ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση της χορήγησης διαφορετικών σιτηρεσίων στην καταπόνηση, ενεργειακή ομοιόσταση και μεταβολικά ένζυμα σε άτομα λαβρακιού (Dicentrarchus labrax)

ΠΑΔΟΒΑΝΗ ΜΑΡΙΑΝΘΗ

ΒΟΛΟΣ, 2022

UNIVERSITY OF THESSALY SCHOOL

AGRICULTURAL SCIENCES

DEPARTMENT OF AGRICULTURE FISHERIES AND AQUATIC ENVIRONMENT

POSTGRADUATE THESIS

Effect of feeding with different diets on stress, energy homeostasis and metabolic enzymes in sea bass individuals (Dicentrarchus labrax)

PADOVANI MARIANTHI

VOLOS, 2022

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

1. Παναγιώτα Παναγιωτάκη**,** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**,** Επιβλέπουσα

2. Έλενα Μεντέ , Καθηγήτρια, Φυσιολογία Θρέψης Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Συνεπιβλέπουσα

3. Ευθυμία Αντωνοπούλου, Αναπληρώτρια καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Μέλος

Περιεχόμενα

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Μεσογειακή Υδατοκαλλιέργεια», στο Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, την περίοδο 2021-2022. Οι διαδικασίες ανάλυσης δειγμάτων εκπονήθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης Ευθυμία Αντωνοπούλου για την καθοδήγηση, την βοήθεια την εμπιστοσύνη και την στήριξη που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια Ελένη Μεντέ, του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας για τη βοήθεια της και την εμπιστοσύνη που έδειξε. Ένα ευχαριστώ οφείλω στην Καθηγήτρια Παναγιώτα Παναγιωτάκη, του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας καθώς δέχτηκε να είναι μέλος της επιτροπής και για τον χρόνο που αφιέρωσε. Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης Dr. Κωνσταντίνο Φειδάντση και τον υποψήφιο διδάκτορα Νικόλα Παντελή καθώς με βοήθησαν στην υλοποίηση των αναλύσεων και στην συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας. Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Άννα Τάμπου για το ευχάριστο και συνεργατικό κλίμα που είχαμε σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης των αναλύσεων και την πολύτιμη βοήθεια της.

Τέλος, χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, που με στήριξε, ωθώντας με να προσπαθώ πάντα για το καλύτερο στη ζωή μου, ήταν πάντα δίπλα μου και με βοηθούσαν να πετύχω τους στόχους μου.

Περίληψη

Η παγκόσμια ζήτηση της παραγωγής θαλάσσιων ειδών εκτροφής έχει οδηγήσει στην έλλειψη των αλιευτικών αποθεμάτων γεγονός που εμποδίζει την εξέλιξη του κλάδου. Η βιολογική υδατοκαλλιέργεια φαίνεται να αποτελεί ελπιδοφόρα προσέγγιση για την εξέλιξη του τομέα καθώς συνδυάζει καλύτερες περιβαλλοντικές πρακτικές και υψηλότερο επίπεδο βιοποικιλότητας, ενώ παράλληλα συμβάλει και στη διατήρηση των φυσικών πόρων και την ευζωία των εκτρεφόμενων οργανισμών συγκριτικά με τους συμβατικούς τρόπους εκτροφής.

Υπάρχει μεγάλο εύρος εναλλακτικών πηγών πρωτεΐνης που έχουν εξεταστεί σε εκτρεφόμενους οργανισμούς τα τελευταία χρόνια με ποικίλα αποτελέσματα. Επιπλέον, έμφαση έχει δοθεί στη μελέτη καινοτόμων πηγών πρωτεΐνης που στοχεύουν στην κάλυψη των απαιτήσεων των εκτρεφόμενων οργανισμών, ενώ ταυτόχρονα φαίνεται να προάγουν την ευζωία τους και να ευνοούν την κυκλική οικονομία. Ειδικότερα, τα μικροφύκη, τα εντομάλευρα, οι βακτηριακής προέλευσης πρωτεΐνες και η πρωτεΐνη μαγιάς εμπίπτουν στους κανονισμούς της βιολογικής ιχθυοκαλλιέργειας και πληρούν πολλές από τις προαναφερθείσες προϋποθέσεις για χρήση τους στις ιχθυοτροφές.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση των επιδράσεων της μερικής αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου με καινοτόμες πηγές πρωτεΐνης σε συνδυασμό με τη χρήση βιολογικών πρώτων υλών. Για το σκοπό αυτό αξιολογήθηκαν οι επιδράσεις των καινοτόμων πρώτων υλών στην καταπόνηση, την ενεργειακή ομοιόσταση και σε μεταβολικά ένζυμα σε άτομα λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*). Ειδικότερα, μελετήθηκε η επιρροή του μεταβολισμού και της φυσιολογίας των ιχθύων μετά τη χορήγηση των διαφορετικών σιτηρεσίων. Επιπλέον, εξετάστηκε η καταπόνηση που υφίστανται τα ψάρια ως αποτέλεσμα της σίτισης με τα σιτηρέσια αυτά μέσα από την μελέτη της έκφρασης των Hsp, της φωσφορυλίωσης των MARKs, Akt (pAkt) και AMPK (pAMPK). Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση των σιτηρεσίων στις διεργασίες απόπτωσης και αυτοφαγίας μέσα από την μελέτη της έκφρασης των σχετιζόμενων πρωτεϊνών. Οι αναλύσεις αφορούν τον ιστό ήπατος.

Τα πειράματα χρηματοδοτήθηκαν από τη δράση Καινοτομία Horizon 2020 (European Union’s Horizon 2020 Innovation Action) της Ευρωπαϊκής ένωσης, με το ερευνητικό πρόγραμμα «FutureEUAqua», βάση της συμφωνίας επιχορήγησης με αρ. 817737, ενώ οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Abstract

The global demand for the production of farmed marine species has led to a shortage of fish stocks which hinders the development of the sector. Organic aquaculture appears to be a promising approach for the development of the sector as it combines better environmental practices and a higher level of biodiversity, while also contributing to the conservation of natural resources and the well-being of farmed organisms compared to conventional farming methods.

There is a wide range of alternative protein sources that have been tested in farmed organisms in recent years with varying results. In addition, has been placed on the study of innovative protein sources that aim to meet the requirements of farmed organisms, while at the same time seem to promote their well-being and favor the circular economy. In particular, microalgae, insect meal, proteins of bacterial origin and yeast protein fall within the regulations of organic fish farming and meet many of the aforementioned conditions for use in fish feed.

The aim of this work was to investigate the effects of the partial replacement of fishmeal with innovative sources of protein in combination with the use of biological raw materials. For this purpose, the effects of innovative raw materials on stress, energy homeostasis and metabolic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) individuals were evaluated. In particular, the influence of the metabolism and physiology of the fish after the administration of the different rations was studied. In addition, the stress experienced by the fish as a result of feeding these diets was examined through the study of the expression of Hsp, the phosphorylation of MARKs, Akt (pAkt) and AMPK (pAMPK). Finally, the effect of diets on the processes of apoptosis and autophagy was studied through the study of the expression of the related proteins. Analyzes concern liver tissue.

This project has received funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 817737. Dissemination should indicate that it reflects the author’s view, and that the EC is not responsible for any use of the results. While the analyzes were carried out at the Aristotle University of Thessaloniki.

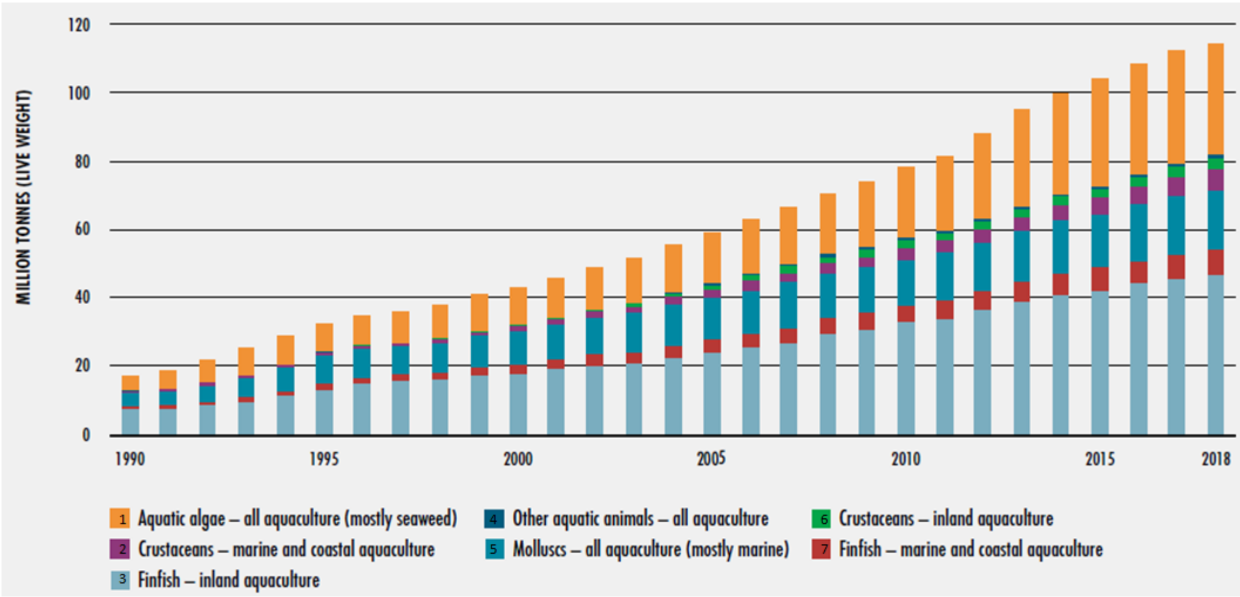
1. Εισαγωγή

1.1 Η υδατοκαλλιέργεια σήμερα

Η υδατοκαλλιέργεια κάνει την εμφάνιση της στην ιστορία του ανθρώπου από την αρχαιότητα, όπου τα αρχαιολογικά ευρήματα έχουν πράγματι αποκαλύψει στοιχεία για τη χρήση των τεχνικών εκτροφής τόσο των ψαριών όσο και των οστρακοειδών σε περιορισμένους χώρους και σκοπός αυτής της πρακτικής ήταν να αποκτήσουν περισσότερες ποσότητες ψαριών από την παραδοσιακή αλιεία (Pagliarino et al., 2012). Οι ρίζες της υδατοκαλλιέργειας πιθανόν να χρονολογούνται πάνω από 5.000 χρόνια πριν, με τα αρχαιολογικά ευρήματα της αρχαίας Αιγύπτου την εποχή των Φαραώ, της αυτοκρατορικής Κίνας και της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας, να επιβεβαιώνουν το γεγονός της εκτροφής ψαριών και μαλακίων σαν επένδυση ζωτικής οικονομικής και διατροφικής σημασίας γι' αυτούς τους αρχαίους πολιτισμούς.

