

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

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Ιστολογική μελέτη εντέρου Τιλάπιας (*Oreochromis spp.*) σε σύστημα
ενυδραιοπονίας μετά από προσθήκες Σιδήρου και Καλίου»**

Βασίλειος Ζουρνατζής
Α.Μ. 02216

ΒΟΛΟΣ 2022

**«Ιστολογική μελέτη εντέρου Τιλάπιας (*Oreochromis spp.*) σε σύστημα
ενυδρειοπονίας μετά από προσθήκες Σιδήρου και Καλίου»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1. Παναγιώτης Βερίλλης**, Επίκουρος Καθηγητής, Μικροσκοπία και ανάλυση εικόνας στην ιστολογία και στους υδρόβιους οργανισμούς, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.
- 2. Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.
- 3. Ελένη Μεντέ**, Καθηγήτρια, Φυσιολογία Θρέψη Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Τομέας Ζωικής Παραγωγής, Ιχθυολογίας, Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος, **Μέλος**.

*Στους γονείς μου
Χρήστο και Κατερίνα,
στα αγαπημένα μου αδέρφια,
Κωνσταντίνο και Ηλία,
στους ανθρώπους που με στήριξαν,
Αντώνη και Θανάση,
και στη Luna
ως ελάχιστο ευχαριστώ
για την ανιδιοτελή τους υποστήριξη.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Επιθυμώ να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε ορισμένους ανθρώπους, η συμβολή και η συμπαράσταση των οποίων ήταν πολύτιμη και καθοριστική στην εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες, οφείλω, πρωτίστως, στον καθηγητή μου και επιβλέποντα της πτυχιακής μου διατριβής, κύριο Παναγιώτη Βερίλλη, Αν. Καθηγητή Μικροσκοπίας και ανάλυσης εικόνας στην ιστολογία και στους υδρόβιους οργανισμούς, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την εκπόνηση αυτής της εργασίας, για τις πολύτιμες συμβουλές και την επιστημονική του καθοδήγηση.

Κρίνω, επίσης, απαραίτητο να εκφράσω εκ των προτέρων την αληθινή μου εκτίμηση προς τα υπόλοιπα μέλη της επιτροπής, για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου, για τις πολύτιμες υποδείξεις και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους στο σύνολό της.

Ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να εκφράσω σε όλους τους καθηγητές και όλες τις καθηγήτριες του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ευχαριστώ ειλικρινά τους γονείς μου για την ολόψυχη αγάπη και υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Είμαι ευγνώμων απέναντι στην οικογένειά μου που στέκεται πάντα δίπλα μου και στηρίζει τις επιλογές και τις αποφάσεις μου, δίνοντάς μου ελπίδα και δύναμη να προσπαθώ για το καλύτερο. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου για τη στήριξη και την παρουσία τους στη ζωή μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ενυδραιοπονία είναι ένα μεικτό σύστημα καλλιέργειας το οποίο συνδυάζει την υδατοκαλλιέργεια με την υδροπονία. Η μέθοδος αυτή καλλιεργεί δύο προϊόντα, ιχθύες και φυτά, ταυτόχρονα με αειφορικό και βιώσιμο τρόπο. Το νερό περιέχει απόβλητα των ψαριών ή υπολείμματα από την τροφή τους, τα οποία είναι πολύ θρεπτικά για τα φυτά και χρησιμοποιούνται ως λίπασμα, ενώ τα φυτά με τη σειρά τους «φιλτράρουν» το νερό και το επιστρέφουν στα ψάρια καθαρό. Στο συγκεκριμένο πείραμα, τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η κόκκινη τιλάπια (*Oreochromis* spp.) και η ρόκα (*Eruca vesicaria*). Η τιλάπια χαρακτηρίζεται από ένα μεγάλο εύρος ανθεκτικότητας σε πολλές φυσικοχημικές και διατροφικές παραμέτρους, κάτι που την καθιστά ιδανική για αυτό το είδος καλλιέργειας. Μερικές θρεπτικές ουσίες όπως ο σίδηρος και το κάλιο είναι απαραίτητες για τη βέλτιστη ανάπτυξη των φυτών και των ιχθύων. Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η παρατήρηση της επίδρασης Fe και K στους μυϊκούς χιτώνες και τις λάχνες του μεσεντέρου της τιλάπιας και πιθανές ιστομορφολογικές αλλοιώσεις. Από την καλλιέργεια των ιχθύων λήφθηκαν δύο ομάδες δειγμάτων για ιστολογική μελέτη του μεσαίου τμήματος του εντέρου (midgut) που αφορούσαν δύο διαφορετικές μεταχειρίσεις: χωρίς προσθήκη θρεπτικών στο νερό του συστήματος της ενυδραιοπονίας και το σιτηρέσιο των ψαριών (control), με προσθήκη σιδήρου και καλίου στο νερό του συστήματος εκτροφής και στο σιτηρέσιο των ψαριών (Fe + K). Στη συνέχεια ακολούθησαν διαδικασίες μονιμοποίησης με διάλυμα Davidson και χρώση με αιματοξυλίνη-εωσίνη. Τελικά, μελετήθηκαν και παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο οι εντερικές λάχνες και οι μυϊκοί χιτώνες του εντέρου. Μετά από μέτρηση των μηκών, βρέθηκε ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στις εντερικές λάχνες και στους μυϊκούς χιτώνες μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων. Η προσθήκη σιδήρου και

καλίου δεν φάνηκε να επηρεάζει τα μελετούμενα δείγματα ως προς την ιστοπαθολογική και ιστομορφολογική δομή του εντέρου.

Λέξεις κλειδιά: ενυδρειοπονία, κόκκινη τιλάπια, σίδηρος, κάλιο

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Ενυδρειοπονία.....	1
1.2. Συστηματική κατάταξη και βιολογία Τιλάπιας (<i>Oreochromis spp.</i>).....	3
1.3. Εισαγωγικά για το πεπτικό σύστημα.....	6
1.3.1. Μορφολογία εντέρου.....	7
1.3.2. Εντερικές λάχνες.....	9
1.3.3. Χιτώνες.....	10
1.4. Πέψη και απορρόφηση θρεπτικών.....	11
1.5. Fe και K.....	13
1.6. Σκοπός της έρευνας.....	15
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	17
2.1. Δείγματα από έντερο τιλάπιας (<i>Oreochromis spp.</i>).....	17
2.2. Πρωτόκολλο ιστοκινέτας.....	18
2.3. Τομή ιστού σε μικροτόμο.....	21
2.4. Πρωτόκολλο χρώσης.....	23
2.5. Παρατήρηση δειγμάτων σε οπτικό μικροσκόπιο.....	25
2.6. Πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων.....	26
2.7. Ανάλυση δεδομένων.....	27
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	28
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	37
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42
5.1. Ελληνική.....	42
5.2. Ξενόγλωσση.....	43
5.3. Ηλεκτρονική.....	51
6. ABSTRACT.....	52

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ενυδρειοπονία

Η ενυδρειοπονία (aquaponics), είναι ένα υβριδικό βιώσιμο σύστημα καλλιέργειας το οποίο συνδυάζει την υδατοκαλλιέργεια (aquaculture) με την υδροπονία (hydroponics), χρησιμοποιώντας συστήματα ανακυκλοφορίας νερού (RAS) για εκτροφή υδρόβιων οργανισμών και καλλιέργεια χωρίς χώμα-έδαφος για φυτικούς οργανισμούς (Rakocy et al., 2010; Somerville et al., 2014).

Το σύστημα βασίζεται κυρίως στην νιτροποίηση της αμμωνίας, στην ομαλή λειτουργία-συμβίωση του τεχνητού οικοσυστήματος και των φυσικών βιολογικών λειτουργιών των εκτρεφόμενων ιχθύων, των βακτηρίων και των καλλιεργούμενων φυτών (Pappa et al., 2017; Somerville et al., 2014). Το αποτέλεσμα είναι η γρήγορη ανάπτυξη των φυτών και η φυσιολογική εκτροφή των ψαριών και ο στόχος είναι η διατήρηση βέλτιστων συνθηκών νερού (Goddek et al., 2019).

Το νερό ανακυκλοφορεί από την δεξαμενή των ψαριών πρώτα σε φίλτρα για να καθαριστεί, έπειτα στη δεξαμενή των καλλιεργούμενων φυτών και τελικά πίσω στην αρχική δεξαμενή. Το νερό φιλτράρεται αρχικά από μηχανικά φίλτρα ώστε να αφαιρεθούν τα στερεά απόβλητα και στη συνέχεια από βιολογικά φίλτρα για τον καθαρισμό από τα διαλυμένα στο νερό απορρίμματα (Thorarinsdottir, 2015). Το νερό περιέχει απόβλητα των ψαριών (κόπρανα και ούρα) ή υπολείμματα από την τροφή τους τα οποία είναι πολύ θρεπτικά για τα φυτά και χρησιμοποιούνται ως λίπασμα, ενώ τα φυτά με τη σειρά τους «φιλτράρουν» το νερό και το επιστρέφουν στα ψάρια καθαρό (Vlahos et al., 2019). Τα φυτά λαμβάνουν τα απαραίτητα για την ανάπτυξή τους συστατικά μέσω του νερού και διάφορων επιπρόσθετων χημικών σκευασμάτων,

καθώς δεν υπάρχει χώμα στην παραγωγή (Nozzi et al., 2018). Στην ενυδραιοπονία, η λίπανση των φυτών γίνεται με τα απόβλητα από τον μεταβολισμό των ψαριών, τα οποία είναι πλούσια σε αμμωνία, μέταλλα και ιχνοστοιχεία που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των φυτών (Pappa et al., 2017). Ωστόσο, τα επίπεδα καλίου (K), ασβεστίου (Ca) και σιδήρου (Fe) στο νερό δεν είναι αρκετά για την βέλτιστη ανάπτυξη των φυτών και απαιτούνται θρεπτικά συμπληρώματα (Goddek et al., 2019).

Τα απόβλητα των ψαριών περιέχουν μεγάλες ποσότητες αμμωνίας (NH_3), η οποία είναι αρκετά τοξική σε υψηλές ποσότητες. Στην ενυδραιοπονία όμως, το νερό καθαρίζεται αποτελεσματικά από τα φυτά και επιστρέφει στα ψάρια καθαρό. Με αυτόν τον τρόπο, η ποσότητα του νερού, παραμένει σταθερή και δεν χρειάζεται προσθήκη μεγάλων όγκων νερού. Επίσης, εξοικονομείται ενέργεια καθώς το νερό διατηρεί μια σχετικά σταθερή θερμοκρασία (Somerville et al., 2014).

Η αμμωνία οξειδώνεται από τα αυτότροφα βακτήρια του βιολογικού φίλτρου *Nitrosomonas* sp. and *Nitrobacter* sp. σε νιτρώδη NO_2^- και νιτρικά NO_3^- αντίστοιχα, τα οποία είναι μη τοξικά για τους ιχθύες σε μικρές ποσότητες (Κλαουδάτος, 2010). Τα νιτρικά NO_3^- απορροφούνται από τις ρίζες των φυτικών οργανισμών (Somerville et al., 2014).

Η ενυδραιοπονία στη σύγχρονη εποχή, ξεκίνησε σε ξηρές περιοχές με περιορισμένη πρόσβαση σε γλυκό νερό, όπως η Αυστραλία και οι Αμερικανικές Παρθένοι Νήσοι, λόγω της αυξανόμενης ανάγκης-ζήτησης τροφίμων (Thorarinsdottir, 2015). Η τεχνική βρίσκεται ακόμα υπό ανάπτυξη, αλλά ουσιαστικά είναι μια αρχαία μέθοδος, αφού στην φύση, στις θάλασσες και στα ποτάμια συμβιώνουν εκατομμύρια χρόνια φυτά και ψάρια.

Η αειφορική ενυδρευσιμότητα, δημιουργεί πολλαπλά οφέλη και για το περιβάλλον. Αρχικά, με αυτόν τον τρόπο καλλιέργειας καταναλώνεται 90% λιγότερο νερό σε σχέση με την παραδοσιακή καλλιέργεια, ενώ ταυτόχρονα δεν μολύνεται ο υδροφόρος ορίζοντας από λιπάσματα και άλλα χημικά ή βιολογικά απόβλητα της καλλιέργειας, όπως για παράδειγμα παρασιτοκτόνα, που αποφεύγονται στις καλλιέργειες ενυδρευσιμότητας, και περιττώματα που περιέχουν υψηλές ποσότητες αμμωνίας αντίστοιχα (Somerville et al., 2014). Ακόμη, μειώνονται κατά πολύ οι εκτάσεις και η ενέργεια που απαιτούνται για την παραγωγή τροφής. Επιπρόσθετα, οι μονάδες είναι πιο ευέλικτες ως προς το μέγεθος και τον τόπο κατασκευής και συχνά βρίσκονται πολύ κοντά στην τοπική αγορά ή σε περιοχές που δεν έχουν τη ικανότητα για άλλου είδους καλλιέργεια, λόγω έλλειψης φυσικών πόρων ή ευνοϊκού κλίματος (Goddek et al., 2019).

Οι ιχθύες που χρησιμοποιούνται στην ενυδρευσιμότητα είναι αποκλειστικά του γλυκού νερού και χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητα στις μεταβολές της θερμοκρασίας, του διαλυμένου οξυγόνου και του pH. Έτσι, ένα από τα πιο διαδεδομένα ψάρια που χρησιμοποιείται στην ενυδρευσιμότητα είναι η τιλάπια Μοζαμβίκης (*Oreochromis mossambicus*) και τα διάφορα υβρίδιά της (*Oreochromis* spp), που έχουν ευνοϊκά χαρακτηριστικά για το σύστημα αυτό (Goddek et al., 2019; Somerville et al., 2014).

1.2. Συστηματική κατάταξη και βιολογία Τιλάπιας (*Oreochromis* spp.)

Τιλάπια είναι το όνομα από μια ομάδα κηλιδών από την Αφρική, κάποια αρκετά σημαντικά για ιχθυοκαλλιέργειες όπως τα *Oreochromis*, *Sarotherodon* και τα *Tilapia* (Philippart & Ruwet, 1982).

