι φορές το συνολικό μήκος του ιχθύος (FAO) (Moriarty and Moriarty 1973). Το ηπατοπάγκρεας είναι το μεγαλύτερο εσωτερικό όργανο και αδένας των ιχθύων, φτάνοντας σε κάποια είδη να αποτελεί το 1% του συνολικού βάρους τους, όπως στον σολομό. Βρίσκεται στην περιτοναϊκή κοιλότητα κοντά στον στόμαχο. Το ήπαρ θεωρείται συμπληρωματικό όργανο του πεπτικού σωλήνα, του οποίου η σύνδεση γίνεται μέσω αγωγών. Μερικές από τις κύριες λειτουργίες του ηπατοπαγκρέατος είναι η αποθήκευση λιπιδίων, η πρωτεϊνσύνθεση (αλβουμίνη, Ινωδογόνο) και γενικότερα εκεί πραγματοποιούνται όλες οι μεταβολικές (αναβολισμός, καταβολισμός) λειτουργίες του οργανισμού. Η δομή των κυττάρων του είναι πολυεδρική έχοντας σφαιρικό πυρήνα με εμφανή πυρηνίσκο και ευδιάκριτη ετεροχρωματίνη. Ακόμη στις φωτογραφίες πολύ διακριτά είναι και λιποσταγονίδια που είναι περιοχές συσσώρευσης του λίπους. Τέλος, το ήπαρ είναι ένα όργανο υψίστης σημασίας για την μελέτη του λόγω της πληθώρας λειτουργιών που καλύπτει και για αυτόν το σκοπό επιλέγεται ως όργανο στόχος για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της δίαιτας του οργανισμού και της δομής, μορφολογίας και λειτουργίας του ήπατος (Βερίλλης 2017) (Buddington and Kuz'mina 2000).

Όσον αφορά το πάγκρεας, αυτό δεν αποτελεί ξεχωριστό όργανο στους περισσότερους ιχθύς, αλλά κυρίως εντοπίζεται ως διάσπαρτα νησίδια στα πυλωρικά τυφλά, στο σπλήνα ή στο εξωτερικό στρώμα γύρω από την πυλαία φλέβα του ήπατος. Η λειτουργία του παγκρέατος διαιρείται σε δύο δράσεις: την εξωκρινή και την ενδοκρινή. Η ενδοκρινής λειτουργία του παγκρέατος συνίσταται στην έκκριση ορμονών όπως η ινσουλίνη, η γλυκαγόνη, η σωματοστατίνη και το παγκρεατικό

πεπτίδιο. Η ποσότητα έκκρισης των ορμονών μπορεί να εξαρτηθεί από εξωτερικούς παράγοντες όπως η θρέψη και οι περιβαλλοντικές συνθήκες. Ακόμη στον ενδοκρινή αδένα βρίσκονται και τα νησίδια του Langerhans τα οποία είναι ένα συσσωμάτωμα αδενικών κυττάρων με ωχρή χρώση (Βερίλλης 2017). Η εξωκρινής μοίρα του παγκρέατος αποτελείται από κυψελοειδή κύτταρα τα οποία έχουν ένα μεγάλο σφαιρικό πυρήνα στον οποίο διακρίνονται 1 μέχρι 3 πυρηνίσκοι και σκούρο βασεόφιλο κυτταρόπλασμα. Η κύρια δράση της εξωκρινούς μοίρας σχετίζεται με την πέψη και πιο συγκεκριμένα με την έκκριση πεπτικών ενζύμων και διττανθρακικών ιόντων (Βερίλλης 2017) (Buddington and Kuz'mina 2000).

1.8) Οικονομική αποτίμηση του είδους

Η τιλάπια της Μοζαμβίκης είναι το πρώτο είδος τιλάπιας που εισήχθη στην ασιατική υδατοκαλλιέργεια, και πιο συγκεκριμένα στο νησί της Ιάβας στην Ινδονησία. Έγινε ο κύριος υποψήφιος για τις υδατοκαλλιέργειες στην Ασία και ξεκίνησε να εισάγεται την δεκαετία του 40 και σε άλλες ασιατικές χώρες. Με αυτόν το τρόπο η μέση ετήσια παραγωγή του συγκεκριμένου είδους αυξήθηκε κατά 26.7% την περίοδο του 1970-1980 σε σύγκριση με το κύριο εμπορικά ανταγωνιστικό είδος την τιλάπια του Νείλου (*Oreochromis niloticus*) που είχε αύξηση 13,1% (El-Sayed 2020). Ο μικρός αρχικός πληθυσμός και ο σκουρόχρωμος χρωματισμός της οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή και ζήτηση αντίστοιχα με αποτέλεσμα το 2002 να έχει έρθει στην δεύτερη θέση στην παραγωγή τιλάπιας με 54,146 τόνους αντιπροσωπεύοντας το 3.6% της συνολικής παραγωγής της εκτρεφόμενης τιλάπιας (El-Sayed 2020).

2) Μέθοδοι και υλικά

2.1) Συλλογή δειγμάτων

Τα δείγματα συλλέχθηκαν από ενυδρεία τα οποία συμμετείχαν σε μια ενυδριοπονική καλλιέργεια. Χρησιμοποιώντας μια απόχη, αφαιρέθηκαν από τα ενυδρεία και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε μια δεξαμενή με αναισθητικό (MS-222). Το αναισθητικό που χορηγήθηκε ήταν σε μεγάλη συγκέντρωση έτσι ώστε να μπορέσει να επιτευχθεί ευθανασία στους ιχθύς. Από τα δείγματα αφαιρέθηκε με ιστολογική τομή το ηπατοπάγκρεας των οργανισμών και ξεκίνησε η μονιμοποίηση τους. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 15 τιλάπιες τις Μοζαμβίκης (*Oreochromis mossambicus*), οι οποίες συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις. Στην πρώτη μεταχείριση δεν προστίθετο κανένα χημικό στο νερό των ενυδρείων. Στη δεύτερη γινόταν προσθήκη Fe σε μορφή Fe-DTPA ώστε η συγκέντρωση του Fe στο νερό να είναι 5mg/L. Στην Τρίτη, παράλληλα με την προσθήκη Fe, γινόταν και προσθήκη K σε μορφή θεικού καλίου (K₂SO₄) ώστε η συγκέντρωση του K στο νερό να είναι 120mg/L (control, προσθήκη, προσθήκη Fe+K). Οι τιλάπιες σε όλες τις μεταχειρίσεις τρέφονταν με εμπορική τροφή.

2.2) Μονιμοποίηση

Μετά την απομόνωση και τον τεμαχισμό των ιστών τους, τοποθετούνται σε μικρά πλαστικά δοχεία, τα οποία περιέχουν κάθε ένα διάλυμα φορμαλδεΰδης 10%, με σκοπό τη μονιμοποίησή τους. Στη συνέχεια, τα δοχεία σημαίνονται με έναν κωδικό που αντιπροσωπεύει τον αριθμό του ιχθύος, την μεταχείριση που υπέστησαν και τον ιστό που συλλέχθηκε.

2.3) Ιστοκινέτα

Μετά από την μονιμοποίηση οι ιστοί τοποθετήθηκαν στην ιστοκινέτα (Εικόνα 2). Η συγκεκριμένη συσκευή πραγματοποίησε αυτόματα τα στάδια της αφυδάτωσης, της διαυγείας και του εμποτισμού με παραφίνη.



Εικόνα 2: Ιστοκινέτα (https://www.researchgate.net/figure/Figura-7-Procesador-de-tejidos-Histoquinete-Laboratorio-de-morfo-fisiologia-del_fig5_327605829)

Στο αρχικό στάδιο, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε σειρά διαδοχικών διαλυμάτων αιθανόλης με αυξανόμενη συγκέντρωση, με σκοπό την αφύδατωση των ιστών. Οι χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις ήταν 70%, 80%, 95% και 100% αιθανόλης. Αρχικά, τα δείγματα επεξεργάστηκαν για 1 ώρα σε διάλυμα 70% αιθανόλης. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν για άλλη μια ώρα σε διάλυμα 80% αιθανόλης. Έπειτα, εκτελέστηκε επεξεργασία σε 95% διάλυμα αιθανόλης για μια ώρα και κατόπιν παρέμειναν για άλλες 2 ώρες σε νέο διάλυμα 95%. Ακολούθως, τοποθετήθηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 100%

για 1 ώρα, και στη συνέχεια για άλλη μια ώρα σε νέο διάλυμα 100%. Τέλος, παρέμειναν για άλλες 2 ώρες σε νέο διάλυμα αιθανόλης 100%.