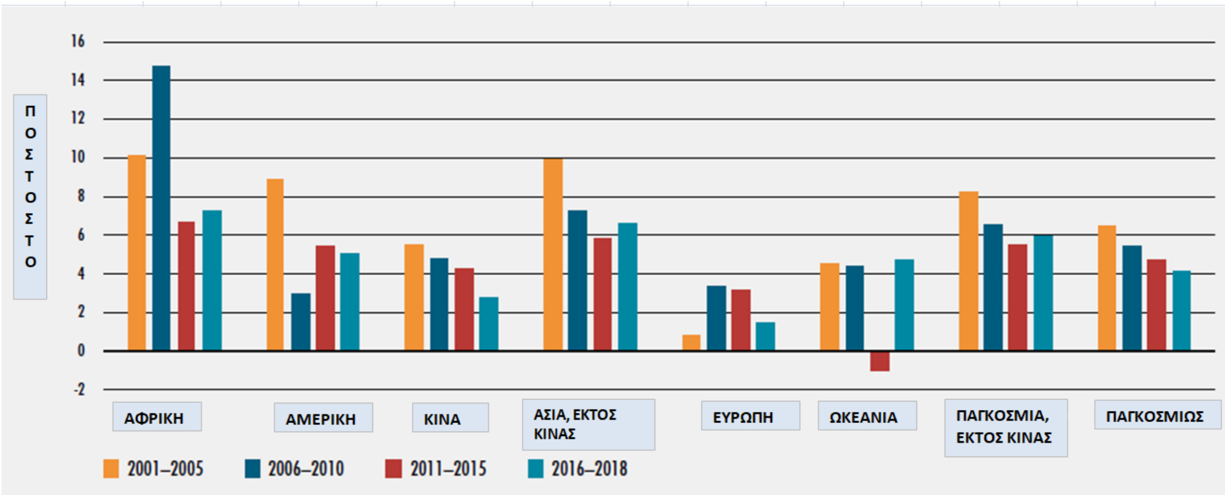
Με τον όρο υδατοκαλλιέργεια εννοείται η ελεγχόμενη εκτροφή υδρόβιων οργανισμών σε φυσικό ή ελεγχόμενο θαλάσσιο περιβάλλον ή σε εσωτερικά νερά. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization, FAO), η υδατοκαλλιέργεια εμφανίζει μεγάλη ανάπτυξη τις τελευταίες δεκαετίες τόσο σε ευρωπαϊκό όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο, αντικατοπτρίζοντας έτσι τη σπουδαιότητα του κλάδου (FAO, 2020). Η υδατοκαλλιέργεια είναι ο ταχύτερα αναπτυσσόμενος τομέας παραγωγής τροφίμων στον κόσμο και συνεισφέρει σχεδόν στο ήμισυ στην παγκόσμια κατανάλωση ψαριών, με την προσδοκία ότι μέχρι το 2030 θα ξεπεράσει το 60-70% (Subasinghe et al., 2009).

Η Ελλάδα συγκαταλέγεται μεταξύ των μεγαλύτερων παραγωγών ψαριών εκτροφής στην Ευρωπαϊκή Ένωση, με περισσότερες από 300 ιχθυοκαλλιέργειες και με ετήσια παραγωγή το 2019 περίπου 125.000 τόνους ψαριών (FGM, Federation of Greek Maricultures, Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών, 2020). Πολύ σημαντικός κλάδος της ελληνικής αγροτικής παραγωγής είναι η βιομηχανία της υδατοκαλλιέργειας, καθώς τα θαλασσινά ψάρια αποτελούν το κορυφαίο ζωικό προϊόν που εξάγεται συνεισφέροντας περίπου στο 11% στις συνολικές εθνικές εξαγωγές (FAO, 2021). Σε παγκόσμιο επίπεδο σύμφωνα με πρόσφατες στατιστικές αναλύσεις για την υδατοκαλλιέργεια που συγκεντρώθηκαν από τον FAO, η παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιέργειας άγγιξε τους 114,5 εκατομμύρια τόνους το 2018, με συνολική αξία πώλησης 263,6 δισεκατομμυρίων δολαρίων Αμερικής. Όσον αφορά τους υδρόβιους οργανισμούς η συνολική παραγωγή ήταν 82,1 εκατομμύρια τόνοι, με τα ψάρια να ξεπερνούν τους 50 εκατομμύρια τόνους το 2018. Συγκεκριμένα, αυτά που προέρχονται από εσωτερική υδατοκαλλιέργεια φτάνουν τους 47 εκατομμύρια τόνους, ενώ η θαλάσσια και παράκτια υδατοκαλλιέργεια αγγίζει τους 7,3 εκατομμύρια τόνους (*Εικόνα 1*) (FAO, 2020).



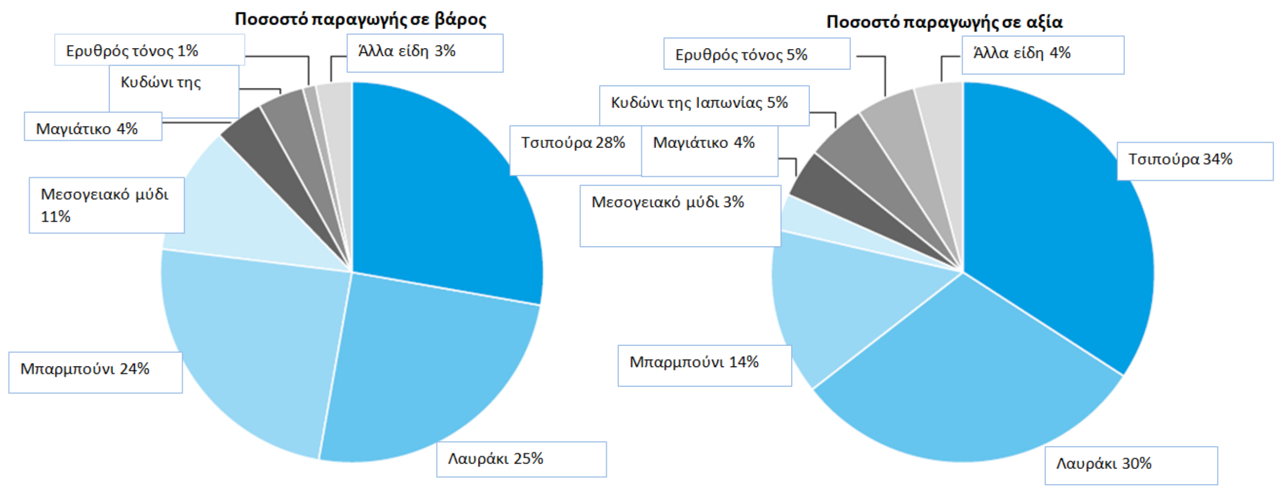
Εικόνα 1. Παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιέργειας υδρόβιων οργανισμών το χρονικό διάστημα 1990-2018 (πηγή: FAO, 2020). Απεικονίζεται σε χρονολογική σειρά ανά πέντε ετών η παραγωγή εκατομμυρίων τόνων των ακόλουθων οργανισμών, στις μπάρες του γραφήματος 1. με πορτοκαλί χρώμα είναι η παραγωγή υδρόβιων φυκιών υδατοκαλλιέργειας, 2. με μωβ χρώμα τα καρκινοειδή θαλάσσιας και παράκτιας υδατοκαλλιέργειας, 3. με ανοιχτό μπλε οι οστειχθύες εσωτερικών υδάτων, 4. με σκούρο μπλε οι υπόλοιποι υδρόβιοι οργανισμοί όλων των ειδών υδατοκαλλιέργειας, 5. με μπλε χρώμα τα μαλάκια όλων των ειδών υδατοκαλλιέργειας (κυρίως θαλάσσια) , 6. με πράσινο χρώμα τα καρκινοειδή εσωτερικών υδάτων υδατοκαλλιέργειας, 7. και με καφέ χρώμα οι οστειχθύες θαλάσσιας και παράκτιας υδατοκαλλιέργειας.

