

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

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Η επίδραση της ασιτίας και της διατροφής με φυσική και τεχνητή τροφή στην ιστολογία του πεπτικού αδένα της καραβίδας (*Nephrops norvegicus*, Linnaeus 1758)»

Κρούτης Κωνσταντίνος

ΒΟΛΟΣ 2010

«Η επίδραση της ασιτίας και της διατροφής με φυσική και τεχνητή τροφή στην ιστολογία του πεπτικού αδένα της καραβίδας (*Nephrops norvegicus*, Linnaeus 1758)»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

- 1) **Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης**, Λέκτορας, Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**,
- 2) **Ελένη Μεντέ**, Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια, Φυσιολογία Θρέψης Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**,
- 3) **Ελένη Γκολομάζου**, Λέκτορας, Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, τον κ. Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη, Λέκτορα του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστήμιου Θεσσαλίας για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από την κ. Ελένη Μεντέ, Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστήμιου Θεσσαλίας και την κ. Ελένη Γκολομάζου, Λέκτορα του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστήμιου Θεσσαλίας για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Παναγιώτη Βερίλλη, Λέκτορα του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστήμιου Θεσσαλίας για την ανιδιοτελή βοήθεια του με σκοπό την μικροσκοπική παρατήρηση και εξέταση των απεικονίσεων των δειγμάτων.

Τέλος αλλά όχι λιγότερο, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες του γενικότερου πειράματος την κ. Βασιλική Κεφεκέ, τον κ. Ζήση Πετμεζά και την κ. Μαρία Σακκομήτρου καθώς επίσης την υποψήφια διδάκτορα κ. Αλεξάνδρα Μεζίτη για την αμέριστη συμπαράσταση τους κατά την διάρκεια του πειράματος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν να διερευνηθεί η επίδραση διαφορετικών διαίτων (φυσική και τεχνητή τροφή), καθώς και της ασιτίας στην ιστολογία του πεπτικού αδένου της караβίδας *N. norvegicus*. 47 караβίδες του είδους *N. norvegicus*, μέσου σωματικού βάρους $46,7 \pm 9,2$ g, αλιεύθηκαν από τον Παγασητικό κόλπο και μεταφέρθηκαν στις εγκαταστάσεις του σταθμού υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος. Οι караβίδες χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες: μια ομάδα (ομάδα P) δώδεκα (12) караβίδων που διατράφηκαν με εμπορικά σύμπληκτα, μια ομάδα (ομάδα M) δεκαέξι (16) караβίδων που διατράφηκαν με κατεψυγμένη σάρκα μυδιών και μια ομάδα (ομάδα S) δεκαεννιά (19) караβίδων οι οποίες παρέμειναν σε ασιτία. Μετά την εκτροφή τους για 20 εβδομάδες, ελήφθησαν δείγματα ιστού ηπατοπαγκρέατος των караβίδων και των τριών ομάδων και μελετήθηκαν ιστολογικά. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η μέση τιμή του ηπατοσωματικού δείκτη είναι μεγαλύτερη στις караβίδες που διατράφηκαν με μύδια, μικρότερη στις караβίδες που διατράφηκαν με σύμπληκτα και ακόμη μικρότερη στις караβίδες που παρέμειναν σε ασιτία. Αυτό υποδηλώνει πως οι караβίδες που διατράφηκαν με μύδια βρίσκονταν σε καλύτερη διατροφική κατάσταση από εκείνες που διατράφηκαν με σύμπληκτα ή παρέμειναν σε ασιτία.

Η αναλογία του αυλού προς την επιφάνεια του σωληνίσκου του πεπτικού αδένου ήταν μεγαλύτερη στις караβίδες που διατράφηκαν με σύμπληκτα του εμπορίου και μικρότερη στις караβίδες που διατράφηκαν με μύδια. Αυτό υποδηλώνει πως η караβίδα (*N. norvegicus*) όταν διατρέφεται με σύμπληκτα καταβάλλει πιο εντατική προσπάθεια για ενδοκυτταρική πέψη στον πεπτικό αδένου από ότι όταν διατρέφεται με μύδια. Περαιτέρω έρευνες είναι αναγκαίες ώστε να διερευνηθεί η καταλληλότητα και

άλλων φυσικών τροφών, αλλά και η σύσταση κατάλληλων τεχνητών τροφών (συμπλήκτων) στη διατροφή της *N. norvegicus*.

Λέξεις κλειδιά: *Nephrops norvegicus*, πεπτικός αδένας, διατροφή, ιστολογία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----------|
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 1 |
| 1.1 Βιολογία της καραβίδας <i>Nephrops norvegicus</i> | 1 |
| 1.2 Φυσιολογία θρέψης της καραβίδας | 3 |
| 1.3 Σκοπός της έρευνας | 8 |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 9 |
| 2.1 Συλλογή πειραματόζωων..... | 9 |
| 2.2 Συνθήκες εκτροφής | 11 |
| 2.3 Λειτουργία κλειστού κυκλώματος | 15 |
| 2.4 Τροφές και χορήγηση τροφής | 18 |
| 2.5 Μέτρηση φυσικοχημικών παραμέτρων | 19 |
| 2.6 Θανάτωση καραβίδων και λήψη ηπατοπαγκρέατος..... | 19 |
| 2.7 Ιστολογική εξέταση | 20 |
| 2.7.1 Απομόνωση του ηπατοπαγκρέατος..... | 20 |
| 2.7.2 Μονιμοποίηση του ιστού | 20 |
| 2.7.3 Αφυδάτωση - διαύγαση - έγκλιση ιστού σε παραφίνη | 21 |
| 2.7.4 Εμβάπτιση, εγκλεισμός σε παραφίνη | 22 |
| 2.7.5 Τομή ιστού στην μικροτόμο | 22 |
| 2.7.6 Αποπαραφίνωση | 23 |
| 2.7.7 Χρώση ιστού..... | 23 |
| 2.7.8 Στερεοποίηση των τομών | 25 |
| 2.8 Μικροσκοπική εξέταση και ανάλυση των απεικονίσεων των δειγμάτων ... | 26 |
| 2.9 Στατιστική επεξεργασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 27 |
| 3.1 Επίδραση των διαφορετικών διαίτων στον ηπατοσωματικό δείκτη των καραβίδων..... | 27 |
| 3.2 Επίδραση των διαφορετικών διαίτων στη δομή των σωληνίσκων του πεπτικού αδένος των караβίδων..... | 28 |
| 3.3 Επίδραση των διαφορετικών διαίτων στον αριθμό των Β-κυττάρων των καραβίδων..... | 37 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 39 |
| 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 43 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 44 |
| ABSTRACT | 46 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Βιολογία της караβίδας *Nephrops norvegicus*

Η караβίδα *Nephrops norvegicus*, Linnaeus 1758 (Εικ. 1.1) είναι ένα δεκάποδο καρκινοειδές της οικογένειας Nephropidae, το οποίο κατανέμεται στον ανατολικό Ατλαντικό ωκεανό, από το Μαρόκο μέχρι τη Νορβηγία και την Ισλανδία, καθώς και στη Μεσόγειο θάλασσα (Εικ.1.2) (Fisher *et al.* 1987, Relini *et al.* 1999). Η συστηματική κατάταξη του είδους είναι:

| | |
|--------------------|----------------------------|
| Κλάση: | Decapoda |
| Τάξη: | Malacostraca |
| Οικογένεια: | Nephropidae |
| Είδος | <i>Nephrops norvegicus</i> |



Εικόνα 1.1. *N. norvegicus* (Picton & Morrow 2007).



Εικόνα 1.2. Γεωγραφική κατανομή της *N. norvegicus* (FAO Fisheries and Aquaculture Department).

Το σώμα της караβίδας (*N. norvegicus*) είναι μεσαίου μεγέθους, το οποίο καλύπτεται από σκληρό εξωσκελετό και φέρει δαγκάνες (Relini *et al.* 1999). Η κοιλιακή χώρα είναι επιμηκυμένη και καταλήγει σε μια ουρά ελικοειδούς σχήματος που επιτρέπει στην караβίδα να κολυμπάει. Ωστόσο, η συμπεριφορά της *N. norvegicus* είναι περισσότερο βαδιστική παρά κολυμβητική (Fisher *et al.* 1987, Relini *et al.* 1999).

Στο πρώτο ζεύγος κεφαλικών απολήξεων βρίσκονται οι οφθαλμοί, οι οποίοι είναι μειωμένης όρασης και φέρουν κινητή βάση στήριξης. Το πρώτο ζεύγος κεραιών είναι κοντό και διχαλωτό. Το δεύτερο ζεύγος κεραιών είναι μακρύ και μη διχαλωτό. Ως δεκάποδο καρκινοειδές, κάθε άτομο του είδους διαθέτει 5 ζεύγη πλεοποδίων και 5 ζεύγη ποδιών, εκ των οποίων τα 3 πρώτα ζεύγη φέρουν δαγκάνες στις άκρες τους. Τα 4 ζεύγη αποτελούν τα βαδιστικά πόδια, ενώ το πέμπτο ζεύγος έχει διαφοροποιηθεί σε δαγκάνες τεμαχισμού και θρυμματοποίησης (Relini *et al.* 1999).

Η ανάπτυξη της, όπως και σε όλα τα καρκινοειδή, είναι μη συνεχής και εξαρτάται από τις διαδοχικές αλλαγές του εξωσκελετού (εκδύσεις). Σε κάθε αλλαγή εξωσκελετού, ο παλιός εξωσκελετός διαρρηγνύεται και η караβίδα μεγαλώνει πολύ γρήγορα πριν ο καινούριος εξωσκελετός σκληρύνει. Στα νεαρά άτομα της караβίδας δεν έχει διαπιστωθεί κάποια συγκεκριμένη περιοδικότητα στις αλλαγές του εξωσκελετού, οι οποίες φαίνεται ότι συμβαίνουν καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (Gramitto 1998). Στα ενήλικα θηλυκά άτομα υπάρχει συγχρονισμός και συνήθως συμβαίνει μετά την επώαση των αυγών (Δεκέμβριος-Μάρτιος) (Gramitto 1998).

Η караβίδα (*N. norvegicus*) είναι ένα είδος με διακριτά φύλα. Τα αρσενικά άτομα είναι κατά βάση μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα θηλυκά (Mente *et al.* 2009). Παρόλο που οι Fisher *et al.* (1987) αναφέρουν ότι το μέγιστο μήκος σώματος που φτάνει το είδος είναι τα 24 cm, κατά καιρούς έχουν συλληφθεί και μεγαλύτερα άτομα,

κυρίως στη βόρειο Αδριατική θάλασσα. Συγκεκριμένα, ο Crnkovic (1965), αναφέρει για άτομα με συνολικό μήκος σώματος τα 26,5 cm που αλιεύτηκαν στα κανάλια της Αδριατικής θάλασσας.

Η караβίδα *N. norvegicus* τρέφεται κυρίως με άλλα μικρά δεκάποδα καρκινοειδή, πολύχαιτους, εχινόδερμα, ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς και ψάρια (Thomas & Davidson 1962, Sarda & Valladares 1990, Cristo & Cartes 1998). Σε μελέτη εξέτασης στομαχικού περιεχομένου του *N. norvegicus* έχουν ανιχνευτεί κομμάτια από κέλυφος και από πόδια άλλων δεκάποδων, καθώς και τμήματα χόνδρων και ιστών από ψάρια (Cristo & Cartes 1998). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι το καλοκαίρι που είναι η περίοδος αναπαραγωγής, το στομαχικό περιεχόμενο ήταν μειωμένο (Cristo & Cartes 1998). Καραβίδες που συλλέχτηκαν με τράτες στα ανοικτά της Βαρκελώνης (βορειοδυτική Ισπανία) σε βάθος 400 m το χειμώνα του 1986, τρέφονταν με διάφορα είδη όπως *Nereis spp.* (με το μαλακό ιστό αυτών), ορισμένα είδη Crangonidae (κυρίως με το σκληρό ιστό, κέλυφος, αυτών) και *Engraulis encrassicolus* (με μαλακούς και σκληρούς ιστούς, και σε συνδυασμό μύες και οστά) (Sarda & Valladares 1990).

1.2. Φυσιολογία θρέψης της караβίδας

Ο Conklin (1995) έχει περιγράψει τη φυσιολογία της θρέψης των караβίδων και αστακών (συνομοταξία Astacidea που περιλαμβάνει τις οικογένειες Nephropidae και Homaridae). Οι караβίδες εντοπίζουν την τροφή τους από απόσταση μέσω οσφρητικών οργάνων που βρίσκονται στις κεραίες τους. Η τροφή τεμαχίζεται σε μικρά κομμάτια μέσω του 3^{ου} ζεύγους δαγκανών και προωθείται στον οισοφάγο μέσω των συλληπτήριων οργάνων. Στον οισοφάγο, η τροφή ενυδατώνεται μέσω σιαλικών εκκρίσεων, χωρίς ωστόσο να ξεκινήσει η ενζυμική διάσπαση της, και προωθείται στην

καρδιακή μοίρα του στομάχου. Εκεί, η τροφή διασπάται σε μικρότερου μεγέθους σωματίδια μέσω του γαστρικού υγρού, το οποίο είναι εμπλουτισμένο με πεπτικά ένζυμα που εκκρίνονται από το ηπατοπάγκρεας. Έπειτα, τα σωματίδια της τροφής προωθούνται στην πυλωρική μοίρα του στομάχου, όπου μειώνεται ακόμα περισσότερο το μέγεθος τους πριν προωθηθούν με τη σειρά τους στον πεπτικό αδένα.

Το ηπατοπάγκρεας ή πεπτικός αδένας, όπως συχνότερα αναφέρεται για τα καρκινοειδή (Weel 1974, Gibson & Barker 1979), συμμετέχει σε διάφορες μεταβολικές δραστηριότητες. Κυρίως, είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση και την έκκριση των πεπτικών ενζύμων τα οποία ξεκινούν τη διαδικασία της πέψης των τροφών όταν αυτές διέλθουν στο στόμαχο. Επίσης, ο πεπτικός αδένας είναι το όργανο στο οποίο ολοκληρώνεται η διαδικασία της πέψης των τροφών. Περαιτέρω, στον πεπτικό αδένα συμβαίνει η απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών και μάλιστα σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι στο έντερο. Επίσης, συμμετέχει στην απέκκριση των περιττωμάτων, τον κύκλο των εκδύσεων και την αποθήκευση των λιπιδίων, των υδατανθράκων και των ανόργανων στοιχείων (Factor 1995).

Ο πεπτικός αδένας των καραβίδων, οποίος καταλαμβάνει περίπου το 2-6% της μάζας του σώματος, αποτελείται από 2 συμμετρικούς λοβούς και βρίσκεται στο ανώτερο μέρος του σώματος, ακριβώς κάτω απ την καρδιά. Αποτελείται από εκατοντάδες μικροσωληνίσκους που καταλήγουν σε δυο συμμετρικούς θαλάμους, οι οποίοι με την σειρά τους καταλήγουν στα πυλωρικά τυφλά του στομάχου. Κάθε σωληνίσκος έχει ένα διπλό δίκτυο από διαμήκεις και κυκλικούς μύες, οι οποίοι συστέλλονται και διαστέλλονται, διασφαλίζοντας μέσα τους την κίνηση των υγρών (Guillaume *et al.* 1999).

Στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης της караβίδας (στάδια ναυπλίου και μύσιδας), ο πεπτικός αδένας αρχίζει να διακρίνεται γύρω από το πρώιμο στομάχι και έχει τη μορφή απλού σάκου στη συγκεκριμένη φάση. Στο στάδιο ανάπτυξης της προνούμφης, οι μικροσωληνίσκοι μεγαλώνουν και αυξάνουν σε αριθμό. Ο συνδετικός ιστός που τους περιβάλλει αρχίζει να αναπτύσσεται και δημιουργεί ένα δίκτυο μυϊκών ινών που διαμορφώνει το τελικό σχήμα του πεπτικού αδένου. Στα πλήρως μεταμορφωμένα στάδια ανάπτυξης των караβίδων, η βασική δομή των σωληνίσκων δε διαφέρει πολύ από αυτή των πρώιμων σταδίων και ο αδένας αποτελείται από μία ομάδα τυφλών σωληνίσκων, οι οποίοι απολήγουν στο μεσέντερο (Guillaume *et al.* 1999).

Τα τοιχώματα των σωληνίσκων αποτελούνται από διακριτές περιοχές (ζώνες) με διαφορετικό λειτουργικό ρόλο. Σε αυτά διακρίνεται μια εξωτερική ζώνη διαφοροποίησης κυττάρων που αποτελείται από εμβρυονικά κύτταρα, μία ενδιάμεση περιοχή που αποτελείται από μία ή περισσότερες λειτουργικές ζώνες με ενδοκρινή ή απορροφητικό ρόλο και τέλος, μία εσωτερική ζώνη όπου τα κύτταρα σταδιακά αποδομούνται και διοχετεύονται εντός του πεπτικού σωλήνα. Σχετικά με την ονομασία, την κατάταξη και τη λειτουργία των κυττάρων που δομούν τους σωληνίσκους υπάρχει διχογνωμία μεταξύ των ερευνητών (Conklin 1995). Ωστόσο, υπάρχει μια γενική παραδοχή για τις επεξηγήσεις που παρατίθενται παρακάτω (Σχ. 1.3) (Guillaume *et al.* 1999).

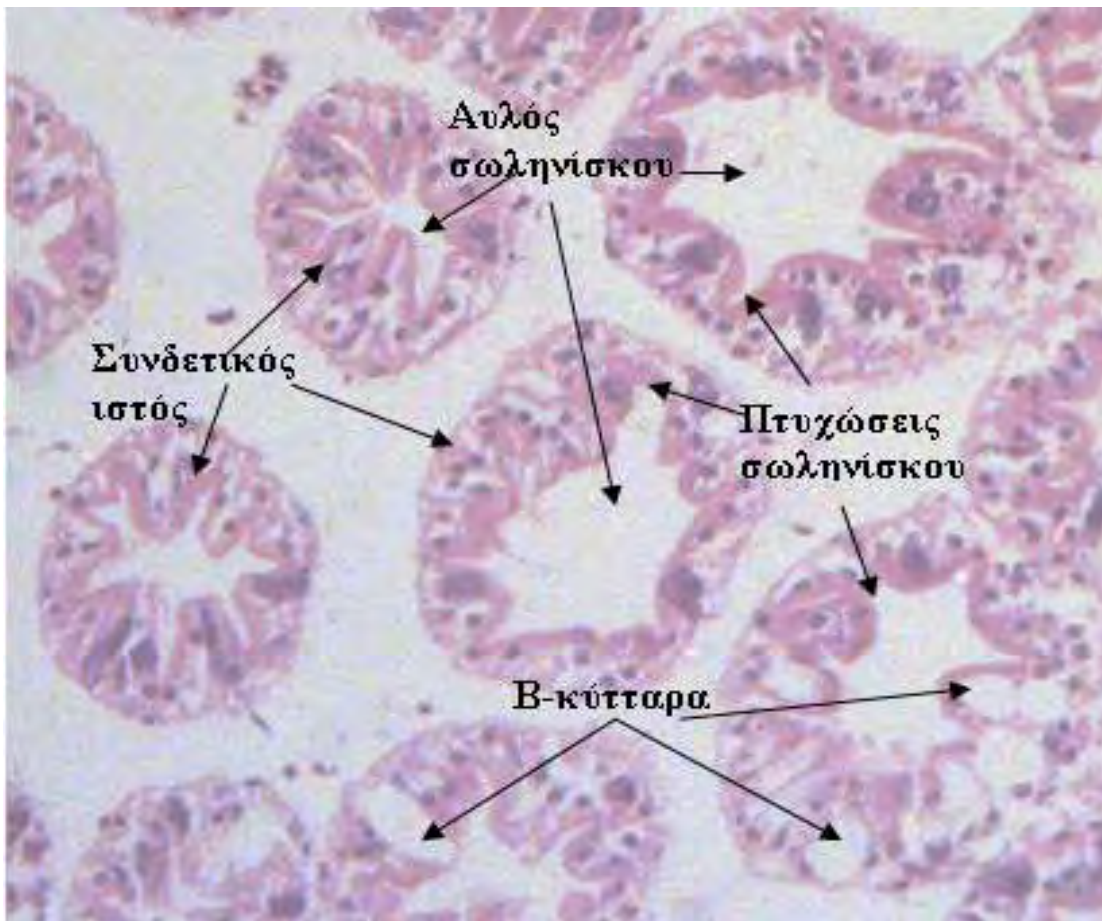
Οι τέσσερις βασικοί τύποι κυττάρων που βρίσκονται στον πεπτικό αδένου των καρκινοειδών αναφέρονται με τα αρχικά που πρότειναν οι Hirsch και Jacobs το 1930: E-κύτταρα ονομάζονται τα εμβρυονικά, R-κύτταρα ονομάζονται τα αναρροφητικά κύτταρα, F-κύτταρα τα ιώδη και B-κύτταρα ονομάζονται τα κύτταρα με μορφή «φουσκάλας». Η μεταξύ τους σχέση και η ακριβής λειτουργία τους είναι αμφιλεγόμενες

και διαφέρουν ανάλογα με τα είδη. Ωστόσο σύμφωνα με τους Barker και Gibson (1977), η πιο πιθανή σειρά είναι: τα E-κύτταρα διαφοροποιούνται σε R και F κύτταρα, με τα F-κύτταρα να ωριμάζουν μετέπειτα σε B-κύτταρα (Gibson 1983). Ένας επιπλέον τύπος κυττάρων, τα μικροσκοπικά M-κύτταρα, που εμφανίζονται στις γαρίδες του γένους Penaidae δεν έχουν αναγνωριστεί στις караβίδες και τους αστακούς (Al-Mohanna *et al.* 1985).

Σύμφωνα με τους Gibson και Barker (1979), κάθε τύπος κυττάρου έχει διακεκριμένο φυσιολογικό ρόλο στον πεπτικό αδένα. Τα εμβρυονικά E κύτταρα στην εξωτερική ζώνη των σωληνίσκων είναι τα μόνα που υφίστανται κυτταρική διαίρεση και είναι αδιαφοροποίητα πρόγονα κύτταρα των F και R κυττάρων. Τα F κύτταρα περιέχουν άφθονο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο, το οποίο τους προσδίδει την ινώδη εμφάνιση σε επίπεδο μικροσκοπίας φωτός. Τα πεπτικά ένζυμα που παράγονται στο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο συγκεντρώνονται στο σύστημα Golgi των F κυττάρων και αποθηκεύονται στα κυστίδια του κυτταροπλάσματος. Καθώς τα κυστίδια επεκτείνονται και συγχωνεύονται μεταξύ τους, δημιουργούνται ενιαία και μεγάλα κυστίδια που περιβάλλονται από ένα λεπτό στρώμα κυτταροπλάσματος και τα οποία συμπίεζον περιφερειακά τις υπόλοιπες κυτταρικές δομές. Έτσι, η εμφάνιση των κυττάρων διαστρεβλώνεται και παίρνει τη χαρακτηριστική μορφή «φουσκάλας» των B κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της σίτισης και της πέψης, τα κυστίδια που περιέχουν τα πεπτικά ένζυμα απελευθερώνονται στον αυλό σε περιοδικές ορδές.

Συνήθως, η απελευθέρωση-έκκριση των κυστιδίων γίνεται «μεροκρινικά», δηλαδή με μία διαδικασία παρόμοιας αυτής της εξωκύτωσης, ή «αποκρινικά», δηλαδή περιβάλλοντας τα με μεμβράνη πριν την απελευθέρωση (Gibson & Barker 1979). Τα B κύτταρα που δεν απελευθερώνονται από τα τοιχώματα των σωληνίσκων υποβάλλονται

σε έναν κύκλο αναμόρφωσης, κατά τη διάρκεια του οποίου τα κύτταρα εμφανίζονται ως F κύτταρα πριν γίνουν πάλι B κύτταρα. Τα R κύτταρα, τα οποία αποτελούν τον αφθονότερο τύπο κυττάρων του πεπτικού αδένου, είναι η βασική περιοχή απορρόφησης και αποθήκευσης των θρεπτικών ουσιών, αν και τα F και B κύτταρα επίσης απορροφούν μερικές θρεπτικές ουσίες μέσω της πινοκύτωσης. Τα R κύτταρα διαθέτουν ένα πυκνό και ευδιάκριτο οδοντωτό στρώμα μικρολαχνών, οι οποίες βοηθούν στην άμεση απορρόφηση και μεταφορά των θρεπτικών ουσιών εντός των κυττάρων. Το κυριότερο και αφθονότερο υλικό αποθήκευσης των R κυττάρων είναι τα λιπίδια, όπως επίσης και κάποια μικρά μόρια γλυκογόνου (Barker & Gibson 1977).



Σχήμα 1.3. Χαρακτηριστική απεικόνιση των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου της καραβίδας *N. norvegicus*. Στο σχήμα δείχνονται ο συνδετικός ιστός, ο αυλός και οι πτυχώσεις των σωληνίσκων καθώς και τα B κύτταρα (σχήμα φουσκάλας).

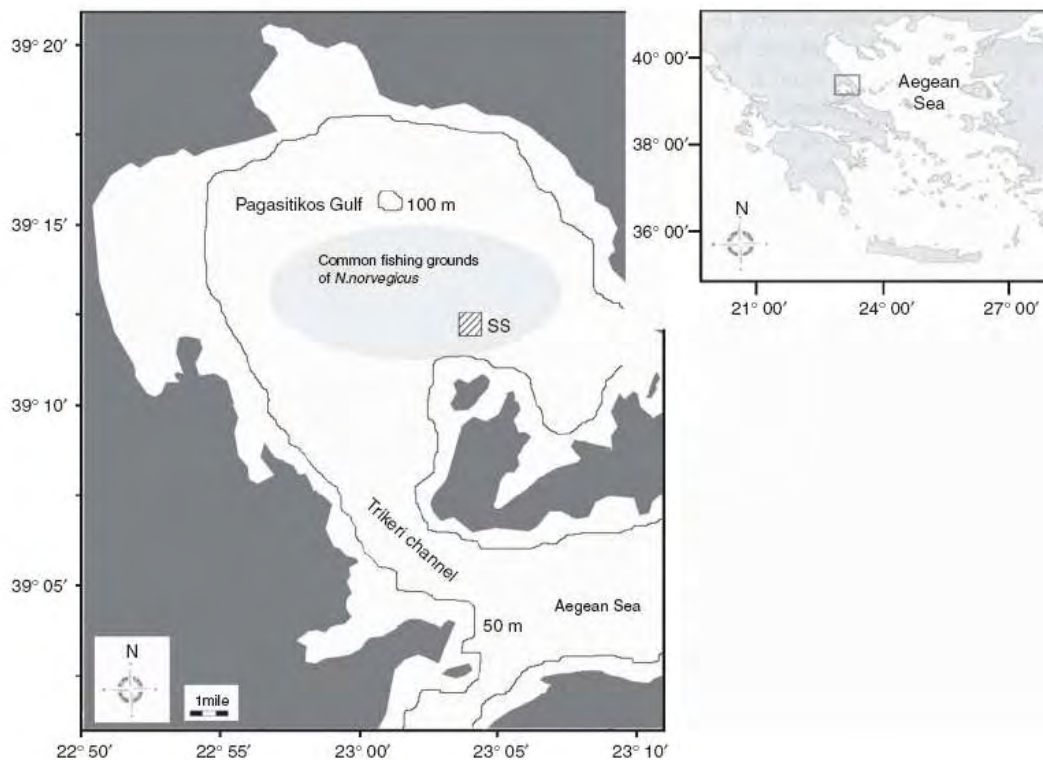
1.3. Σκοπός της έρευνας

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν να διερευνηθεί η επίδραση διαφορετικών διαιτών (φυσική και τεχνητή τροφή), καθώς και της ασιτίας στην ιστολογία του πεπτικού αδένου της караβίδας *N. norvegicus*. Για το σκοπό αυτό διεξήχθη διατροφικό πείραμα διάρκειας 20 εβδομάδων κατά το οποίο άτομα του παραπάνω είδους διατράφηκαν με εμπορικά σύμπληκτα, με κατεψυγμένη σάρκα μυδιών ή παρέμειναν σε ασιτία.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συλλογή πειραματόζων

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα συλλέχτηκαν τον Απρίλιο του 2009 με τη βοήθεια αλιεία από τη θαλάσσια περιοχή του Παγασητικού κόλπου (Σχ. 2.1). Συνολικά συλλέχτηκαν 47 καραβίδες, οι οποίες ήταν αρσενικού φύλου. Για την αλιεία των καραβίδων χρησιμοποιήθηκαν ειδικές παγίδες (Εικ. 2.1) οι διαστάσεις των οποίων ήταν 60 cm × 45 cm × 30 cm (μήκος × πλάτος × ύψος) με άνοιγμα ματιού 28 χιλιοστά. Το βάθος στο οποίο τοποθετήθηκαν οι παγίδες ήταν 85-90 m.



Σχήμα 2.1. Αλιευτικό πεδίο της καραβίδας *N. norvegicus* στον Παγασητικό κόλπο (γκριζωπή έλλειψη). Η περιοχή με τις γραμμώσεις αντιπροσωπεύει την περιοχή σύλληψης των πειραματόζων (υιοθετημένο από Mente *et al.* 2009).



Εικόνα 2.1. Ειδική παγίδα αλίευσης που χρησιμοποιήθηκε για την αλίευση των караβίδων *N. norvegicus* στον Παγασητικό κόλπο (από αρχείο συγγραφέα).

Αμέσως μετά την αλίευση, οι караβίδες τοποθετήθηκαν σε ατομικές παγίδες (Εικ. 2.2) ώστε να αποφευχθούν τυχόν φαινόμενα κανιβαλισμού κατά τη μεταφορά τους στον πειραματικό σταθμό του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Οι παγίδες αυτές ήταν κυλινδρικού σχήματος μήκους 17,5 cm και διαμέτρου 10 cm και κατασκευάστηκαν από πλαστικό δίχτυ με μεγάλο άνοιγμα ματιού (1,2 cm). Μετά την τοποθέτηση των караβίδων στις ατομικές παγίδες μεταφοράς τους, αυτές κλείνονταν με πλαστικούς σφιγκτήρες ώστε να μη μπορούν να διαφύγουν οι караβίδες από αυτές. Τέλος οι ατομικές παγίδες με τις караβίδες τοποθετήθηκαν σε δεξαμενή μεταφοράς, η οποία περιείχε θαλασσινό νερό από την περιοχή της αλιείας τους, μέσω της οποίας μεταφέρθηκαν στον πειραματικό σταθμό του Τμήματος.