2.4) Διαύγεια και εμποτισμός

Κατά την διαδικασία της διαύγειας, τα δείγματα τοποθετήθηκαν για δύο ώρες σε ξυλόλη, και στη συνέχεια επανατοποθετήθηκαν σε νέο διάλυμα ξυλόλης για άλλες δύο ώρες, με σκοπό τον καθαρισμό της αιθανόλης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εμποτισμός με παραφίνη, όπου τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία σε υγρή παραφίνη για δύο ώρες, και έπειτα επανατοποθετήθηκαν σε δοχείο με παραφίνη για τέσσερις επιπλέον ώρες. Κατά τη διάρκεια όλων των αυτών των σταδίων της αφύδατωσης και του καθαρισμού, η ιστοκινέτα ρυθμίστηκε έτσι ώστε να αναδεύει τα δείγματα καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας..

Πίνακας 1 παρουσίαση των σταδίων του πρωτοκόλλου της ιστοκινέτας

α/α	ΔΙΑΛΥΜΑ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΣΤΑΔΙΟ
1	Αλκοόλη 70%	1 h	ΑΦΥΔΑΤΩΣΗ
2	Αλκοόλη 80%	1 h	
3	Αλκοόλη 95%	1 h	
4	Αλκοόλη 95%	2 h	
5	Αλκοόλη 100%	1 h	
6	Αλκοόλη 100%	1 h	
7	Αλκοόλη 100%	2 h	
8	Ξυλόλη	2 h	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ (ΔΙΑΥΓΑΣΗ)
9	Ξυλόλη	2 h	
10	Παραφίνη	2 h	ΕΜΠΟΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΠΑΡΑΦΙΝΗ
11	Παραφίνη	4 h	

2.5) Έγκλιση

Στη συνέχεια οι μονιμοποιημένες τομές τοποθετήθηκαν στο μηχανήμα σκλήνωσης. Το εγκλιτικό μέσο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν η παραφίνη με σημείο τήξης 58-60°C. Μετά την τέλεια διαπότιση του ιστού με υγρή παραφίνη κατασκευάστηκε ένα μπλοκ παραφίνης χρησιμοποιώντας ένα ορθογώνιο καλούπι.

2.6)Κόψιμο τομών

Μετά την στερεοποίηση της παραφίνης, το μπλοκ παραφίνης τοποθετήθηκε στη μικροτόμο (εικόνα 3) προκειμένου να τεμαχιστεί ο ιστός με τη χρήση μιας ατσάλινης λεπίδας. Οι τομές είχαν πάχος 5-10 μm , και μετά την επιλογή των καλύτερα οπτικά τομών, τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 40°C για αφαίρεση της παραφίνης. Στη συνέχεια, οι τομές συλλέγονται με μια αντικειμενοφόρο πλακά και τοποθετούνται σε μια θερμαινόμενη πλακά για να εξατμιστεί το νερό. Τέλος, οι τομές τοποθετούνται σε κλίβανο και θερμαίνονται για δεκαπέντε λεπτά στους 50°C.

2.7) Χρώση

Μετά την αφαίρεση των τομών από τον κλίβανο, ξεκινά η διαδικασία της χρώσης. Στις συγκεκριμένες τομές χρησιμοποιήθηκε διπλή χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Πριν την έναρξη της χρώσης, εφαρμόστηκε ξυλόλη με σκοπό την αφαίρεση της παραφίνης. Οι τομές τοποθετήθηκαν δύο φορές για δεκαπέντε λεπτά η κάθε μια, σε ξυλόλη, και στη συνέχεια σε αιθανόλη 100% δύο φορές για δύο λεπτά η κάθε μια.

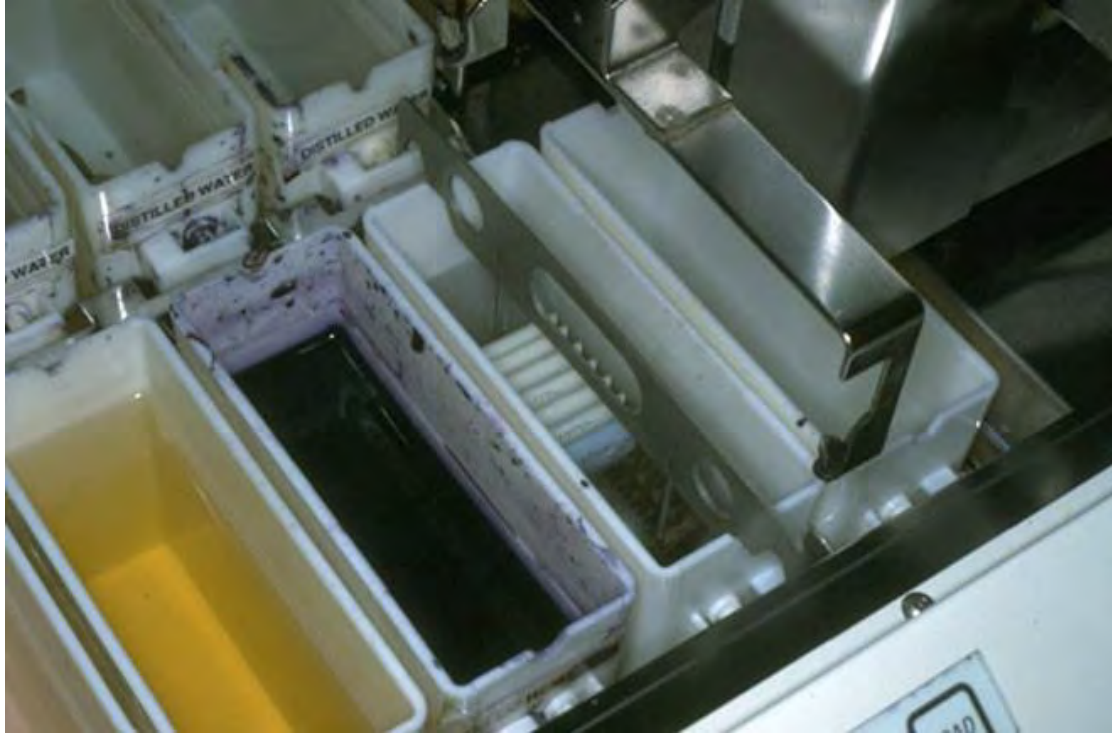
Στη συνέχεια ακολούθησε το στάδιο της ενυδάτωσης, κατά το οποίο τα δείγματα τοποθετήθηκαν αρχικά σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 96% για δύο λεπτά, αμέσως μετά σε διάλυμα αιθανόλης 80% για ένα λεπτό, και στη συνέχεια σε διάλυμα αιθανόλης 70% για ένα λεπτό.



Εικόνα 3: Μικροτόμος

<https://webpath.med.utah.edu/HISTHTML/HISTOTCH/TECH008.html>

Μετά τη διαδικασία της ενυδάτωσης, ακολουθεί η χρωστική επεξεργασία των ιστών. Οι τομές τοποθετήθηκαν σε δοχείο με χρώση αιματοξιλίνης για δέκα λεπτά, στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης για δύο λεπτά, υποβλήθηκαν τρεις φορές σε διάλυμα οξικής αλκοόλης 1%, και επαναλαμβανόταν η διαδικασία ξεπλύματος με τρέχουσα βρύση. Έπειτα, οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε χρώση ηωσίνης για τρία λεπτά και έπειτα ξαναξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό.