Η παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιέργειας εκτρεφόμενων υδρόβιων ζώων αυξήθηκε κατά μέσο όρο κατά 5,3% ανά έτος την περίοδο 2001–2018, ενώ η αύξηση ήταν 4% το 2017 και 3,2% το 2018. Ο χαμηλός ρυθμός ανάπτυξης οφείλεται στην επιβράδυνση της Κίνας που αποτελεί τον μεγαλύτερο παραγωγό, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής υδατοκαλλιέργειας μόλις 2,2% το 2017 και 1,6 % το 2018, ενώ η παραγωγή από τον υπόλοιπο κόσμο εξακολουθούσε να έχει μέτρια ανάπτυξη 6,7% το 2017 και 5,5% το 2018. Οι υψηλοί ετήσιοι ρυθμοί αύξησης (10,8% και 9,5%) της παγκόσμιας παραγωγής υδρόβιων ζώων παρατηρήθηκαν τη δεκαετία του 1980 και 1990, αντίστοιχα. Ο μέσος ετήσιος ρυθμός ανάπτυξης ήταν 5,8% την περίοδο 2001–2010 και 4,5% την περίοδο 2011–2018. Παρά την αργή ανάπτυξη σε παγκόσμιο επίπεδο, υψηλός ρυθμός ανάπτυξης την περίοδο 2009–2018 εξακολουθεί να παρατηρείται σε ορισμένες χώρες, συμπεριλαμβανομένων μεγάλων παραγωγών όπως η Ινδονησία (12,45%), το Μπαγκλαντές (9,1%), η Αίγυπτος (8,4%) και το Εκουαδόρ (12%) (*Εικόνα 2*) (FAO, 2020).



Εικόνα 2. Ετήσιος ρυθμός αύξησης παραγωγής υδρόβιων οργανισμών στην υδατοκαλλιέργεια το χρονικό διάστημα 2001-2018 (πηγή: FAO, 2020).

Ο μεγάλος αριθμός ειδών που εκτρέφονται στην υδατοκαλλιέργεια σε όλο τον κόσμο οφείλεται τόσο στην ποικιλομορφία των κλιματικών και περιβαλλοντικών συνθηκών όσο και στους διάφορους τύπους παραγωγής που χρησιμοποιούνται, δηλαδή γλυκό, θαλασσινό και υφάλμυρο νερό. Ο συνολικός αριθμός ειδών που εκτρέφονται παρουσιάζει σημαντική αύξηση, από το 2006 έως το 2018 η ποικιλία των ειδών αυξήθηκε κατά 31,8% και πιο συγκεκριμένα, από 472 σε 622 είδη (FAO, 2020). Ωστόσο, υπάρχουν κάποια είδη που καλλιεργούνται σε μεγαλύτερο ποσοστό όπως είναι η τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το ευρωπαϊκό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) τα οποία είναι τα πιο συνηθισμένα εκτρεφόμενα είδη στη Μεσόγειο Θάλασσα, φτάνοντας το 2019 τους 464.000 τόνους με αξία 2,24 δισεκατομμυρίων δολαρίων (USD). Παράλληλα αυτά τα δύο είδη κυριαρχούν και στην ελληνική υδατοκαλλιέργεια με συνολική παραγωγή περίπου 117.000 τόνους, από τους οποίους εξάγεται περίπου 80%. Η Ελλάδα είναι ένας από τους μεγαλύτερους προμηθευτές παγκοσμίως, καθώς παρέχει 58% των συνολικών πωλήσεων στην Ευρώπη και 24% των πωλήσεων παγκοσμίως (FGM, Federation of Greek Maricultures, 2020). Η υδατοκαλλιέργεια συμβάλλει σε ποσοστό 95% στην παγκόσμια παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού, το 97% της οποίας προέρχεται από την Μεσόγειο και συγκεκριμένα από την Ελλάδα και την Τουρκία, ενώ οι κύριοι καταναλωτές είναι, εκτός από τις δύο χώρες παραγωγής, η Γαλλία, η Ισπανία και η Ιταλία. Πρέπει να σημειωθεί πως η ανάπτυξη του κλάδου εκτροφής τσιπούρας και λαβρακιού ήταν αργή εξαιτίας των δυσκολιών στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων γόνου υψηλής ποιότητας. Οι βελτιώσεις που πραγματοποιήθηκαν στα εκκολαπτήρια στα τέλη της δεκαετίας του 1980 οδήγησαν σε αυξημένη προσφορά των ατόμων και από το 2000 η παραγωγή λαβρακιού έχει αυξηθεί κατά 115% και της τσιπούρας κατά 95% (*Εικόνα 3*).



Εικόνα 3. Εκτρεφόμενα είδη στην Μεσόγειο (πηγή: FAO, 2020).

1.2 Βιολογική υδατοκαλλιέργεια

1.2.1 Προέλευση και εξέλιξη της βιολογικής υδατοκαλλιέργειας

Η βιολογική υδατοκαλλιέργεια ξεκίνησε με το κίνημα της βιολογικής γεωργίας και αυτές οι ρίζες συνεχίζουν να διαμορφώνουν τον κλάδο με πολλούς τρόπους (Bergleiter et al., 2009). Η μέθοδος της βιολογικής παραγωγής απορρέει από μια πολιτιστική προσέγγιση η οποία βασίζεται στο σεβασμό για το περιβάλλον. Το 1994 χρονολογείται η εξέλιξη των πρώτων συστημάτων βιολογικής παραγωγής του κυπρίνου σε Αυστρία και Γερμανία, που πραγματοποιήθηκε από εκτροφείς παραγωγούς. Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 η αγορά των βιολογικών προϊόντων παρουσιάζεται, ως εξειδικευμένη αγορά και προσφέρει ως επί το πλείστον βιολογικά τρόφιμα, εκτός από ψάρια. Ενώ το 1999 ξεκίνησε στην Ιρλανδία το πρώτο πρόγραμμα εκτροφής βιολογικών μυδιών, και στο έτος 2000 αναφέρεται η πρωτοβουλία βιολογικής εκτροφής καρκινοειδών που τράβηξε την προσοχή της διεθνούς κοινότητας (Pagliarino et al., 2012).

Αν και η Ελλάδα βρίσκεται στις πρώτες θέσεις στην Ε.Ε. στην παραγωγή θαλασσινών ειδών εντατικής εκτροφής, η βιολογική υδατοκαλλιέργεια δεν έχει αναπτυχθεί αναλόγως και η παραγωγή της είναι πολύ χαμηλότερη από άλλες χώρες με εξίσου ή λιγότερο σημαντική υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα. Στην Ελλάδα, παράγονται βιολογικά ψάρια από το 2006, κυρίως λαβράκια και τσιπούρες, δύο είδη που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο εμπορικό ενδιαφέρον. Η αγορά βιολογικών προϊόντων στην Ελλάδα δεν είναι ακόμα ανάλογη σε μέγεθος με αυτή της Ε.Ε, αλλά εξακολουθεί ακόμα να διαμορφώνεται. Παρόλα αυτά, διαθέτει μια αξιόλογη δυναμική ως συνέπεια της ευαισθητοποίησης των Ελλήνων τόσο των παραγωγών όσο και των καταναλωτών σε σχέση γενικά με την προστασία του περιβάλλοντος και ειδικότερα με τη διατροφή.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξημένη ζήτηση για προϊόντα τα οποία παράγονται και με βιολογικές μεθόδους. Αυτό είναι αποτέλεσμα του ενδιαφέροντος που δείχνουν οι καταναλωτές τόσο για τα ζητήματα υγείας όσο και για την υποβάθμιση του περιβάλλοντος, όπως η υπεραλίευση. Η παραγωγή από τη βιολογική υδατοκαλλιέργεια το 2000, ήταν 5.000 τόνοι, από τις Ευρωπαϊκές χώρες, το 2003 άγγιξε τους 8000, ενώ το 2005 έφτασε στους 10.330 τόνους και η αξία της έφτασε σε 56,08 εκ. και σήμερα έχει ξεπεράσει τους 11.000 τόνους. Οι προβλέψεις για το 2030 είναι ότι η παραγωγή από τη βιολογική υδατοκαλλιέργεια θα φτάσει τους 1,2 εκατομμύρια τόνους (Lembo & Mente 2019).

1.2.2. Νομοθεσία και κανονισμοί

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση, η σημασία της βιολογικής παραγωγής έκανε την εμφάνιση της από τα τέλη του 1980 και ήδη από τις αρχές του 1990 άρχισε να αναπτύσσεται το σχετικό κανονιστικό πλαίσιο. Συγκεκριμένα, τον Ιούνιο του 1991 το συμβούλιο θέσπισε τον Κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 2092/91 περί του βιολογικού τρόπου παραγωγής γεωργικών προϊόντων και των σχετικών ενδείξεων στα γεωργικά προϊόντα και στα προϊόντα διατροφής. Με τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 2092/91 το συμβούλιο αποφάσισε τη δημιουργία ενός κοινοτικού πλαισίου, το οποίο ορίζει λεπτομερώς τις απαιτήσεις προκειμένου ένα γεωργικό προϊόν ή ένα τρόφιμο να μπορεί να φέρει μία ένδειξη για την βιολογική παραγωγή του. Ο κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2092/91 παραχωρούσε τη δυνατότητα στην Ευρωπαϊκή Επιτροπή να αναπτύξει λογότυπο σχετικά με τον τρόπο βιολογικής παραγωγής καθώς και μια ένδειξη ελέγχου, με στόχο να εξειδικεύσει ρητά ότι το καλυπτόμενο προϊόν είχε υπαχθεί στο καθεστώς ελέγχου που ο κανονισμός ορίζει. Στις 28/06/2007 ψηφίστηκε ο κανονισμός (ΕΚ) 834/2007 για τη βιολογική παραγωγή και την επισήμανση των βιολογικών προϊόντων. Η χρήση του κοινοτικού λογότυπου βιολογικής παραγωγής "Ε.Ε- βιολογικό" καθίσταται υποχρεωτική, επιτρέπεται όμως να χρησιμοποιούνται και κρατικά ή ιδιωτικά λογότυπα τα οποία έχουν επίσημη αναγνώριση από τις αρμόδιες αρχές της κάθε χώρας μέλους.

Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 834/2007 στοχεύει στη δημιουργία μιας αειφόρου διαχείρισης της παραγωγής η οποία σέβεται τα συστήματα και την φύση, διατηρεί και βελτιώνει την κατάσταση των φυσικών πόρων και την ισορροπία μεταξύ αυτών. Επιπλέον, συμβάλλει στη διατήρηση ενός υψηλού επιπέδου βιοποικιλότητας και κάνει υπεύθυνη χρήση των ενεργειακών και των φυσικών πόρων. Ενώ παράλληλα, ανταποκρίνεται σε υψηλού επιπέδου πρότυπα μεταχείρισης των ζώων και ειδικότερα ικανοποιεί τις ιδιαίτερες ανάγκες των διάφορων ειδών.

Στις αρχές της βιολογικής υδατοκαλλιέργειας οι Ευρωπαίοι εκτροφείς είχαν στην διάθεσή τους μια σειρά από πρότυπα τα οποία βασίζονται σε ορισμένες γενικές αρχές, όπως, για παράδειγμα, η προστασία του περιβάλλοντος, η χρησιμοποίηση ειδικά διαμορφωμένων τροφίμων, ο σεβασμός της καλής διαβίωσης των ζώων, οι κατάλληλες ιατρικές θεραπείες και ο αποκλεισμός οποιασδήποτε γενετικής χειραγώγησης. Ένα σημαντικό βήμα προς την κατεύθυνση της τυποποίησης των διαφορετικών προτύπων έγινε τον Σεπτέμβριο του 2005 , όταν κατά τη διάρκεια της Συνέλευσης της IFOAM (Διεθνής Ομοσπονδία Κινημάτων Βιολογικής Γεωργίας) εγκρίθηκαν τα βασικά πρότυπα για τη βιολογική υδατοκαλλιέργεια. Όμως η πραγματική αλλαγή πραγματοποιήθηκε με την έναρξη της ισχύος του Κανονισμού (ΕΟΚ) 710 του 2009, που αφορά την παραγωγή βιολογικής υδατοκαλλιέργειας ζώων και θαλάσσιων φυκών (Lembo & Mente, 2019).

Για τις ελληνικές υδατοκαλλιέργειες πολλές δυνατότητες δημιουργούνται με τον νέο Κανονισμό (ΕΟΚ) 710/2009 για την βιολογική ιχθυοκαλλιέργεια, που τέθηκε σε εφαρμογή στις 5 Αυγούστου 2009. Πλέον, η νομοθεσία για την βιολογική παραγωγή και τα βιολογικά προϊόντα που μέχρι τώρα κάλυπτε τη φυτική και ζωική παραγωγή, την μεταποίηση, τις ζωοτροφές, επεκτείνεται και καλύπτει την βιολογική ιχθυοκαλλιέργεια και την παραγωγή φυκών. Η επέκταση της νομοθεσίας για την βιολογική παραγωγή και στις ιχθυοκαλλιέργειες αποτελεί πολύ σημαντικό γεγονός για την παραγωγή ασφαλών και ταυτόχρονα υψηλής ποιότητας προϊόντων με ελάχιστες επιπτώσεις στο υδάτινο περιβάλλον.

Οι γενικές αρχές της βιολογικής παραγωγής, όπως θα εφαρμόζονται και στην βιολογική ιχθυοκαλλιέργεια βασίζονται στον κατάλληλο σχεδιασμό και διαχείριση των βιολογικών διεργασιών βάσει οικολογικών συστημάτων τα οποία αξιοποιούν του φυσικούς πόρους κάθε οικοσυστήματος με μεθόδους σύμφωνα με την αρχή της αειφόρου εκμετάλλευσης της αλιείας. Προβλέπεται επίσης, ότι η βιολογική ιχθυοκαλλιέργεια πρέπει να διαφυλάσσει τη βιοποικιλότητα των φυσικών υδατικών οικοσυστημάτων. Η τεχνική διευκόλυνσης της αναπαραγωγής με την βοήθεια ορμονών ή παραγώγων τους δεν είναι συμβατή με τις αρχές της βιολογικής παραγωγής, συνεπώς οι ουσίες αυτές δεν χρησιμοποιούνται. Οι πρώτες ύλες για την διατροφή των ιχθύων πρέπει, κατά προτίμηση, να προέρχονται από βιώσιμη αλιευτική εκμετάλλευση, ενώ η διαχείριση της υγείας τους πρέπει να βασίζεται στην πρόληψη των ασθενειών (Van de Meer M et.al., 2001).

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 710/2009 ο τομέας της βιολογικής υδατοκαλλιέργειας έχει επίσημη μορφή ώστε να εξασφαλίσει στους καταναλωτές ένα πιστοποιημένο προϊόν που να ανταποκρίνεται στις ανάγκες τους. Ο νέος κανονισμός αφορά τη θέσπιση κανόνων για την βιολογική παραγωγή ζώων υδατοκαλλιέργειας και φυκών και αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για την ανάπτυξη της βιώσιμης βιολογικής υδατοκαλλιέργειας. Ειδικότερα, καθορίζει κανόνες για την διατροφή των ιχθύων, την παρασκευή και προέλευση των ιχθυοτροφών, την διαχείριση της υγείας των ψαριών που πρέπει να βασίζεται αρχικά στην πρόληψη των ασθενειών, και γενικότερα την παραγωγή των ζώων υδατοκαλλιέργειας και φυκιών. Η βιολογική πιστοποίηση αναφέρεται στην παραγωγική διαδικασία, και όχι σε ποιότητα προϊόντος. Η βιολογική παραγωγή τροφής προωθεί τη βιοποικιλότητα, τους βιολογικούς κύκλους και τη βιολογική δραστηριότητα. Από την άλλη πλευρά, ενθαρρύνει τη συντήρηση του οικοσυστήματος, με τον περιορισμό της εισαγωγής βλαβερών ουσιών που μειώνουν ή μεταβάλλουν τη συνδεσιμότητα των συστατικών του περιβάλλοντος. Λαμβάνοντας μέτρα για τη μείωση του στρες, την ελευθερία κίνησης, τη παροχή βιολογικώς πιστοποιημένης τροφής, βελτιστοποιείται η υγεία των ζώων μειώνοντας την εξάρτηση από τα φάρμακα, περιλαμβάνοντας και τα αντιβιοτικά (Lembo & Mente, 2019).

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΕ) 2020/1963 της 11ης Νοεμβρίου 2020 (σχετικά με την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΕ) 2018/848 για τη βιολογική παραγωγή και την επισήμανση των βιολογικών προϊόντων όσον αφορά την ημερομηνία εφαρμογής του και ορισμένες άλλες ημερομηνίες που αναφέρονται στον εν λόγω κανονισμό) καθορίζονται οι αρχές της βιολογικής παραγωγής και θεσπίζονται κανόνες σχετικά με τη βιολογική παραγωγή, τη σχετιζόμενη πιστοποίηση και τη χρήση σχετικών με τη βιολογική παραγωγή ενδείξεων στην επισήμανση και στη διαφήμιση, καθώς και κανόνες σχετικά με ελέγχους επιπρόσθετους όσων ορίζονται στον κανονισμό (ΕΕ) 2017/625. Ορίζεται η βιολογική παραγωγή, η οποία σύμφωνα με τον κανονισμό είναι η χρήση μεθόδων παραγωγής σύμφωνα με τον παρόντα κανονισμό σε όλα τα στάδια παραγωγής, παρασκευής και διανομής, ακόμη και κατά τη διάρκεια της περιόδου μετατροπής που αναφέρεται στο άρθρο 10. Καθώς και το βιολογικό προϊόν, το οποίο προέρχεται από βιολογική παραγωγή, εξαιρουμένων των προϊόντων που παράγονται κατά τη διάρκεια της περιόδου μετατροπής που αναφέρεται στο άρθρο 10. Οι μη εκτρεφόμενοι ιχθύες ή τα θηράματα δεν θεωρούνται βιολογικά προϊόντα.

Η βιολογική παραγωγή επιδιώκει τους ακόλουθους γενικούς στόχου: α) να συμβάλει στην προστασία του περιβάλλοντος και του κλίματος, β) να διατηρήσει τη μακροχρόνια γονιμότητα των εδαφών, γ) να συμβάλει σε υψηλό επίπεδο βιοποικιλότητας, δ) να συμβάλει σημαντικά σε ένα μη τοξικό περιβάλλον, ε) να συμβάλει σε υψηλού επιπέδου πρότυπα σχετικά με τις συνθήκες διαβίωσης των ζώων και, ειδικότερα, να ικανοποιεί τις ιδιαίτερες ανάγκες συμπεριφοράς των διαφόρων ειδών ζώων, στ) να προωθήσει τους βραχείς διαύλους διανομής και την τοπική παραγωγή στις διάφορες περιοχές της Ένωσης, ζ) να ενθαρρύνει τη διατήρηση των σπάνιων και αυτόχθονων φυλών που απειλούνται με εξαφάνιση, η) να συμβάλει στην ανάπτυξη της προμήθειας φυτικού γενετικού υλικού προσαρμοσμένου στις ειδικές ανάγκες και επιδιώξεις της βιολογικής γεωργίας, θ) να συμβάλει σε υψηλό επίπεδο βιοποικιλότητας, ιδίως με τη χρήση ποικίλου φυτικού γενετικού υλικού, όπως βιολογικού ετερογενούς υλικού και βιολογικών ποικιλιών τα οποία είναι κατάλληλα για τη βιολογική παραγωγή, ι) να προωθήσει την ανάπτυξη των δραστηριοτήτων βιολογικής αναπαραγωγής φυτών με στόχο τη συμβολή στην ανάπτυξη ευνοϊκών οικονομικών προοπτικών για τον βιολογικό τομέα (Κανονισμό (ΕΕ) 2020/1963).