Εικόνα 2.2. Ατομικές παγίδες μεταφοράς (από αρχείο συγγραφέα).

2.2. Συνθήκες εκτροφής

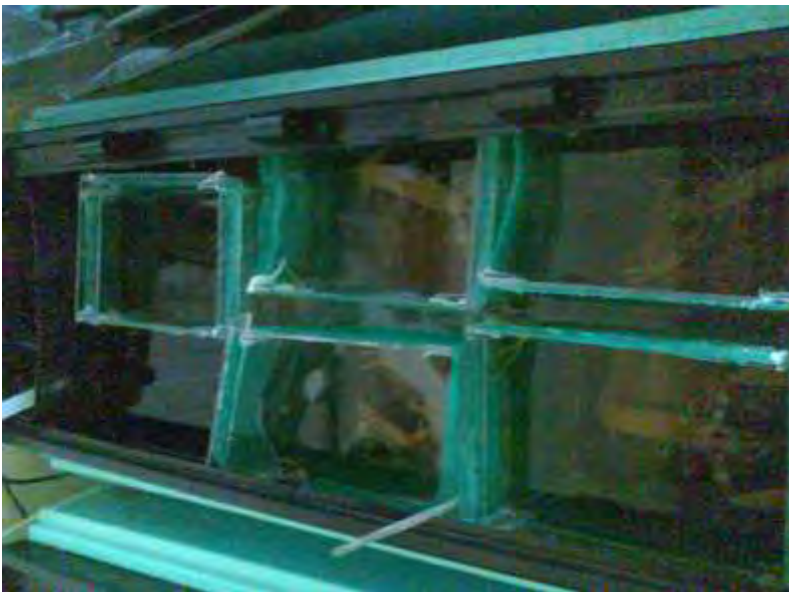
Οι συλλεχθήσες караβίδες παρέμειναν στις παγίδες μεταφοράς και τοποθετήθηκαν με αυτόν τον τρόπο σε 6 γυάλινα ενυδρεία χωρητικότητας 100 L και 1 γυάλινο ενυδρείο χωρητικότητας 190 L κλειστού κυκλώματος κυκλοφορίας νερού, όπου αφέθηκαν να εγκλιματιστούν για 14 ημέρες. Έπειτα από 14 ημέρες, και αφού ζυγίστηκαν και μετρήθηκαν ατομικά (Πιν. 2.1), οι караβίδες τοποθετήθηκαν σε ατομικά κλουβιά μήκους 20 cm, πλάτους 15 cm και ύψους 17 cm σχήματος ορθογωνίου παραλληλεπιπέδου (Εικ. 2.3), τα οποία με τη σειρά τους τοποθετήθηκαν στα κατάλληλα ενυδρεία όπως φαίνεται και στην εικόνα 2.4.

Πίνακας 2.1. Ακριβές βάρος και μήκος κεφαλοθώρακα για κάθε ένα από τα ζώα του πειράματος.

| | ΑΤΟΜΟ | ΒΑΡΟΣ (g) | ΜΗΚΟΣ ΚΕΦΑΛΟΘΩΡΑΚΑ (cm) |
|--|--------------|------------------|--------------------------------|
| Ομάδα καραβίδων που παρέμειναν σε αστία | S1 | 58,47 | 44,0 |
| | S2 | 72,17 | 48,9 |
| | S3 | 47,06 | 43,7 |
| | S4 | 48,8 | 41,6 |
| | S5 | 26,18 | 33,3 |
| | S6 | 42,04 | 37,0 |
| | S7 | 24,77 | 32,3 |
| | S8 | 49,05 | 40,5 |
| | S9 | 33,58 | 36,4 |
| | S10 | 26,47 | 34,3 |
| | S11 | 40,95 | 40,5 |
| | S12 | 21,58 | 34,3 |
| | S13 | 39,65 | 38,5 |
| | S14 | 18,54 | 30,2 |
| | S15 | 42,47 | 40,5 |
| | S16 | 33,34 | 37,5 |
| Ομάδα καραβίδων που διατράφηκαν με σύμπηκτα | P1 | 43,93 | 36,4 |
| | P2 | 42,36 | 38,5 |
| | P3 | 65,31 | 45,6 |
| | P4 | 31,7 | 35,4 |
| | P5 | 48,5 | 43,7 |
| | P6 | 47,23 | 40,6 |
| | P7 | 51,77 | 43,7 |
| | P8 | 41,91 | 37,5 |
| | P9 | 43,39 | 40,5 |
| | P10 | 47,32 | 38,5 |
| | P11 | 59,7 | 43,7 |
| | P12 | 52,32 | 40,6 |
| Ομάδα καραβίδων που διατράφηκαν με μύδια | M1 | 51,34 | 41,6 |
| | M2 | 49,35 | 41,6 |
| | M3 | 43,14 | 40,6 |
| | M4 | 29,68 | 34,3 |
| | M5 | 35,87 | 29,4 |
| | M6 | 50,35 | 41,6 |
| | M7 | 32,43 | 33,3 |
| | M8 | 44,14 | 40,6 |
| | M9 | 52,94 | 41,6 |
| | M10 | 59,61 | 44,7 |
| | M11 | 41,75 | 36,5 |
| | M12 | 39,59 | 38,5 |
| | M13 | 48,68 | 40,6 |
| | M14 | 60,05 | 44,6 |
| | M15 | 35,44 | 34,3 |
| | M16 | 59,5 | 42,7 |



Εικόνα 2.3. Ατομικά κλουβιά εκτροφής των караβίδων στο εργαστήριο (από αρχείο συγγραφέα).



Εικόνα 2.4. Ενυδρεία όπου τοποθετήθηκαν τα ατομικά κλουβιά με τις εκτρεφόμενες караβίδες (από αρχείο συγγραφέα).

Για τη κατασκευή των ατομικών κλουβιών χρησιμοποιήθηκαν κομμάτια πλεξιγκλάς, κατάλληλων διαστάσεων τα οποία κολλήθηκαν μεταξύ τους με ειδική μη τοξική σιλικόνη, δημιουργώντας κατ' αυτό τον τρόπο ένα τετράγωνο πλαίσιο, πάνω στο οποίο κολλήθηκε πλαστικό δίχτυ με εξαιρετικά μικρό άνοιγμα ματιού, μεγέθους 0,2cm,

αφήνοντας μόνο τη πάνω πλευρά ανοικτή, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα παροχής τροφής και η δυνατότητα απομάκρυνσης της (σιφονισμού). Κατά τη διάρκεια του πειράματος, η πάνω πλευρά καλύφθηκε με καπάκι κατάλληλων διαστάσεων ώστε να αποτρέπεται η διαφυγή των ζώων. Το πλαστικό δίχτυ κολλήθηκε πάνω στα κλουβιά με σιλικόνη και ενισχύθηκε με λεπτή κλωστή.

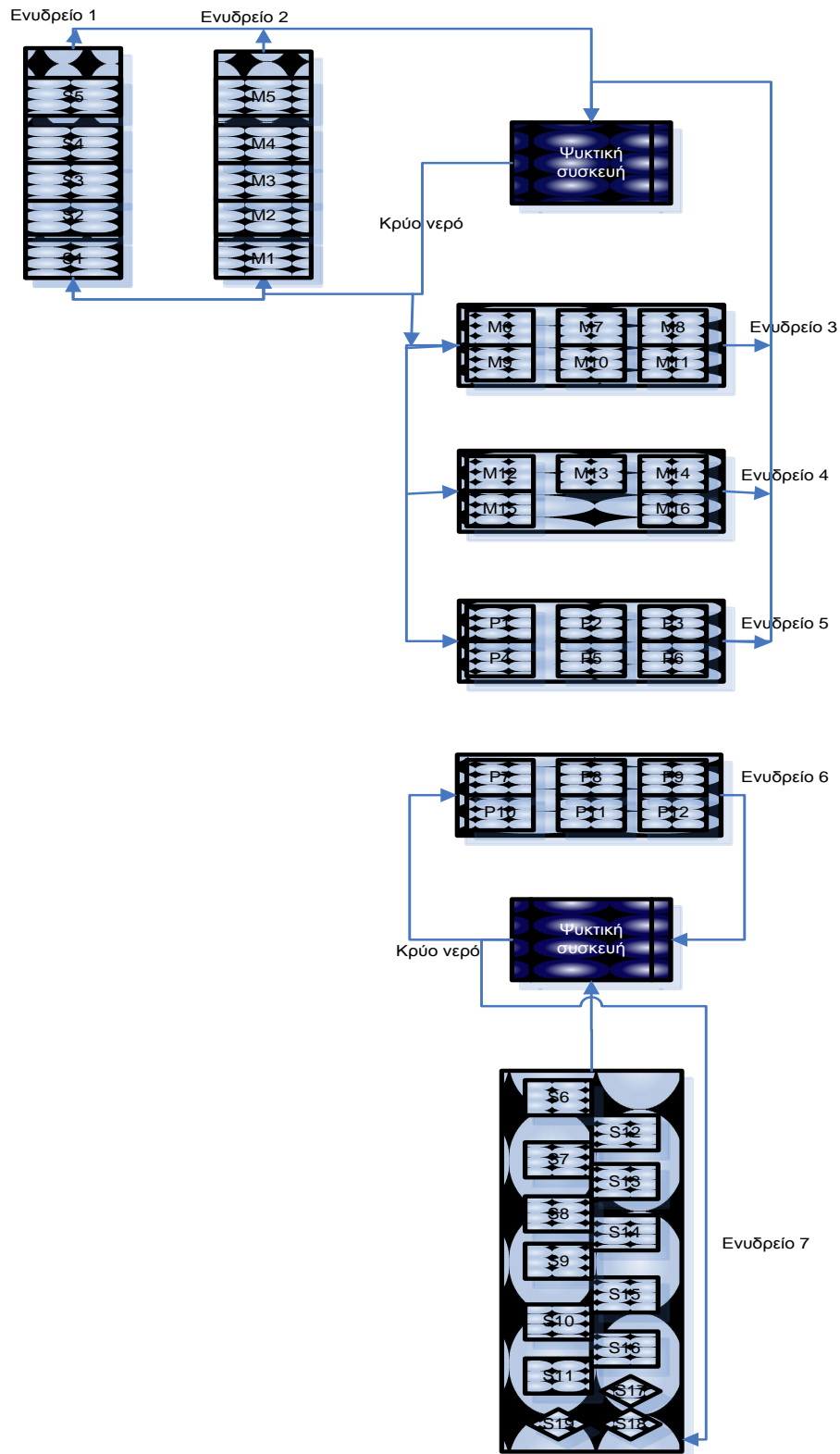
Είναι απαραίτητο να σημειωθεί πως, μέσα στα ενυδρεία είχαν νωρίτερα τοποθετηθεί τούβλα στον πυθμένα, ώστε κατά την τοποθέτηση των ατομικών κλουβιών πάνω σε αυτά, το ανώτερο τμήμα τους να βρίσκεται λίγο πάνω από την επιφάνεια του νερού. Κατά αυτόν τον τρόπο αποτρέπονταν η διαφυγή της караβίδας και διευκολύνονταν η παροχή και η συλλογή της εναπομείνουσας τροφής. Οι караβίδες χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες: Μια ομάδα (ομάδα P) δώδεκα (12) караβίδων που θα σιτίζονταν με σύμπηκτα του εμπορίου (πελλέτες), μια ομάδα (ομάδα M) δεκαέξι (16) караβίδων που θα σιτίζονταν με σάρκα κατεψυγμένου μυδιού και μια ομάδα (ομάδα S) δεκαεννέα (19) караβίδων που θα παρέμεναν σε ασιτία. Σε κάθε ένα από τα ενυδρεία των 100 L τοποθετήθηκαν πέντε έως έξι ατομικά κλουβιά караβίδων, ενώ στο μεγαλύτερο ενυδρείο (190 L) δώδεκα κλουβιά. Όπως προαναφέρθηκε, οι караβίδες χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες (ομάδες P, M και S) και τοποθετήθηκαν στα επτά ενυδρεία. Το πρώτο ενυδρείο απαρτιζόταν από πέντε άτομα της ομάδας S, τα επόμενα τρία ενυδρεία από πέντε άτομα της ομάδας M, έξι άτομα της ομάδας M και πέντε άτομα της ομάδας M, αντίστοιχα, το τέταρτο και πέμπτο ενυδρείο φιλοξενούσαν έξι άτομα της ομάδας P το καθένα και τέλος στο μεγαλύτερο ενυδρείο είχαν τοποθετηθεί δεκατέσσερα άτομα της ομάδας (S) εκ των οποίων τα έντεκα ήταν τοποθετημένα σε ατομικά κλουβιά και τα υπόλοιπα τρία αφέθηκαν ελεύθερα στο ενυδρείο λόγω περιορισμένου χώρου.

2.3. Λειτουργία κλειστού κυκλώματος

Για τη διεξαγωγή του πειράματος ήταν απαραίτητη η δημιουργία ενός κλειστού κυκλώματος κυκλοφορίας νερού (Σχ.2.1). Το κλειστό κύκλωμα αποτελούνταν από:

- Επτά γυάλινα ενυδρεία εκ των οποίων τα έξι ήταν χωρητικότητας 100 L το καθένα και ένα χωρητικότητας 190 L,
- Δύο ψυκτικές συσκευές,
- Μηχανικά και βιολογικά φίλτρα καθαρισμού νερού,
- Σύστημα πλαστικών σωλήνων,
- Σύστημα παροχής οξυγόνου.

Αρχικά, το θαλασσινό νερό εισέρχονταν στην ψυκτική συσκευή μέσω μιας οπής (είσοδος), όπου και ψυχόταν στους $13 \pm 0,5$ °C και στη συνέχεια εξερχόταν από μία δεύτερη οπή (έξοδος) και κατανέμονταν ομοιόμορφα μέσω των πλαστικών σωλήνων στο σύστημα. Το νερό αφού κυκλοφορούσε μέσα στα ενυδρεία, στη συνέχεια αντλούνταν από αυτά μέσω μικρών συσκευών άντλησης νερού, τα οποία βρίσκονταν τοποθετημένα μέσα στα φίλτρα και οδηγούνταν πίσω στην ψυκτική συσκευή (είσοδος), όπου και ψυχόταν εκ νέου προτού επανακυκλοφορήσει στο σύστημα. Με τον τρόπο αυτό, το νερό επανακυκλοφορούσε συνεχώς από τα ενυδρεία στις ψυκτικές συσκευές και αντίστροφα και διατηρούταν σε σταθερή χαμηλή θερμοκρασία στους $13 \pm 0,5$ °C. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί πως στον Πειραματικό Σταθμό λειτουργούσε κλιματισμός, ώστε να διατηρείται και η ατμοσφαιρική θερμοκρασία σε χαμηλά επίπεδα.