Εικόνα 4:Μηχάνημα χρώσεων

<https://webpath.med.utah.edu/HISTHTML/HISTOTCH/TECH014.html>

2.8) Επικάλυψη τομών

Η τελευταία διαδικασία είναι η επικάλυψη των τομών. Αφού ολοκληρωθεί η χρώση τοποθετούμε τις τομές σε δοχεία με αυξανόμενα ποσοστά αιθανόλης μέχρι η αιθανόλη να είναι σε ποσοστό 100%. Ακόμη, τοποθετούμε τις τομές σε ξυλόλη για 2 λεπτά και επαναλαμβάνουμε το ίδιο βήμα για αλλά 5 λεπτά. Τέλος, τοποθετούμε μια καλυπτρίδα με συγκόλληση με DPX.

Πίνακας 2. Παρουσίαση της διαδικασίας χρώσης των τομών

α/α		ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΣΤΑΔΙΟΥ	ΣΤΑΔΙΟ
1	Ξυλόλη	15 min	ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗ
2	Ξυλόλη	15 min	
3	Αιθανόλη 100%	2 min	ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ
4	Αιθανόλη 100%	2 min	ΞΥΛΟΛΗΣ
5	Αιθανόλη 96%	2 min	ΕΝΥΔΑΤΩΣΗ
6	Αιθανόλη 80%	1 min	
7	Αιθανόλη 70%	1 min	
8	Τρεχούμενο νερό βρύσης	2 min	
9	Διάλυμα Αιματοξυλίνης	5 έως 15 min	ΧΡΩΣΗ
10	Ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό βρύσης	2 min	
11	Αμμωνιούχο νερό (Acid Alcohol 1%)	1-3 DIPS	
12	Ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό βρύσης	2 min	
13	Διάλυμα Ηωσίνης	3 min	
14	Ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό βρύσης	30 sec	
15	Αιθανόλη 70%	30 sec	ΑΦΥΔΑΤΩΣΗ
16	Αιθανόλη 80%	30 sec	
17	Αιθανόλη 96%	30 sec	
18	Αιθανόλη 100%	2 min	
19	Αιθανόλη 100%	2 min	
20	Ξυλόλη	2 min	ΔΙΑΥΓΑΣΗ
21	Ξυλόλη	5 min	

2.9) Παρατήρηση δειγμάτων

Στα πλακίδια στη συνέχεια δόθηκαν κωδικοί για να τα ξεχωρίσουμε, και έπειτα ξεκίνησε η παρατήρηση κάτω από μικροσκόπιο. Συνολικά παρασκευάστηκαν 15 πλακίδια, αντίστοιχα με τον αριθμό των ιχθύων που συλλέξαμε. Κάθε πλακίδιο περιείχε μία ή περισσότερες τομές από το ηπατοπάγκρεας ενός συγκεκριμένου ιχθύος. Η παρατήρηση έγινε υπό τη χρήση του χρυσού καταδυτικού φακού (100X) για την

καλύτερη και ευκολότερη καταμέτρηση των λιποσταγονιδίων των ηπατοκυττάρων. Κατά τη διάρκεια της παρατήρησης λήφθηκαν εικόνες με χρήση κάμερας

Στη συνέχεια, με τη χρήση του προγράμματος ImageJ μετρήθηκε το εμβαδόν τουλάχιστον 250 ηπατοκυττάρων και λιποσταγονιδίων από κάθε μεταχείριση.



Εικόνα 5: Οπτικό μικροσκόπιο <https://www.pexels.com/el-gr/photo/5726698/>

2.10) Στατιστική ανάλυση

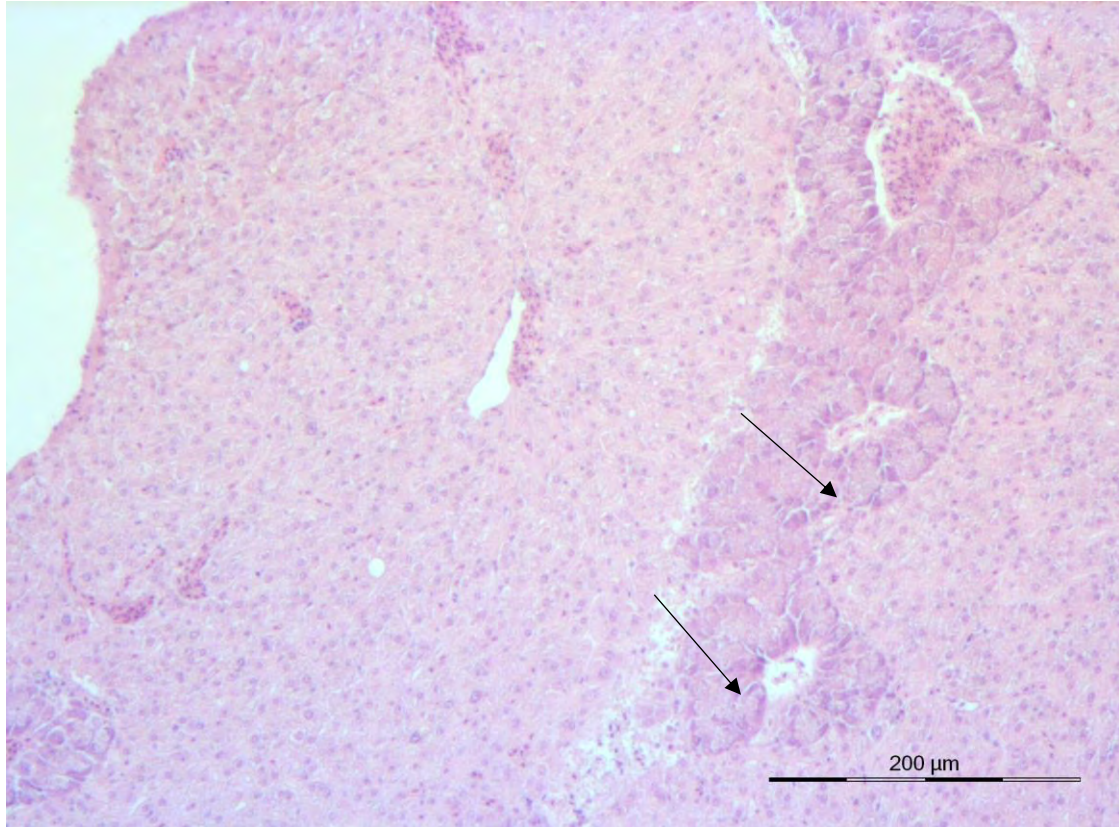
Τα δεδομένα στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ένα στατιστικό φύλο προκειμένου να γίνουν οι κατάλληλες τροποποιήσεις και να υπολογιστούν τα περιγραφικά στοιχεία των αναλύσεων. Στη συνέχεια, με την χρήση του στατιστικού

προγράμματος jamoní, υπολογίσαμε εάν υπήρχε σημαντική διαφοράς μεταξύ των 3 μεταχειρίσεων (control, F, Fk) με την χρήση της μεθόδου ANOVA.