1.2.3. Τι ορίζεται ως βιολογικό ψάρι

Η βιολογική υδατοκαλλιέργεια εντάσσεται στα πλαίσια της αειφορικής ανάπτυξης και της εφαρμογής των αρχών της υδατοκαλλιέργειας, δηλαδή βιώσιμης και φιλικής προς το περιβάλλον, με καλής ποιότητας τελικό προϊόν και συμβολή στην τοπική ανάπτυξη. Η βιολογική ιχθυοκαλλιέργεια είναι η βιολογική εκτροφή ιχθύων βάση συγκεκριμένων προτύπων και προδιαγραφών. Στοχεύει σε ένα σύστημα αειφόρου διαχείρισης το οποίο σέβεται το περιβάλλον, τα συστήματα και τους κύκλους της φύσης, τη διατήρηση και βελτίωση της κατάστασης του εδάφους, την υπεύθυνη χρήση των ενεργειακών και των φυσικών πόρων ειδικότερα του νερού και του αέρα καθώς και ανακύκλωση των αποβλήτων και των παραπροϊόντων ζωικής και φυτικής προέλευσης. Με την βιολογική υδατοκαλλιέργεια γίνεται τήρηση υψηλού επιπέδου προτύπων μεταχείρισης των ζώων ειδικότερα στην ικανοποίηση των ιδιαίτερων αναγκών συμπεριφοράς, με στόχο τη συμβολή σε υψηλό επίπεδο βιοποικιλότητας. Επιπλέον στοχεύει στην παραγωγή προϊόντων υψηλής ποιότητας, αποκλείοντας τη χορήγηση Γενετικά Τροποποιημένων Ουσιών (ΓΤΟ) (Lembo & Mente, 2019).

Η παραγωγή του βιολογικού ψαριού απαιτεί τον έλεγχο όλης της διαδικασίας παραγωγής από τα αυγά έως τα ενήλικα ψάρια συμπεριλαμβανομένου των ζωοτροφών και της ποιότητας του νερού. Το ελεύθερο άγριο ψάρι, δεν μπορεί να θεωρηθεί βιολογικό ψάρι καθώς υπάρχει αδυναμία να ελεγχθεί ο κύκλος ζωής του και επομένως δεν μπορεί να του δοθεί πιστοποίηση. Η άριστη ποιότητα νερού χωρίς την παρουσία χημικών ή άλλων ουσιών είναι βασική αρχή των βιολογικών εκτρεφόμενων ιχθύων, δεδομένου ότι αν αυτό είναι επιβαρυμένο υπάρχει κίνδυνος ακόμα και για την επιβίωσή τους, έτσι είναι απαραίτητο να παρακολουθείται συνεχώς η ποιότητα του νερού. Το ίδιο ακριβώς ισχύει και για τη χορηγούμενη τροφή, η οποία θα πρέπει να είναι πιστοποιημένη βιολογική ή τα συστατικά της να είναι φυσικής προέλευσης. Η χρήση αντιβιοτικών απαγορεύεται, ενώ επιτρέπονται μόνο οι εμβολιασμοί για ασθένειες ενδημικές που μπορεί να υπάρχουν σε κάθε χώρα (Pagliarino et al., 2012)..

Η αργή αρχική ανάπτυξη της βιολογικής υδατοκαλλιέργειας οφείλεται στην απουσία διεθνών και παγκόσμιων αποδεχόμενων κανονισμών και κριτηρίων για την παραγωγή των βιολογικών προϊόντων υδατοκαλλιέργειας. Η βιολογική παραγωγή τροφής προωθεί τη βιοποικιλότητα, τους βιολογικούς κύκλους και τη βιολογική δραστηριότητα. Από την άλλη πλευρά, ενθαρρύνει τη συντήρηση του οικοσυστήματος, με τον περιορισμό της εισαγωγής βλαβερών ουσιών που μειώνουν ή μεταβάλλουν τη συνδεσιμότητα των συστατικών του περιβάλλοντος. Λαμβάνοντας μέτρα για τη μείωση του στρες, την ελευθερία κίνησης, τη παροχή βιολογικώς πιστοποιημένης τροφής, βελτιστοποιείται η υγεία των ζώων μειώνοντας την εξάρτηση από τα φάρμακα, περιλαμβάνοντας και τα αντιβιοτικά (Lembo & Mente 2019).

Παρά το γεγονός ότι η βιολογική υδατοκαλλιέργεια αποτελεί σήμερα μόνο ένα μικρό τμήμα της παγκόσμιας παραγωγής των υδατοκαλλιεργειών, με την έγκριση των Κανονισμών (ΕΟΚ) 834/2007 και 710/2009 για τη βιολογική παραγωγή και την επισήμανση των βιολογικών προϊόντων, έχουν ανοίξει οι προοπτικές της αγοράς με εξαιρετικό ενδιαφέρον σε Ευρωπαϊκό επίπεδο (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων).

1.2.4. Βιολογική και συμβατική υδατοκαλλιέργεια

Η διαχείριση ενός βιολογικού ιχθυοτροφείου εμπλέκει πολύ περισσότερα τεχνάσματα, επιβάλλοντας περιορισμούς που είναι απαραίτητο να εφαρμόζονται, για να πιστοποιηθούν τα προϊόντα τους ως βιολογικά. Ειδικότερα, σε μια βιολογική εκμετάλλευση η αξιολόγηση της ποιότητας της θέσης, των περιβαλλοντικών κινδύνων και της εδαφικής κατανομής είναι θεμελιώδη. Τα αυγά και ο γόνος που χρησιμοποιούνται πρέπει να προέρχονται από βιολογικές εκμεταλλεύσεις, η πυκνότητα των ψαριών στην βιολογική εκτροφή είναι μικρότερη από εκείνη της συμβατικής, η διατροφή που δίνεται στα ψάρια πρέπει να προέρχεται από βιολογικές καλλιέργειες, απαγορεύεται η χρήση προληπτικών και θεραπευτικών ουσιών και για την φροντίδα των ψαριών χρησιμοποιούνται μόνο φυσικές ουσίες και ομοιοπαθητικά κτηνιατρικά φαρμακευτικά προϊόντα και τέλος ενώ στη συμβατική αναπαραγωγή η διαδικασία πιστοποίησης είναι προαιρετική, στη βιολογική γίνεται υποχρεωτική (Russo et.al., 2012).

Η βιολογική υδατοκαλλιέργεια διαφέρει από τη συμβατική μεθοδολογία γιατί πληροί ορισμένες περιβαλλοντικές προδιαγραφές, όπως η χρήση των φυτικών ζωοτροφών που προέρχονται αποκλειστικά και μόνο από βιολογικές καλλιέργειες. Η βιολογική υδατοκαλλιέργεια θα πρέπει να θεωρηθεί ως μια ευκαιρία και όχι ως ανταγωνιστής της συμβατικής παραγωγής, δεδομένου ότι απευθύνεται και μπορεί να ικανοποιήσει ένα πολύ συγκεκριμένο τύπο καταναλωτών. Ένα πλεονέκτημα των βιολογικών ψαριών είναι και ο τρόπος με τον οποίο αναπτύσσονται, αφού στους κλωβούς ο αριθμός των ψαριών είναι μικρός, με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται πιο σωστά. Η βιολογική παραγωγή εκτροφής διαφέρει από την συμβατική γιατί έχει μικρότερη πυκνότητα εκτροφής, μεγαλύτερο σεβασμό στο περιβάλλον και στην ποιότητα των νερών και για την μη χρήση ζωοτροφών και χημικών ουσιών που περιέχουν γενετικά τροποποιημένες ουσίες.

Οι βιολογικοί τρόποι παραγωγής ελέγχονται και πιστοποιούνται από ανεξάρτητους φορείς εξουσιοδοτημένους από το Υπουργείο Γεωργίας. Τα βιολογικά ψάρια κοστίζουν έως και 100% ακριβότερα από τα συμβατικά. Έτσι την ίδια στιγμή που ένα κιλό συμβατικής τσιπούρας κοστίζει (σε τιμές χονδρικής) 4,5 ευρώ το κιλό, η βιολογική φτάνει ακόμα και τα 9 ευρώ, ενώ στο λαβράκι η τιμή του συμβατικού κυμαίνεται από 5 ευρώ έως και 5,5 ευρώ το κιλό και του βιολογικού από 10 έως 11 ευρώ. Η μεγάλη διαφορά στην τιμή αποτελεί άλλωστε και το λόγο για τον οποίοι οι επιχειρήσεις προβληματίζονται για το μέγεθος των επενδύσεων τους στο τομέα της βιολογικής παραγωγής καθώς δεν είναι ακόμα βέβαιοι ότι μεγάλες παραγωγές μπορούν να απορροφηθούν από την αγορά.

1.3 Διατροφή και υδατοκαλλιέργεια

Στην υδατοκαλλιέργεια το σύστημα διατροφής και η τροφή που χρησιμοποιείται αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο κόστος εξόδων και είναι πολύ σημαντικό για την επιβίωση των ιχθύων. Τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια είναι κύριες πηγές πρωτεϊνών και λιπιδίων που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των ζωοτροφών στην βιομηχανία της υδατοκαλλιέργειας. Σήμερα, η προμήθεια ποσότητας ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίου σε ιχθυοτροφές έχει μειωθεί σημαντικά. Αυτό οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, κυρίως όμως στην μείωση των αλιευμάτων με αποτέλεσμα την αύξηση του κόστους ιχθυαλεύρου και ιχθυελαίου (Hodar et al., 2020). Στην ιχθυοκαλλιέργεια, η διατροφή είναι κρίσιμη, επειδή οι ιχθυοτροφές αντιπροσωπεύουν περίπου το 60% του κόστους παραγωγής.