Κάποιοι αντιπρόσωποι του γένους *Oreochromis* έχουν την ικανότητα υβριδισμού μεταξύ τους και την παραγωγή γόνιμων απογόνων (Russell et al., 2012). Για παράδειγμα, απόγονοι από υβριδικά είδη μεταξύ *O. mossambicus* με *O. aureus* παρουσίαζαν βελτίωση της αντοχής στο κρύο (Cnaani et al., 2000), ενώ με *O. niloticus* ταχύτερη αύξηση της βιομάζας (Kamal & Mair, 2005). Τέλος, υβριδοποίηση *O. mossambicus* με *O. hornorum* οδηγούν σε δημιουργία μόνο αρσενικών απογόνων που είναι πιο κατάλληλοι για εντατική υδατοκαλλιέργεια (Lovshin, 1982).

Σύμφωνα με την παγκόσμια βάση δεδομένων χωροκατακτητικών ειδών Global invasive species database (GISD, 2022), η κόκκινη τιλάπια (*Oreochromis* spp.) αποτελεί ένα υβριδικό προϊόν μεταξύ *O. mossambicus* και είτε *O. niloticus* ή *O. hornorum*. Η αναπαραγωγή της τιλάπιας είναι εύκολη και γρήγορη, οι διατροφικές και φυσιολογικές απαιτήσεις αρκετά εύελικτες, συνθήκες ευνοϊκές και ελκυστικές για υδατοκαλλιέργεια (Porra & Masser, 1999).

Πίνακας 1. Ταξινομική κατάταξη του γένους *Oreochromis* spp. (πηγή: Integrated Taxonomic Information System - *Oreochromis* Günther, 1889 (ITIS, 2022)).

Κλάση	<i>Teleostei</i>
Υπερτάξη	<i>Acanthopterygii</i>
Τάξη	<i>Perciformes</i>
Υπόταξη	<i>Labroidei</i>
Οικογένεια	<i>Cichlidae</i>
Γένος	<i>Oreochromis</i>

Η τιλάπια Μοζαμβίκης ή *Oreochromis mossambicus* (Peters 1852) είναι ψάρι γλυκού νερού, αυτόχθονο των ποταμών της νότιας και νοτιοανατολικής Αφρικής.

Ιστορικά, στις αρχές του 1930 το είδος εξάχθηκε σε περιοχές της Ασίας για τη συμβολή στον έλεγχο υδρόβιων εντόμων άγριων φυκιών (Pullin & Lowe-McConnell, 1980) και σε μετέπειτα χρόνια για υδατοκαλλιέργειες και εμπλουτισμό ιχθυοαποθεμάτων στο φυσικό ενδιαίτημα (Philippart & Ruwet, 1982). Πλέον εμφανίζεται σε πολυάριθμα μέρη του πλανήτη όπως Βόρεια και Νότια Αμερική, Ασία, Αυστραλία και φυσικά Αφρική (Russell et al., 2012). Ωστόσο, από το 2006 ανήκει στη λίστα των 100 πιο «εισβολικών» ειδών σύμφωνα με την ISSG, ενώ προστέθηκε και στη Κόκκινη Λίστα Απειλούμενων Ειδών της Διεθνούς Ένωσης Προστασίας της Φύσης IUCN ως ευάλωτο είδος λόγω αύξησης πληθυσμών συνήθως τιλάπιας Νείλου και υβριδισμού των 2 ειδών (Bills, 2019). Οι τιλάπιες αυτές αποτελούν είδη βενθοπελαγικά, τροπικά και αμφίδρομα. Εμφανίζουν γενετική ωρίμανση σε μήκη 6-28 cm και συνηθισμένο ολικό μήκος ενήλικα 35 cm. Το μέγιστο δημοσιευμένο βάρος που καταγράφηκε ήταν 1.1 kg, ενώ 11 έτη καταχωρήθηκε ως η υποτιθέμενη μέγιστη ηλικία (Fishbase, 2022).

Οι τιλάπιες είναι φιλόθερμα και ευρύαλα είδη (Philippart & Ruwet, 1982). Η τιλάπια Μοζαμβίκης θεωρείται ως η πιο ανθεκτική του γένους μερικές φορές με ανθεκτικότητα σε αλατότητες να κυμαίνεται μεταξύ 0‰ με 120‰ (Whitfield & Blaber, 1979). Σύμφωνα με τους Bruton και Bolt (1975), οι βέλτιστες θερμοκρασίες εμφανίζονται μεταξύ 25° και 28°C για τα ιχθύδια και με ανθεκτικότητα στους 16,5° – 39°C. Τα ενήλικα προτιμούν ρηγά νερά με θερμοκρασία μεταξύ 22° και 30°C και ανθεκτικότητα 19° – 32°C.

Επίσης, τα *Oreochromis* spp. χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητα σε εύρος φυσικοχημικών μεταβλητών, όπως υψηλή θολερότητα, ρύπανση από τοξικές ουσίες, διακυμάνσεις διαλυμένου οξυγόνου (Philippart & Ruwet, 1982). Είναι ανεκτικοί,

ακόμη, σε παθογόνα, παράσιτα και στο στρες (Somerville et al., 2014). Τιμές pH 3,7 – 10,3 του νερού δεν είναι θανατηφόρες (Murthy et al., 1981), ενώ επιβιώνουν και σε ενδιαιτήματα με χαμηλά επίπεδα οξυγόνου, με την τιλάπια Μοζαμβίκης να επιβιώνει σε ποσότητα ελάχιστου διαλυμένου οξυγόνου 1 ppm για μικρές περιόδους (Philippart & Ruwet, 1982). Τα *O. mossambicus* θάβονται για μήνες στην υγρή άμμο, μέχρι και 3m, σε περιόδους ξηρασίας (Donnelly, 1978).

Τα αρσενικά κατασκευάζουν κυκλικές φωλιές για αναπαραγωγή σε λασπώδης ή αμμώδης πυθμένες (Bruton & Boltt, 1975). Έπειτα, απελευθερώνουν φερομόνες για να προσελκύσουν τις θηλυκές τιλάπιες να ωοτοκήσουν. Ακολούθως, τα θηλυκά τοποθετούν τα αυγά στο στόμα τους μαζί με σπέρμα και τα κουβαλούν για 20-22 μέρες μέχρι εκκόλαση (Fryer et al., 1972). Η τιλάπια Μοζαμβίκης ωοτοκεί 100 – 4000 αυγά τη γέννα, η οποία πραγματοποιείται 5 -10 φορές το χρόνο (Webb & Maughan, 2007).

Οι τιλάπιες είναι ουσιαστικά παμφάγα είδη, τρέφονται με φυτοπλαγκτόν, περίφυτα, ζωοπλαγκτόν, υδρόβια φυτά, ασπόνδυλα, τρίμματα, βενθικούς οργανισμούς, βακτήρια, αυγά, έντομα, άλγη κ.α. (Porma & Masser, 1999; Stickney, 2017).

1.3. Εισαγωγικά για το πεπτικό σύστημα

Το πεπτικό σύστημα των ιχθύων είναι σωληνοειδές και παρουσιάζει εγκολπώσεις. Αρχίζει από το στόμα και τη στοματική κοιλότητα, συνεχίζει με τον φάρυγγα και τον οισοφάγο, τον στομάχο, το έντερο με τα πυλωρικά τυφλά και το ορθό και καταλήγει στην έδρα (Βερίλλης & Μεντέ, 2017). Τα ψάρια παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία στη δομή του πεπτικού συστήματος. Υπάρχουν ορισμένα που φέρουν κοντό ή μακρύ οισοφάγο, με ή χωρίς στομάχο, μακρύ ή κοντό έντερο, παρουσία ή απουσία πυλωρικών τυφλών (Αντωνοπούλου, 2015). Τα χορτοφάγα ψάρια έχουν μικρό

στόμαχο και μεγάλου μήκους έντερο, ενώ τα σαρκοφάγα στόμαχο μεγάλο και μήκος εντέρου μικρό. Τα παμφάγα βρίσκονται μεταξύ των δύο κατηγοριών (Νεοφύτου & Νεοφύτου, 2017).

Το γαστρεντερικό σύστημα χωρίζεται σε 4 μορφολογικά τμήματα (Harder, 1975; Μεντέ & Νέγκας, 2011).

1. Το πρόσθιο τμήμα (headgut - foregut)
2. Το κεντρικό τμήμα του μεσεντερίου (midgut).
3. Το ακραίο τμήμα του μεσεντερίου (midgut).
4. Το τελικό τμήμα (οπισθέντερο – hindgut) ή ορθό έντερο

1.3.1. Μορφολογία εντέρου

Το έντερο είναι συνήθως ένας μακρύς περιτυλιγμένος σωλήνας, όπου λαμβάνει χώρα η πέψη και η απορρόφηση θρεπτικών ουσιών (Μεντέ & Νέγκας, 2011) και μοιάζει με το λεπτό έντερο των θηλαστικών. Το σχήμα του εντέρου, εκτός από τις διατροφικές συνήθειες εξαρτάται και από το σχήμα-μέγεθος του ψαριού, αλλά και το ενδιαίτημα διαβίωσης. Το μήκος των εντέρων αυξάνεται αναλογικά με το μήκος των ιχθύων. Τα θρυμματοφάγα εμφανίζουν το μεγαλύτερο έντερο σε μήκος, αμέσως μετά βρίσκονται τα φυτοφάγα, τα παμφάγα και τελευταία τα σαρκοφάγα στη γενική κατάταξη (Αντωνοπούλου, 2015). Το έντερο μπορεί να έχει τη μορφή ενός ευθύ σωλήνα ή ένα σύνολο από πολύπλοκους βρόγχους και περιελίξεις. Η μεγαλύτερη εντερική επιφάνεια συνδέεται με μεγαλύτερη πεπτική αποδοτικότητα, δηλαδή υψηλότερη απορρόφηση θρεπτικών (Wilson & Castro, 2010).

Στους ιχθύες γίνεται δύσκολα η διάκριση των τμημάτων εντέρου, όπως λεπτού - παχύ έντερο, και χρησιμοποιείται η κυτταρολογία για την διερεύνηση (Μεντέ & Νέγκας, 2011).

Στο τελικό άκρο του εντέρου υπάρχει ο εδρικός σφιγκτήρας, καίτοι συχνά δεν υπάρχει εμφανές ορθό. Στο κεντρικό έντερο αποθηκεύονται προσωρινά οι τροφές μετά την κατάποση (Μεντέ & Νέγκας, 2011). Στα είδη που έχουν στόμαχο, το κεντρικό τμήμα του εντέρου φέρει συχνά ένα τυφλό τελείωμα, το τυφλό έντερο (caeca), ή και έναν υψηλό αριθμό πυλωρικών τυφλών (Αντωνοπούλου, 2015). Η λειτουργία του τυφλού θεωρείται ότι αυξάνει την επιφάνεια του εντέρου και κατά συνέπεια την απορροφητική ικανότητα της πεπτικής οδού (Μεντέ & Νέγκας, 2011). Στο λεπτό έντερο γίνεται η ολοκλήρωση της πέψης των τροφών και η απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών (Mescher, 2018). Το ακραίο τμήμα του εντέρου, που αναφέρεται και ως ειλέος, συμβάλει στην ωσμορρύθμιση, μέσω της απορρόφησης των μεταλλικών ιόντων (Αντωνοπούλου, 2015).

Το πρόσθιο τμήμα του εντέρου έχει σωληνοειδής μορφή και το επιθήλιο είναι ενδοδερμικής προέλευσης. Στο πρόσθιο τμήμα πραγματοποιείται η χημική επεξεργασία και απορρόφηση της τροφής, όπως και η απορρόφηση ηλεκτρολυτών από το νερό (Παπουτσόγλου, 2008).

Στο κεντρικό έντερο γίνεται η προσωρινή αποθήκευση των τροφών μετά την κατάποση. Το μεσεντέριο συνεχίζει την χημική πέψη και την απορρόφηση θρεπτικών όπως των πρωτεϊνούχων υλικών (Μεντέ & Νέγκας, 2011). Το επιθήλιο του μεσεντέρου είναι ενδοδερμικό (Wilson & Castro, 2010). Το μεσεντέριο αποτελεί ιστό

από τον οποίο συγκρατείται το λεπτό έντερο και συμβάλει στην προσέγγιση νεύρων και του κυκλοφορικού συστήματος στον πεπτικό σωλήνα (Παπουτσόγλου, 2008).

Το οπίσθιο έντερο απομακρύνει τα άχρηστα προϊόντα της πέψης προς την έδρα για την αποβολή, έχει μεγάλη διάμετρο και δεν εμφανίζεται σε όλα τα είδη ιχθύων, όπως τα κυπρινοειδή στα οποία το οπίσθιο ξεχωρίζεται πολύ δύσκολα από το μεσεντέριο και δεν έχουν στόμαχο (Harder, 1975). Χωρίζεται από μεσέντερο με την ειλεοκολική βαλβίδα η οποία ελέγχει τη δίοδο των ουσιών από το πρόσθιο στο οπίσθιο έντερο και το αντίστροφο (Παπουτσόγλου, 2008).

1.3.2. Εντερικές λάχνες

Η εντερική λάχνα είναι ένας σχηματισμός (προεκβολές) του βλεννογόνου και αποτελείται από έναν επιθήλιο και έναν χιτώνα συνδετικού ιστού, ο οποίος περιέχει τριχοειδή αγγεία αίματος και λέμφου (Βερίλλης & Μεντέ, 2017). Στις βάσεις εντοπίζονται πόροι εντερικών αδένων και στο ελεύθερο άκρο μικρολάχνες (Παπουτσόγλου, 2008). Η μορφή των λαχνών μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Το εντερικό επιθήλιο μπορεί να είναι απλό (κυλινδρικό) ή ψευδοπολύστιβο και αποτελείται από εντεροκύτταρα, που εμφανίζουν ψυκτροειδή παρυφή, και βλεννογόνα κύτταρα ή σπάνια και βλεφαριδοφόρα κύτταρα (Βερίλλης & Μεντέ, 2017). Οι λάχνες, σε αρκετά ψάρια όπως οι τιλάπιες, έχουν το μεγαλύτερο μήκος στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου, ενώ τη μεγαλύτερη διάμετρο στο οπίσθιο και το μεσεντέριο έχει το μικρότερο σε πάχος μυϊκό χιτώνα (Okuthe & Bhomela, 2020).