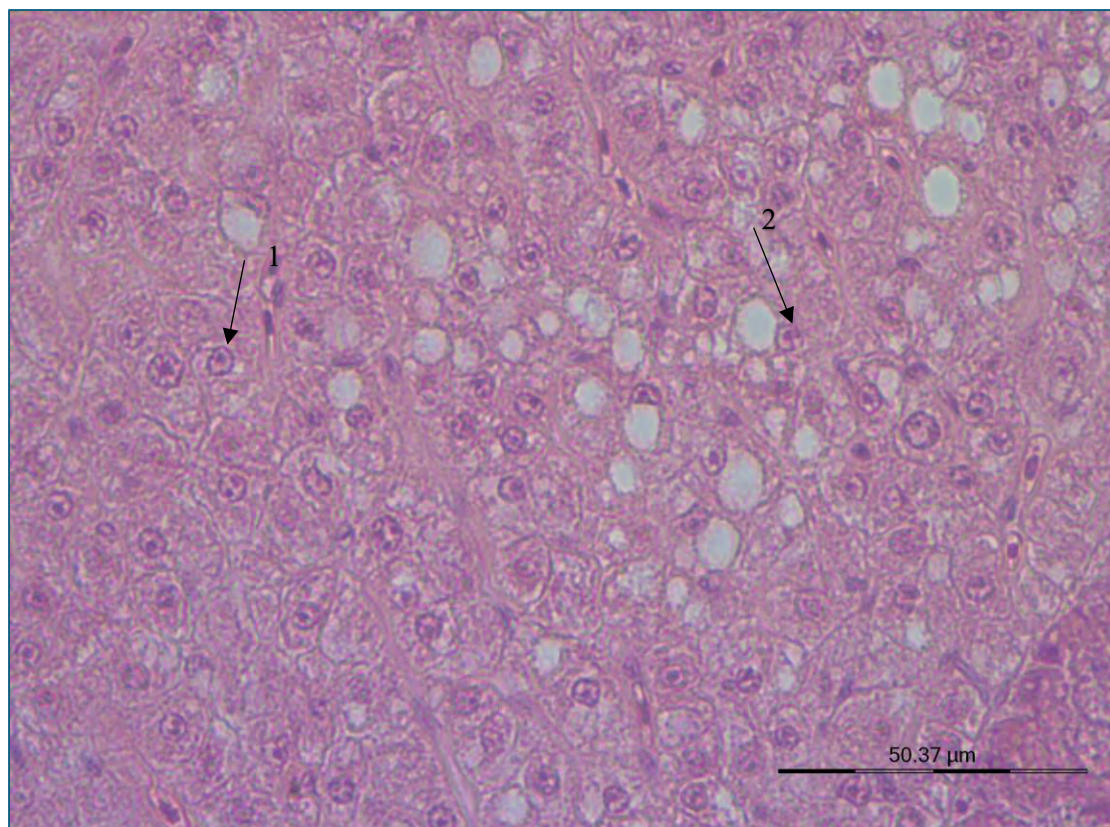
3) Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1) Αποτελέσματα

Οι μετρήσεις των ηπατοκυττάρων και των λιποσταγονιδίων προέκυψαν από φωτογραφίες που πάρθηκαν από το οπτικό μικροσκόπιο (Εικόνες 6,7,8,9).



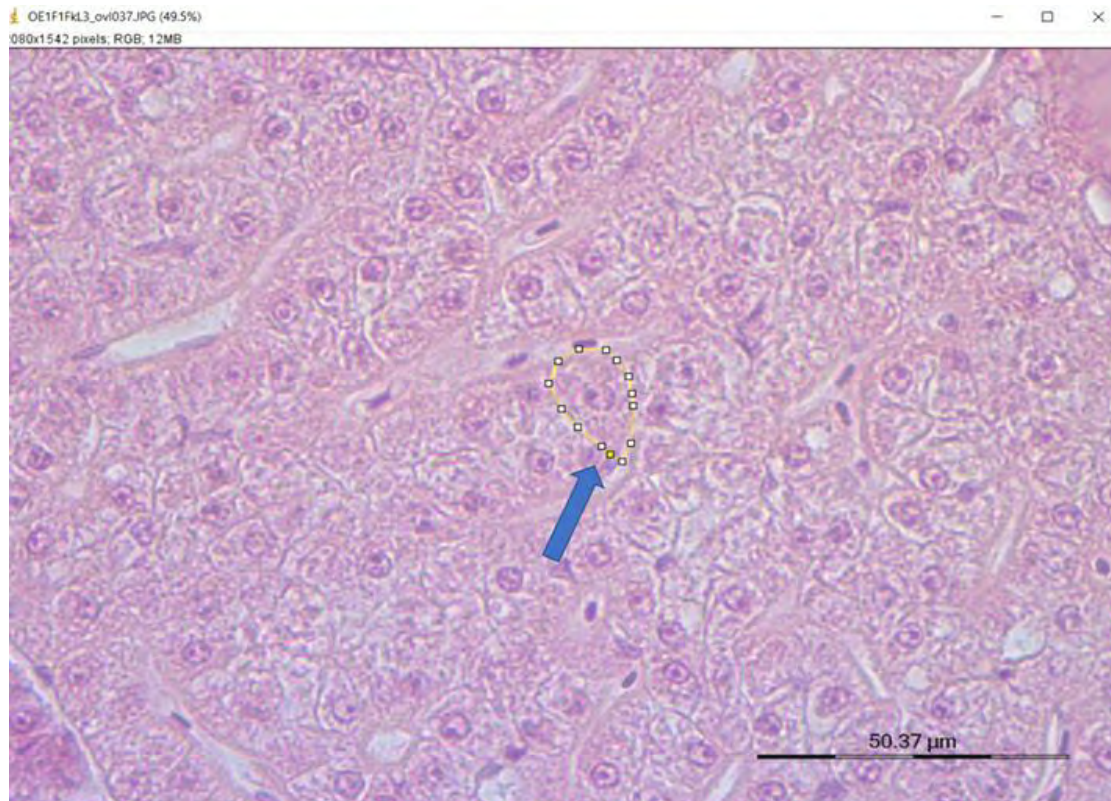
Εικόνα 6. Δείγμα: OE1F4CL1 ηπατοπαγκρέατος, μεταχείριση control, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη μεγέθυνση X100. Στα δυο βέλη παρατηρούνται 2 παγκρεατικά νησίδια.



Εικόνα 7. Δείγμα OE1F5CL1 ηπατοπαγκρέατος, μεταχείριση control, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη, μεγέθυνση X400. 1) πυρήνας ηπατοκυττάρου, 2) λιποσταγονίδιο.

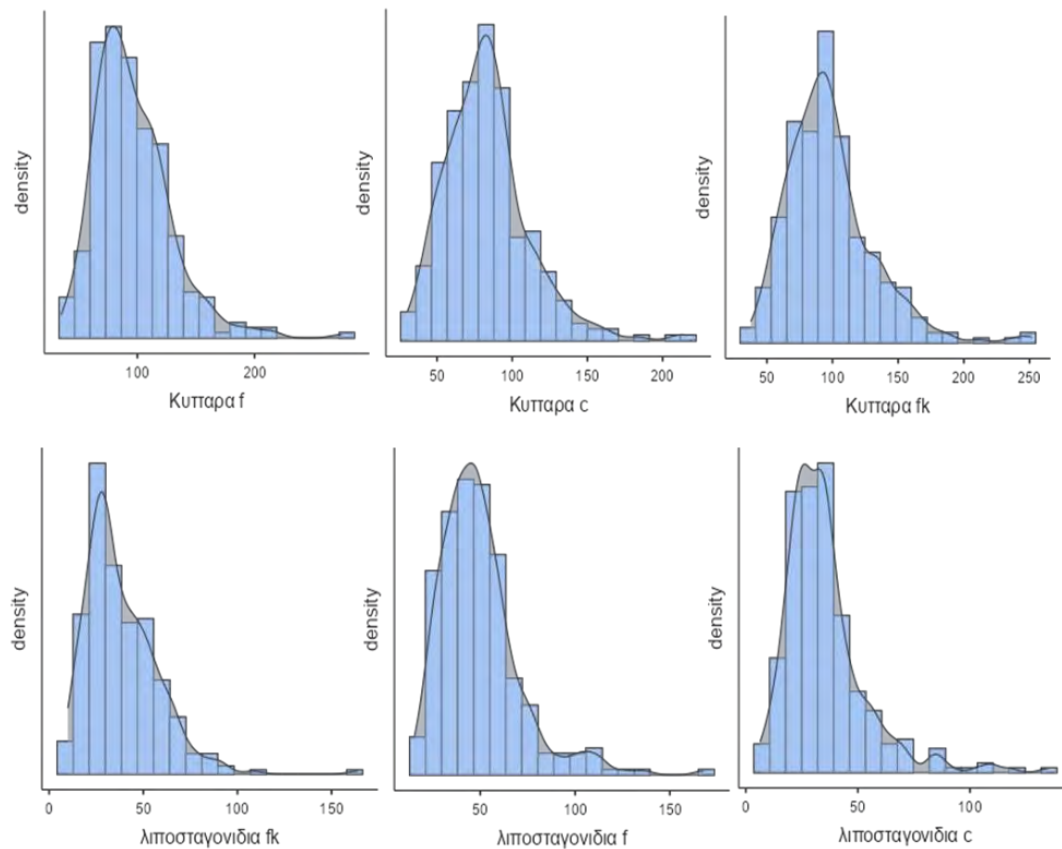


Εικόνα 8. Δειγμα OE1F3FL1 ηπατοπαγκρέατος, μεταχείριση F, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη, μεγέθυνση X100.