Η τροφή των υδρόβιων οργανισμών θα πρέπει να ανταποκρίνεται πλήρως στην κάλυψη των θρεπτικών αναγκών των ψαριών για τη μεγιστοποίηση της σωματικής ανάπτυξης, να διασφαλίζει την καλή υγεία τους, να οδηγεί στην επιθυμητή ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων τους (υψηλής θρεπτικής αξίας εδώδιμης σάρκας, καλής ποιότητας αυγά και σπέρμα), να είναι ελκυστική και εύπεπτη, και παράλληλα να παράγεται με το χαμηλότερο δυνατό κόστος (Jackson, 2006). Η υδατοκαλλιέργεια χρησιμοποιεί ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια όχι μόνο σε σαρκοφάγα και παμφάγα είδη αλλά και σε φυτοφάγα, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια της ζωής τους, όταν η απαίτηση σε πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα υψηλή (Jackson, 2009).

Σε παγκόσμια κλίμακα η χρήση των ιχθυελαίων και ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές είναι ευρύτατη (Jackson, 2006). Οι άγριοι πληθυσμοί ψαριών οι οποίοι δεν καταναλώνονται άμεσα από τον άνθρωπο χρησιμοποιούνται ως συστατικά των ιχθυελαίων και ιχθυαλεύρων. Τα σιτηρέσια αυτά αποτελούν τα βασικά συστατικά της διατροφής των εκτρεφόμενων ειδών στις υδατοκαλλιέργειες. Στη διατροφή των υδρόβιων οργανισμών των υδατοκαλλιεργειών και των ψαριών υψηλού τροφικού επιπέδου, σαρκοφάγων ειδών, όπως η τσιπούρα (*Sparus aurata)*, το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και η πέστροφα (*Oncorchyncus mykiss*), είναι απαραίτητο να περιλαμβάνεται μεγάλος όγκος τροφής υψηλής βιολογικής αξίας. Για την σωστή ανάπτυξη των ιχθύων είναι σημαντική η περιεκτικότητα και η ποσότητα των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών (Schipp, 2008).

Τα ιχθυάλευρα αποτελούν υψηλής ποιότητας τροφή και εύπεπτο συστατικό στις ζωοτροφές, τα οποία χρησιμοποιούνται στα σιτηρέσια πολλών εκτρεφόμενων ζώων. Περιέχουν ιδανική σύνθεση σε αμινοξέα, παρέχοντας αρκετά καλή ποιότητα πρωτεϊνών για τα περισσότερα καλλιεργούμενα είδη ψαριών, είναι εύγευστα και ενισχύουν την απορρόφηση, ενώ το ιχθυέλαιο αποτελεί επίσης σημαντική πηγή λιπαρών οξέων (Jackson, 2006).

Οι πρωτεΐνες που προέρχονται από ιχθύες συμβάλλουν κατά 16% στην κατανάλωση ζωικών πρωτείων από τον άνθρωπο σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό τροφίμων και γεωργίας (FAO, 2012). Η σωστή εκτροφή των οργανισμών παίζει καθοριστικό ρόλο στην διαβίωση τους καθώς επηρεάζει σημαντικά την απόκρισή τους στο στρες, την υγεία τους και την αντοχή τους σε ασθένειες (Ashley, 2007). Συνεπώς, η βελτίωση της βιομηχανίας των υδατοκαλλιεργειών θα συμβάλει στην καλύτερη παραγωγή των ιχθύων. Σε συνθήκες εντατικής και ημι-εντατικής καλλιέργειας τα ψάρια υπόκεινται σε αυξημένη καταπόνηση εξαιτίας περιβαλλοντικών παραγόντων και υγειονομικών συνθηκών. Παράλληλα, η διατροφή είναι πολύ σημαντική στην εκτροφή των ιχθύων και δεν πρέπει να θεωρείται ως μια απλή διαδικασία ταΐσματος των οργανισμών. Αντίθετα, η διατροφή είναι μια αλληλεπίδραση της θρεπτικής ουσίας με τους ζωντανούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης των ιχθυοτροφών, της κατάποσης, της απελευθέρωσης ενέργειας, της απομάκρυνσης των αποβλήτων, της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής. Οι ιχθυοτροφές περιέχουν την ενέργεια και τα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και την υγεία των υδρόβιων ζώων. Οι ανεπάρκειες ή οι υπερβολές σε κάποια θρεπτικά συστατικά μπορούν να μειώσουν την ανάπτυξη ή να οδηγήσουν σε ασθένειες (Craig et al., 2017).

Η ανάπτυξη, η υγεία και η αναπαραγωγή των ψαριών εξαρτώνται κυρίως από την παρουσία των θρεπτικών ουσιών που λαμβάνουν μέσω της διατροφής τους. Επιπλέον, παράγοντες όπως η σύνθεση της τροφής, η σίτιση, το σύστημα χορήγησης διατροφής και το σύστημα εκτροφής επηρεάζουν τη σύνθεση της σάρκας ψαριού και την ποιότητα του τελικού προϊόντος, τη περιεκτικότητα σε λιπίδια και τη σύνθεση λιπαρών οξέων (Trichet, 2010). Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και η σύνθεση της φαίνεται να είναι προκαθορισμένες για κάθε είδος ανεξάρτητα από την περιεκτικότητα των συστατικών της δίαιτας ή τον τρόπο σίτισης (Shearer, 2001). Στην βιομηχανία παραγωγής ζωικών προϊόντων η σωστή διατροφή είναι απαραίτητη για την οικονομική παραγωγή ενός υγιούς και υψηλής ποιότητας προϊόντος (Craig et al. 2017). Η διατροφή των ψαριών με δίαιτες που δεν πληρούν τις θρεπτικές τους απαιτήσεις, δεν επηρεάζει μόνο την αύξηση των οργανισμών αλλά επιδρά στην ευαισθησία τους έναντι σε ασθένειες, μεταβάλλει την συμπεριφορά τους αλλά και προκαλεί διάφορα παθολογικά συμπτώματα. Συχνά, η θερμοκρασία του νερού φαίνεται να επηρεάζει τα αποτελέσματα νηστείας για τα περισσότερα είδη υδατοκαλλιέργειας (Rasmussen, 2001).

Καθώς υδατοκαλλιέργειες βρίσκονται σε μια σταθερά ανοδική πορεία τις τελευταίες δεκαετίες σε παγκόσμιο επίπεδο, η παραγωγή αυξάνεται ολοένα και περισσότερο. Παράλληλα, η συνεχόμενη αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού και η επακόλουθη αυξημένη ανάγκη για παραγωγή τροφής έχουν δημιουργήσει μια τεράστια πίεση στις υδατοκαλλιέργειες για μεγιστοποίηση της παραγωγής της. Εκτιμάται ότι ο ανθρώπινος πληθυσμός θα ξεπεράσει τα 9,8 δισεκατομμύρια μέχρι το 2050 (UNDESA, 2020). Κάποιοι παράγοντες οι οποίοι οδήγησαν στην μείωση της παραγωγής ιχθυαλεύρου με αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής τους είναι η υποβάθμιση του θαλάσσιου περιβάλλοντος, η μείωση των ιχθυοαποθεμάτων εξαιτίας της υπεραλίευσης και η αυξημένη ζήτηση των προϊόντων λόγω ραγδαίας αύξησης του πληθυσμού. Οι παράγοντες αυτοί έχουν δημιουργήσει μια ανάγκη για παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων σιτηρεσίων που θα χρησιμοποιηθούν ως τροφή στα διάφορα εκτρεφόμενα είδη (Sanchez-Muros et al., 2014). Η βιομηχανία παραγωγής ιχθυοτροφών στις υδατοκαλλιέργειες χρησιμοποιεί μεγάλο ποσοστό της παγκόσμιας παραγωγής ιχθυαλεύρων. Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη την ολοένα αυξανόμενη και έντονη πίεση που ασκείται στις υδατοκαλλιέργειες για παραγωγή τροφής, η έρευνα έχει στραφεί πλέον στην αναζήτηση εναλλακτικών πηγών πρωτεϊνών, ικανών να αντικαταστήσουν τα άλευρα και τα έλαια που χρησιμοποιούνται σήμερα ευρύτατα αλλά με μη αειφορικό τρόπο.