Γενικά, τα εντεροκύτταρα (ή απορροφητικά) είναι ψηλά, στενά με επιμηκυμένο πυρήνα και στο πάνω μέρος τους υπάρχει ψυκτροειδής παρυφή (μικρολάχνες). Οι

μικρολάχνες συμβάλλουν στην αύξηση της επιφάνειας του εντέρου και επιτελούν σπουδαίο απορροφητικό και πεπτικό ρόλο (Βερίλλης & Μεντέ, 2017).

Τα βλεννογόνα κύτταρα (βλεννοπαραγωγά ή goblet cells) παρατηρούνται διάσπαρτα ανάμεσα στα εντεροκύτταρα των λαχνών, ενώ αυξάνονται προς την έδρα σε αριθμό. Το σχήμα τους είναι καλυκοειδές και ο πυρήνας περιορίζεται στη βάση. Το πάνω μέρος του κυττάρου περιέχει σφαιρίδια βλέννας με όξινες γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες αποβάλλονται στον αυλό (Βερίλλης & Μεντέ, 2017).

Οι μικρολάχνες αυξάνουν την περιοχή επιφάνειας περίπου 20 φορές αυξάνοντας κατά πολύ την απορροφητικότητα όταν έρθουν σε επαφή με θρεπτικά (Mescher, 2018). Οι μικρολάχνες περιέχουν μια σειρά ινών πολυσακχαριτών που επιμηκύνονται και διαμορφώνουν τους γλυκοκάλυκες, ένα δίκτυο φιλτραρίσματος (Μεντέ & Νέγκας, 2011). Σε περιόδους αστίας παρατηρείται μείωση του αριθμού ή πλήρης απουσία μικρολαχνών. Η γενικότερη υφή και κατάσταση του λεπτού εντέρου και των μικρολαχνών αντανακλούν την διατροφική δραστηριότητα και τις συνθήκες διαβίωσης (Μεντέ & Νέγκας, 2011).

Επίσης οι εντερικές λάχνες δεν διαφοροποιούνται ιδιαίτερα στα διάφορα τμήματα του εντέρου, ενώ μερικά εντεροκύτταρα διατηρούν την ενδοκυττωτική λειτουργία τους σε αντίθεση με τα θηλαστικά (Αντωνοπούλου, 2015).

1.3.3. Χιτώνες

Ιστολογικά το έντερο αποτελείται από τον υποβλεννογόνο χιτώνα, τον βλεννογόνο χιτώνα, ο οποίος φέρει πτυχές για την αύξηση της απορροφητικής ικανότητας, τον μυϊκό χιτώνα που αποτελείται από λείες και γραμμωτές μυϊκές ίνες και είναι υπεύθυνος για τις περισταλτικές κινήσεις του εντέρου και τον ορογόνο χιτώνα. Σε

όλους τους χιτώνες υπάρχουν αιμοφόρα αγγεία, μυϊκές ίνες, συνδετικοί ιστοί και κυλινδρικά κύτταρα (εντεροκύτταρα) τα οποία απορροφούν θρεπτικές ουσίες (Μεντέ & Νέγκας, 2011).

Ο υποβλεννογόνος χιτώνας περιέχει πολυάριθμα ηωσινόφιλα κοκκώδη κύτταρα και λεμφικούς ιστούς. Τα ηωσινόφιλα σχετίζονται με την ενδογενή ανοσία και φλεγμονή, περιέχουν αντιμικροβιακά πεπτίδια και με την αποκοκκίωση τους, προκαλούν αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας και συμβάλλουν στην προσκόλληση ουδετερόφιλων. Σε αρκετούς ιχθύες κάτω από τον υποβλεννογόνο χιτώνα εντοπίζεται το *stratum compactum*, ένα στρώμα που περιέχει ινοβλάστες κάθετα σε κολλαγόνες ίνες (Βερίλλης & Μεντέ, 2017).

Η βλεννογόνος μυϊκή στιβάδα αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα μυϊκών κυττάρων και συμβάλλει στην κίνηση της βλέννας (Βερίλλης & Μεντέ, 2017), εμφανίζεται συχνά σε κυπρινοειδή (Khojasteh, 2012) ενώ δεν υπάρχει σε πολλά είδη όπως η ιριδίζουσα πέστροφα (Khojasteh et al., 2009). Ο μυϊκός χιτώνας αποτελείται από ένα εξωτερικό επίμηκες και ένα εσωτερικό κυκλοτερές στρώμα από λείες μυϊκές ίνες. Η μυϊκή στιβάδα, αποτελούμενη από λεία μυϊκά κύτταρα, είναι κατασκευασμένη για να διασφαλίζει την περισταλτική κίνηση, προωθεί δηλαδή την τροφή και την αναμιγνύει με πεπτικά συνήθως ένζυμα (Βερίλλης & Μεντέ, 2017).

1.4. Πέψη και απορρόφηση θρεπτικών

Οι διαδικασίες πέψης και απορρόφησης τη τροφής ξεκινούν με την πρόσληψη τροφής. «Πέψη» είναι το σύνολο των φυσικών (μηχανικών) και χημικών διεργασιών που επιτελούνται στο πεπτικό σωλήνα, με σκοπό την αποδόμηση της τροφής, την απορρόφηση και την αξιοποίηση των θρεπτικών (Παπουτσόγλου, 2008). Οι φυσικές

διαδικασίες περιλαμβάνουν τον τεμαχισμό, την σύνθλιψη και τη πολτοποίηση της τροφής. Οι χημικές διεργασίες επιτελούνται με διάφορες δραστικές ουσίες, όπως το HCl (μόνο στομάχι), πεπτικά ένζυμα και νευροορμονικούς μηχανισμούς. Τα θρεπτικά αφού απορριφθούν από το έντερο, διοχετεύονται και μοιράζονται στα υπόλοιπα όργανα και ιστούς του σώματος για να επιτελέσουν τις αντίστοιχες μεταβολικές λειτουργίες. Ανάλογα με την δράση τους τα ένζυμα στη φυσιολογία χωρίζονται σε πρωτεάσες (ένζυμα πρωτεόλυσης), εστεράσες (ένζυμα λιπόλυσης) και καρβοϋδράσες (αμυλολυτικά ένζυμα) (Μεντέ & Νέγκας, 2011).

Η χημική πέψη είναι υδρολυτική διεργασία και τα ένζυμα που μετέχουν, ονομάζονται υδρολάσες και καταλύουν την υδρόλυση. Μερικά πεπτικά ένζυμα δεν εμφανίζονται σε όλους τους ιχθύες ή εκκρίνονται από διαφορετικά όργανα. Για παράδειγμα, η πεψίνη συναντάται στο στομάχι το οποίο δεν υπάρχει σε μερικά είδη. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης στα ψάρια κυμαίνεται στους 30-40° C. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες μειώνεται η πεπτική απόδοση συγκριτικά με τις μεταβολικές απαιτήσεις (Μεντέ & Νέγκας, 2011).

Το pH του εντέρου είναι συνήθως 7-9. Οι θρεπτικές ουσίες στο έντερο διαχέουν τη μεμβράνη ψυκτροειδούς παρυφής από το επιθήλιο, βγαίνουν από τα εντεροκύτταρα για να φτάσουν στο αίμα και έπειτα στον υπόλοιπο οργανισμό (Bakke et al., 2010). Πολλές φορές πριν εξέλθουν στο κυκλοφορικό σύστημα τα προϊόντα της πέψης, τα εντεροκύτταρα επεξεργάζονται τη μοριακή δομή τους (ενδοκυτταρική πέψη). Στις εξωτερικές μεμβράνες των μικρολαχνών πραγματοποιείται μεμβρανική πέψη (υδρολυτική διεργασία) με χρήση ενζύμων του μικροκάλκα για την τελική αποδόμηση (Παπουτσόγλου, 2008).

Η τροφή ζωικής προέλευσης είναι πιο εύπεπτη από της φυτικής προέλευσης. Έτσι, το έντερο των φυτοφάγων είναι πολύ μεγαλύτερο σε μήκος από αυτό των σαρκοφάγων γιατί χρειάζεται περισσότερη επεξεργασία της δύσπεπτης τροφής. Αντίθετα, τα σαρκοφάγα έχουν πολύ μικρό μήκος. Τα παμφάγα βρίσκονται ανάμεσα, ενώ οι ιχθύες που τρέφονται με μικρούς ασπόνδυλους (καρκινοειδή, πολύχαιτους), έχουν μεγαλύτερο έντερο από τους ιχθύες που τρέφονται αποκλειστικά με άλλους ιχθύες. Το μέγεθος του στομάχου είναι αντιστρόφως ανάλογο του μεγέθους του εντέρου στα ψάρια (Παπουτσόγλου, 2008).

1.5. Fe και K

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί απαιτούν ανόργανα στοιχεία και ιχνοστοιχεία για τις ζωτικές τους λειτουργίες όπως την ρύθμιση ισορροπίας pH, τη δημιουργία σκελετού και την ομοιόσταση του οργανισμού. Κάποια στοιχεία ενεργοποιούν ένζυμα, ενώ άλλα βιοσυνθέτουν ορμόνες. Έτσι, στοιχεία όπως νάτριο, κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, χλώριο απαιτούνται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις για την φυσιολογική λειτουργία των οργανισμών. Αρκετοί υδρόβιοι οργανισμοί προσλαμβάνουν στοιχεία και από την τροφή και από το νερό. Τα στοιχεία Fe, K, Ca, Mg, Zn, Na, Cu, Se παρέχονται κυρίως από το νερό (Αντωνοπούλου, 2015).

Ελλείψεις των στοιχείων προκαλούν σοβαρά και ποικίλα προβλήματα όπως εμφάνιση πληγών στα πτερύγια και το δέρμα, ανορεξία, καταρράκτη των οφθαλμών (Zn) (Lall, 2003), περιπτώσεις οστεοπόρωσης και δυσμορφίας οστών (Ca) (Lall, 2003; Παπουτσόγλου, 2008), αναιμία (Fe), εκφύλιση μυϊκών ινών, μείωση της κολυμβητικής δραστηριότητας, της ορέξεως, σκελετικές δυσμορφίες, όπως κυρτότητα, και λήθαργο (Mg) (Lall & Kaushik, 2021; Παπουτσόγλου, 2008), διάβρωση πτερυγίων (Cu, Zn), μυϊκή δυστροφία (Se) (Lall & Kaushik, 2021),

αρρυθμία και προβλήματα στο συκώτι (K) (Okuthe & Bhomela, 2020), αδράνεια γονάδων, μαλάκωμα των οστών, μειωμένη αξιοποίηση τροφής και μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης (Na) (Lall, 2003). Για τους ιχθύες, μεγάλη αύξηση ενός στοιχείου όπως το ασβέστιο μειώνει σε υψηλό βαθμό την απορρόφηση άλλων απαραίτητων στοιχείων όπως ο φώσφορος, μειώνοντας έτσι τον ρυθμό ανάπτυξης (Liang et al., 2018). Πρόσληψη υπερβολικών ποσοτήτων ανόργανων στοιχείων είτε από τη διατροφή είτε από το νερό μέσω των βραγχίων προκαλεί τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς (Lall & Kaushik, 2021). Περίσσεια των στοιχείων μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα όπως ιστοπαθολογικές βλάβες στο συκώτι (Fe), σοβαρές βλάβες στα βράγχια, νέκρωση στο συκώτι και στα νεφρά (Cu), μείωση της αιμογλοβίνης και του αιματοκρίτη (Zn) (Lall, 2003). Γενικά ελλείψεις ή περίσσειες προκαλούν μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης ή και θνησιμότητες. Έτσι, πρέπει να υπάρχει μια σωστή αναλογία των στοιχείων ώστε να διατηρείται η ομοιόσταση του οργανισμού (Lall & Kaushik, 2021).

Ο σίδηρος (Fe) αποτελεί μέταλλο απαραίτητο, συμβάλλει αρκετά στον σχηματισμό ερυθρών αιμοσφαιρίων, αφού ενώνεται με πρωτεΐνες για τη δημιουργία αιμογλοβίνης (αιμοσφαιρίνη) και μυοσφαιρίνη. Βοηθάει και στη μεταφορά οξυγόνου μέσω των ερυθροκυττάρων. Χρησιμοποιείται και σε ενζυμικές αντιδράσεις στο μεταβολισμό ενέργειας (Webster & Lim, 2002). Έλλειψη Fe προκαλεί μείωση της ανάπτυξης, μείωση των τιμών αιματοκρίτη και αναιμία ενώ υπερβολική παρουσία δημιουργεί αιμορραγίες, μείωση της αξιοποίησης της τροφής και μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, ευπάθεια σε μολυσματικές ασθένειες τοξικότητα και θνησιμότητα (Lall, 2003; Παπουτσόγλου, 2008). Το γαστρεντερικό σύστημα παίζει πρωταρχικό ρόλο στην απορρόφηση του σιδήρου, ενώ η απορρόφηση μέσω των βραγχίων γίνεται κυρίως

όταν οι ιχθύες δεν έχουν αναπτύξει το γαστρεντερικό τους σύστημα πλήρως ή υπάρχει κάποια λειτουργική βλάβη σε αυτό (Lall & Kaushik, 2021). Στις τροφές εμφανίζεται με οργανικές μορφές, κυρίως σε συνδυασμό με πρωτεΐνες όπως η αιμογλοβίνη και η μυοσίνη. Σε ανόργανες μορφές και σε πρωτεϊνικά συμπλέγματα πρέπει να μετατρέπονται σε ιοντικές μορφές μέσω γαστρικών υγρών και άλλων πεπτικών εκκρίσεων για την απορρόφηση τους (Lall, 2003). Στους φυτικούς οργανισμούς είναι απαραίτητο για τη φωτοσύνθεση, τη μείωση αζώτου, σύνθεση χλωροφύλλης, σύνθεση DNA και άλλες κυτταρικές λειτουργίες (Kasozi et al., 2019).