Σχήμα 2.1. Σχηματική αναπαράσταση του κλειστού κυκλώματος (τα ατομικά κλουβιά των καραβίδων αναπαριστώνται με τα μικρά τετράγωνα που βρίσκονται μέσα στα ενυδρεία) (Πετμεζάς 2010).

Επίσης, το νερό του κυκλώματος ανανεώθηκε (περίπου 70% του συνολικού όγκου νερού) τη 10^η εβδομάδα του πειράματος προκειμένου να αποβληθούν οι όποιοι επιβλαβείς μεταβολίτες είχαν συσσωρευτεί στο κύκλωμα. Το νερό παρεχόταν στο κύκλωμα μέσω εγκατεστημένου συστήματος ροής στο σταθμό, το οποίο συνδεόταν με ειδικό εξωτερικό υδατόπυργο χωρητικότητας τριών κυβικών μέτρων (3 m³), που περιείχε θαλασσινό νερό, που είχε συλλεχθεί με τη βοήθεια οχήματος του δήμου Ν. Ιωνίας από την περιοχή των Αλυκών Βόλου.

Τα φίλτρα που χρησιμοποιούνταν στα ενυδρεία για το καθαρισμό του νερού αποτελούνταν από τρία μέρη. Το πρώτο μέρος περιελάμβανε ειδικό υαλοβάμβακα (μηχανικό φίλτρο), που βοηθούσε στην απομάκρυνση της ανόργανης και οργανικής ύλης, το δεύτερο μέρος περιελάμβανε κατάλληλες πορώδεις κατασκευές (σχήματος αστεριού), τοποθετημένες σε πλαστικά μικρά κουτάκια, απαραίτητες για τη εδραίωση και ανάπτυξη των απονιτροποιητικών βακτηρίων του γένους *Nitrosomonas* και *Nitrobacter* (βιολογικό φίλτρο), τα οποία βοηθούν στη μετατροπή της τοξικής αμμωνίας στα λιγότερα τοξικά νιτρικά και νιτρώδη και το τρίτο μέρος περιελάμβανε τη συσκευή άντλησης νερού.

Ο υαλοβάμβακας, καθώς και ο ενεργός άνθρακας, αντικαθιστούσαν κάθε μήνα, εξασφαλίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο την βέλτιστη ποιότητα του νερού. Επίσης είναι απαραίτητο να αναφερθεί η παρουσία ειδικών βακτηρίων στο νερό, τα οποία είχαν διοχετευθεί στα ενυδρεία, με τη μορφή εμπορικού διαλύματος, λίγες ημέρες πριν τη τοποθέτηση των караβίδων, επιτυγχάνοντας έτσι την ανάπτυξη των απαραίτητων βακτηρίων πάνω στις κατάλληλες πορώδεις κατασκευές (σχήματος αστεριού) που αναφέρονται παραπάνω. Οι βακτηριακές αποικίες ενισχύονταν κάθε μήνα, με την προσθήκη 10 ml βακτηρίων/ενυδρείο.

Τα ενυδρεία καλύφθηκαν εξωτερικά με φελιζόλ και μαύρες πλαστικές σακούλες (Εικ.2.5) ώστε να αποτραπεί η διείσδυση του φωτός σε αυτά και να υπάρχουν συνθήκες χαμηλού φωτισμού ομοιάζοντας αυτές του φυσικού περιβάλλοντος των караβίδων.



Εικόνα 2.5. Ενυδρεία καλυμμένα με φελιζόλ και μαύρες πλαστικές σακούλες (από αρχείο συγγραφέα).

2.4. Τροφές και χορήγηση τροφής

Έπειτα από την περίοδο εγκλιματισμού διάρκειας 14 ημερών, ξεκίνησε η διαδικασία παροχής τροφής στις караβίδες. Όπως προαναφέρθηκε, δώδεκα караβίδες (P1-P12) τρέφονταν με εμπορικά σύμπληκτα τσιπούρας, δεκαέξι τρέφονταν με κατεψυγμένη σάρκα μυδιών (M1-M16) και δεκαεννιά караβίδες παρέμειναν σε ασιτία (S1-S19). Η τροφή χορηγούνταν ατομικά σε αφθονία στις ομάδες που τρεφόταν με σύμπληκτα και μύδια και σε προζυγισμένες ποσότητες (περίπου 0,5 g σύμπληκτα, ή 2,5 g μύδια), μία φορά την ημέρα, 3 φορές την εβδομάδα.

2.5. Μέτρηση φυσικοχημικών παραμέτρων

Η μέτρηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού γίνονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα (τρεις φορές την εβδομάδα). Για τη μέτρηση τους χρησιμοποιήθηκαν ειδικές ηλεκτρονικές συσκευές (θερμόμετρο, οξυγονόμετρο, πεχάμετρο, αλατόμετρο), ενώ για τη μέτρηση της αμμωνίας έγινε χρήση ειδικού εμπορικού κριτηρίου. Η θερμοκρασία του νερού διατηρούνταν στους $13 \pm 0,5$ °C με τη βοήθεια ψήκτρας, το διαλυμένο οξυγόνο διατηρούνταν στα $8,5 \pm 0,3$ mg/l με συνεχή οξυγόνωση του νερού, το pH κυμαίνονταν στο $7,8 \pm 0,2$, ενώ τέλος η αλατότητα $38 \pm 0,5$ ‰.

2.6. Θανάτωση караβίδων και λήψη ηπατοπαγκρέατος

Η θανάτωση των караβίδων πραγματοποιήθηκε στις 17/9/2009 έπειτα από 169 ημέρες διεξαγωγής πειράματος. Η θανάτωση προκλήθηκε με τρύπημα στην κορυφή του κεφαλοθώρακά τους με μυτερό αντικείμενο, στην περιοχή του εγκεφάλου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε τομή και λήψη του ηπατοπαγκρέατος από όλα τα άτομα (18 στο σύνολο) που επιβίωσαν στο τέλος του διατροφικού πειράματος για να μελετηθεί ιστολογικά. Συγκεκριμένα, δειγματίστηκε για ιστολογική εξέταση το ηπατοπάγκρεας από τέσσερις (4) караβίδες που διατρέφονταν με σύμπληκτα του εμπορίου (ομάδα P), από δέκα (10) караβίδες που διατρέφονταν με κατεψυγμένα μύδια (ομάδα M) και από τέσσερις (4) караβίδες που παρέμειναν σε ασιτία κατά τη διάρκεια του πειράματος. Το ηπατοπάγκρεας αφού προζυγίστηκε τοποθετήθηκε σε ειδικά πλαστικά δοχεία (χωρητικότητας 25 ml) που περιείχαν υδατικό διάλυμα φορμόλης 10% και τα οποία αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (-20 °C) μέχρι τη στιγμή της ιστολογικής τους εξέτασης.

2.7. Ιστολογική εξέταση

Το ηπατοπάγκρεας των караβίδων μελετήθηκε ιστολογικά. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν ιστολογικά οι μεταβολές στη δομή του ηπατοπαγκρέατος που επέφερε η διατροφή ή ασιτία των караβίδων στον ηπατοσωματικό δείκτη, στο σχήμα και το μέγεθος των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου, στον αυλό και στον αριθμό των Β-κυττάρων.

Για τη μικροσκοπική ανατομική μελέτη του ηπατοπαγκρέατος χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές ιστολογίας οι οποίες περιλαμβάνουν τα εξής στάδια:

- Απομόνωση του ηπατοπαγκρέατος,
- Μονιμοποίηση του ιστού,
- Αφυδάτωση- διαύγαση- έγκλιση ιστού σε παραφίνη,
- Εμβάπτιση και εγκλεισμός σε παραφίνη,
- Τομή ιστού στη μικροτόμο,
- Αποπαραφίνωση,
- Χρώση του ιστού,
- Στερεοποίηση των τομών.

2.7.1 Απομόνωση του ιστού του ηπατοπαγκρέατος

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η τομή της караβίδας και η απομόνωση του ηπατοπαγκρέατος της, ακολούθησε η αφαίρεση ενός μέρους του, πάχους 0,5-1 cm.

2.7.2 Μονιμοποίηση του ιστού

Ο ιστός τοποθετήθηκε άμεσα στο μονιμοποιητικό υγρό (διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10%). Η ποσότητα του μονιμοποιητικού υγρού ήταν πολλαπλάσια περίπου

10 φορές τον όγκο των δειγμάτων του ιστού. Η παραμονή του ιστού στο μονιμοποιητικό υγρό διήρκησε 48 ώρες. Σε όλη τη διαδικασία μονιμοποίησης το δείγμα παρέμεινε σε ειδικούς διάτρητους ανθεκτικούς υποδοχείς (πλαστικά «καλαθάκια»), αφού πρώτα αυτοί σημάνθηκαν με μολύβι με την ημερομηνία και τον κωδικό αριθμό του δείγματος.

2.7.3 Αφυδάτωση - διάλυση- έγκλιση ιστού σε παραφίνη

Μετά την παραμονή στο μονιμοποιητικό υγρό ακολουθήθηκε η σταδιακή αφυδάτωση, ο καθαρισμός, η διάλυση και η έγκλιση του ιστού σε παραφίνη. Αυτή η διαδικασία έγινε με τη βοήθεια ειδικής συσκευής που καλείται ιστοκινέτα. Το πρόγραμμα της ιστοκινέτας που χρησιμοποιήθηκε είχε συνολική διάρκεια 15 ωρών. Η διαδικασία ήταν η εξής:

Αρχικά τα πλαστικά καλαθάκια με τα δείγματα βυθίστηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης για δύο ώρες. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για μισή ώρα στο δεύτερο δοχείο της ιστοκινέτας που περιείχε νερό βρύσης. Μετά το πέρας της μισής ώρας τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 96% αιθανόλης για μια μισή ώρα. Έπειτα τοποθετήθηκαν εκ νέου σε διάλυμα 96% αιθανόλης για μια ώρα. Κατόπιν τοποθετήθηκαν σε νέο διάλυμα 96% αιθανόλης για δύο ώρες. Έπειτα, βυθίστηκαν σε διάλυμα 100% αιθανόλης ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία της αφυδάτωσης.

Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ακετόνη για μια ώρα. Το επόμενο στάδιο ήταν η βύθιση των δειγμάτων σε ξυλόλη για μια ώρα. Η διαδικασία συνεχίστηκε με τη βύθιση των δειγμάτων σε νέο διάλυμα ξυλόλης, όπου και ολοκληρώθηκε η διαδικασία του καθαρισμού του ιστού.

Έπειτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υγρή παραφίνη για μια ώρα. Τέλος τα δείγματα βυθίστηκαν εκ νέου σε δοχείο με παραφίνη, όπου και συνεχίστηκε η ανάδευση τους για ακόμη δύο ώρες μέχρι την ολοκλήρωση και του τελευταίου σταδίου.

Κατά τη διάρκεια της όλης διαδικασίας στην ιστοκινέτα πραγματοποιούνταν ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε τα διαλύματα αιθανόλης να διεισδύσουν ευκολότερα στον ιστό του δείγματος. Με ήπια περιοδική ανακίνηση η διαδικασία επιταχύνονταν, ενώ επίσης εξασφαλιζόνταν η ομοιογενής επεξεργασία των δειγμάτων. Για αυτό τον λόγο, η ιστοκινέτα ρυθμίστηκε ώστε η ανάδευση των δειγμάτων να γίνεται αυτόματα και σε όλα τα στάδια ανά τακτά διαστήματα.

2.7.4 Εμβάπτιση, εγκλεισμός σε παραφίνη

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας στην ιστοκινέτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ένα γυάλινο ποτήρι ζέσεως που περιείχε λιωμένη παραφίνη θερμοκρασίας 60 °C. Τα καλαθάκια ανοίχτηκαν και με τη βοήθεια λαβίδας αφαιρέθηκε ο ιστός και τοποθετήθηκε μέσα στους ειδικούς μεταλλικούς υποδοχείς που περιείχαν λιωμένη παραφίνη. Έπειτα, οι μεταλλικοί υποδοχείς που περιείχαν τον ιστό εγκλεισμένο σε λιωμένη παραφίνη τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη ώστε να στερεοποιηθεί ο εγκλεισμός.

2.7.5 Τομή ιστού στην μικροτόμο

Ο κάθε εγκλεισμένος, σε παραφίνη, ιστός τμήθηκε περιφερειακά με τη βοήθεια νυστεριού ώστε να δημιουργηθεί παρασκευάσμα σχήματος μικρού κύβου, το οποίο ήταν ενδεδειγμένο για τη μετέπειτα τομή του στη μικροτόμο. Οι τομές του ιστού ήταν μεγέθους 6 μm. Προκειμένου για την ενδελεχή εξέταση του ιστού, από κάθε δείγμα

πραγματοποιήθηκε ένας αριθμός 9 τομών. Κατόπιν, οι ιστολογικές τομές τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο, θερμοκρασίας 40 °C, για να ενυδατωθούν και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις προσκολλημένες σειρές των ιστολογικών τομών τοποθετήθηκαν πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα για να στεγνώσουν γρηγορότερα.

2.7.6 Αποπαραφίνωση

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν για ελάχιστο χρόνο σε μια πηγή θερμότητας (στη φλόγα ενός λύχνου), ώστε να υγροποιηθεί η παραφίνη και να απομακρυνθεί γρηγορότερα κατά τη μετέπειτα βύθιση του δείγματος σε υδατικό διάλυμα καθαρισμού. Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια καμινέτου θερμάνθηκαν ελαφρώς και σε σχετική απόσταση από τη φλόγα οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τον ιστό να βρίσκεται στην άνω πλευρά τους.

2.7.7 Χρώση ιστού

Στη συνέχεια, ο ιστός χρωματίστηκε σε διάλυμα χρώσης αιματοξυλίνης-εωσίνης, με τις αντικειμενοφόρους πλάκες να βυθίζονται σε διαδοχικά διαλύματα βάση του παρακάτω πρωτοκόλλου:

- Ξυλόλη για 3 λεπτά
- Ξυλόλη για 3 λεπτά
- Αιθανόλη 100% για 2 λεπτά
- Αιθανόλη 100% για 2 λεπτά
- Διάλυμα αιθανόλης 96% για 1 λεπτό
- Διάλυμα αιθανόλης 96% για 1 λεπτό

- Διάλυμα αιθανόλης 70% για 1 λεπτό
- Ξέπλυμα σε νερό βρύσης για 1 λεπτό
- Αιματοξιλίνη για 10 λεπτά
- Ξέπλυμα σε νερό βρύσης για 5 λεπτά
- 3 εμβαπτίσεις σε διάλυμα Acid alcohol 1%
- Ξέπλυμα σε νερό βρύσης για 5 λεπτά
- Εωσίνη για 10 λεπτά
- 2 εμβαπτίσεις σε νερό βρύσης
- 2 εμβαπτίσεις σε διάλυμα αιθανόλης 70%
- 2 εμβαπτίσεις σε διάλυμα αιθανόλης 96%
- 2 εμβαπτίσεις σε διάλυμα αιθανόλης 96%
- Αιθανόλη 100% για 2 λεπτά
- Ξυλόλη για 3 λεπτά
- Ξυλόλη για 5 λεπτά

Συγκεκριμένα, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν ανά δέκα σε ειδική θήκη ώστε να ομαδοποιηθεί η διαδικασία της χρώσης. Κατά την ενυδάτωση των δειγμάτων, η θήκη με τις 10 αντικειμενοφόρους τοποθετήθηκε διαδοχικά σε 100% αιθανόλη για δύο λεπτά και στο επόμενο 100% αιθανόλη πάλι για δύο λεπτά. Έπειτα η θήκη εμβαπτίστηκε σε διάλυμα αιθανόλης 96% για ένα λεπτό και στη συνέχεια σε νέο διάλυμα αιθανόλης 96% για ένα λεπτό. Κατόπιν τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 70% για ένα λεπτό. Για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της ενυδάτωσης οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλύθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης για ένα λεπτό.