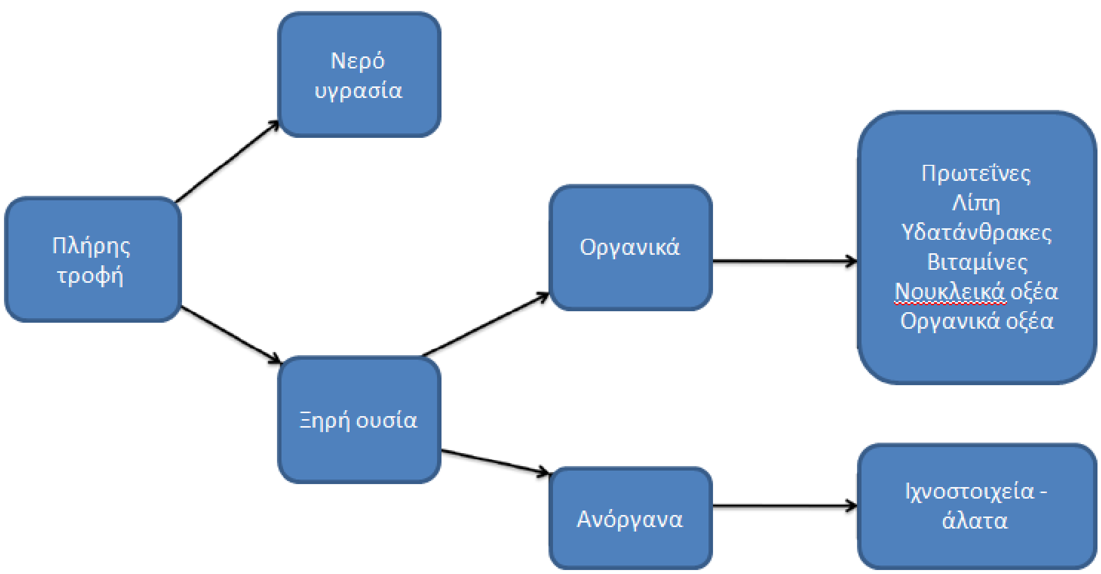
Εάν συγκρίνουμε τις τροφές της υδατοκαλλιέργειας με τις ζωοτροφές εκτρεφόμενων ειδών της κτηνοτροφίας, παρατηρείται πως η υδατοκαλλιέργεια χρησιμοποιεί πολύ μεγαλύτερο ποσοστό ιχθυαλεύρων, το οποίο προσαρμόζεται ανάλογα με το εκτρεφόμενο είδος και τις τροφικές του συνήθειες στο φυσικό περιβάλλον. Εάν ένα είδος είναι σαρκοφάγο τότε το ποσοστό ιχθυαλεύρου είναι υψηλότερο σε σύγκριση με φυτοφάγους οργανισμούς (Martin, 1999). Υπάρχουν πολλές πηγές πρωτεϊνών που έχουν τη δυνατότητα αντικατάστασης των ιχθυαλεύρων χωρίς να επηρεάζεται η ανάπτυξη και η αύξηση των ψαριών (Tacon & Metian, 2009). Στις εναλλακτικές πρωτεΐνες περιλαμβάνονται ζωικές πηγές πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των εντομοαλεύρων, αλλά και πολλές φυτικές πηγές πρωτεϊνών (Anastasiou & Nengas, 2005).

Με τις καινοτόμες πρώτες ύλες θεωρούνται όλες οι νέες και πρωτοποριακές πρώτες ύλες ή ακόμη και ο τρόπος επεξεργασίας μίας νέας πρώτης ύλης ή ήδη υπάρχουσας στη βιομηχανία παραγωγής ιχθυοτρόφων. Καινοτόμες πρώτες ύλες, μπορούν να χαρακτηριστούν η βακτηριακή πρωτεΐνη, τα μικροφύκη, τα εντομάλευρα, η πρωτεΐνη μαγιάς κ.α. Υπάρχει μεγάλο εύρος συστατικών με προοπτική να αντικαταστήσουν το ιχθυάλευρο στα σιτηρέσια των εκτρεφόμενων ιχθύων. Τέτοια συστατικά μπορούν να παραχθούν από μικροβιακούς οργανισμούς (βακτήρια, μύκητες, μικροφύκη), άγριες και εκτρεφόμενες προνύμφες, λάρβες/νύμφες εντόμων και γαστερόποδα (σαλιγκάρια) (Biswas et al., 2020). Η βακτηριακή πρωτεΐνη είναι μια μονοκυτταρική και παράγεται με μέθοδο φυσικής ζύμωσης, παρόμοια με την παραγωγή μαγιάς. Τα μικρόβια παράγουν μια θρεπτική τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (71%) και χαμηλού λίπους (10%), η οποία αποτελεί μια βιώσιμη εναλλακτική λύση για την βιομηχανία παραγωγής ιχθυοτροφών.

Τα μικροφύκη αποτελούν μια άλλη πηγή με δυναμική να ενταχθεί ως βοηθητική πηγή πρωτεΐνης. Τα μικροφύκη είναι αρχή της τροφικής αλυσίδας στους ωκεανούς καθώς αποτελούν τροφή για το ζωοπλαγκτόν και αυτό με τη σειρά του τροφή για τους ιχθύες. Είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στο φυσικό περιβάλλον και αποτελούν τη φυσική τροφή πολλών υδρόβιων οργανισμών. Παρέχουν υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών, λίπους, έχουν ισορροπημένο προφίλ αμινοξέων, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες καθώς καροτενοείδη και στερόλες, ωστόσο η χημική σύσταση των μικροφυκών διαφέρει ως προς το είδος και τις συνθήκες καλλιέργειας (Skrede et al., 2011). Τα απολιπομένα προϊόντα μικροφυκών έχουν μειωμένα επίπεδα ω3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ωστόσο διατηρούν πολύτιμα θρεπτικά συστατικά που τα καθιστούν ικανά να αντικαταστήσουν το ιχθυάλευρο.

1.4 Τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά

Ο οργανισμός των ιχθύων δεν μπορεί να συνθέσει σε επαρκείς ποσότητες όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά όπως είναι τα αμινοξέα (EAA), τα λιπαρά οξέα (FAS), τα ανόργανα συστατικά και τις βιταμίνες, για αυτό το λόγο θα πρέπει να λαμβάνονται από τη διατροφή. Η χημική ενέργεια των τροφίμων παράγεται κυρίως από την οξείδωση πρωτεϊνών, υδατανθράκων και λιπιδίων στα κύτταρα του σώματος ως τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) (Lall & Dumas, 2015). Η σίτιση των εκτρεφόμενων ειδών γίνεται κατά κύριο λόγο με κατάλληλα επεξεργασμένες ιχθυοτροφές οι οποίες είναι ειδικές για κάθε είδος. Οι ιχθυοτροφές πρέπει να παρασκευάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτουν τις απαιτήσεις του κάθε οργανισμού. Η θρεπτική ουσία, είναι το χημικό στοιχείο ή ενώσεις αυτών, τις οποίες μπορεί να χρησιμοποιήσει ένας οργανισμός με σκοπό να καλύψει τις ανάγκες του μεταβολισμού και της αύξησης του. Οι τροφές περιέχουν μία σειρά χημικών ουσιών που μπορούν να ταξινομηθούν σε κατηγορίες ανάλογα με τη σύνθεση, τις ιδιότητες και την λειτουργία τους (*Εικόνα 4*). Όλες οι τροφές περιέχουν ένα ποσοστό υγρασίας, οπότε μία αρχική διαίρεση μπορεί να περιλαμβάνει τον διαχωρισμό των συστατικών σε υγρασία και ξηρή ύλη, η οποία με τη σειρά της χωρίζεται σε οργανικό και ανόργανο υλικό (Houlihan et al., 2008).



Εικόνα 4. Ιεραρχική υποδιαίρεση της τροφής διαχωρίζοντας τα κύρια χημικά συστατικά. Μορφοποίηση εικόνας από Houlihan, 2008.

1.4.1 Πρωτεΐνες και αμινοξέα

Τα δομικά συστατικά των πρωτεϊνών αποτελούν τα αμινοξέα (AA) και είναι απαραίτητο να υπάρχουν στα κύτταρα για να γίνει η σύνθεση των πολυπεπτιδίων. Οι πρωτεϊνικές απαιτήσεις στους οργανισμούς δεν είναι συγκεκριμένες, ωστόσο τα αμινοξέα είναι απαραίτητα με σκοπό την σύνθεση των πρωτεϊνών. Η σωστή ανάπτυξη, η ευζωία, η αύξηση και η επιβίωση των οργανισμών επιτυγχάνεται με την επαρκή παροχή των αμινοξέων (Ren *et al*., 2012). Η σύνθεση τους εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του υποστρώματος, το είδος, το αναπτυξιακό στάδιο, τη φυσιολογική κατάσταση, το μικροβίωμα του εντέρου, τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και τις παθολογικές καταστάσεις. Η ισορροπία των αμινοξέων στις δίαιτες αποτελεί σημαντικό κομμάτι για τη πρόσληψη των πρωτεϊνών (Wu et al., 2013).

Τα αμινοξέα έχουν ταξινομηθεί ως θρεπτικά απαραίτητα ή μη απαραίτητα για τα θηλαστικά, τα πτηνά και τα ψάρια (Le Plenier *et al.*, 2012). Ως απαραίτητα αμινοξέα ορίζονται εκείνα τα οποία δεν συντίθενται από τα κύτταρα του οργανισμού de novo, ή αν συντίθενται η ποσότητα δεν είναι επαρκής ώστε να καλύψει τις ανάγκες του οργανισμού, με αποτέλεσμα να πρέπει να ληφθούν μέσω της τροφής. Σε αντίθεση, με τα μη απαραίτητα αμινοξέα, τα οποία συντίθενται de novo σε επαρκείς ποσότητες από τα κύτταρα του οργανισμού καλύπτοντας τις ανάγκες του (Wu et al., 2013).