Το κάλιο (K) είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της ωσμωτικής πίεσης στα κύτταρα και συμβάλλει στην συντήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας. Η ανεπάρκεια καλίου προκαλεί μυϊκές αδυναμίες, προκαλώντας διόγκωση εντέρου, αδυναμίες στους καρδιακούς, αναπνευστικούς μύες και απώλειες των αντίστοιχων οργάνων (Lall, 2003). Επιπρόσθετα, ιχθύες με ανεπάρκεια καλίου εμφανίζουν μειωμένη αξιοποίηση τροφής και κατά συνέπεια μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης (Παπουτσόγλου, 2008), αν και δύσκολα εμφανίζονται περιπτώσεις ανεπάρκειας στους ιχθύες γιατί το κάλιο βρίσκεται σε αφθονία στο νερό (Lall, 2003). Ιόντα καλίου χαλαρώνουν τους μύες και χρησιμοποιούνται σε ενζυμικές αντιδράσεις (Webster & Lim, 2002), ενώ συμβάλλει σημαντικά και στη φωτοσύνθεση στους φυτικούς οργανισμούς (Goddek et al., 2019).

1.6. Σκοπός της έρευνας

Η παρούσα μελέτη επιτελέστηκε για την διερεύνηση τυχόν διαφοροποιήσεων στην ιστοφυσιολογία του εντέρου τιλάπιας, καλλιεργούμενης με σύστημα ενυδρείοπονίας, σε συνδυασμό με καλλιέργεια ρόκας εκτελώντας 2 διαφορετικές μεταχειρίσεις: (1) χωρίς περαιτέρω προσθήκες θρεπτικών για τα φυτά, (2) με προσθήκες καλίου και σιδήρου για την ανάπτυξη των φυτών. Σκοπός ήταν η παρατήρηση της επίδρασης Fe

και Κ στους μυϊκούς χιτώνες και τις λάχνες του μεσεντέρου και πιθανές ιστομορφολογικές αλλοιώσεις.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Δείγματα από έντερο τιλάπιας (*Oreochromis spp.*)

Τα δείγματα του πειράματος προήρθαν από καλλιέργεια ενυδρειοπονίας μεταξύ ατόμων κόκκινης τιλάπιας (*Oreochromis spp.*) και ρόκας (*Eruca vesicaria*). Από την καλλιέργεια των ιχθύων λήφθηκαν δύο ομάδες δειγμάτων για ιστολογική μελέτη του μεσαίου τμήματος του εντέρου (midgut) που αφορούσαν δύο διαφορετικές μεταχειρίσεις: χωρίς προσθήκη θρεπτικών στο νερό του συστήματος της ενυδρειοπονίας και το σιτηρέσιο των ψαριών (control), με προσθήκη σιδήρου και καλίου στο νερό του συστήματος εκτροφής και στο σιτηρέσιο των ψαριών (Fe + K).

Μετά την απομόνωση και την αφαίρεση του ιστού ακολούθησαν τα παρακάτω βήματα για την προετοιμασία των δειγμάτων:

1. Μονιμοποίηση,
2. Αφυδάτωση και καθαρισμός,
3. Έγκλειση σε παραφίνη,
4. Κόψιμο σε λεπτές τομές,
5. Αποπαραφινοποίηση και ενυδάτωση των τομών,
6. Βάψιμο – χρώση των τομών,
7. Αφυδάτωση και καθαρισμός των τομών,
8. Καθήλωση και έγκλειση της τομής πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα.



Εικόνα 1. Μονιμοποίηση αφυδάτωση, καθαρισμός και έγκλειση σε παραφίνη (Πηγή: Mescher (2018)).

Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο (Axiostar plus Carl Zeiss Light Microscopy, Carl Zeiss Ltd., Gottingen, Germany), φωτογραφήθηκαν με κάμερα προσαρμοσμένη στο μικροσκόπιο και έπειτα ακολούθησε στατιστική επεξεργασία και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

2.2. Πρωτόκολλο ιστοκινέτας

Μονιμοποίηση είναι μια χημική διαδικασία που έχει ως κύριο σκοπό την προστασία των ιστών από αυτόλυση και βακτηριακή μόλυνση καθώς και τη σταθεροποίησή τους ώστε να διατηρείται η ιστολογική και κυτταρική δομή στα επόμενα στάδια (Βερίλλης, 2018). Για τους λόγους αυτούς η διαδικασία λαμβάνει μέρος αμέσως μετά τη θανάτωση του οργανισμού, συνήθως ήδη 30 λεπτά μετά από το θάνατο οι ιστοί είναι ήδη ακατάλληλοι (Βερίλλης, 2015), ώστε να αποφευχθούν οι διάφορες αλλοιώσεις.

Τα μονιμοποιητικά είναι διάφοροι οργανικοί διαλύτες και δραστικές οργανικές ή ανόργανες ουσίες. Μερικά από τα πιο κοινά μονιμοποιητικά είναι η αιθανόλη, η φορμαλδεΰδη, το οξικό οξύ, το πικρικό οξύ κ.ά.. Γενικά, τα μονιμοποιητικά υγρά που χρησιμοποιούνται στους ιχθύες είναι το ουδέτερο υδατικό διάλυμα φορμόλης 10%, το διάλυμα Bouin, το διάλυμα Davidson ή και κάποιος συνδυασμός τους. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα Davidson για 24 ώρες σε 4° C. Σε θερμοκρασία 4° C

έχει παρατηρηθεί μείωση της αυτόλυσης των ιστών (George et al., 2016). Το υγρό Davidson είναι ένα πολύ γρήγορο μονιμοποιητικό και για μικρά σε μέγεθος δείγματα συνιστάται ο περιορισμός 24 ωρών πριν την επόμενη επεξεργασία των δειγμάτων. Ο ιστός που θα μονιμοποιηθεί θα πρέπει να έχει μικρό μέγεθος, συνήθως περίπου 5mm και να τοποθετηθεί σε διάλυμα τουλάχιστον 15 φορές μεγαλύτερο τον όγκο του (Latendresse et al., 2002).

Πίνακας 2. Μονιμοποιητικό διάλυμα Davidson για χρήση σε ιστοπαθολογία (Πηγή: Βερίλλης (2015)).

Διάλυμα Davidson για ιστοπαθολογία	
Φορμόλη 37 %	50 ml
Αλκοόλη 70%	75 ml
Οξικό οξύ (Glacial)	25 ml
Νερό	75 ml

Το νερό παρεμποδίζει την περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος και για τον λόγο αυτό πρέπει να αφαιρείται. Η αφυδάτωση πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο, ώστε να αποφεύγεται η παραμόρφωση και η σκλήρυνση του παρασκευάσματος λόγω παρατεταμένης παραμονής στο αφυδατωτικό μέσο (Troiano et al., 2009). Για την αφυδάτωση, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικές πλαστικές κασετίνες. Σε κάθε κασετίνα αναγράφονταν ο κωδικός του κάθε δείγματος την προέλευση του (έντερο) και την ομάδα της δειγματοληψίας (Control, Fe+K). Στη συνέχεια, η αφυδάτωση επιτεύχθηκε με διαδοχικά εμβαπτίσματα των κασετινών από υδατικά διαλύματα

αιθανόλης σε βαθμιαίες σειρές με αύξουσα συγκέντρωση και πυκνότητα (70%, 80%, 90%, 95% και 100%). Η επόμενη επεξεργασία ονομάζεται διαύγαση και αναφέρεται στην αντικατάσταση της αιθανόλης με άλλες ισχυρές οργανικές διαλυτές ουσίες με σκοπό τη διάλυση του λίπους και τη διαφανοποίηση του δείγματος (Βερίλλης, 2018). Έτσι, χρησιμοποιήθηκε ξυλόλη για την απομάκρυνση όλων των υπολειμμάτων της αλκοόλης.

Οι ιστοί είναι μαλακοί και εύθραυστοι ακόμα και μετά από την στερέωση. και χρειάζεται να εμποτιστούν με κάποιο υλικό που θα τους σκληρώνει, ώστε να μπορούν στη συνέχεια να κοπούν σε λεπτές τομές και να χρωματιστούν. Η εμποτίση καθιστά τους ιστούς δύσκαμπτους, άρα πιο ανθεκτικούς στο κόψιμο (Μούσης, 2002).



Εικόνα 2. Ιστοκινέτα τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος (Πηγή: Χατζηιωάννου and Βαφείδης (2015)).

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε δοχεία με τηγμένη παραφίνη, ένα μείγμα αλειφατικών υδρογονανθράκων και σημείο τήξης 60-61° C περίπου. Η θερμότητα έχει ως αποτέλεσμα να εξατμίζεται το διαλυτικό και οι χώροι που αδειάζουν να γεμίζουν με παραφίνη (Χατζηιωάννου & Βαφείδης, 2015). Η παραφίνη στην υγρή μορφή

διδυεύει στους ιστούς, στα κύτταρα και στα ενδιάμεσα διαστήματα και με ψύξη στερεώνεται.

Πίνακας 3. Παράδειγμα διάρκειας αφυδάτωσης και εμποτισμού παραφίνωσης στην ιστοκινέτα. Ο χρόνος επεξεργασίας μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με το πάχος και το μέγεθος των δειγμάτων (Πηγή: Joly (2011)).

Ενδεικτικό πρόγραμμα ιστοκινέτας	
Αιθανόλη 70%	30 λεπτά
Αιθανόλη 95%	30 λεπτά
Αιθανόλη 95%	30 λεπτά
Αιθανόλη 100%	15 λεπτά
Αιθανόλη 100%	30 λεπτά
Αιθανόλη 100%	60 λεπτά
Ξυλόλη	30 λεπτά
Ξυλόλη	60 λεπτά
Ξυλόλη	60 λεπτά
Παραφίνη	45 λεπτά
Παραφίνη	45 λεπτά
Παραφίνη	45 λεπτά
Παραφίνη	Μέχρι την πήξη

2.3. Τομή ιστού σε μικροτόμο

Τα δείγματα πλαισιώθηκαν και καλύφθηκαν από τηγμένη παραφίνη η οποία αφέθηκε μέχρι την πήξη, σχηματίζοντας κύβους παραφίνης με το ιστολογικό δείγμα στο εσωτερικό τους.



Εικόνα 3. Εγκλεισμός ιστού σε παραφίνη και τοποθέτηση σε κασετίνα (Πηγή: Μούσης (2002)).

Οι κύβοι παραφίνης με τον εγκλεισμένο ιστό, τοποθετήθηκαν και στερεώθηκαν στον ειδικό υποδοχέα της μικροτόμου. Η σκλήνωση πραγματοποιήθηκε στους 60° C και η παραφίνη προσανατολίστηκε πριν την τελική πήξη ώστε οι τομές που ακολούθησαν από μικροτόμο να κοπούν κάθετα και να παρθεί εγκάρσια ιστολογική εικόνα του εντέρου. Οι ιστοί τοποθετήθηκαν κάθετα στην υποδοχή του μικροτόμου και με την κίνηση του βραχίονα και του μαχαιριού του μηχανήματος, δημιουργήθηκαν διαδοχικές τομές μεγέθους 5-10 μm στα παρασκευάσματα κατά ίσα διαστήματα και μήκος. Οι τομές τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 40°C και έπειτα απλώθηκαν σε γυάλινα πλακίδια για να στεγνώσουν σε θερμαινόμενη πλάκα στους 40° C. Οι παρασκευασμένες τομές σε αυτό το σημείο είναι διαφανές και απαιτείται χρώση για τελική παρατήρηση.



Εικόνα 4. Δημιουργία τομών σε μικροτόμο (Πηγή: Μούσης (2002)).

2.4. Πρωτόκολλο χρώσης

Προκειμένου να γίνει εφικτή η διάκριση των ιστολογικών – κυτταρικών δομών των παρασκευασμάτων, χρησιμοποιούνται υδατοδιαλυτές χρωστικές ουσίες, αφού έχει αφαιρεθεί η παραφίνη από τις τομές και έχουν υποστεί ενυδάτωση. Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε η χρήση συνδυασμού της συνηθισμένης μεθόδου χρώσης με αιματοξυλίνη και εωσίνη (H&E). Οι χρωστικές βάφουν τα συστατικά των ιστών περισσότερο ή λιγότερο εκλεκτικά, με πολλές από αυτές να συμπεριφέρονται ως όξινες ή βασικές χημικές ενώσεις που σχηματίζουν ηλεκτροστατικούς δεσμούς (άλατα) με ιονισμένες ρίζες των μορίων των ιστών. Κυτταρικά συστατικά όπως τα νουκλεϊκά οξέα με ένα καθαρά αρνητικό φορτίο (ανιονικά) χρωματίζονται περισσότερο με βασικές χρωστικές και αποκαλούνται βασεόφιλα. Κατιονικά

συστατικά, όπως οι πρωτεΐνες με πολλές ιονισμένες αμινομάδες, έχουν συνάφεια με όξινες χρωστικές και ονομάζονται οξεόφιλα (Mescher, 2018).

Η αιματοξυλίνη ως βάση παράγει ένα σκοτεινό μπλε ή ιώδες (μωβ) χρώμα, βάφοντας το όξινο DNA στον πυρήνα και άλλες βασεόφιλες δομές, όπως τα πλούσια σε RNA μέρη του κυτταροπλάσματος, τη μεσοκυττάρια ουσία και τα ριβοσώματα. Αντίθετα, η εωσίνη ως οξύ βάφει ροζ άλλα συστατικά του κυτταροπλάσματος, περιοχές με αλκαλικό pH και το κολλαγόνο (Mescher, 2018; Βερίλλης, 2015). Σε πολλές μεθόδους χρώσης, ορισμένες δομές όπως οι πυρήνες καθίστανται εμφανείς, ενώ άλλα μέρη του κυττάρου παραμένουν ελεύθερα χρώσης. Σε τέτοιες περιπτώσεις χρησιμοποιείται μία αντίχρωση για να δώσει πρόσθετες πληροφορίες. Η αντίχρωση είναι συνήθως μία απλή χρώση που εφαρμόζεται χωριστά για να επιτρέψει την καλύτερη αναγνώριση των πυρήνων και άλλων δομών. Στη χρώση H&E, η εωσίνη είναι η αντίχρωση στην αιματοξυλίνη (Mescher, 2018).