Εικόνα 9: OE1F1FKL3 δείγμα: ηπατοπαγκρέατος, μεταχείριση F, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη, μεγέθυνση X400. Στο βέλος φαίνεται η μέτρηση του εμβαδού ενός ηπατοκυττάρου

Στα διαγράμματα 1-6 παρατηρούμε την κατανομή των δειγμάτων.



Διαγράμματα 1-6: Διαγράμματα κατανομής των δειγμάτων. Στην πρώτη στήλη είναι τα διαγράμματα για τη μέτρηση των εμβαδών των ηπατοκυττάρων και στη δεύτερη στήλη για τη μέτρηση των εμβαδών των λιποσταγονιδίων.

Για την εξασφάλιση αξιόπιστων αποτελεσμάτων, διενεργήθηκαν στατιστικά τεστ. Αρχικά, ελέγχθηκε η κανονικότητα της κατανομής στα δείγματα μέσω του τεστ κανονικότητας Shapiro-Wilk (βλ. πίνακα 3). Η αρχική υπόθεσή μας ήταν ότι υπάρχει κανονική κατανομή τόσο στα ηπατοκύτταρα όσο και στα λιποσταγονίδια, με επίπεδο σημαντικότητας (p -value) που τέθηκε στο 0,05. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το p -value είναι μικρότερο από 0,05 σε όλες τις μετρήσεις τόσο των ηπατοκυττάρων όσο και των λιποσταγονιδίων, υποδεικνύοντας ότι δεν υπάρχει κανονική κατανομή στις μετρήσεις μας.

Πίνακας 3: Πίνακας ελέγχου κανονικότητας με χρήση του test κανονικότητας Shapiro-wilk στα εμβαδά των ηπατοκυττάρων και των λιποσταγονιδίων			
Μεταχείριση	test	p ηπατοκύτταρα	p λιποσταγονίδια
C	Shapiro-Wilk	< .001	< .001
F	Shapiro-Wilk	< .001	< .001
FK	Shapiro-Wilk	< .001	< .001

Στον (πίνακα 4) μπορούμε να παρατηρήσουμε τις μετρήσεις του εμβαδού των ηπατοκυττάρων και των λιποσταγονιδίων. Όσον αφορά τα ηπατοκύτταρα από τον μαρτυρά (C) μετρήθηκαν 300 κύτταρα από την μεταχείρισή με σίδηρο (F) 324 και από την μεταχείριση με κάλιο και σίδηρο (FK) 303 . Ακόμη 300 λιποσταγονίδια από τον μαρτύρα (C) 296 από την μεταχείριση με σίδηρο (F) και 301 από την μεταχείριση με κάλιο και σίδηρο (FK).

Το σύνολο των μετρήσεων δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή και συνεπώς τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν ως διάμεσος (median) $\pm$ ενδοτεταρτημοριακό εύρος (interquartile range - IQR) για τα ηπατοκύτταρα και τα λιποσταγονίδια. Το μέσο εμβαδό των ηπατοκυττάρων για την μεταχείριση C υπολογίστηκε ως $83,2 \pm 28,2 \mu\text{m}^2$, για την F $95,9 \pm 32,5 \mu\text{m}^2$ και για την FK $98,0 \pm 33,3 \mu\text{m}^2$. Όσον αφορά για τα λιποσταγονίδια η μεταχείριση C είχε μέσον εμβαδό $35,3 \pm 18,4 \mu\text{m}^2$, η μεταχείριση F $49,6 \pm 21,3 \mu\text{m}^2$ και η μεταχείριση FK $38,3 \pm 19,2 \mu\text{m}^2$.

Πίνακας 4: Μετρήσεις εμβαδού (μm^2) ηπατοκυττάρων και λιποσταγονιδίων ανά πειραματική διαίτα. Ο αριθμός των μετρήσεων δίνεται εντός παρενθέσεως.			
	Δίαιτα χωρίς καμία προσθήκη	Δίαιτα με προσθήκη Fe	Δίαιτα με προσθήκη K και Fe
Ηπατοκύτταρα	83,2 $\pm$ 28,2 (299)	95,9 $\pm$ 32,5 (324)	98,0 $\pm$ 33,3 (303)
Λιποσταγονίδια	35,3 $\pm$ 18,4 (301)	49,6 $\pm$ 21,3 (296)	38,3 $\pm$ 19,2 (300)

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ομοιομορφία των δειγμάτων με το Levene's test. Και στις δύο περιπτώσεις, η αρχική υπόθεση αμφισβητήθηκε εκ νέου, διότι το p ήταν μικρότερο από 0.05 (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Τεστ Levene για εξέταση ομοιογένειας στη διακύμανση για το εμβαδό των ηπατοκυττάρων και των λιποσταγονιδίων για τις μεταχειρίσεις C, F, FK. Δεν υπήρξε ομοιογένεια στη διακύμανση ($p < 0.05$).					
		Statistic	df	df2	p
επιφάνια ηπατοκυττάρων	Levene's	3,58	2	924	0,028
επιφάνια λιποσταγονιδίων	Levene's	3,03	2	894	0,049

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε το Independent Samples Median Test τόσο για τα ηπατοκύτταρα όσο και για τα λιποσταγονίδια, διότι το p στο Levene's test ήταν μικρότερο από 0.05. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο στα ηπατοκύτταρα όσο και στα λιποσταγονίδια, το p ήταν μικρότερο από 0.05, επομένως καταλαβαίνουμε ότι υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων (Πίνακας 6).

Πίνακας 6 : Independent samples media test για εξέταση της διακύμανσης του εμβαδού των ηπατοκυττάρων και των λιποσταγονιδίων για τις μεταχειρίσεις C, F, FK. Υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων $p < 0.05$.		
test		sig
independent samples media test	ηπατοκυτταρα	0,000
independent samples media test	λιποσταγονιδια	0,000

Επίσης, με τη μέθοδο Median Pairwise, οι τρεις μεταχειρίσεις C, F, και FK συγκρίθηκαν μεταξύ τους τόσο στα ηπατοκύτταρα όσο και στα λιποσταγονίδια. Η μηδενική υπόθεση ορίστηκε ως ότι η πρώτη μεταχείριση δεν έχει στατιστικά σημαντική διαφορά από την δεύτερη. Αναλυτικότερα, όσον αφορά τα ηπατοκύτταρα, οι ομάδες C-F και C-FK παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$), ενώ η ομάδα F-FK είχε $p\text{-value} > 0.05$ ($p = 0.162$), καθιστώντας τη διαφορά μη στατιστικά σημαντική. Επίσης, ως προς τα λιποσταγονίδια, παρατηρήθηκε ότι οι ομάδες C-F και F-FK εμφάνισαν $p < 0.05$ ($p = 0.001$), με αποτέλεσμα να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων σε αυτές τις ομάδες. Τέλος, η ομάδα C-FK παρουσίασε μη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, με $p > 0.05$ ($p = 0.074$). Η μηδενική υπόθεση ορίστηκε ως ότι η πρώτη μεταχείριση δεν έχει στατιστικά σημαντική διαφορά από την 2.

Πίνακας 7: Median pairwise test για εξέταση στατιστικών διαφορών μεταξύ των μεταχειρίσεων C, FK, F των ηπατοκυττάρων και των λιποσταγονιδίων			
			p
Ηπατοκύτταρα	C	F	0.001
	C	FK	0.001
	F	FK	0.162
Λιποσταγονίδια	C	F	0.001
	C	FK	0.074
	F	FK	0.001

3.2) Συζήτηση

Σε ένα διατροφικό πείραμα που έγινε στον ινδικό κυπρίνο (*Labeo rohita*) και διήρκησε 93 ημέρες εξετάστηκε η επίδραση έξι διαφορετικών περιεκτικοτήτων σιδήρου σε ποσοστό 0, 25, 50, 75, 100, 125 ppm, με χρήση θεικού σιδήρου ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) εντός του σιτηρεσίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η 3η ομάδα, δηλαδή τα 50 ppm σιδήρου, παρουσίασαν καλύτερες επιδόσεις όσον αφορά την αύξηση βάρους, την μετατρεψιμότητα της τροφής και τον ρυθμό ανάπτυξης τους. Ακόμη, οι τροφές με μεγαλύτερα ποσοστά σιδήρου είχαν σαν αποτέλεσμα μικρότερη έως και αρνητική αύξηση του βάρους και κακή μετατρεψιμότητα της τροφής (Chanda et al. 2017).