Μετά την ενυδάτωση, ακολουθήθηκε η χρώση του ιστού. Η θήκη τοποθετήθηκε στο δοχείο χρώσης που περιείχε αιματοξιλίνη για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό βρύσης για πέντε λεπτά. Εμβαπτίστηκαν τρεις φορές σε διάλυμα όξινης αλκοόλης 1% και ξανά ξεπλύθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης για πέντε λεπτά. Στο τελευταίο στάδιο της χρώσης τοποθετήθηκαν στην εωσίνη για δέκα λεπτά.

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της χρώσης, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίστηκαν σε δοχείο με νερό βρύσης δύο φορές, αμέσως μετά εμβαπτίστηκαν διαδοχικά δύο φορές σε διάλυμα 70% αιθανόλης, δύο φορές σε διάλυμα 96% αιθανόλης και έπειτα σε νέο διάλυμα 96% αιθανόλης. Εν συνεχεία, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε αιθανόλη 100% για δύο λεπτά και άλλα δύο λεπτά σε νέα αιθανόλη 100%.

Ακολούθησε η διαδικασία της διαύγασης, όπου οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίστηκαν σε ξυλόλη για δύο λεπτά και εν συνεχεία άλλα δύο λεπτά σε νέο όγκο ξυλόλης.

2.7.8 Στερεοποίηση των τομών

Αφού ολοκληρώθηκε και η τελευταία εμβάπτιση διαύγασης, κάθε μια αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε πάνω σε ένα καθαρό χαρτί με την πλευρά του δείγματος να είναι στραμμένη προς τα πάνω. Έπειτα, τοποθετήθηκαν οι καλυπτρίδες αφού προηγουμένως είχε προστεθεί στο δείγμα μικρή ποσότητα υγρού επικόλλησης (DPX). Οι αντικειμενοφόρες τοποθετήθηκαν πάνω σε χαρτί για πέντε ώρες μέχρι να στεγνώσουν και μετά ήταν έτοιμες για παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

2.8. Μικροσκοπική εξέταση και ανάλυση των απεικονίσεων των δειγμάτων

Οι ιστολογικές τομές μελετήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο (Axiostar plus Carl Zeiss Light Microscopy, Carl Zeiss Ltd, Gottingen, Germany) σε μεγέθυνση $\times 100$. Οι απεικονίσεις κάθε παρασκευάσματος φωτογραφήθηκαν μέσω ειδικού προσαρμοσμένου στο μικροσκόπιο φωτογραφικού φακού και αναλύθηκαν μέσω ειδικού λογισμικού προγράμματος (ProgRes Capture Pro (version 2.1)). Όλες οι απεικονίσεις κάθε ιστού ηπατοπαγκρέατος χρησιμοποιήθηκαν για τη γενική περιγραφή των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου, τη μέτρηση του εμβαδού επιφάνειας του αυλού (σε μm^2), το εμβαδόν της επιφάνειας του σωληνίσκου του πεπτικού αδένου (σε μm^2), καθώς και τον αριθμό των Β-κυττάρων. Η αναλογία του εμβαδού του αυλού προς το εμβαδόν της επιφάνειας του σωληνίσκου του πεπτικού αδένου χρησιμοποιήθηκε, σύμφωνα με τους Ong & Johnston (2006), ώστε να προσδιοριστεί εάν η αναλογία αυτή επηρεάστηκε ανάλογα με τη διατροφική αγωγή των καραβίδων. Τα Β-κύτταρα απαριθμήθηκαν από έναν αριθμό 10 σωληνίσκων και ταυτόχρονα αξιολογήθηκαν οπτικά όπως έχουν προτείνει οι Johnston *et al.* (2003).

2.9. Στατιστική επεξεργασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που λήφθηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πακέτο SPSS 18.0. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με την μέθοδο ανάλυσης παραλλακτικότητας (One Way Anova). Σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων του ηπατοσωματικού δείκτη, του εμβαδού των αυλών και των σωληνίσκων των πεπτικών αδένων, καθώς και του αριθμού των Β-κυττάρων των διαφορετικών ομάδων αντίστοιχα καθορίστηκαν με το κριτήριο Tukey test σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0,05$.

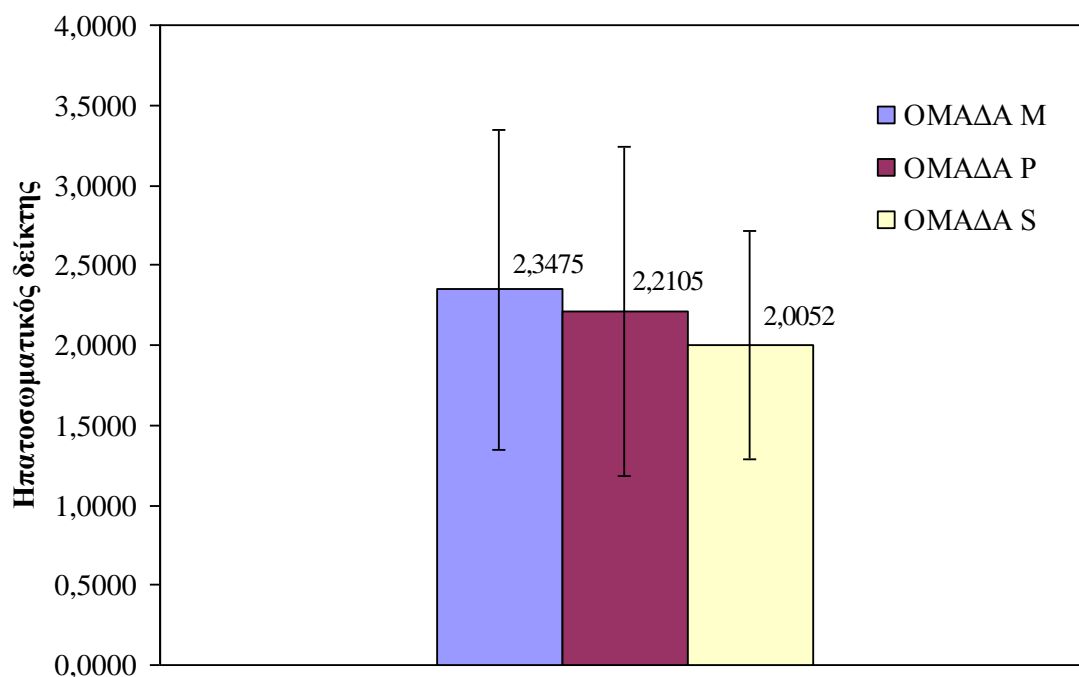
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Επίδραση των διαφορετικών διαίτων στον ηπατοσωματικό δείκτη των καραβίδων

Ο ηπατοσωματικός δείκτης εκφράζει τη σχέση σωματικού βάρους της караβίδας προς το βάρος του ηπατοπαγκρέατος της εκφρασμένο επί της εκατό. Από τις σχετικές μετρήσεις (Πιν. 3.1) βρέθηκε πως η μέση τιμή του ηπατοσωματικού δείκτη είναι μεγαλύτερη στις караβίδες που σιτίστηκαν με μύδια ($2,3475 \pm 1,0017$, μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση), μικρότερη στις караβίδες που σιτίστηκαν με σύμπηκτα ($2,2105 \pm 1,0298$) και ακόμη μικρότερη στις караβίδες που παρέμειναν σε ασιτία ($2,0052 \pm 0,7134$) (Σχ. 3.1). Ωστόσο, οι διαφορές στις τιμές του δείκτη ανάμεσα στις τρεις ομάδες είναι στατιστικώς μη σημαντικές ($P=0,833$).

Πίνακας 3.1. Τιμές του ηπατοσωματικού δείκτη.

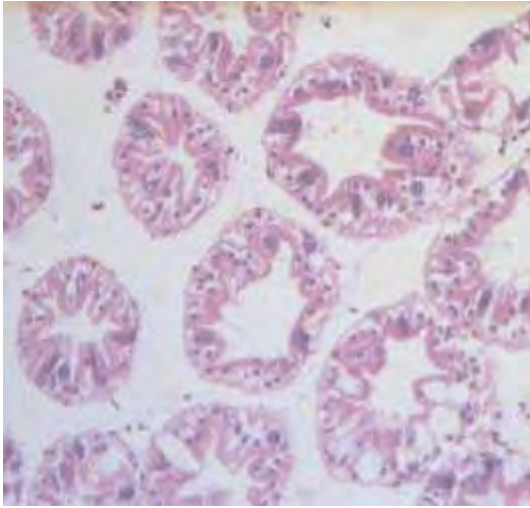
| | Όνομασία δείγματος | Βάρος Ηπ. (g) | Ηπατοσ. δείκτης |
|--|--------------------|--|---------------------------------------|
| Ομάδα καραβίδων που διατράφηκαν με μύδι | M1 | 1,6810 | 3,1456 |
| | M2 | 1,3720 | 2,6651 |
| | M3 | 1,4930 | 3,4361 |
| | M4 | 1,2050 | 4,0600 |
| | M5 | 0,3740 | 1,0427 |
| | M7 | 0,8230 | 1,8474 |
| | M8 | 1,5520 | 2,6036 |
| | M11 | 0,4660 | 1,1278 |
| | M12 | 0,8200 | 1,7009 |
| | M15 | 1,0870 | 1,8458 |
| | | Μέση τιμή ομάδας M \pm T.A | 1,0873 \pm 0,4551 |
| Ομάδα καραβίδων που διατράφηκαν με σύμπηκτο | P1 | 0,413 | 0,9421 |
| | P7 | 1,234 | 2,4097 |
| | P8 | 0,86 | 2,0520 |
| | P11 | 1,867 | 3,4383 |
| | | Μέση τιμή ομάδας P \pm T.A | 1,0935 \pm 0,6153 |
| Ομάδα καραβίδων που παρέμειναν σε ασιτία | S2 | 1,1120 | 1,5266 |
| | S3 | 0,8520 | 1,7687 |
| | S8 | 0,5370 | 1,6605 |
| | S17 | 0,6740 | 3,0650 |
| | | Μέση τιμή ομάδας S \pm T.A | 0,7938 \pm 0,2483 |



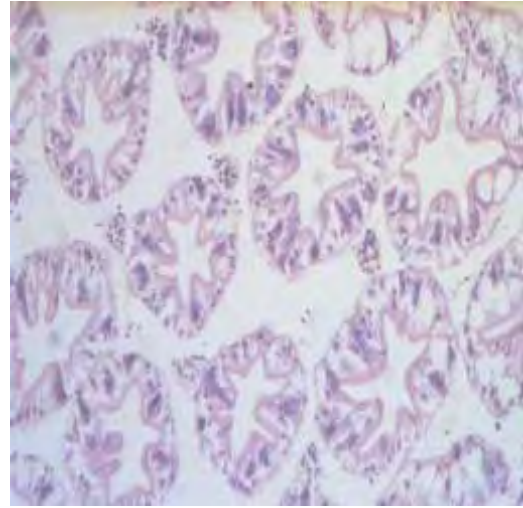
Σχήμα 3.1. Ο ηπατοσωματικός δείκτης των πειραματικών ομάδων (μέσος όρος και τυπική απόκλιση).

3.2. Επίδραση των διαφορετικών διαίτων στη δομή των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου των καραβίδων

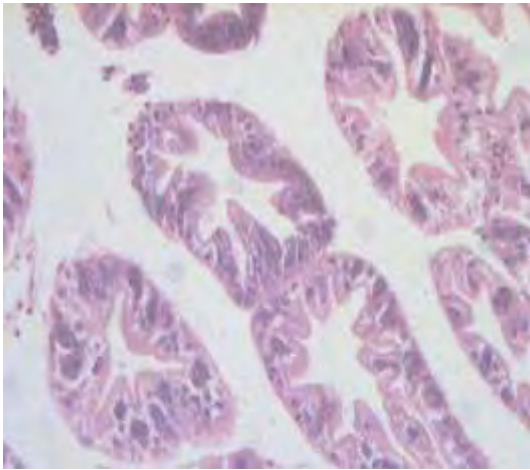
Η δομή των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου των πειραματικών καραβίδων μελετήθηκε μετά από παρασκευή ιστολογικών παρασκευασμάτων του ηπατοπαγκρέατος και παρατήρησή τους σε οπτικό μικροσκόπιο. Στην δομή των σωληνίσκων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Το σχήμα του αυλού ήταν ευδιάκριτο στις περισσότερες περιπτώσεις όλων των διατροφικών ομάδων. Όμως υπήρχε μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου ακόμη και μέσα στην ίδια ομάδα καραβίδων (Εικ. 3.1α, β, Εικ 3,2, Εικ. 3.3).



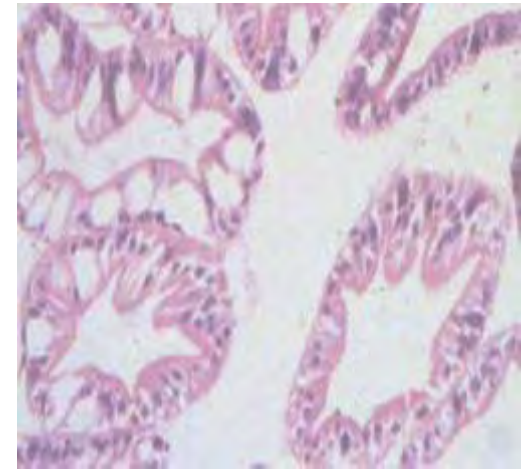
M1



M2

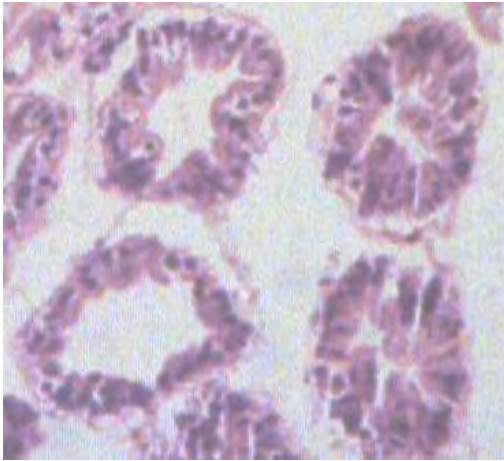


M3

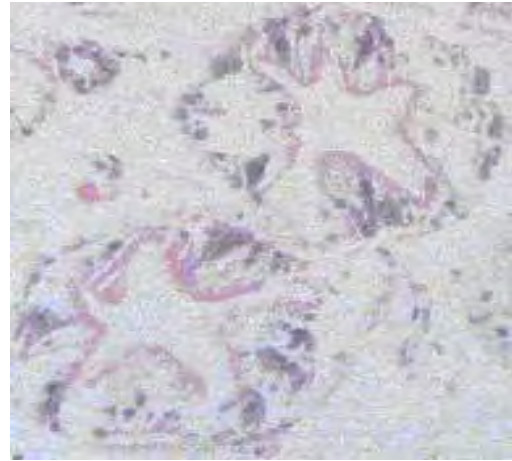


M4

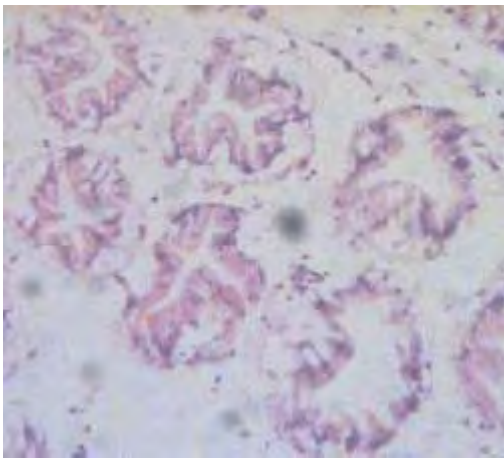
Εικόνα 3.1 α. Χαρακτηριστική απεικόνιση των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου της καραβίδας *N. norvegicus* μετά από την σίτιση τους με μύδι για 20 εβδομάδες.