Με το πέρας της διαδικασίας της χρώσης, οι τομές επικαλύφθηκαν με επικαλυπτικό υλικό από ρητίνη και ακολούθησε η τοποθέτηση καλυπτρίδας με σκοπό την προστασία και την διατήρηση των δειγμάτων για μελλοντική χρήση ακόμα και με την πάροδο του χρόνου, αλλά και την βελτίωση της τελικής εικόνας των δειγμάτων.

Πίνακας 2. Πρωτόκολλο χρώσης Αιματοξυλίνης & Εωσίνης (Πηγή: Χατζηιωάννου and Βαφείδης (2015)).

Διάλυμα	Διάρκεια σταδίου	Στάδιο
Διάλυμα Αιματοξυλίνης	5 έως 15 λεπτά	Χρώση
Διαφοροποίηση	3 έως 15 λεπτά	
Ξέπλυμα σε νερό βρύσης		
Αμμωνιούχο νερό	3 έως 15 καταδύσεις	
Ξέπλυμα σε νερό βρύσης		
Διάλυμα Εωσίνης	15 έως 2 λεπτά	
Αιθανόλη 95 %	2 λεπτά	Αφυδάτωση
Αιθανόλη 95 %	2 λεπτά	
Αιθανόλη 100 %	2 λεπτά	
Αιθανόλη 100 %	2 λεπτά	
Ξυλόλη	2 λεπτά	Διαύγαση
Ξυλόλη	2 λεπτά	

2.5. Παρατήρηση δειγμάτων σε οπτικό μικροσκόπιο

Με την ολοκλήρωση των διαδικασιών χρώσης, οι μυϊκές δομές και οι εντερικές λάχνες ήταν ευδιάκριτες και έτοιμες για παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο (Axiostar plus Carl Zeiss Light Microscopy, Carl Zeiss Ltd., Gottingen, Germany) σε μεγεθύνσεις x100 και x400. Ταυτόχρονα με την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, τα δείγματα φωτογραφήθηκαν σε μορφή εικόνων JPG μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή από ειδική συνδεδεμένη κάμερα (ProgRes C10 plus, JENOPTIK AG, Jenoptik Laser,

Optik, Systeme GmbH, Germany) και μέσω του αντίστοιχου προγράμματος καταγραφής.



Εικόνα 5. Οπτικό μικροσκόπιο για παρατήρηση δειγμάτων και καταγραφή εικόνων (Προσωπικό αρχείο).

2.6. Πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων

Η επεξεργασία των ιστολογικών αρχείων εκτελέστηκε με το πρόγραμμα ImageJ (Image Processing and Analysis in Java). Το ImageJ είναι ένα δωρεάν προς χρήση πρόγραμμα ανάλυσης και επεξεργασίας εικόνων και αναπτύχθηκε από τα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας (NIH) και τον Wayne Rasband το 1997. Μετρήθηκαν με το λογισμικό αυτό ενδεικτικά μήκη (πλάτη) των μυϊκών χιτώνων και ύψη των εντερικών λάχνων για κάθε ομάδα και τα αποτελέσματα αποθηκεύτηκαν σε αρχεία excel (Excel 2016 της Microsoft ,Office 365).

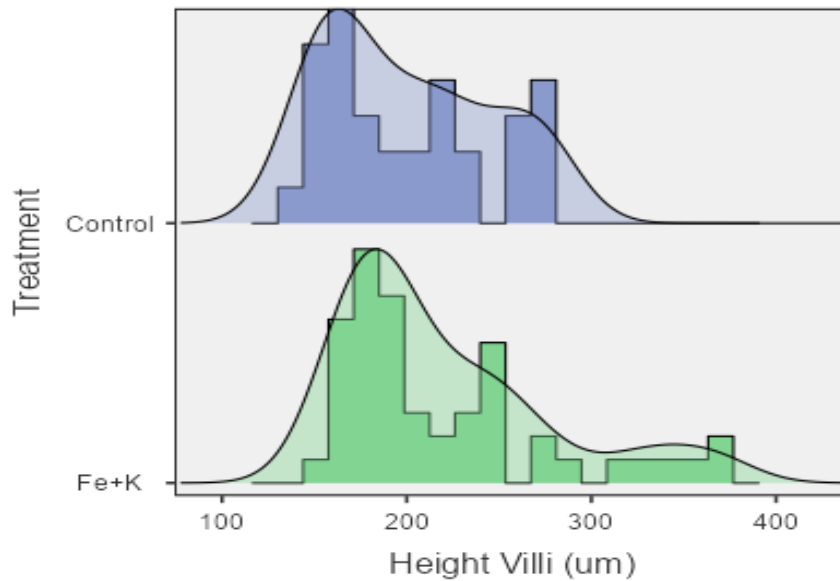
2.7. Ανάλυση δεδομένων

Με τη χρήση στατιστικών μεθόδων γίνεται η προσπάθεια επαλήθευσης ή απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης (H_0) ή αντίστοιχα την εναλλακτική υπόθεση (H_1). Έγινε έλεγχος κανονικότητας των δειγμάτων, στατιστική επεξεργασία των δεδομένων και στατιστική σύγκριση για τις δυο ομάδες. Για τον έλεγχο κανονικότητας χρησιμοποιήθηκε το τεστ Kolmogorov-Smirnov για τους μυϊκούς χιτώνες και το Shapiro-Wilk για τις λάχνες, ενώ για τα τεστ ομοιογένειας το Bartlett's test για τους χιτώνες και το Levene's test για τις λάχνες. Για να καθοριστούν οι διαφορές στις 2 μεταχειρίσεις των ομάδων χρησιμοποιήθηκαν το student's t test και Mann-Whitney's U test αντίστοιχα.

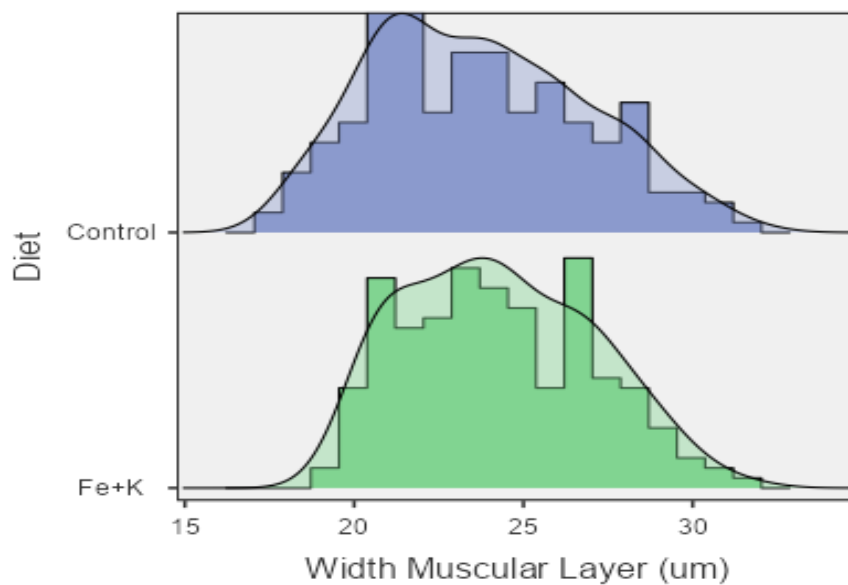
Το διάστημα εμπιστοσύνης (Confidence Interval) τέθηκε στο 95%, δηλαδή επίπεδο σημαντικότητας p (significance level) 0.05, αποδεχόμενοι μέχρι 5% σφάλμα. Για τη στατιστική ανάλυση και σύγκριση των δεδομένων των 2 ομάδων δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα Jamovi (έκδοση 2.2.3, Αυστραλία) από την εταιρεία Jamovi.org. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με μορφή μέσου (mean) \pm τυπικό σφάλμα (standard error mean) και διαμέσου (median) \pm ενδοτεταρτημοριακό εύρος (interquartile range) για τους μυϊκούς χιτώνες και τις εντερικές λάχνες αντίστοιχα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι ιστολογικές τομές εντέρου αμφοτέρως παρατηρήθηκαν σχολαστικά για τους διαφορετικούς χειρισμούς. Στο σχήμα 1 και σχήμα 2 φαίνονται οι πληθυσμοί των δειγμάτων σε μορφή διαγράμματος.



Σχήμα 1. Διαγραμματική απεικόνιση για τα ύψη λαχνών (μm) μεταξύ των μεταχειρίσεων Control και Fe+K.

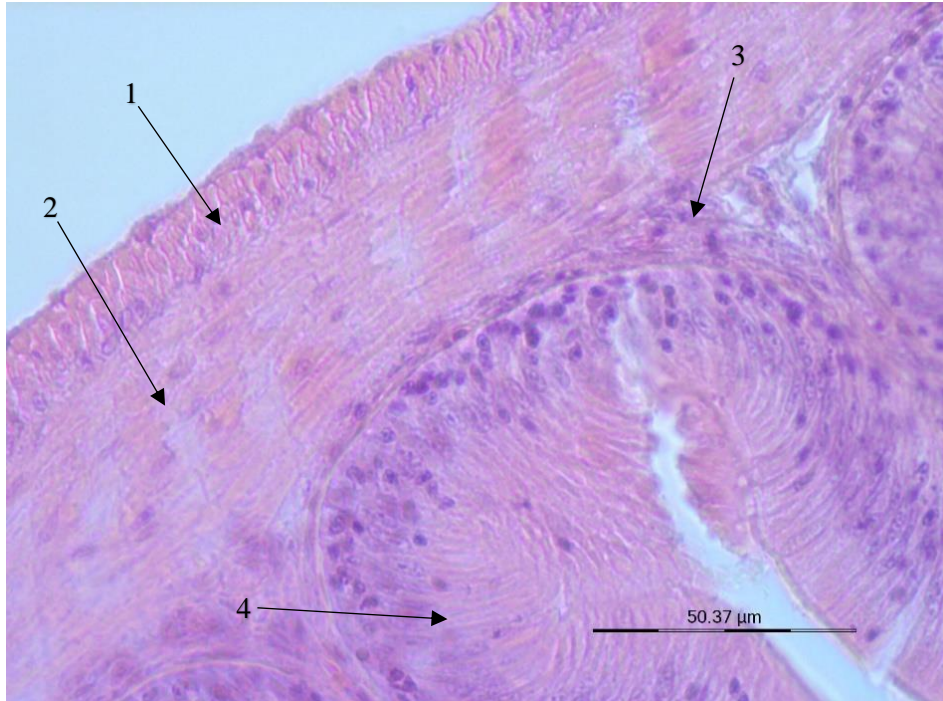


Σχήμα 2. Διαγραμματική απεικόνιση για τα πλάτη μυϊκών χιτώνων (μm) μεταξύ των μεταχειρίσεων Control και Fe+K.

Στα ιστολογικά δείγματα εκ πρώτης όψης δεν παρατηρήθηκε κάποια βασική σημαντική ιστομορφολογική αλλοίωση. Ορισμένες μόνο τομές φάνηκαν να έχουν δυσμορφίες είτε στις λάχνες ή στους χιτώνες λόγω πιθανώς κάποιου σφάλματος σε κάποιο στάδιο της ιστολογικής προετοιμασίας των δειγμάτων. Εικόνες της δειγματοληψίας παρατίθενται στη συνέχεια.



Εικόνα 6. Δείγμα OE1F1FKG, μυϊκού ιστού μεσεντέρου, Fe+K μεταχείρισης, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη, μεγέθυνση x100. Φαίνονται εντερική λάχνα (1) και μυϊκός χιτώνας του μεσεντέρου (2).



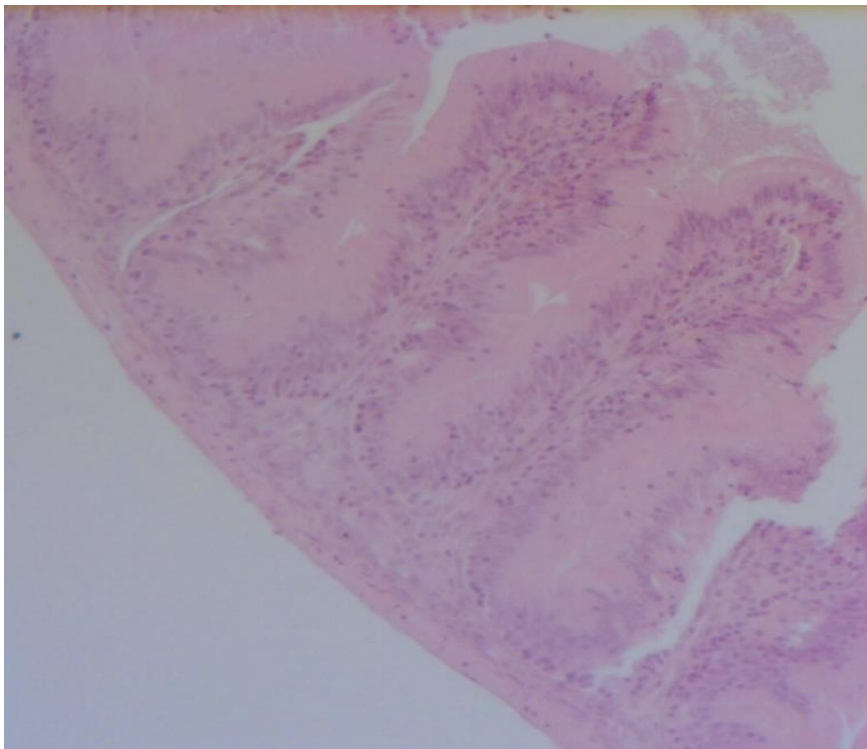
Εικόνα 7. Δείγμα OE1F1FKG, μυϊκού ιστού μεσεντέρου, Fe + K μεταχείρισης, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη, μεγέθυνση x400. Ενδείξεις : 1: έξω επιμήκης μυϊκός χιτώνας, 2: έσω κυκλοτερής μυϊκός χιτώνας, 3: υποβλεννογόνος χιτώνας, 4: βλεννογόνος χιτώνας.