Μια άλλη έρευνα αφορούσε την επίδραση του διατροφικού σιδήρου στο ανοσοποιητικό σύστημα, και στην ακεραιότητα των βραγχίων των νεαρών ιχθυδίων κυπρίνου (*Chortofagos Kyprinos*). Στην ερευνά εισήχθησαν 7 διαφορετικές τροφές όπου το ποσοστό του σιδήρου κυμαινόταν από 12,15mg/kg μέχρι 136,37mg/kg και διήρκησε 60 μέρες. Επίσης, τα ιχθίδια μολύνθηκαν με το βακτήριο *Flavobacterium* για να εξεταστεί η ανθεκτικότητα των βραγχίων, η όξινη φωσφατάση και η ποσότητα της μηλονοδιαλδεΐδης. Από τα αποτελέσματα αυτής της ερευνάς φάνηκε ότι η έλλειψη σιδήρου μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη δράση της όξινης φωσφατάσης και της λυσοζύμης, μείωση των επιπέδων mRNA του αναστολέα της αποπτωτικής πρωτεΐνης και σε εξασθενημένη ανοσολογική λειτουργία και δομική ακεραιότητα στα βράγχια του κυπρίνου. Η έρευνα έδειξε ότι οι τιμές του σιδήρου για τις 3 αυτές παραμέτρους είναι 76,52mg/kg, 80,43mg/kg και 83,17 mg/kg αντίστοιχα (Guo et al. 2018).

Επιπλέον σε μια ερευνά που δοκιμάστηκε η αντικατάσταση του ιχθυάλευρου από βαμβακόσπορο στον Ασιατικό οπλέγναθο (*Oplegnathus fasciatus*) σε ποσοστά από 0-50% και πιο συγκεκριμένα στις τροφές με ποσοστά 20% και 30% βαμβακόσπορου προστέθηκε 0,1% και 0,2% συμπλήρωμα φυτάσης και σιδήρου (Fe)

με σκοπό την διερεύνηση για μείωση χρήσης του ιχθυαλεύρου και την ανοσοποιητική αντίδραση του οργανισμού. Τα αποτελέσματα όσον αφορά τις τροφές με τον σίδηρο δεν έδειξαν σημαντική διαφορά στην ανάπτυξη του μεγέθους του οργανισμού και της αιμοσφαιρίνης σε σχέση με τις τροφές που δεν είχαν σίδηρο. Ακόμη στο ήπαρ παρατηρήθηκε αυξημένη ποσότητα γκοσσυπόλης και αυτό το ποσοστό αυξανόταν με βάση το ποσοστό του βαμβακόσπορου στην τροφή. Παρόλα αυτά στις τροφές που περιείχαν σίδηρο παρατηρήθηκε ότι στο ήπαρ δεν παρατηρήθηκε συγκέντρωση γκοσσηπόλης με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί ότι ο σίδηρος αποτρέπει την συσσώρευση γκοσσηπόλης στο ήπαρ. Παρόμοιο αποτέλεσμα είχαν και οι Shiyu and Chen (2022) οι οποίοι δοκίμασαν αντικατάσταση ιχθυαλεύρου με βαμβακόσπορο σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις με συμπλήρωμα σιδήρου στον κυπρίνο (*Ctenopharyngodon idellus*) για να μπορέσει να καταπολεμηθεί η συσσώρευση σιδήρου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ποσότητα σιδήρου πρέπει να κυμαίνεται από 1-2g για κάθε 1 g γκοσσυπόλης που περιέχεται στην τροφή για να μπορέσει να αντέξει στην υψηλή περιεκτικότητα του βαμβακάλευρου με σκοπό την ανακούφιση των εντερικών φλεγμονών και την αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας του εντέρου του κυπρίνου μέσω της ρύθμισης της ομοιόστασης (Lim and Lee 2009, Chen et al 2022).

Ακόμα σε νεαρά ιχθίδια λαυρακίου (*Dicentrarchus labrax*) έγινε διατροφική μελέτη με συμπλήρωμα διατροφικού σιδήρου σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις 63, 120, 188, 316, 425, and 554 mg/kg και δυο διαφορετικές θερμοκρασίες νερού, 27°C και 33°C, με σκοπό να διερευνηθεί η βέλτιστη ποσότητα σιδήρου που χρειάζεται το συγκεκριμένο είδος για να έχει την βέλτιστη ανάπτυξη, στην αντιοξειδωτική κατάσταση και στον μεταβολισμό του σιδήρου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι βέλτιστες τιμές σιδήρου στην τροφή είναι 178,5mg/kg στους 27 °C και 209mg/Kg

στους 33 °C. Αυτή η αύξηση στου 33 °C οφείλεται στην αυξημένη ροή του. επίσης, στις τροφές με υψηλή περιεκτικότητα σιδήρου παρατηρήθηκε καταστολή των εντερικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών του σιδήρου και ταυτόχρονα μειούμενη παραγωγή εψιδίνης (Wang et al. 2023).

Γενικά ο σίδηρος και το κάλιο είναι δυο πολύ σημαντικά στοιχεία για την ανάπτυξη των ιχθύων. Πιο συγκεκριμένα η έλλειψη σιδήρου συνδέεται με μικροκυταρική αναιμία, ανορεξία και με καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος και μειωμένη ανάπτυξη του οργανισμού (Nairz and Weiss.2020). Αντιθέτως, μια διατροφή υψηλή σε σίδηρο προκαλεί οξειδωτικό στρές (Papanikolaou and Pantopoulos 2005).

Σε μια δοκιμή υδροπονίας, όπου χρησιμοποιήθηκε νερό από απόβλητα υδατοκαλλιεργειών με την τεχνική της Καλλιέργειας σε λεπτό στρώμα θρεπτικού διαλύματος, δοκιμάστηκαν 4 διαφορετικές τροφές με διαφορετικές συγκεντρώσεις σιδήρου: T1 (1.0 mg/L), T2 (1.5 mg/L), T3 (2.0 mg/L) και T4 (2.5 mg/L), στον Σιαμαίο καρχαρία (*Pangasianodon hypophthalmus*), σε συνδυασμό με το φυτό σπανάκι (*Spinacia oleracea* L.). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η τροφή T2 επέδειξε την καλύτερη απόδοση στην ανάπτυξη των ιχθύων και στην ποιότητα του σπανακιού, χωρίς να θέτει σε κίνδυνο την υγεία του ιχθύος. Ωστόσο, σε υψηλότερες δόσεις σιδήρου (T3 και T4), παρατηρήθηκε μείωση στην ανάπτυξη των ιχθύων και στην απόδοση του σπανακιού. Παρόλα αυτά, η συγκέντρωση σιδήρου στο πλάσμα του αίματος, η ολική αιμοσφαιρίνη του πλάσματος και οι αιματολογικές παράμετροι αυξήθηκαν στις τελευταίες δύο μεταχειρίσεις .(Farooq et al. 2023)