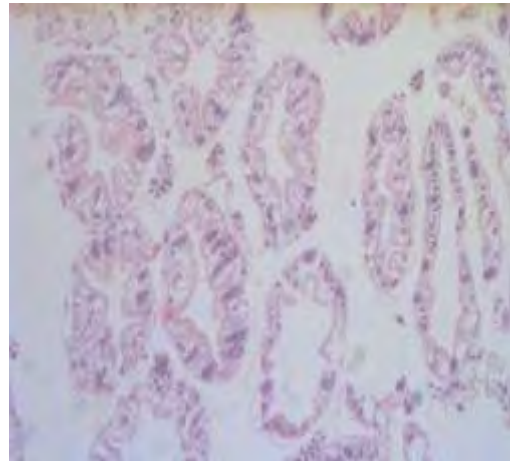
M5



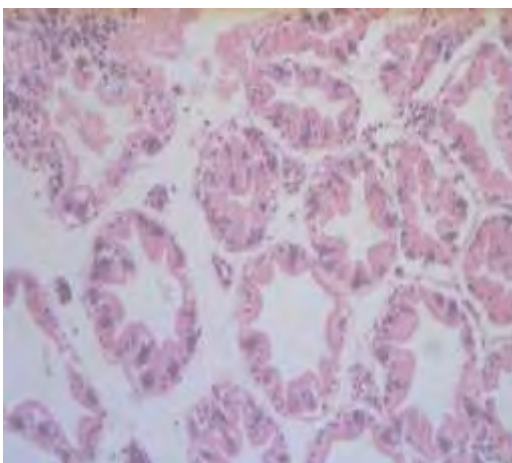
M7



M8

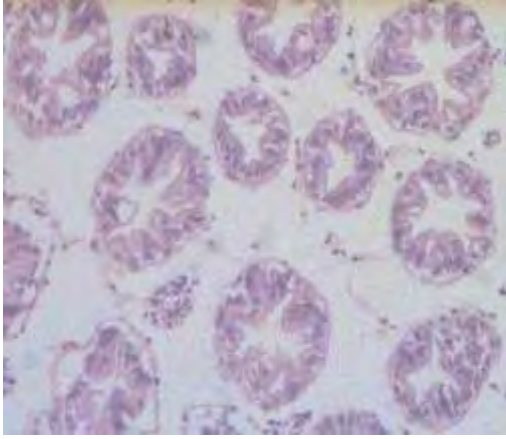


M12

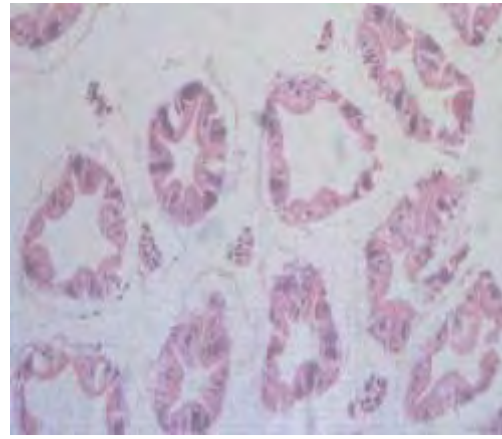


M15

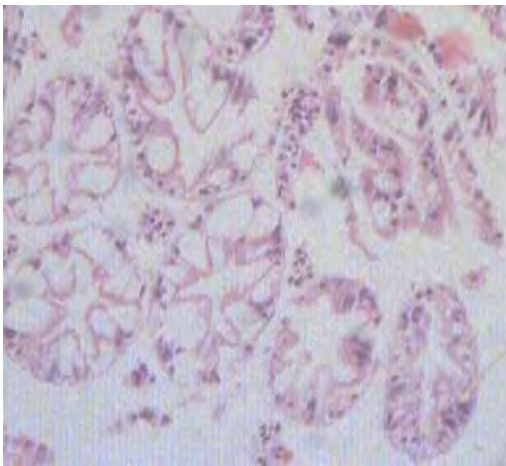
Εικόνα 3.1 β. Χαρακτηριστική απεικόνιση των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου της καραβίδας *N. norvegicus* μετά από την σίτιση τους με μύδι για 20 εβδομάδες.



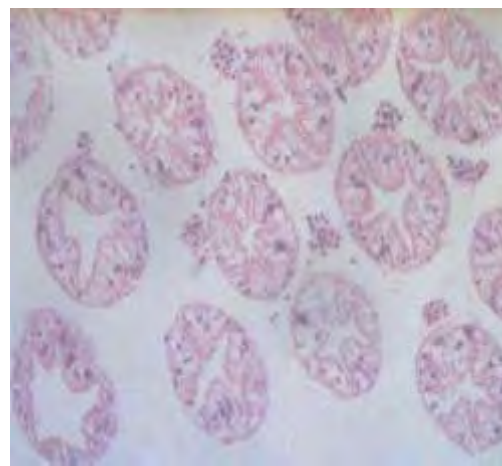
P1



P7

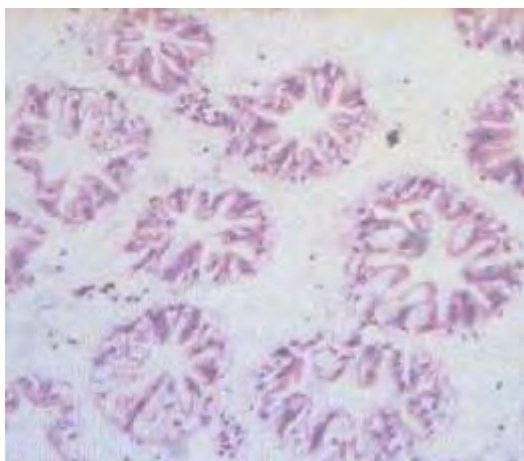


P8

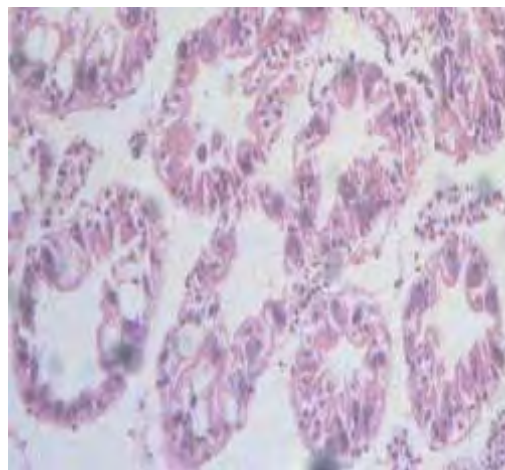


P11

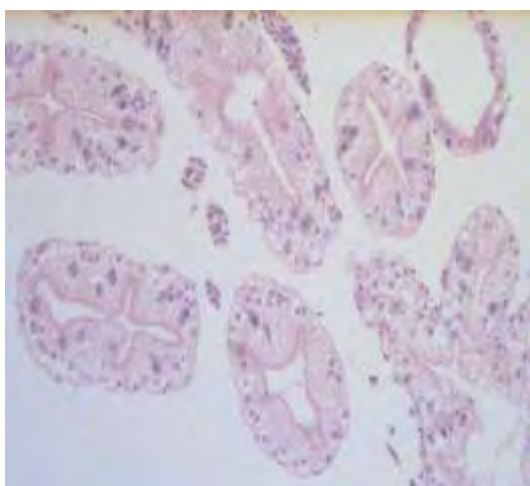
Εικόνα 3.2. Χαρακτηριστική απεικόνιση των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου της καραβίδας *N. norvegicus* μετά από την σίτιση τους με σύμπηκτο για 20 εβδομάδες.



S3



S8



S17

Εικόνα 3.3. Χαρακτηριστική απεικόνιση των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου της καραβίδας *N. norvegicus* μετά από ασιτία 20 εβδομάδων.

Στον Πίνακα 3.2 φαίνονται το εμβαδόν του αυλού, το εμβαδόν της επιφάνειας του σωληνίσκου του πεπτικού αδένου και η μεταξύ τους αναλογία.

Το εμβαδόν της επιφάνειας του αυλού των καραβίδων που διατράφηκαν με μύδια κυμάνθηκε από 36,05 έως 134,94 μm^2 με μέση τιμή $84,52 \pm 28,04 \mu\text{m}^2$ (μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση) (Πιν. 3.2). Το εμβαδόν των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου στις καραβίδες που διατράφηκαν με μύδια κυμάνθηκε από 161,14 έως 726,60 μm^2 με

μέση τιμή $456,77 \pm 191,89$. Η αναλογία εμβαδού της επιφάνειας του αυλού προς την επιφάνεια του σωληνίσκου σε αυτή τη διατροφική ομάδα караβίδων κυμάνθηκε από 0,13 έως 0,28 με μέση τιμή $0,20 \pm 0,06$.

Το εμβαδόν της επιφάνειας των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου των караβίδων που διατράφηκαν με σύμπηκτα του εμπορίου κυμάνθηκε από 33,57 έως 101,78 μm^2 με μέση τιμή $68,77 \pm 19,96 \mu\text{m}^2$. Το εμβαδόν της επιφάνειας των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου στις караβίδες που διατράφηκαν με σύμπηκτα του εμπορίου κυμάνθηκε από 237,83 έως 382,99 μm^2 με μέση τιμή $291,66 \pm 47,80$. Η αναλογία εμβαδού επιφάνειας αυλού προς την επιφάνεια σωληνίσκου του πεπτικού αδένου σε αυτή τη διατροφική ομάδα караβίδων κυμάνθηκε από 0,14 έως 0,18 με μέση τιμή $0,24 \pm 0,09$.

Το εμβαδόν της επιφάνειας του αυλού των караβίδων μετά από ασιτία κυμάνθηκε από 47,03 έως 142,88 μm^2 με μέση τιμή $80,65 \pm 42,77 \mu\text{m}^2$. Το εμβαδόν της επιφάνειας των σωληνίσκων στις караβίδες που έμειναν σε ασιτία κυμάνθηκε από 190,09 έως 459,68 μm^2 με μέση τιμή $323,70 \pm 152,19$. Η αναλογία εμβαδού επιφάνειας αυλού προς την συνολική επιφάνεια σωληνίσκου στην ομάδα караβίδων που παρέμεινε σε ασιτία κυμάνθηκε από 0,13 έως 0,37 με μέση τιμή $0,27 \pm 0,10$.

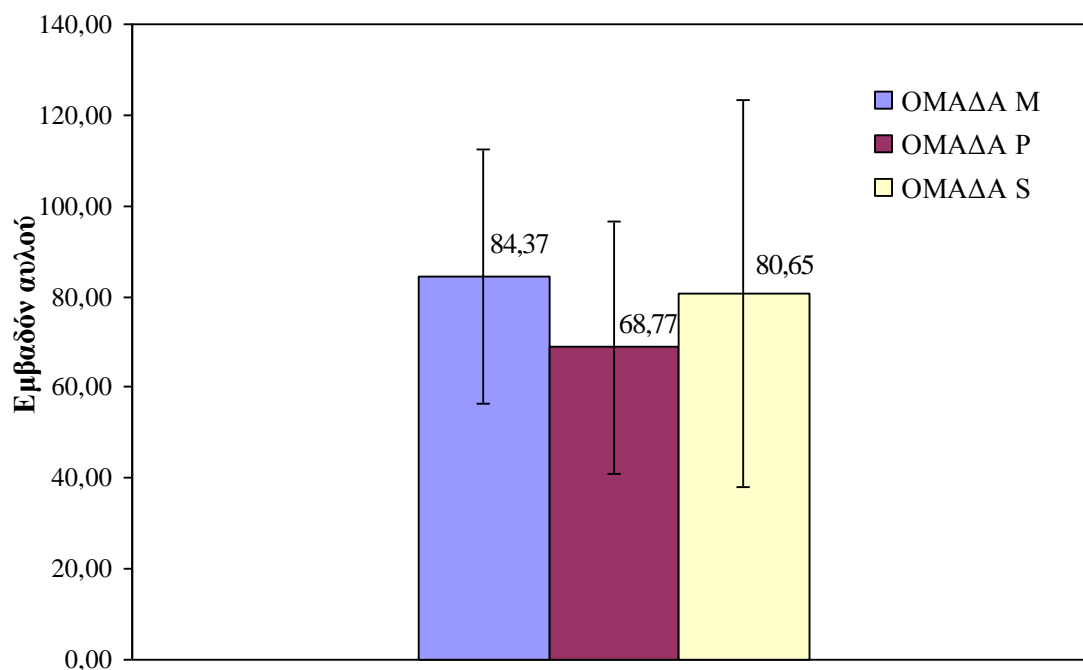
Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε πως το μέγεθος των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου των караβίδων που διατράφηκαν με σύμπηκτα του εμπορίου ήταν μικρότερο από το μέγεθος των σωληνίσκων των караβίδων που διατράφηκαν με μύδια. Επιπλέον το εμβαδόν της επιφάνειας του αυλού (Σχ. 3.2) και το εμβαδόν της επιφάνειας του σωληνίσκου του πεπτικού αδένου των караβίδων που διατράφηκαν με μύδια είναι μεγαλύτερα από ό,τι αυτά των караβίδων που διατράφηκαν με σύμπηκτα ή παρέμειναν σε ασιτία (Σχ. 3.3). Επίσης το εμβαδόν της επιφάνειας του

αυλού και της επιφάνειας των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου των καραβίδων που παρέμειναν σε ασιτία είναι μεγαλύτερα από εκείνο των καραβίδων που διατράφηκαν με σύμπηκτο. Η αναλογία εμβαδού επιφάνειας αυλού προς την συνολική επιφάνεια σωληνίσκου ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα καραβίδων που παρέμεινε σε ασιτία, μικρότερη στην ομάδα που διατράφηκε με σύμπηκτο του εμπορίου και ακόμη χαμηλότερη στην ομάδα που διατράφηκε με μύδια (Σχ. 3.4).