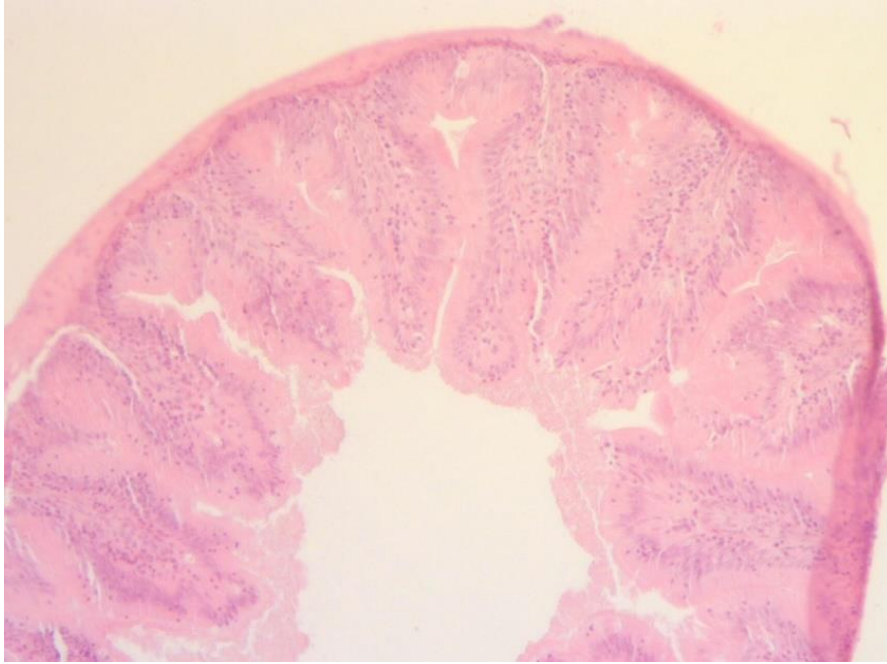
Εικόνα 8. Δείγμα OE1F2CG, μυϊκού ιστού μεσεντέρου, Control μεταχείρισης, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη, μεγέθυνση x100.



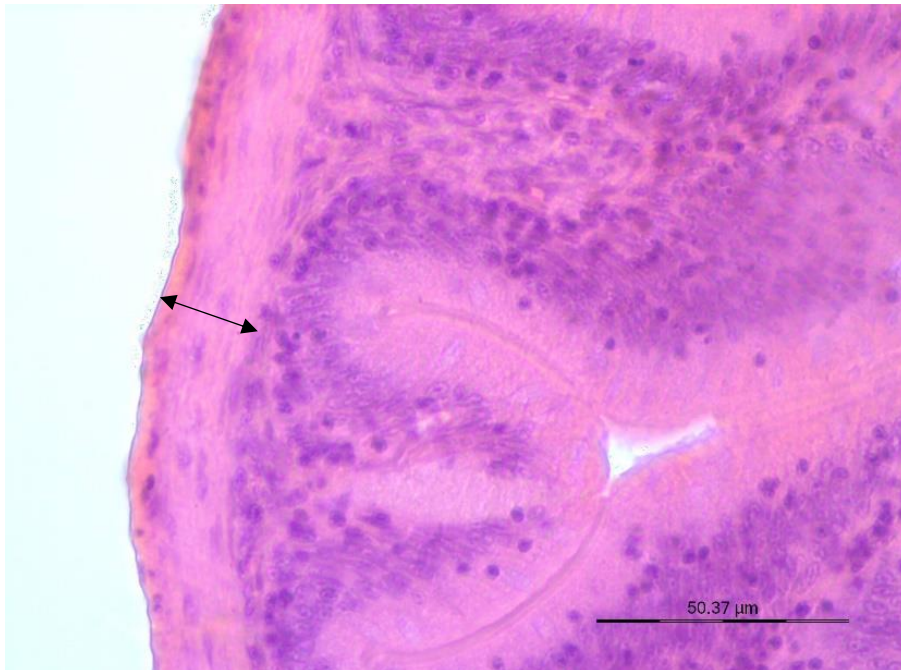
Εικόνα 9. Δείγμα OE1F5CG, μυϊκού ιστού μεσεντέρου, Control μεταχείρισης, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη, μεγέθυνση x100. Με μαύρο βέλος απεικονίζεται το ύψος της εντερικής λάχνης.



Εικόνα 10. Δείγμα OE1F4FKG, μυϊκού ιστού μεσεντέρου, Fe+K μεταχείρισης, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη, μεγέθυνση x100.



Εικόνα 11. Δείγμα OE1F3FKG, μυϊκού ιστού μεσεντέρου, Fe+K μεταχείρισης, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη, μεγέθυνση x100.



Εικόνα 12. Δείγμα OE1F5CG, μυϊκού ιστού μεσεντέρου, Control μεταχείρισης, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη, μεγέθυνση x400. Με μαύρο βέλος απεικονίζεται το πάχος του μυϊκού χιτώνα.

Τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν ως διάμεσος (median) \pm ενδοτεταρτημοριακό εύρος (interquartile range - IQR) για τις εντερικές λάχνες. Τα μέσα ύψη των λαχνών για τη μεταχείριση Control παρουσιάστηκαν ως $191,33 \pm 75,504 \mu\text{m}$, ενώ για Fe+K $198,17 \pm 69,624 \mu\text{m}$. Για τους χιτώνες προβλήθηκαν ως μέσο (mean) \pm τυπικό σφάλμα μέσου (standard error of mean), δηλαδή $23,69 \pm 0,229 \mu\text{m}$ για Control και $24,23 \pm 0,200 \mu\text{m}$ για Fe+K (Πίν. 5). Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι μεγέθη των λαχνών και των χιτώνων ήταν ίδια στην μεταχείριση Control με αυτή του Fe + K. Οι τιλάπιες και στις δύο περιπτώσεις είχαν τον ίδιο ρυθμό αύξησης.

Πίνακας 5. Επιδράσεις των δύο διαφορετικών μεταχειρίσεων στα ύψη των εντερικών λαχνών (διάμεσος \pm ενδοτεταρτημοριακό εύρος) και στα πλάτη των μυϊκών χιτώνων (μέσος \pm τυπικό σφάλμα μέσου) του μεσεντέρου σε επίπεδο σημαντικότητας $p = 0.05$.

Μεταχείριση	Ύψος εντερικών λαχνών (μm)	Πλάτος μυϊκών χιτώνων (μm)
Control	$191,328 \pm 75,5043$	$23,695 \pm 0,2290$
Fe+K	$198,169 \pm 69,6240$	$24,287 \pm 0,2001$

Για διατύπωση έγκυρων αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν στατιστικά τεστ. Ελέγχθηκε η κανονικότητα κατανομής στα δείγματα αρχικά, με χρήση τεστ κανονικότητας. Για τις εντερικές λάχνες χρησιμοποιήθηκε το Shapiro-Wilk, ενώ για τους μυϊκούς χιτώνες το Kolmogorov-Smirnov. Η αρχική υπόθεση για τα τεστ δηλώνει πως υπάρχει κανονική κατανομή και για να απορριφθεί θα πρέπει ο αριθμός που υπολογίστηκε στατιστικά να είναι μικρότερος από επίπεδο σημαντικότητας p που ορίστηκε. Η αρχική υπόθεση απορρίφθηκε για τις εντερικές λάχνες γιατί στο τεστ Shapiro-Wilk το p βγήκε μικρότερο από $0,05$ (Πίν. 6), άρα στα δείγματα δεν είχαμε

κανονική κατανομή, ενώ για τους μυϊκούς χιτώνες επιβεβαιώθηκε η αρχική υπόθεση, δηλαδή είχαμε κανονική κατανομή, αφού το p ήταν μεγαλύτερο από 0,05 (Πίν. 7).

Πίνακας 6. Τεστ κανονικότητας για το ύψος στις εντερικές λάχνες μεταξύ Control και Fe+K. Δεν εμφανίζουν κανονική κατανομή ($p < 0,05$).

Τεστ Κανονικότητας εντερικών λαχνών		
	Statistic	p
Shapiro-Wilk	0,8939	< ,001

Πίνακας 7. Τεστ κανονικότητας για το μήκος μυϊκών χιτώνων εντέρου μεταξύ Control και Fe+K. Εμφανίζουν κανονική κατανομή ($p > 0,05$).

Τεστ Κανονικότητας μυϊκών χιτώνων		
	Statistic	p
Kolmogorov-Smirnov	0,0606	0,119

Ακολούθως, εξετάστηκε η ομοιογένεια στη διακύμανση με το Levene's test για τις εντερικές λάχνες και με το Bartlett's test για τους μυϊκούς χιτώνες. Η εναλλακτική υπόθεση απορρίφθηκε γιατί το p ήταν μεγαλύτερο του 0,05, δηλαδή οι πληθυσμοί εμφάνιζαν ομοιογένεια στη διακύμανση και στις δύο περιπτώσεις (Πίν. 8, Πίν. 9).

Πίνακας 8. Τεστ Levene για εξέταση ομοιογένεια στη διακύμανση για το ύψος των εντερικών λαχνών μεταξύ Control και Fe+K. Υπάρχει ομοιογένεια στη διακύμανση ($p > 0,05$).

Ομοιογένεια στη διακύμανση εντερικών λαχνών					
		F	df	df2	p
Ύψος					
εντερικών	Levene's	1,0092	1	79	0,318
λαχνών (μm)					

Πίνακας 9. Τεστ Bartlett για εξέταση ομοιογένειας στη διακύμανση για το μήκος των μυϊκών χιτώνες μεταξύ Control και Fe+K. Υπάρχει ομοιογένεια στη διακύμανση ($p > 0,05$).

Ομοιογένεια στη διακύμανση μυϊκών χιτώνων		F	df	df2	p
Πλάτος μυϊκών χιτώνων (μm)	Variance ratio	1,3098	191	191	0,063

Διενεργήθηκε, τελικά, το Mann-Whitney U test για την μη παραμετρική σύγκριση των πληθυσμών. Αναφορικά με τις εντερικές λάχνες στους διαφορετικούς χειρισμούς, τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την μηδενική υπόθεση, δηλαδή δεν εμφάνιζαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές οι λάχνες μεταξύ τους (Πίν. 10).

Πίνακας 10. Mann-Whitney test για σύγκριση των μηκών των εντερικών λαχνών μεταξύ Control και Fe+K. Δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων ($p > 0,05$).

Independent Samples U-Test		Statistic	p
Ύψος εντερικών λαχνών (μm)	Mann- Whitney U	625,0000	0,126

Με το student's t test στους μυϊκούς χιτώνες απορρίφθηκε η εναλλακτική υπόθεση αφού το $p > 0,05$ (Πίν. 11). Δηλαδή, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα μεγέθη μεταξύ των δύο διαφορετικών τρόπων εκτροφής.

Πίνακας 11. Student's t test για σύγκριση των μηκών των μυϊκών χιτώνων μεταξύ Control και Fe+K. Δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεταχειρίσεων ($p > 0,05$).

Independent Samples T-Test			
		Statistic	p
Πλάτος μυϊκών χιτώνων (μm)	Student's t	-1,9474	0,052

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ένα επιτυχημένο σύστημα ενυδρειοπονίας παρέχει πολλά πλεονεκτήματα. Είναι αρκετά οικονομικό, αποδοτικό και φιλικό προς το περιβάλλον, εκτρέφοντας δύο εμπορεύσιμα προϊόντα ταυτόχρονα, με γρήγορα βέλτιστα αποτελέσματα και υψηλή βιοασφάλεια (Somerville et al., 2014).

Τα δείγματα εντέρου της έρευνας δεν φάνηκαν να έχουν έντονες ιστομορφολογικές και ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις σε καμία από τις δύο μεταχειρίσεις. Οι εντερικές λάχνες δεν παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές μεγέθους ανάμεσα στις διαφορετικές μεθόδους εκτροφής. Οι λάχνες φάνηκαν να απορροφούν τα θρεπτικά με παρόμοια ικανότητα. Δηλαδή, ο σίδηρος και το κάλιο δεν είχαν κάποια επίδραση στις εντερικές λάχνες, η απορρόφηση έγινε αποτελεσματικά χωρίς εμφανείς επιδράσεις στην ανάπτυξη. Το ίδιο συνέβη και με τους μυϊκούς χιτώνες.

Το ύψος των εντερικών λαχνών ένας από τους συνηθέστερους ιστομορφομετρικούς δείκτες σε διατροφικές έρευνες για το έντερο των ιχθύων (Okuthe & Bhomela, 2020; Vatsos, 2021). Η ανάπτυξη των υδρόβιων οργανισμών σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος των λαχνών (Raskovic et al., 2011). Σε ψάρια αύξηση του ύψους των λαχνών προκάλεσε καλύτερες επιδόσεις ανάπτυξης του οργανισμού μέσω των φυσιολογικών ενζύμων, γιατί σε μεγαλύτερες λάχνες γίνεται καλύτερη απορρόφηση άρα και το ζώο αναπτύσσεται πιο γρήγορα (Løkka et al., 2013; Moldal et al., 2014). Το ίδιο συμβαίνει και με τους μυϊκούς χιτώνες του εντέρου που αύξηση του πάχους υποδηλώνει ανάπτυξη του ψαριού λόγω της επιτάχυνσης της διαδικασίας της πέψισης που έχει ως επακόλουθο την αύξηση της απορρόφησης των θρεπτικών (Su et al., 2022). Το ύψος των εντερικών λαχνών και το πάχος των μυϊκών χιτώνων είναι καλοί δείκτες για την υγεία του εντέρου (Khojasteh, 2012).