Ακόμη όσον αφορά το κάλιο οι περισσότερες έρευνες σχετικά με τη διατροφή των ιχθύων με περίσσεια καλίου στηρίζονται περισσότερο στην ανάπτυξη των φυτών παρά των ιχθύων. Παρόλα αυτά πρέπει να σημειωθεί ότι το κάλιο έχει μια σημαντική επιρροή στον ρυθμό ανάπτυξης, στην επιβίωση τους αλλά και στα αιματολογικά χαρακτηριστικά. Μια τέτοια ερευνά πραγματοποιήθηκε στο αφρικανικό γατόψαρο (*Clarias gariepinus*) σε περίοδο 69 ημέρων. Συνολικά 630 γατόψαρα συμμετείχαν σε αυτό το διατροφικό πείραμα τα οποία τέθηκαν σε 7 διαφορετικές τροφές με διαφορετική ποσότητα καλίου και διαφορετικά συμπληρώματα καλίου. Πιο αναλυτικά το μυρμηκικό κάλιο (KDF) χορηγήθηκε σε ποσότητες 3, 6, 9 g/Kg, το χλωριούχο κάλιο (KCl) σε ποσοτητες 1,7, 3,4 και 5,1 g/kg ενώ η τελευταία τροφή ήταν ο μάρτυρας η οποία δεν περιείχε καθόλου συμπληρώματα καλίου. Ακόμη, το πείραμα διεξάχθηκε σε σύστημα ανακύκλωσης νερού (RAS). Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας ήταν ανάμικτα και δεν μπόρεσαν να προσδιορίσουν την βέλτιστη ποσότητα καλίου. Όσον αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά η KDF των 6g είχε την καλύτερη μετατρεψιμότητα της τροφής (FCR) αλλά τη συνολική αύξηση του βάρους είχε η KCL των 3,4g. Σχετικά με τα αιματολογικά χαρακτηριστικά παρατηρήθηκε ότι η καλύτερη τροφή ήταν η KDF των 9g διότι οι ιχθύες με αυτή την τροφή είχαν αυξημένο αιματοκρίτη, αιμοσφαιρίνη και ποσοστό αιμοσφαιρίνης στα κύτταρα σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Όσον αφορά τον μέσο όγκο ερυθρών η KDF των 9g έρχεται δεύτερη μετά την KCl των 1,7g (Siqwepu, Salie, and Goosen 2020). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στα ιχθίδια του αφρικανικού γατόψαρου (Wenzel et al. 2021).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ιστολογική ανάλυση του ήπατος, στην οποία παρατηρήθηκε ότι το κάλιο δεν είχε καμία επίδραση στη μορφολογία του. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι όσον αφορά τα ποσοστά σιδήρου μεγαλύτερη ποσότητα είχε ο

μάρτυρας. Τέλος η συγκεκριμένη έρευνα έδειξε ότι για τις αιματολογικές εξετάσεις η KDF είναι το καλύτερο συμπλήρωμα καλίου αλλά σε ενυδρειοπονικές καλλιέργειες πρέπει να τροποποιηθεί κατάλληλα για να μπορέσει να ωφελήσει του φυτικούς οργανισμούς χωρίς να είναι επιβλαβείς για τους ιχθύς και να μην επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξης τους (Siqwepu, Salie, and Goosen 2020).

4) Συμπεράσματα

Ο σίδηρος και το κάλιο αποτελούν βασικά στοιχεία της διατροφής της τιλάπιας της Μοζαμβίκης και άλλων ιχθύων, καθώς συμβάλλουν τόσο στη φυσική ανάπτυξη όσο και στην εσωτερική λειτουργία του οργανισμού. Μελέτες έχουν δείξει ότι η πρόσληψη σιδήρου (F) και η συνδυαστική πρόσληψη σιδήρου και καλίου (FK) προάγουν την ανάπτυξη των ηπατοκυττάρων. Επίσης, όσον αφορά τα λιποσταγονίδια, η πρόσληψη περισσότερου σιδήρου (F) έχει δείξει στατιστικά μεγαλύτερη επίδραση σε σχέση με άλλες μεθόδους, αν και αυτό μπορεί να επιφέρει αρνητικές επιπτώσεις στη φυσιολογία του ιχθύος.

Γενικά, η προσθήκη σιδήρου και καλίου ως συμπληρώματα σε συστήματα ενυδριοποίησης για την τιλάπια της Μοζαμβίκης (*Oreochromis mozambicus*) και άλλα είδη ιχθύων έχει αποδειχθεί ευεργετική, όπως έχουν δείξει αρκετές μελέτες, χωρίς να προκαλεί βλάβη στην υγεία των ιχθύων. Ωστόσο, οι δόσεις πρέπει να παραμένουν εντός φυσιολογικών ορίων, τα οποία πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω για την εύρεση της βέλτιστης διατροφής.

Επιπλέον, συνιστάται η διεξαγωγή νέων ερευνών για την εξέλιξη, τη βελτίωση και τη βελτιστοποίηση αυτής της μεθόδου διατροφής.

5)Βιβλιογραφία

5.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Ahmad Khuram Shahzad, Sidra Yaqoob, Mahwash Mahar Gul. 2022. 'Dynamic green synthesis of iron oxide and manganese oxide nanoparticles and their cogent antimicrobial, environmental and electrical applications', 42: 239-63.
- Alexis Maria, Argyro Andriopoulou, Ioannis Nengas. 2002. 'Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, at two water temperatures', *Aquaculture*, 210: 59-67.
- Anderson J., A. J. Jackson, A. J. Matty, B. S. Capper. 1984. 'Effects of dietary carbohydrate and fibre on the tilapia *Oreochromis niloticus* (Linn.)', *Aquaculture*, 37: 303-14.
- B. R. Allanson, A. Bok, N. I. Van Wyk. 1971. 'The influence of exposure to low temperature on *Tilapia mossambica* Peters (Cichlidae).', *Journal of Fish Biology*, 9: 181-85.
- Barry Butler, Damien W. Burrows. 2007. "DISSOLVED OXYGEN GUIDELINES FOR FRESHWATER HABITATS OF NORTHERN AUSTRALIA " In, 51. James Cook University.
- Buddington Randal, Victoria Kuz'mina. 2000. The Laboratory Fish. In: Chapter 23. Digestive System.
- Chanda Soumen, A. Samanta, Baidya Paul, Koushik Ghosh, Shiba Giri. 2017. 'Effect of Dietary Iron Level on Growth Performance and Enzyme Activity in Rohu (*Labeo rohita* Hamilton) Fingerlings', *Indian Journal of Animal Nutrition*, 34: 224.
- Chen Cuiying, Baoli Sun, Xiaoxia Li, Peiyu Li, Wutai Guan, Yingzuo Bi, Qing Pan. 2013. 'N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Quantification of optimum requirement of dietary linolenic acid in juvenile fish', *Aquaculture*, 416-417: 99-104.
- Chen Shiyu, Yan Lin, Linghong Miao, Bo Liu, Xianping Ge. 2022. 'Iron homeostasis of liver-gut axis alleviates inflammation caused by dietary cottonseed meal through dietary Fe^{2+} supplementation in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)', *Aquaculture*, 561: 738647.
- Dj Russell., Paul. Thuesen, Fiona. Small. 2012. *Tilapia in Australia: Development of management strategies for the control and eradication of feral tilapia populations in Australia*.
- El-Sayed Abdel-Fattah M. 2020. *Tilapia Culture (Second Edition)* (Academic Press).