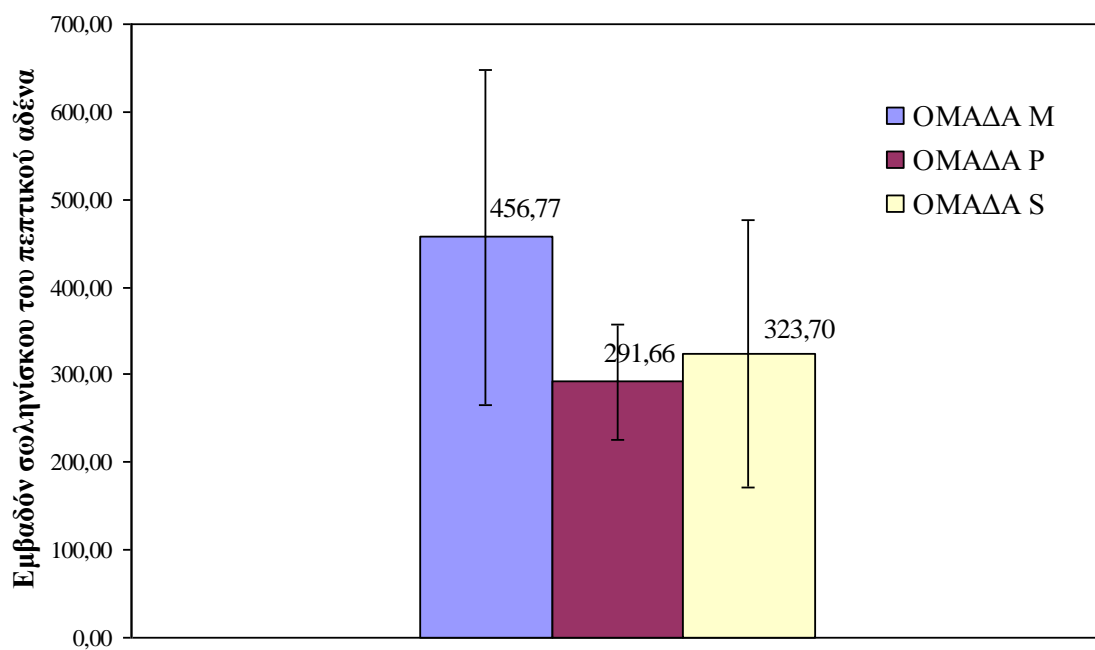
Από τη στατιστική επεξεργασία των παραπάνω αποτελεσμάτων προέκυψε ότι δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιμέρους ομάδων, αφού οι διαφορές στο εμβαδόν της επιφάνειας του αυλού ($P= 0,709$), της επιφάνειας του πεπτικού αδένου ($P= 0,195$) και της μεταξύ τους αναλογίας ($P= 0,403$) είναι στατιστικώς μη σημαντικές. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν την τάση ότι στη διατροφή με μύδι παρατηρείται καλύτερη πεπτική ικανότητα, ενώ ακολουθεί η διατροφή με σύμπηκτο.

Πίνακας 3.2. Εμβαδόν επιφάνειας αυλού (σε μm^2), εμβαδόν επιφάνειας του σωληνίσκου του πεπτικού αδένου (σε μm^2) και μεταξύ τους αναλογία.

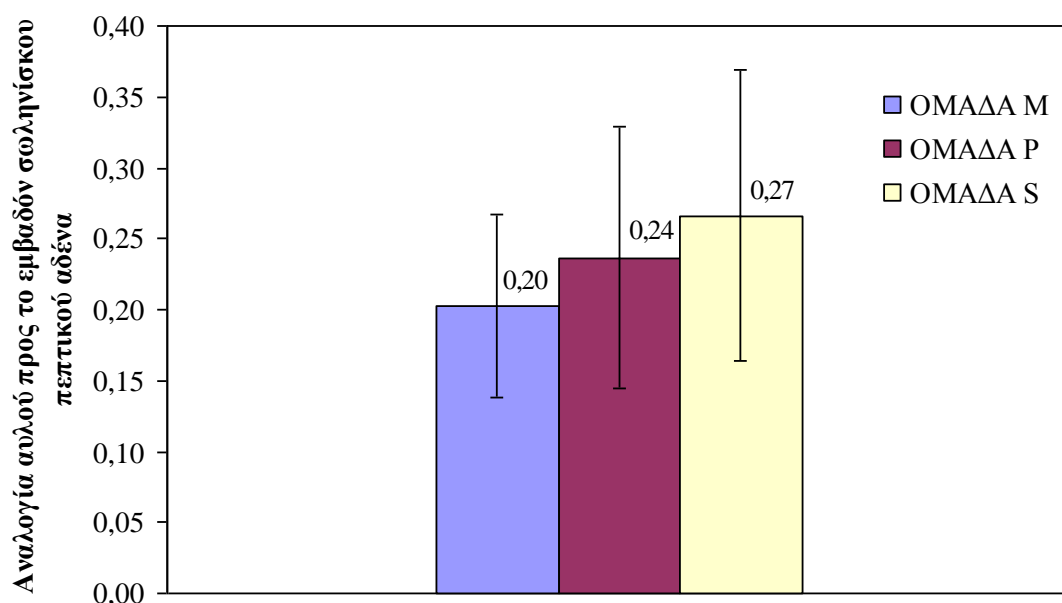
| | Όνομασία δείγματος | Εμβαδόν επιφάνειας αυλού (μm^2) | Εμβαδόν επιφάνειας σωληνίσκου πεπτικού αδένου (μm^2) | Λόγος εμβαδού επιφάνειας αυλού προς επιφάνειας σωληνίσκου |
|---|---------------------------|--|---|---|
| Ομάδα καραβίδων που διατράφηκαν με μύδι | M1 | 99,82 ± 70,16 | 451,25 ± 333,96 | 0,22 |
| | M2 | 71,28 ± 21,55 | 492,95 ± 325,55 | 0,14 |
| | M3 | 99,30 ± 37,29 | 726,60 ± 535,32 | 0,14 |
| | M4 | 87,46 ± 29,16 | 664,80 ± 385,00 | 0,13 |
| | M5 | 36,05 ± 19,68 | 161,14 ± 81,84 | 0,22 |
| | M7 | 88,31 ± 37,72 | 567,78 ± 497,29 | 0,16 |
| | M8 | 55,09 ± 28,86 | 167,74 ± 37,71 | 0,33 |
| | M11 | 104,64 ± 36,53 | 540,45 ± 394,67 | 0,19 |
| | M12 | 68,29 ± 63,64 | 306,11 ± 293,50 | 0,22 |
| | M15 | 134,94 ± 79,62 | 488,88 ± 408,46 | 0,28 |
| | Μέση τιμή ομάδας M | 84,52 ± 28,04 | 456,77 ± 191,89 | 0,20 ± 0,06 |
| Ομάδα καραβίδων που διατράφηκαν με σύμπηκτο | P1 | 33,57 ± 23,28 | 237,83 ± 182,17 | 0,14 |
| | P7 | 101,78 ± 70,80 | 293,03 ± 106,76 | 0,35 |
| | P8 | 69,39 ± 47,05 | 252,77 ± 156,82 | 0,27 |
| | P11 | 70,35 ± 56,46 | 382,99 ± 220,79 | 0,18 |
| | Μέση τιμή ομάδας P | 68,77 ± 19,96 | 291,66 ± 47,80 | 0,24 ± 0,09 |
| Ομάδα καραβίδων που παρέμειναν σε αστιία | S2 | 60,17 ± 40,95 | 451,25 ± 333,96 | 0,13 |
| | S3 | 72,52 ± 31,95 | 193,79 ± 61,59 | 0,37 |
| | S8 | 47,03 ± 22,39 | 190,09 ± 56,02 | 0,25 |
| | S17 | 142,88 ± 97,14 | 459,68 ± 355,95 | 0,31 |
| | Μέση τιμή ομάδας S | 80,65 ± 42,77 | 323,70 ± 152,19 | 0,27 ± 0,10 |



Σχήμα 3.2. Το εμβαδόν της επιφάνειας του αυλού των σωληνίσκων των πειραματικών ομάδων (μέσος όρος και τυπική απόκλιση).



Σχήμα 3.3. Το εμβαδόν των σωληνίσκων του πεπτικού αδένα των πειραματικών ομάδων (μέσος όρος και τυπική απόκλιση).



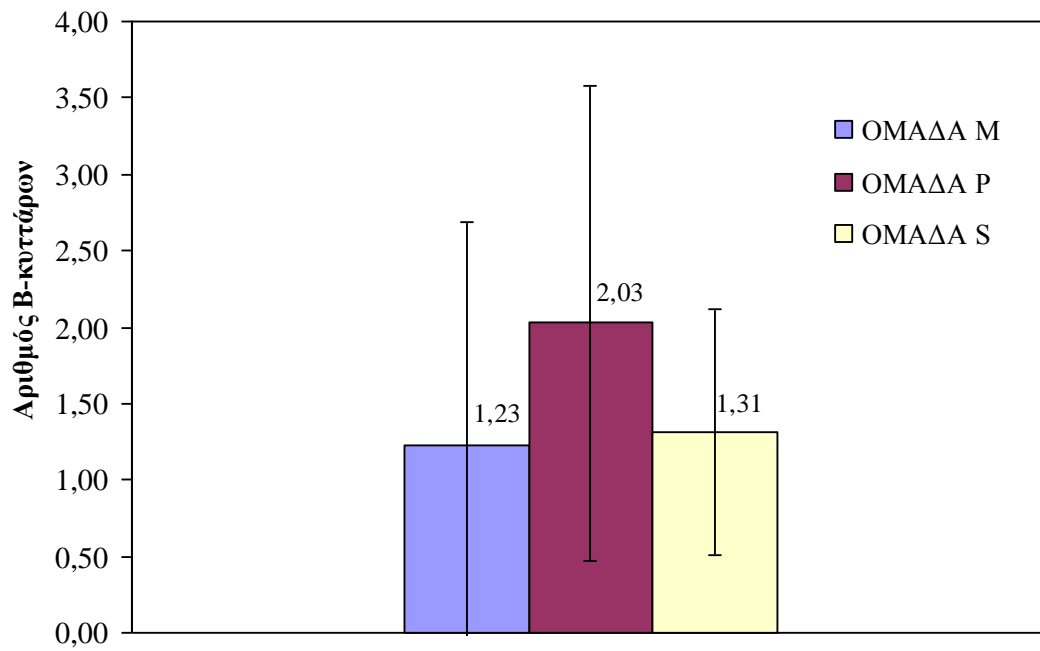
Σχήμα 3.4. Η αναλογία της επιφάνειας του αυλού προς το εμβαδόν του σωληνίσκου του πεπτικού αδένου των πειραματικών ομάδων (μέσος όρος και τυπική απόκλιση).

3.3. Επίδραση των διαφορετικών διαίτων στον αριθμό των Β-κυττάρων των καραβίδων

Μετρήθηκε ο αριθμός των Β-κυττάρων ο οποίος ενδεχομένως να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της διατροφικής κατάστασης των καρκινοειδών. Ο αριθμός των Β-κυττάρων μεταξύ των τριών ομάδων διαφοροποιείται ελαφρώς (Πιν. 3.3). Στην ομάδα των καραβίδων που διατράφηκαν με σύμπηκτο ο αριθμός των Β-κυττάρων είναι λίγο πιο υψηλός σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες. Η ομάδα των καραβίδων που διατράφηκε με μύδι παρουσίασε τον μικρότερο αριθμό των Β-κυττάρων (Σχ. 3.5). Παρόλα αυτά οι διαφορές τους δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($P=0,594$).

Πίνακας 3.3. Αριθμός Β-κυττάρων των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου.

| Αριθμός Β-κυττάρων | | | |
|---------------------|---|---|---|
| | Ομάδα καραβίδων που διατράφηκαν με μύδι | Ομάδα καραβίδων που διατράφηκαν με σύμπηκτο | Ομάδα καραβίδων που παρέμειναν σε αστία |
| Μέση τιμή \pm Τ.Α | 1,23 \pm 1,46 | 2,03 \pm 1,56 | 1,31 \pm 0,80 |



Σχήμα 3.5. Ο αριθμός Β-κυττάρων των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου από τις τρεις πειραματικές ομάδες (μέσος όρος και τυπική απόκλιση).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα προπτυχιακή διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών διαιτών (κατεψυγμένη σάρκα μυδιών και σύμπηκτα του εμπορίου) και της ασιτίας στο ηπατοπάγκρεας της караβίδας *N. norvegicus*. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν μικροσκοπικές παρατηρήσεις των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου των караβίδων που διατράφηκαν είτε με σύμπηκτα του εμπορίου, είτε με κατεψυγμένη σάρκα μυδιών είτε παρέμειναν σε ασιτία, μετρήθηκε ο ηπατοσωματικός δείκτης, το εμβαδόν του αυλού, του σωληνίσκου του πεπτικού αδένου καθώς και η μεταξύ τους αναλογία. Ακόμη μετρήθηκε και ο αριθμός των Β-κυττάρων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος, ο δείκτης ήταν ελαφρώς υψηλότερος στην ομάδα που διατράφηκε με μύδια, χαμηλότερος στην ομάδα που διατράφηκε με σύμπηκτα και ακόμη χαμηλότερος στην ομάδα που παρέμεινε σε ασιτία. αλλά οι διαφορές στον δείκτη των ομάδων δεν είναι στατιστικώς σημαντικές, αφού οι τιμές του ηπατοσωματικού δείκτη των караβίδων όλων των ομάδων δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους ($P=0,833$).

Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες που να διερευνούν την επίδραση της διατροφής στα μορφομετρικά χαρακτηριστικά του πεπτικού αδένου της караβίδας (*N. norvegicus*). Οι Ward & Carter (2009) δουλεύοντας με τον αστακό *Jasus edwardsii* μελέτησαν την καταλληλότητα διαφορετικών διαίτων που διέφεραν ως προς την πηγή των λιπιδίων και παρατήρησαν ότι δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στον ηπατοσωματικό δείκτη των αστακών μεταξύ των διαφορετικών διατροφικών ομάδων. Οι Johnston *et al.* (2003) διεξήγαγαν πείραμα με τον αστακό *Jasus edwardsii* διατρέφοντας τον με δίαιτες που διέφεραν ως προς το περιεχόμενό τους σε

υδατάνθρακες και λιπίδια. Η έρευνά τους έδειξε ότι ο ηπατοσωματικός δείκτης μειωνόταν όσο αυξάνονταν το επίπεδο του διαιτητικού λίπους συγκριτικά με αυτό των υδατανθράκων και ότι η δίαιτα με αναλογία διαιτητικών υδατανθράκων/λιπιδίων ίση με 2/1 απέδωσε τη μέγιστη σωματική αύξηση. Στην παρούσα μελέτη, η χημική σύσταση των μυδιών και των εμπορικών συμπήκτων που χρησιμοποιήθηκαν, και που αναλύθηκαν σε παράλληλες διπλωματικές εργασίες (Κεφεκέ 2010, Πετμεζάς 2010), ήταν υδατάνθρακες 5,77% και λιπίδια 2,23% (αναλογία 2,5/1) για τα μύδια και υδατάνθρακες 22,4% και λιπίδια 13,3% (αναλογία 1,6/1) για τα σύμπηκτα του εμπορίου. Άρα, λοιπόν, όπως και στο πείραμα των Johnston *et al.* (2003) με τον αστακό *Jasus edwardsii*, η αύξηση του διαιτητικού λόγου λιπιδίων/υδατανθράκων, όπως ήταν η περίπτωση των εμπορικών συμπήκτων, οδήγησε σε μείωση του ηπατοσωματικού δείκτη των καραβίδων συγκριτικά με εκείνες που διατράφηκαν με δίαιτα-μύδια, αν και η διαφοροποίηση αυτή κρίθηκε στατιστικώς μη σημαντική. Είναι γνωστό πως ο υψηλός ηπατοσωματικός δείκτης στα καρκινοειδή αντικατοπτρίζει μία υψηλότερης ποιότητας διατροφική κατάσταση του οργανισμού που οδηγεί σε καλύτερη ανάπτυξη (Jones & Obst 2000). Προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα ότι η διατροφή της *N. norvegicus* με μύδια, λόγω της χαμηλότερης περιεκτικότητας τους σε λιπίδια, οδήγησε σε υψηλότερο ηπατοσωματικό δείκτη, ο οποίος με τη σειρά του αντικατοπτρίζει μία καλύτερη διατροφική κατάσταση της καραβίδας από ότι η διατροφή της με σύμπηκτα του εμπορίου που περιέχουν υψηλά επίπεδα σε λιπίδια. Ο χαμηλότερος ηπατοσωματικός δείκτης που βρέθηκε στις καραβίδες που παρέμειναν σε ασιτία αντικατοπτρίζει τη χαμηλή ποιότητα της διατροφικής τους κατάστασης.