Έρευνες εκτροφής ιχθύων πραγματεύονται ότι ο σίδηρος δεν φαίνεται να επηρεάζει αρκετά την ανάπτυξη, αλλά κυρίως τις αιματολογικές τιμές των ψαριών. Συγκεκριμένα, σε έρευνα για σολομό Ατλαντικού βρέθηκε ότι ο σίδηρος δεν επηρέασε σε υψηλό βαθμό την ανάπτυξη των σολομών, ενώ τα ψάρια φάνηκαν να προσαρμόζονται στο διαιτολόγιο γρήγορα και να απορροφούν περισσότερο σίδηρο (Andersen et al., 1996). Η προσαρμογή του εντέρου είναι απαραίτητη διαδικασία για την ομοιοστάση και τη σωστή λειτουργία του πεπτικού συστήματος (Shaw et al., 2012). Στην ενυδρείοπονία οι φυτικοί οργανισμοί έχουν τη δυνατότητα απορρόφησης μερικής ποσότητας Fe από το νερό. Συνεπώς, στο πείραμα δεν κατέληξε όλη η ποσότητα του μετάλλου στους εκτρεφόμενους ιχθύες, όπως αναφέρεται και σε άλλο πείραμα ενυδρείοπονίας με τιλάπια, κατά το οποίο, στην πλειονότητα της διάρκειας του, σίδηρος κατέληγε σε σημαντικές ποσότητες στα φυτά ή απορροφούταν από το βιολογικό φίλτρο (Deswati et al., 2019). Η χορήγηση σιδήρου πρέπει να είναι προσεκτική και ισορροπημένη για όλους τους οργανισμούς του συστήματος ενυδρείοπονίας, ώστε να υπάρξει βέλτιστη ανάπτυξη των ιχθύων και των φυτών (Kasozzi et al., 2019). Αν οι ποσότητες είναι ανεπαρκείς για την σωστή ανάπτυξη των φυτών, το αποτέλεσμα είναι οι φυτικοί οργανισμοί να μην φιλτράρουν το νερό από τα τοξικά απόβλητα και ως επακόλουθο το νερό να γυρίζει τοξικό από αμμωνιακά στους ιχθύες και να προκαλεί θνησιμότητες όταν βρίσκεται σε υψηλές περιεκτικότητες (Deswati et al., 2019).

Σε έρευνα πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) με χορήγηση διαφορετικών σιτηρεσίων, εμπορικής τροφής και τροφής με διαφορετικές ποσότητες συμπληρωμάτων σιδήρου, έδειξε ότι τα ψάρια με την εμπορική τροφή και με το σιτηρέσιο με τον λιγότερο συμπληρωματικό σίδηρο αναπτύσσονταν πιο γρήγορα, σε

σχέση με τις άλλες μεταχειρίσεις, και με τον ίδιο ρυθμό, με τους μυϊκούς χιτώνες να έχουν το ίδιο και το μεγαλύτερο πάχος σε αυτές τις μεταχειρίσεις, ενώ τα ύψη των εντερικών λαχνών να είναι ίδια σε αυτές και σχεδόν παρόμοια σε όλες τις περιπτώσεις (Evlıyaođlu et al., 2022). Επιβεβαιώνεται, έτσι, η παρούσα έρευνα κατά την οποία οι μυϊκοί χιτώνες και οι εντερικές λάχνες με προσθήκη μερικής ποσότητας σιδήρου φάνηκαν να έχουν την ίδια αύξηση με την ομάδα τρεφόμενη από εμπορική τροφή. Περίσσεια σιδήρου στα ψάρια δεν απορροφάται πλήρως, επηρεάζοντας αρνητικά την ανάπτυξη, ενώ σε υψηλότερες ποσότητες προκαλεί προβλήματα στους ιστούς και θνησιμότητα (Evlıyaođlu et al., 2022). Το είδος *Oryzias matanensis*, σε λίμνη με υψηλότερες τιμές από το επιτρεπτό όριο σιδήρου και νικελίου, είχε υποστεί σοβαρές βλάβες στις εντερικές λάχνες ή είχαν καταστραφεί τελείως ενώ οι χιτώνες δεν μπορούσαν να διακριθούν μεταξύ τους, με αποτέλεσμα η απορρόφηση των θρεπτικών να γίνεται αρκετά δύσκολα, ο ρυθμός ανάπτυξης να μειώνεται και να αυξάνονται οι θνησιμότητες (Fahmi et al., 2019). Οι λάχνες και οι χιτώνες της τιλάπιας σε αυτήν την έρευνα δεν παρουσίαζαν τέτοιες αλλοιώσεις.

Οι μικρολάχνες του εντέρου εξαρτώνται από τις διατροφικές συνθήκες και αυξάνονται σε μέγεθος για την καλύτερη απορρόφηση ή μειώνονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Μεντέ & Νέγκας, 2011) ή σε περιόδους αστίας (Chappell et al., 2003). Σε έρευνα για το λεπτό έντερο ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) παρατηρήθηκαν λιγότερες σε αριθμό μικρολάχνες ενώ αρκετά εντεροκύτταρα είχαν παραμορφωμένο πυρήνα μετά από προσθήκη οξειδίου του σιδήρου (Fe_3O_4) (Agayeva et al., 2020). Ο βλεννογόνος του εντέρου θεωρείται η σημαντικότερη τοποθεσία απορρόφησης σιδήρου στο έντερο (Μεντέ & Νέγκας, 2011)

Ο σίδηρος αποτελεί απαραίτητο στοιχείο που συμβάλλει στην κυτταρική αναπνοή διαμέσου της οξειδοαναγωγής και της μεταφοράς ηλεκτρονίων. Υπάρχουν λίγες πληροφορίες για τον μεταβολισμό και την απορρόφηση του στους υδρόβιους οργανισμούς (Μεντέ & Νέγκας, 2011). Έλλειψη Fe προκαλεί μείωση του επιπέδου αιματοκρίτη και της ανάπτυξης, ενώ υπερβολική παρουσία δημιουργεί αιμορραγίες, ευπάθεια σε μολυσματικές ασθένειες και είναι τοξικό (Παπουτσόγλου, 2008). Δεν φάνηκε να υπήρχε έλλειψη κατά τη διάρκεια του πειράματος. Οι πρόσθετες ποσότητες Fe και K προορίζονται συνήθως κατά ένα βαθμό για τον φυτικό καλλιεργούμενο οργανισμό στα συστήματα ενυδρείοπονίας που τα χρειάζονται σε μεγάλο βαθμό (Goddek et al., 2019), σε αντίθεση με τους ιχθύες που έχουν μικρότερες απαιτήσεις (John et al., 2022).

Το κάλιο βρίσκεται σε αφθονία στο νερό και στα συνηθισμένα σιτηρέσια που χρησιμοποιούνται όπως τα ιχθυάλευρα. Η πρόσληψη από το νερό γίνεται μέσω των βραγχίων, ενώ η ανεπάρκεια καλίου προκαλεί μειωμένη αξιοποίηση τροφής και κατά συνέπεια μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης (Παπουτσόγλου, 2008). Μειωμένες ποσότητες προκαλούν, ακόμη, νευρομυικά και καρδιαγγειακά προβλήματα, ενώ υπερβολικές ποσότητες δημιουργούν αρρυθμίες και προβλήματα στο συκώτι (Oroku-Okrah et al., 2015).

Μελέτη ενυδρείοπονίας μεταξύ γατόψαρου (*Pangasianodon hypophthalmus*) και σπανακιού (*Spinacia oleracea*), έδειξε ότι το κάλιο δεν επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξης του γατόψαρου, σε αντίθεση με το σπανάκι που είχε αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης (John et al., 2022), επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της έρευνας.

Σε άλλη έρευνα προσθήκη υπερμαγγανικού καλίου δεν επηρέασε τα ύψη των εντερικών λαχνών και σε μεγάλες ποσότητες είχε αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη της τιλάπιας του Νείλου (Mahgoub et al., 2020). Σε χρυσόψαρο προσθήκη καλίου σε αρκετά υψηλές ποσότητες προκαλεί μείωση των μυϊκών χιτώνων (Groot et al., 1979).

Στην εκτροφή ιχθύων ο κύριος στόχος είναι να επιτυγχάνεται η βέλτιστη σχέση μεταξύ της παρεχόμενης τροφής και της απορρόφησης αυτής από τον οργανισμό, αλλά και των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού. Στην ενυδραιοπονία είναι πιο δύσκολη η επιλογή και η συνύπαρξη των ειδών, γιατί το κάθε είδος έχει τις δικές του βέλτιστες απαιτήσεις. Η τιλάπια είναι ιδανική για καλλιέργεια ενυδραιοπονίας αφού εμφανίζει ανθεκτικότητα και προσαρμοστικότητα σε μεγάλο εύρος φυσικοχημικών και διατροφικών παραμέτρων, ενώ παράλληλα αποτελεί σπουδαίο εμπορικό και θρεπτικό προϊόν (Goddek et al., 2019; Somerville et al., 2014).

Τα αποτελέσματα της μελέτης υποδηλώνουν ότι κάλιο και σίδηρος μπορούν να προστεθούν στο σύστημα ενυδραιοπονίας χωρίς να επηρεάζεται αρνητικά ο ρυθμός ανάπτυξης της τιλάπιας (*Oreochromis spp.*) και χωρίς να αλλοιώνονται οι μυϊκοί χιτώνες και οι λάχνες του μεσεντέρου ιστομορφολογικά. Έρευνες σχετικά με το γαστρεντερικό σύστημα των ιχθύων και τις επιδράσεις των θρεπτικών σε αυτό είναι λιγοστές σε εκτροφές ενυδραιοπονίας. Η ενυδραιοπονία είναι ένα βιώσιμο σύστημα το οποίο θα συμβάλλει μελλοντικά στην παραγωγή τροφής υψηλής ποιότητας και θρεπτικής αξίας. Νέες έρευνες συνιστώνται για την εξέλιξη, την αναβάθμιση και την βελτιστοποίηση αυτής της μεθόδου.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1. Ελληνική

- Αντωνοπούλου, Ε. (2015). Καλλιέργεια ιχθύων – διατροφή και θρέψη In *Υδατοκαλλιέργειες* Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. <http://hdl.handle.net/11419/5086> (Βουλτσιάδου, Ε., Αμπατζόπουλος, Θ., Αντωνοπούλου, Ε., Γκάνιας, Κ., Γκέλης, Σ., Στάικου, Α., & Τριανταφυλλίδης, Α. 2015. Υδατοκαλλιέργειες)
- Βερίλλης, Π. (2015). Προετοιμασία δειγμάτων για οπτική μικροσκοπία. In *Οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία* (pp. 55-59). Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας.
- Βερίλλης, Π. (2018). Επιλογή υγρού μονιμοποίησης. In *Εισαγωγή στις ιστομορφολογικές αλλοιώσεις υδρόβιων ζωικών οργανισμών* (pp. 25). Πανεπιστημιακές σημειώσεις του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Βερίλλης, Π., & Μεντέ, Ε. (2017). *Ιστοφυσιολογία ιχθύων και καρκινοειδών*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.
- Κλαουδάτος, Σ. Δ., Κλαουδάτος, Δ. Σ. . (2010). Ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού. In *Κατασκευές υδατοκαλλιεργητικών συστημάτων: Θαλάσσιες – Λιμνοθαλάσσιες – Χερσαίες* (pp. 52-56). Εκδόσεις Πρόπομος.
- Μεντέ, Ε., & Νέγκας, Ι. (2011). *Στοιχεία Φυσιολογίας Θρέψεως και Εφαρμοσμένη Διατροφή Ιχθύων και Καρκινοειδών*. Εκδόσεις Παπαζήση Α.Ε.Β.Ε.
- Μούσης, Μ. (2002). Εργαστήριο Ζωολογίας Ι, Ιστολογία. In Τ. Β. Πανεπιστήμιο Κρήτης (Ed.), *Εργαστηριακές Σημειώσεις*. Ηράκλειο.
- Νεοφύτου, Ν. Χ., & Νεοφύτου, Χ. Ν. (2017). Ανατομία-Φυσιολογία Ψαριών. In *Ιχθυολογία* (Τρίτη ed., pp. 97-103). Εκδόσεις University Studio Press.

Παπουτσόγλου, Σ. (2008). Πεπτικό σύστημα ιχθύων μορφολογία και ιδιότητες. In *Διατροφή ιχθύων* (pp. 167-177). Εκδόσεις: Α.Θ. Σταμούλης.