- FAO. 'Nile tilapia - *Oreochromis niloticus*'. <https://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/nile-tilapia/nile-tilapia-home/en/>. (προσβαση:30-04-2024)
- Farooq Aatira, Ajit Kumar Verma, Chandrakant Mallikarjun Hittinahalli, Tincy Varghese, Madhuri Shrikant Pathak. 2023. 'Iron supplementation in aquaculture wastewater and its impact on osmoregulatory, haematological, blood biochemical, and stress responses of pangasius with spinach in nutrient film technique based aquaponics', *Aquaculture*, 567: 739250.
- fishbase. 'Oreochromis mossambicus (Peters, 1852)'. https://www.fishbase.se/country/CountrySpeciesSummary.php?c_code=608&id=3. (προσβαση:30-04-2024)
- Fitzsimmons Kevin. 2019. "Oreochromis mossambicus (Mozambique tilapia)." In. cabi digital library: CABI Compendium.
- Gatlin Delbert M. 2003. '12 - Nutrition and Fish Health.' in John E. Halver and Ronald W. Hardy (eds.), *Fish Nutrition (Third Edition)* (Academic Press: San Diego).
- Gauthier D.P. Konnert, Walter J.J. Gerrits, Sander W.S. Gussekloo, Johan W. Schrama,. 2022. "Balancing protein and energy in Nile tilapia feeds." In, 11. Global Seafood Alliance.
- Guo Yan-Lin, Pei Wu, Wei-Dan Jiang, Yang Liu, Sheng-Yao Kuang, Jun Jiang, Ling Tang, Wu-Neng Tang, Yong-An Zhang, Xiao-Qiu Zhou, Lin Feng. 2018. 'The impaired immune function and structural integrity by dietary iron deficiency or excess in gill of fish after infection with *Flavobacterium columnare*: Regulation of NF- κ B, TOR, JNK, p38MAPK, Nrf2 and MLCK signalling', *Fish & Shellfish Immunology*, 74: 593-608.
- Hisano Hamilton, Phillipe T. L. Barbosa, Liliam A. Hayd, Cristiano C. Mattioli. 2019. 'Evaluation of Nile tilapia in monoculture and polyculture with giant freshwater prawn in biofloc technology system and in recirculation aquaculture system', *International Aquatic Research*, 11: 335-46.
- K. Chinnadurai, P. Prema , V. Veeramanikandan , K. Ramesh Kumar , Van-Huy Nguyene, Najat Marraiki , Nouf S.S. Zaghloul , P. Balaji. 2022. "Toxicity evaluation and oxidative stress response of fumaronitrile, a persistent organic pollutant (POP) of industrial waste water on tilapia fish (*Oreochromis mossambicus*)." In *Environmental Research*. Environmental Research.
- Lim Chhorn, Mediha Yildirim-Aksoy, Phillip Klesius. 2011. 'Lipid and Fatty Acid Requirements of Tilapias', *North American Journal of Aquaculture*, 73: 188-93.
- Lim Se-Jin, Kyeong-Jun Lee. 2009. 'Partial replacement of fish meal by cottonseed meal and soybean meal with iron and phytase supplementation for parrot fish *Oplegnathus fasciatus*', *Aquaculture*, 290: 283-89.

- Mahmoudi Morteza, Shilpa Sant, Ben Wang, Sophie Laurent, Tapas Sen. 2011. 'Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63: 24-46.
- Mashifane T. B., and N. A. G. Moyo. 2014. 'Acute toxicity of selected heavy metals to *Oreochromis mossambicus* fry and fingerlings', *African Journal of Aquatic Science*, 39: 279-85.
- Moriarty Christine M., D. J. W. Moriarty. 1973. 'Quantitative estimation of the daily ingestion of phytoplankton by *Tilapia nilotica* and *Haplochromis nigripinnis* in Lake George, Uganda', *Journal of Zoology*, 171: 15-23.
- Nairz Manfred, Günter Weiss. 2020. 'Iron in infection and immunity', *Molecular Aspects of Medicine*, 75: 100864.
- New Michael B., Somsak Singholka, and Methil Narayanan Kutty. 2000.
- Ng, Wing-Keong, and Cheong-Yew Chong. 2004. 'An overview of lipid nutrition with emphasis on alternative lipid sources in tilapia feeds', *New Dimensions in Farmed Tilapia. Proceedings of the Sixth International Symposium on Tilapia in Aquaculture*.
- Papanikolaou G., K. Pantopoulos. 2005. 'Iron metabolism and toxicity', *Toxicol Appl Pharmacol*, 202: 199-211.
- Philippart J.-C., J.-C. Ruwet. 1982. 'Ecology and distribution of tilapias': 15-60.
- Piccinetti Chiara Carla, Costanza Montis, Massimo Bonini, Rosaria Laurà, Maria Cristina Guerrero, Giuseppe Radaelli, Fabio Vianello, Veronica Santinelli, Francesca Maradonna, Valentina Nozzi, Andrea Miccoli, Ike Olivotto. 2014. 'Transfer of Silica-Coated Magnetic (Fe₃O₄) Nanoparticles Through Food: A Molecular and Morphological Study in Zebrafish', *Zebrafish*, 11: 567-79.
- Radini Ibrahim Ali, Nazim Hasan, Maqsood Ahmad Malik, Zaheer Khan. 2018. 'Biosynthesis of iron nanoparticles using *Trigonella foenum-graecum* seed extract for photocatalytic methyl orange dye degradation and antibacterial applications', *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 183: 154-63.
- Rashk E. Eram, Koel Mukherjee, Ashish Saha, Surajit Bhattacharjee, Anwar Mallick, Biplab Sarkar. 2022. 'Nanoscale iron for sustainable aquaculture and beyond', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 44: 102440.
- Rodjaroen Somrak, Karun Thongprajukaew, Peerapong Jaihao, Suktianchai Saekhow, Nutt Nuntapong. 2020. 'Mixed feeding schedules switching between dietary crude protein levels for mono-sex male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)', *Aquaculture Reports*, 18: 100509.

- Sakhare Vishwas, Shivaji Jetithor. 2016. 'Food and feeding behaviour of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) from Borna Reservoir of Maharashtra', *Journal of Fisheries*, 4: 431-34.
- Siqwepu Oyama, Khalid Salie, Neill Goosen. 2020. 'Evaluation of potassium diformate and potassium chloride in the diet of the African catfish, *Clarias gariepinus* in a recirculating aquaculture system', *Aquaculture*, 526: 735414.
- Sundaria Naveen, Manoj Singh, Prateek Upreti, Ravendra P. Chauhan, J. P. Jaiswal, Anil Kumar. 2019. 'Seed Priming with Iron Oxide Nanoparticles Triggers Iron Acquisition and Biofortification in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Grains', *Journal of Plant Growth Regulation*, 38: 122-31.
- Villarreal F. D., G. K. Das, A. Abid, I. M. Kennedy, D. Kultz. 2014. 'Sublethal effects of CuO nanoparticles on Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) are modulated by environmental salinity', *PLOS ONE*, 9: e88723.
- Waldvogel-Abramowski S., G. Waeber, C. Gassner, A. Buser, B. M. Frey, B. Favrat, J. D. Tissot. 2014. 'Physiology of iron metabolism', *Transfus Med Hemother*, 41: 213-21.
- Wang, Miao, and Maixin Lu. 2016. 'Tilapia polyculture: a global review', *Aquaculture Research*, 47: 2363-74.
- Wang, Zhe, Xueshan Li, Kangle Lu, Ling Wang, Xuekun Ma, Kai Song, and Chunxiao Zhang. 2023. 'Effects of dietary iron levels on growth performance, iron metabolism and antioxidant status in spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*) reared at two temperatures', *Aquaculture*, 562: 738717.
- Watanabe Takeshi, Viswanath Kiron, Shuichi Satoh. 1997. 'Trace minerals in fish nutrition', *Aquaculture*, 151: 185-207.
- Wenzel Lisa C., Sebastian M. Strauch, Ep Eding, Francisco X. Presas-Basalo, Berit Wasenitz, Harry W. Palm. 2021. "Effects of Dissolved Potassium on Growth Performance, Body Composition, and Welfare of Juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*).". In *Fishes*.
- Yonar M. Enis. 2012. 'The effect of lycopene on oxytetracycline-induced oxidative stress and immunosuppression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.)', *Fish & Shellfish Immunology*, 32: 994-1001.

5.2) Ελληνική βιβλιογραφία

- Παναγιώτης Βερίλλης, Έλενα Μεντέ. 2017. *Ιστοφυσιολογία ιχθύων και καρκινοειδών* (πανεπιστημιακές εκδόσεις θεσσαλίας: βολός).

6)Abstract

Tilapia of Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) is considered one of the most important species in aquaculture, both for its commercial value as well as its nutritional benefits. In this study, the histology of the liver of Mozambique tilapia was analyzed, focusing particularly on the hepatic cell area and lipid droplets. The aim was to determine the impact of two important nutrients, iron (Fe) and potassium (K), on this specific organ. More specifically, for the experiment, 15 tilapia were collected, all of which had participated in an aquaponics trial involving the supplementation of iron (Fe) and potassium (K) in the water. The results indicated that the area of liver cells was greater when both iron (Fe) and potassium (K) were added to the water (F and FK). Additionally, regarding lipid droplets, supplementation with iron (Fe) led to larger lipid droplets.