Το επιθήλιο και οι πτυχώσεις του σωληνίσκου ήταν ευδιάκριτα, όπως επίσης και τα λιπιδικά κυστίδια και τα Β- κύτταρα. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν λιγιστές μελέτες

σχετικά με την επίδραση διαφορετικών τροφών στην ιστολογία του ηπατοπαγκρέατος των καρκινοειδών (Rottland *et al.* 2010, Williams 2007, Simon 2009, Simon & Jeffs 2008, Johnston *et al.* 2003, Guo *et al.* 2006). Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη προσπάθεια διερεύνησης της επίδρασης της τροφής στον πεπτικό αδένα του *N. norvegicus*.

Η αναλογία του αυλού προς τη συνολική επιφάνεια του σωληνίσκου του πεπτικού αδένα για τις καραβίδες που διατράφηκαν με μύδια ($0,20 \pm 0,06$) ήταν χαμηλότερη, αλλά όχι στατιστικώς σημαντική. Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε από τον Simon (2009) σχετικά με την ανταπόκριση του πεπτικού αδένα του αστακού *Jasus edwardsii* που διατράφηκε με μύδια και σύμπληκτα του εμπορίου βρέθηκε, όπως και στην παρούσα μελέτη ότι, ο λόγος του αυλού προς τη συνολική επιφάνειας του σωληνίσκου του πεπτικού αδένα ήταν υψηλότερος στους αστακούς που διατράφηκαν με σύμπληκτα από ότι σε εκείνους που διατράφηκαν με μύδια και ότι το pH του πεπτικού αδένα της πρώτης ομάδας ήταν πιο όξινο. Ο ίδιος συγγραφέας συμπεράνει πως αυτό δείχνει ότι ο οργανισμός καταβάλλει πιο εντατική προσπάθεια για ενδοκυτταρική πέψη στον πεπτικό αδένα όταν διατρέφεται με σύμπληκτα από ότι με δίαιτα με μύδι και πως αυτό επηρεάζει και την όρεξη του. Το παραπάνω συμπέρασμα επιβεβαιώνεται και από τις μετρήσεις που έκαναν οι δύο συνεργάτες του γενικότερου πειράματος (Κεφεκέ 2010, Πετμεζιάς 2010) όπου η πρόσληψη τροφής των καραβίδων που διατρέφονταν με σύμπληκτα ήταν χαμηλότερη από εκείνη των καραβίδων που διατρέφονταν με μύδια. Επίσης, ο Simon (2009) αναφέρει πως η εκτροφή των νεαρών αστακών με τεχνητή τροφή για 6 μήνες οδήγησε σε μια χαρακτηριστική μείωση της πεπτικής λειτουργίας των αστακών.

Ο αριθμός των Β- κυττάρων των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου των καραβίδων που διατράφηκαν με σύμπηκτο του εμπορίου βρέθηκε μεγαλύτερος από τον αριθμό των Β-κυττάρων των σωληνίσκων του πεπτικού αδένου των καραβίδων που διατράφηκαν με μύδι. Στην ομάδα των καραβίδων που έμειναν σε ασιτία ο αριθμός των Β-κυττάρων είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο των σωληνίσκων των καραβίδων που διατράφηκαν με μύδι και μικρότερος των σωληνίσκων των καραβίδων που διατράφηκαν με σύμπηκτο. Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε από τον Simon (2009) ο αριθμός των Β-κυττάρων ανά σωληνίσκο στους αστακούς που σιτίστηκαν με σύμπηκτα είναι μεγαλύτερος από τον αριθμό των Β-κυττάρων των αστακών που διατράφηκαν με μύδι. Ο Simon (2009) αναφέρει πως ο υψηλότερος αριθμός των Β-κυττάρων ανά σωληνίσκο στους αστακούς που σιτίστηκαν με σύμπηκτα είναι ένας επιπλέον πιθανός δείκτης της εντατικής προσπάθειας του οργανισμού για ενδοκυτταρική πέψη στον πεπτικό αδένου ή/και αποβολής των παραπροϊόντων της πέψης (τοξικά ανόργανα στοιχεία, πεπτικά ένζυμα, άπεπτα μέρη τροφής) από τον πεπτικό αδένου (Brunet *et al.* 1994). Αυτό μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μιας φτωχής πεπτικότητας της τροφής παράγοντας μία περίσσεια άπεπτων μερών τροφής στον πεπτικό αδένου (Al-mohanna & Nott 1987).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Παρατηρήθηκε ότι οι καραβίδες που διατράφηκαν με χαμηλά επίπεδα λιπιδίων και υδατανθράκων και χαμηλότερο λόγο λιπιδίων/υδατανθράκων, όπως στην περίπτωση των μυδιών, παρουσίασαν ελαφρώς υψηλότερο ηπατοσωματικό δείκτη συγκριτικά με τις καραβίδες που διατράφηκαν με υψηλά επίπεδα λιπιδίων και υδατανθράκων, όπως στην περίπτωση των συμπίκτων.
- Η διατροφή της *N. norvegicus* με μύδια, λόγω της χαμηλότερης περιεκτικότητας τους σε λιπίδια, οδήγησε σε υψηλότερο ηπατοσωματικό δείκτη, ο οποίος με τη σειρά του αντικατοπτρίζει μία καλύτερη διατροφική κατάσταση της καραβίδας από ότι η διατροφή της με σύμψηκτα του εμπορίου που περιέχουν υψηλά επίπεδα σε λιπίδια.
- Η αναλογία του αυλού προς την επιφάνεια του σωληνίσκου του πεπτικού αδένου, καθώς και ο αριθμός των Β-κυττάρων τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της διατροφικής κατάστασης των καρκινοειδών.
- Βάση των ιστολογικών παρατηρήσεων του πεπτικού αδένου (επιφάνεια αυλού & αριθμός Β-κυττάρων), η καραβίδα (*N. norvegicus*) όταν διατρέφεται με σύμψηκτα καταβάλλει μια πιο εντατική προσπάθεια για ενδοκυτταρική πέψη στον πεπτικό αδένου από ότι όταν διατρέφεται με μύδια.

Περαιτέρω έρευνες είναι αναγκαίες ώστε να διερευνηθεί η καταλληλότητα και άλλων φυσικών τροφών, αλλά και η σύσταση κατάλληλων τεχνητών τροφών (συμπύκτων) στη διατροφή της *N. norvegicus*.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενογλωσση βιβλιογραφία

- Al-Mohanna S. Y., Nott J. W., Lane D.J.W. (1985). M-“midget” cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* de Haan 1844 (Decapoda: Natantia). *Crustacean*, 48: 260-268
- Al-mohanna S.Y., Nott J.A. (1987). R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea decapoda) *Marine Biology*, 95: 129-137
- Barker P. L., Gibson R. (1977). Observations on the feeding mechanism, structure of the gut, and digestive physiology of the European lobster *Homarus gammarus* (L.) (Decapoda: Nephropidae). *Marine Biology*, 26: 297-324
- Brunet M., Arnaud J., Mazza J. (1994). Gut structure and digestive cellular processes in marine Crustacea. *Oceanogr. Marine Biology Annu.*, 32: 335-367
- Conklin D. E. (1995). Digestive Physiology and Nutrition. In: *Biology of the Lobster Homarus americanus*. New York, pp 442-445
- Cristo M., Cartes J.E. (1998). A comparative study of the feeding ecology of *Nephrops norvegicus* (L) in the bathyal Mediterranean and adjacent Atlantic. *Scientia Marina*, 62: 81-90
- Crnković D. (1965). Ispitivanje ekologije i mogućnosti racionalnog unaprijeđenja eksploatacije raka *Nephrops norvegicus* (L) u kanalskom području sjeveroistočnog Jadrana. Disertacija, PMF Sveučilišta u Zagrebu
- Factor J. D. (1995). The Digestive System. In: *Biology of the Lobster Homarus americanus*. New York, pp 390-439
- Fisher W., Schneider M., Bauchot, M. L. (1987). Fishes FAO identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire. Vol. I – II., Rome, FAO., 1-2: 760
- Gibson R. (1983). Feeding and digestion in decapod crustaceans. In: “Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition” (Pruder G., Langdon C. J., Conklin D. E, eds.), Baton Rouge, Louisiana State University, 59-70
- Gibson R., Barker P. L. (1979). The decapod hepatopancreas. *Marine Biology*, 17:285-346
- Gramitto M.E. (1998). Molt pattern Identification through gastrolith examination on *Nephrops norvegicus* (L.) in the Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, 62: 17-23.
- Guillaume J., Kaushik S., Bergot P., Metailler R. (1999). Nutrition and feeding of fish and crustaceans, Inra, Efremer, Plouzane, France, 243-245
- Guo R., Liu Y. J., Tian L. X., Huang J. W. (2006). Effect of dietary cornstarch levels on growth performance, digestibility and microscopic structure in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* reared in brackish water. *Aquaculture Nutrition*, 12: 83–88
- Hirsch G. C., Jacobs W. (1930). Der Arbeitsrhythmus der Mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus* II. Teil: Wachstum als primärer Factor des Rhythmus eines polyphasischen organigen Sekretionssystems. *Z. Vergl. Physiol.*, 12: 524-557
- Johnston D.J., Calvert K.A., Carter C.G., Crear B.J. (2003). Dietary carbohydrate/lipid ratios and nutritional condition in juvenile southern rock lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, 220: 667–682

- Jones P.L., Obst J.H. (2000). Effects of starvation and subsequent refeeding on the size and nutrient content of the hepatopancreas of *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). *J. Crust. Biol.*, 20: 431–441
- Mente E., Karapanagiotidis I., Logothetis P., Vafidis D. Malandrakis E., Neofitou N., Exadactylos A., Stratakos A. (2009). The reproductive cycle of Norway lobster. *Journal of Zoology*, 4: 324-332
- Ong B.L., Johnston D. (2006). Influence of feeding on hepatopancreas structure and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. *J. Shellfish Res.*, 25: 113–121
- Relini G., Bertrand J., Zamboni A. (1999). Synthesis of the knowledge on bottom fishery resources in Central Mediterranean (Italy and Corsica). *Marine Biology Medit.*, 6 (suppl. 1)
- Rotllant G., Gisbert E., Karapanagiotidis I.T., Gkolomazou E., Mente E. (2010). Effects of different diets on the digestive physiology of Norway lobster *Nephrops norvegicus*
- Sarda F., Valladares F.J. (1990). Gastric evacuation of different foods by *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Decapoda) and estimation of soft tissue ingested, maximum food intake and cannibalism in captivity. *Marine Biology* 104: 25-30
- Simon C. J. (2009). Digestive enzyme response to natural and formulated diets in cultured juvenile spiny lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, 294: 271–281
- Simon C. J., Jeffs A. (2008). Feeding and gut evacuation of cultured juvenile spiny lobsters, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, 280: 211–219
- Thomas H. J., Davidson C. (1962). The food of the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *Marine Research*, 3: 1–15
- Ward L. R., Carter G. C. (2009). An evaluation of the nutritional value of alternative lipid sources to juvenile southern rock lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, 296: 292–298
- Weel P.B. (1974). Hepatopancreas? *Comp. Biochem. Physiol.*, 47: 1-9
- Williams C. K. (2007). Nutritional requirements and feeds development for post-larval spiny lobster: A review *Aquaculture*, 263:1–14

Ελληνική βιβλιογραφία

- Κεφεκέ, Β. (2010). Κατανάλωση τροφής από το είδος *Nephrops norvegicus* σε συνθήκες εκτροφής: Διατροφική αγωγή με μύδια. Προπτυχιακή διπλωματική εργασία του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, σελ. 64
- Πετμεζάς, Ζ. (2010). Κατανάλωση τροφής από το είδος *Nephrops norvegicus* σε συνθήκες εκτροφής: Διατροφική αγωγή με σύμπηκτο του εμπορίου. Προπτυχιακή διπλωματική εργασία του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, σελ. 63

Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

- FAO Fisheries and Aquaculture Department.: <http://www.fao.org/fishery/species/2647/en>. (Πρόσβαση: 19-08-2010)
- Picton B.E., Morrow C.C. (2007). In *Encyclopedia of Marine Life of Britain and Ireland*.: <http://www.habitas.org.uk/marinelife/species.asp?item=S23650>. (Πρόσβαση: 20-08-2010)

ABSTRACT

The aim of the present study was to research the effect of different diets (natural and artificial food) as well as the starvation on the histology of Norway lobster's (*N. norvegicus*) digestive gland. 47 lobsters with mean body weight $46,7\pm 9,2$ g, were caught from Pagasitikos (gulf and transported to the aquaculture station of the Department of Ichthyology and Aquatic Environment. The lobsters were divided into three groups: the group P (12 lobsters) fed with commercial pellets, the group M (16 lobsters) fed with frozen flesh of mussels and the group S (19 lobsters) which were kept in starvation. After a growing period of 20 weeks, digestive gland were removed from lobsters of each group and were studied histologically. Results showed that the mean value of hepatosomatic index was higher in the lobster fed with mussels, followed by those fed with pellets while the lower value was observed in starved lobster. The above results indicate that the diet state of the lobster fed with mussels was better compared to those fed with pellets.

The ratio of the tubule lumen to the total surface of the tubule was higher in the lobster fed with pellets and lower in the lobster fed with mussels. This indicates that when the lobsters are fed with pellets more effort is spent for intracellular digestion in the digestive gland compared to those fed with mussels. Further research is needed for determining the suitability of other natural foods as well as defining the composition of proper artificial foods (pellets) used in the nutrition of *N. norvegicus*.

Keywords: *Nephrops norvegicus*, digestive gland, nutrition, histology.