Χατζιωάννου, Μ., & Βαφείδης, Δ. (2015). Μέθοδοι και τεχνικές ιστολογίας. In *Εργαστηριακές ασκήσεις ιστολογίας [Εργαστηριακός Οδηγός]* (pp. 22-29). Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. <http://hdl.handle.net/11419/5136>

5.2. Ξενόγλωσση

Agayeva, N. J., Rzayev, F. H., Gasimov, E. K., Mamedov, C. A., Ahmadov, I. S., Sadigova, N. A., Khusro, A., Al-Dhabi, N. A., & Arasu, M. V. (2020). Exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles in simplified food chain: Study on ultrastructural characterization. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3258-3266. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.032>

Andersen, F., Maage, A., & Julshamn, K. (1996). An estimation of dietary iron requirement of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr [<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.1996.tb00006.x>]. *Aquaculture Nutrition*, 2(1), 41-47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.1996.tb00006.x>

Bakke, A. M., Glover, C., & Krogdahl, Å. (2010). 2 - Feeding, digestion and absorption of nutrients. In M. Grosell, A. P. Farrell, & C. J. Brauner (Eds.), *Fish Physiology* (Vol. 30, pp. 57-110). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)03002-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)03002-5)

Bills, R. (2019). *Oreochromis mossambicus* <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T63338A174782954.en>. (errata version published in 2020) (IUCN Red List of Threatened Species)

- Bruton, M. N., & Boltt, R. E. (1975). Aspects of the biology of *Tilapia mossambica* Peters (Pisces: Cichlidae) in a natural freshwater lake (Lake Sibaya, South Africa) [<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1975.tb04618.x>]. *Journal of Fish Biology*, 7(4), 423-445. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1975.tb04618.x>
- Chappell, V. L., Thompson, M. D., Jeschke, M. G., Chung, D. H., Thompson, J. C., & Wolf, S. E. (2003). Effects of Incremental Starvation on Gut Mucosa. *Digestive Diseases and Sciences*, 48(4), 765-769. <https://doi.org/10.1023/A:1022849112100>
- Cnaani, A., Gall, G. A. E., & Hulata, G. (2000). Cold tolerance of tilapia species and hybrids. *Aquaculture International*, 8, 289-298. <https://doi.org/10.1023/A:1009299109614>
- Deswati, D., Suyani, H., Muchtar, A. K., Abe, E. F., Yusuf, Y., & Pardi, H. (2019). Copper, iron and zinc contents in water, pakcoy (*Brassica rapa* L.) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the presence of aquaponics. *Rasayan Journal of Chemistry*, 12, 40-49. <https://doi.org/10.31788/RJC.2019.1215062>
- Donnelly, B. G. (1978). EVIDENCE OF FISH SURVIVAL DURING HABITAT DESSICATION IN RHODESIA. *Journal of the Limnological Society of Southern Africa*, 4(1), 75-76. <https://doi.org/10.1080/03779688.1978.9633152>
- Evliyaoğlu, E., Kilercioğlu, S., Yılmaz, H. A., Turchini, G. M., Paolucci, M., Clark, T. D., Demirkale, İ., & Eroldoğan, O. T. (2022). Iron supplementation in plant-based aquafeed: Effects on growth performance, tissue composition, iron-related serum parameters and gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus*

mykiss). *Aquaculture*, 550, 737884.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737884>

Fahmi, U., Andriani, I., Salmah, S., Hatta, T., Andy Omar, S., & Sari, D. K. (2019).

Histopathology of liver and intestine of pangkulan bare fish (*Oryzias matanensis*) Polluted by nickel and iron in Lake Matano, South Sulawesi. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 370, 012078.

<https://doi.org/10.1088/1755-1315/370/1/012078>

Fryer, G., Iles, T. D., & Yonge, C. M. (1972). *The cichlid fishes of the great lakes of*

Africa : their biology and evolution. Edinburgh : Oliver and Boyd.

<http://lib.ugent.be/catalog/rug01:000093159>

George, J., Van Wettere, A. J., Michaels, B. B., Crain, D., & Lewbart, G. A. (2016).

Histopathologic evaluation of postmortem autolytic changes in bluegill (*Lepomis macrochirus*) and crappie (*Pomoxis anularis*) at varied time intervals and storage temperatures. *PeerJ*, 4, e1943. <https://doi.org/10.7717/peerj.1943>

Goddek, S., Joyce, A., Kotzen, B., & Burnell, G. (2019). *Aquaponics Food Production*

Systems - Combined Aquaculture and Hydroponic Production Technologies for the Future (1 ed.). Springer Cham.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-15943-6>

Groot, J. A., Albus, H., & Siegenbeek van Heukelom, J. (1979). A mechanistic

explanation of the effect of potassium on goldfish intestinal transport. *Pflügers Archiv*, 379(1), 1-9. <https://doi.org/10.1007/BF00622898>

Harder, W. (1975). *Anatomy of Fishes*. E. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung,

Stuttgart.

- John, V. C., Verma, A. K., Krishnani, K. K., Chandrakant, M. H., Bharti, V. S., & Varghese, T. (2022). Optimization of potassium (K⁺) supplementation for growth enhancement of *Spinacia oleracea* L. and *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) in an aquaponic system. *Agricultural Water Management*, *261*, 107339. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.107339>
- Joly, J.-P. (2011). *MOLLUSCS PROCESSING FOR DIAGNOSIS BY HISTOLOGY* European Union Reference Laboratory for Molluscs Diseases, Ifremer, Genetics and Pathology Laboratory, Avenue de Mus de Loup, 17390
- Kamal, A., & Mair, G. (2005). Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids. *Aquaculture*, *247*, 189-201. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.008>
- Kasozi, N., Tandlich, R., Fick, M., Kaiser, H., & Wilhelmi, B. (2019). Iron supplementation and management in aquaponic systems: A review. *Aquaculture Reports*, *15*, 100221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100221>
- Khojasteh, S. M. (2012). The morphology of the post-gastric alimentary canal in teleost fishes: a brief review. *International Journal of Aquatic Science*, *3*.
- Khojasteh, S. M. B., Sheikhzadeh, F., Mohammadnejad, D., & Azami, A. (2009). Histological, histochemical and ultrastructural study of the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *World applied sciences journal*, *6*, 1525-1531.
- Lall, S., & Kaushik, S. (2021). Nutrition and Metabolism of Minerals in Fish. *Animals*, *11*. <https://doi.org/10.3390/ani11092711>

- Lall, S. P. (2003). 5 - The Minerals. In J. E. Halver & R. W. Hardy (Eds.), *Fish Nutrition (Third Edition)* (pp. 259-308). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012319652-1/50006-9>
- Latendresse, J. R., Warbritton, A. R., Jonassen, H., & Creasy, D. M. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's Fluid. *Toxicologic Pathology*, 30(4), 524-533. <https://doi.org/10.1080/01926230290105721>
- Liang, H., Mi, H., Ji, K., Ge, X., Re, M., & Xie, J. (2018). Effects of Dietary Calcium Levels on Growth Performance, Blood Biochemistry and Whole Body Composition in Juvenile Bighead Carp (*Aristichthys nobilis*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18.
https://doi.org/http://doi.org/10.4194/1303-2712-v18_4_14
- Løkka, G., Austbø, L., Falk, K., Bjerås, I., & Koppang, E. O. (2013). Intestinal morphology of the wild atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Morphology*, 274(8), 859-876. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmor.20142>
- Lovshin, L. L. (1982). *Tilapia hybridization* The biology and culture of tilapias, ICLARM conference proceedings.
- Mahgoub, H. A., El-Adl, M. A. M., Ghanem, H. M., & Martyniuk, C. J. (2020). The effect of fucoidan or potassium permanganate on growth performance, intestinal pathology, and antioxidant status in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 46(6), 2109-2131.
<https://doi.org/10.1007/s10695-020-00858-w>
- Mescher, A. L. (2018). *Junqueira's basic histology: Text and atlas* (Fifteenth ed.). McGraw-Hill Education.

- Moldal, T., Løkka, G., Wiik-Nielsen, J., Austbø, L., Torstensen, B., Rosenlund, G., Dale, O., Kaldhusdal, M., & Koppang, E. (2014). Substitution of dietary fish oil with plant oils is associated with shortened mid intestinal folds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC veterinary research*, *10*, 60. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-60>
- Murthy, V. K., Reddanna, P., & Govindappa, S. (1981). Hepatic carbohydrate metabolism in *Tilapia mossambica* (Peters) acclimated to low environmental pH. *Canadian Journal of Zoology*, *59*(3), 400-404. <https://doi.org/10.1139/z81-058>
- Nozzi, V., Graber, A., Schmautz, Z., Mathis, A., & Junge, R. (2018). Nutrient Management in Aquaponics: Comparison of Three Approaches for Cultivating Lettuce, Mint and Mushroom Herb. *Agronomy*, *8*, 27. <https://doi.org/10.3390/agronomy8030027>
- Okuthe, G., & Bhomela, B. (2020). Morphology, histology and histochemistry of the digestive tract of the Banded tilapia, *Tilapia sparrmanii* (Perciformes: Cichlidae). *Zoologia*, *37*, 1-14. <https://doi.org/10.3897/zoologia.37.e51043>
- Opoku-Okrah, C., Acquah, B. K. S., & Dogbe, E. E. (2015). Changes in potassium and sodium concentrations in stored blood. *The Pan African medical journal*, *20*, 236-236. <https://doi.org/10.11604/pamj.2015.20.236.5851>
- Pappa, V., Mente, E., Kapsis, P., & Berillis, P. (2017). Aquaponics Software in Greece. *Journal of Fisheries Sciences com*, *11*. <https://doi.org/10.21767/1307-234X.1000123>
- Philippart, J.-C., & Ruwet, J.-C. (1982). Ecology and distribution of tilapias. 15-59.

- Popma, T., & Masser, M. (1999). *Tilapia: Life History and Biology*. Southern Regional Aquaculture Center, SRAC Pub.
- Pullin, R. S. V., & Lowe-McConnell, R. H. (1980). The biology and culture of tilapias. . In *International conference on the biology and culture of tilapias* (pp. 25–58, 74–80). International Center for Living Aquatic Resource Management.
- Rakocy, J., Bailey, D., Shultz, R., & Thoman, E. (2010). Update on tilapia and vegetable production in the UVI aquaponic system. In *Proceedings of the Sixth International Symposium on Tilapia in Aquaculture*.
- Raskovic, B., Stankovic, M., Markovic, Z., & Poleksic, V. (2011). Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, 56, 87-100.
<https://doi.org/10.2298/JAS1101087R>
- Russell, D. J., Thuesen, P. A., & Thomson, F. E. (2012). A review of the biology, ecology, distribution and control of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters 1852) (Pisces: Cichlidae) with particular emphasis on invasive Australian populations. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22(3), 533-554. <https://doi.org/10.1007/s11160-011-9249-z>
- Shaw, D., Gohil, K., & Basson, M. D. (2012). Intestinal mucosal atrophy and adaptation. *World journal of gastroenterology*, 18(44), 6357-6375.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i44.6357>
- Somerville, C., Cohen, M., Pantanella, E., Stankus, A., & Lovatelli, A. (2014). Small-scale aquaponic food production: integrated fish and plant farming. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, 1-262.

- Stickney, R. R. (2017). Tilapia Feeding Habits and Environmental Tolerances. In *Tilapia in Intensive Co-culture* (pp. 25-35).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118970652.ch2>
- Su, X., Ji, D., Yao, J., Zou, Y., & Yan, M. (2022). Comparative Analysis of Intestinal Characteristics of Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*) and Intestinal Flora with Different Growth Rates. *Fishes*, 7(2), 65.
<https://www.mdpi.com/2410-3888/7/2/65>
- Thorarinsdottir, R. (2015). *Aquaponics Guidelines*.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4975.6880>
- Troiano, N., Ciovacco, W., & Kacena, M. (2009). The Effects of Fixation and Dehydration on the Histological Quality of Undecalcified Murine Bone Specimens Embedded in Methylmethacrylate. *Journal of histotechnology*, 32, 27-31. <https://doi.org/10.1179/his.2009.32.1.27>
- Vatsos, I. N. (2021). Planning and Reporting of the Histomorphometry Used to Assess the Intestinal Health in Fish Nutrition Research—Suggestions to Increase Comparability of the Studies [Opinion]. *Frontiers in Veterinary Science*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.666044>
- Vlahos, N., Levizou, E., Stathopoulou, P., Berillis, P., Antonopoulou, E., Bekiari, V., Krigas, N., Kormas, K., & Mente, E. (2019). An Experimental Brackish Aquaponic System Using Juvenile Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) and Rock Samphire (*Crithmum maritimum*). *Sustainability*, 11.
<https://doi.org/10.3390/su11184820>

- Webb, A., & Maughan, M. (2007). Pest Fish Profiles. *Oreochromis mossambicus* – Mozambique Tilapia. *Australian Centre for Tropical Freshwater Research*, Article 12 pp. (James Cook University)
- Webster, C. D., & Lim, C. E., Eds. (2002). *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*. CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851995199.0327>
- Whitfield, A. K., & Blaber, S. J. M. (1979). The distribution of the freshwater cichlid *Sarotherodon mossambicus* in estuarine systems. *Environmental Biology of Fishes*, 4(1), 77-81. <https://doi.org/10.1007/BF00005931>
- Wilson, J. M., & Castro, L. F. C. (2010). 1 - Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. In M. Grosell, A. P. Farrell, & C. J. Brauner (Eds.), *Fish Physiology* (Vol. 30, pp. 1-55). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)03001-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)03001-3)

5.3. Ηλεκτρονική

- Fishbase. (2022). *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) Mozambique tilapia
Fishbase. <https://doi.org/https://www.fishbase.se/summary/Oreochromis-mossambicus.html>
- GISD. (2022). Species profile *Oreochromis mossambicus*. Retrieved May 14, 2022, from <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=131>
- ITIS, -. I. T. I. S. (2022). *Oreochromis* Günther, 1889 Integrated Taxonomic Information System. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=170014#null

6. ABSTRACT

Aquaponics is a hybrid culture system that combines aquaculture with hydroponics. This method cultivates fish and plants, simultaneously with a sustainable and viable way. The water contains fish waste (feces and urine) or food residue, which are very nutritious for plants and are used as fertilizer, while the plants «filter» the water and return it back to the fish clean. In the current experiment, the species that were used were red tilapia (*Oreochromis* spp.) and rocket (*Eruca vesicaria*). Tilapia is particularly characterized by a great range of durability against physicochemical and dietary parameters, making it ideal for this type of culture. Some nutrients like iron and potassium are necessary for optimal plant and fish growth. The aim of this study was to observe the effects that Fe and K have to the intestinal villi and the muscle layers of tilapia's midgut and the potential histomorphological alteration to the intestine. Fish culture samples were taken from the midgut and divided in two teams coming from two different treatments: without additional nutrition in the water of the aquaponics system and the fish diet (control), and with additional iron and potassium in the water of the aquaponics system and the fish diet (Fe + K). Consequently, the samples were processed with Davidson fixatives and hematoxylin-eosin staining. Eventually, intestinal villi and muscle layers were studied and observed with optical microscope. After the lengths were measured, it was found that there was no great difference of the villi and the muscle layers between the different treatments. The addition Fe and K in the aquaponics system had no histomorphological alteration to the intestine.

Keywords: aquaponics, red tilapia, iron, potassium