Τα ψάρια, όπως όλα τα ζώα, έχουν ανάγκη από ένα σωστό ισορροπημένο μίγμα απαραίτητων και μη απαραίτητων αμινοξέων ενώ χρειάζονται υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης σε σχέση με τα χερσαία ζώα. Η διατροφική αξία μιας πηγής πρωτεΐνης προσδιορίζεται από την ποσότητα της πρωτεΐνης, τη σύσταση των αμινοξέων αλλά και από την ύπαρξη ή μη αντι-διαιτητικών παραγόντων (Watanabe, 2002). Τα βασικά αμινοξέα που πρέπει να υπάρχουν στη διατροφή των ψαριών, όπως παρουσιάζονται και στον Πίνακα 1, είναι τα ακόλουθα: αργινίνη, ιστιδίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, θρεονίνη, τρυπτοφάνη και βαλίνη. Η ισορροπημένη σύσταση των αμινοξέων στα ιχθυάλευρα συμβάλλει ώστε να χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα πρωτεΐνης στις ιχθυοτροφές (Mile & Chapman, 2006). Εκτός από αυτά τα δέκα, άλλα δύο αμινοξέα θεωρούνται ημι-απαραίτητα, η κυστίνη και η τυροσίνη, καθώς μπορούν να συντεθούν μόνο από τα πρόδρομά τους, μεθειονίνη και φαινυλαλανίνη αντίστοιχα (Wilson, 2003). Ωστόσο, τα απαραίτητα αμινοξέα δεν διατηρούν την ισορροπία του σωματικού αζώτου, γι’ αυτό χρειάζεται και μία πηγή μη απαραίτητων αμινοξέων, όπως η γλυκίνη και η αλανίνη (Yu et al., 1985). Τα βιβλία διατροφής των ζώων δεν θεωρούν την κυστεΐνη και την τυροσίνη ως EAA (Wu, 2014) διότι μπορούν να συντεθούν από την μεθειονίνη και την φαινυλαλανίνη στο ήπαρ, αντίστοιχα. Το άθροισμα των EAA συνήθως αντιστοιχεί στο 30% του συνολικού ποσοστού των πρωτεϊνών που απαιτούνται (Cowey, 1995). Όμως οι δίαιτες δεν πρέπει να έχουν αναλογία EAA/NEAA 30:70 καθώς αυτό έχει αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη τους. Για την ικανοποιητική απόδοση πρωτεϊνών η αναλογία αυτή πρέπει να είναι περίπου 50-60:50-40 (Peres & Oliva, 2006). Το ποσοστό πρωτεϊνικής απαίτησης στα ψάρια δεν είναι απόλυτο, αλλά εξαρτάται από την πηγή προέλευσης της πρωτεΐνης, το προφίλ των αμινοξέων και το ποσοστό της ενέργειας που περικλείει.

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των αμινοξέων ως διατροφικά απαραίτητα (EAA), μη απαραίτητη (NEAA) και υπό όρους απαραίτητα αμινοξέα (CEAA) των ιχθύων (Wu et al. 2013).

EAA	NEAA	CEAA
Arg	Ala	Gln
Cys	Asn	Glu
His	Asp	Gly
Ile	Ser	Tau
Leu		
Lys		
Met		
Phe		
Pro		
Thr		
Trp		
Tyr		
Val		

1.4.2 Λιπίδια και Υδατάνθρακες

Τα λιπίδια αποτελούν κατά κανόνα περίπου το 7-15% της διατροφής των ψαριών, παρέχουν απαραίτητα λιπαρά οξέα και χρησιμεύουν για την μεταφορά των βιταμινών στους οργανισμούς (Craig et al., 2017). Τα απλά λιπίδια περιλαμβάνουν λιπαρά οξέα και τριακυγλυκερόλες. Τα λιπαρά οξέα αποτελούν τις κύριες δομικές μονάδες όλων των λιπιδίων, με εξαίρεση τη χοληστερόλη. Η παραγωγή μεταβολικής ενέργειας είναι μια από τις βασικότερες λειτουργίες των λιπαρών οξέων με τη μορφή αδενοτριφωσφορικού οξέος, μέσω της μιτοχονδριακής β-οξείδωσης (Tocher, 2003). Τα λιπίδια θεωρούνται η κύρια πηγή ενέργειας στις δίαιτες των ιχθύων (38,5 kJ/g), περίπου διπλάσια ενεργειακή ποσότητα από ότι οι πρωτεΐνες (23,6 kJ/g) και οι υδατάνθρακες (17,3 kJ/g) (Oliva-Teles, 2012). Η περιεκτικότητα σε λιπίδια των ψαριών μπορεί να υπερβεί σημαντικά την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Αυτό αντικατοπτρίζει το πόσο σημαντικό ρόλο έχουν τα λιπίδια και συγκεκριμένα των λιπαρών οξέων τους ως πηγές ενέργειας στα ψάρια για ανάπτυξη, αναπαραγωγή και μετακίνηση (Tocher, 2003). Εκτός από την τιμή της ενεργειακής πυκνότητας των λιπιδίων, η αποτελεσματικότητα με την οποία η διατροφική λιπιδική ενέργεια μετατρέπεται σε σωματικό λίπος είναι επίσης η μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των πρωτεϊνών και υδατανθράκων (Glencross, 2009).

Τα λιπαρά οξέα που απαιτούν τα ψάρια είναι τα ωμέγα 3 και ωμέγα 6 (n-3 και n-6). Τα λιπαρά οξέα διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες 1. κορεσμένα λιπαρά οξέα (χωρίς διπλούς δεσμούς), 2. ακόρεστα λιπαρά οξέα (> 2 διπλούς δεσμούς), 3. πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (> 4 διπλούς δεσμούς) (Craig et al., 2017). Τα LC-PUFA (πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας) ορίζονται συνήθως ως PUFA (πολυακόρεστα λιπαρά οξέα) με $C \geq 20$ και ≥ 3 διπλούς δεσμούς, περιλαμβάνει όλα τα κύρια βιολογικά ενεργά LC-PUFA όπως το εικοσαπενταενικό οξύ EPA, το εικοσιεξανοικό οξύ DHA και το αραχιδονικό οξύ ARA. Τα PUFA (δηλαδή όλα τα λιπαρά οξέα με 2 ή περισσότερους διπλούς δεσμούς) είναι απαραίτητο να παρέχονται στην διατροφή των ψαριών, διότι δεν μπορούν να συντεθούν de novo σε σπονδυλωτά λόγω έλλειψης ω-6 και ω-3 δεσατουράσεων, υπεύθυνων για την παραγωγή PUFA από 18:1n-9 (Sargent et al., 2002).

Πιο συγκεκριμένα τα ψάρια αλμυρού νερού συνήθως απαιτούν ω-3 λιπαρά οξέα για βέλτιστη ανάπτυξη και υγεία, συνήθως σε ποσότητες που κυμαίνονται από 0,5 έως 2,0 % της ξηρής δίαιτας. Τα δύο κύρια βασικά λιπαρά οξέα αυτής της ομάδας είναι το εικοσαπενταενοικό οξύ (EPA: 20: 5n-3) και το εικοσιεξανοικό οξύ (DHA: 22: 6n-3). Ενώ, τα ψάρια γλυκού νερού δεν απαιτούν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, αλλά απαιτούν συχνά ένα 18-c n-3 λιπαρό οξύ, το λινολενικό οξύ (18: 3-n- 3) σε ποσότητες που κυμαίνονται από 0,5 έως 1,5 % της ξηρής δίαιτας (Craig et al., 2017). Αυτό το λιπαρό οξύ δεν μπορεί να παραχθεί από ψάρια γλυκού νερού και έτσι πρέπει να διατίθεται στη δίαιτα. Πολλά ψάρια γλυκού νερού μπορούν να συνθέσουν λινολενικό οξύ χρησιμοποιώντας ενζυμικά συστήματα συνθέτοντας τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας EPA και DHA, τα οποία είναι απαραίτητα για άλλες μεταβολικές λειτουργίες και ως συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης. Τα ψάρια του αλμυρού νερού τυπικά δεν διαθέτουν αυτά τα συστήματα σύνθεσής τους και απαιτούν ωμέγα-3 λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας στη διατροφή τους (Kabeya et al., 2015).

Οι υδατάνθρακες αποτελούν μια εξαιρετική πηγή ενέργειας και άνθρακα. Τα ψάρια δεν έχουν διατροφικές απαιτήσεις για υδατάνθρακες λόγω της ικανότητάς τους να συνθέτουν αποτελεσματικά γλυκόζη από μη υδατανθρακικές πρόδρομες ουσίες όπως το γαλακτικό, το πυροσταφυλικό και τα αμινοξέα (NRC, 2011). Αυτό σημαίνει ότι μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν ακόμα και χωρίς υδατάνθρακες στην διατροφή τους. Παρόλα αυτά, η βέλτιστη συσσώρευση υδατανθράκων στην τροφή των εκτρεφόμενων ψαριών έχει ωφέλημα αποτελέσματα. Αφενός μπορεί να αυξήσει την κατακράτηση πρωτεϊνών και λιπιδίων εμποδίζοντας τον καταβολισμό αυτών των δαπανηρών ουσιών για ενεργειακές ανάγκες και να μειώσουν το φορτίο του αζώτου που απελευθερώνεται στο περιβάλλον και αφετέρου παρέχουν μεταβολίτες για βιολογικές συνθέσεις και υποστηρίζουν την σύνθεση των ιχθυοτροφών διατηρώντας το κόστος τους χαμηλό (Kamalam et al., 2017).

1.4.3 Βιταμίνες και ιχνοστοιχεία

Οι βιταμίνες τις περισσότερες φορές δεν συντίθενται από τα ίδια τα ψάρια, αλλά παρέχονται στην διατροφή τους. Είναι απαραίτητες οργανικές ενώσεις με σκοπό να υποστηρίξουν την φυσιολογική ανάπτυξη των ιχθύω (Craig et al., 2017). Μερικές από τις απαραίτητες βιταμίνες είναι οι εξής C, B1, B2, B6, B12, K, A, Βιοτίνη, Χολίνη, Φολικό οξύ, Ινοσιτόλη, Νιασίνη, Παντοθενικό οξύ και Τοκοφερόλη (Davis & Gatlin, 1996). Η ανεπάρκεια κάθε βιταμίνης έχει συγκεκριμένα συμπτώματα, αλλά η μειωμένη ανάπτυξη είναι το πιο κοινό σύμπτωμα οποιασδήποτε ανεπάρκειας βιταμινών (Craig et al., 2017).

Τα ιχνοστοιχεία είναι απαραίτητα ανόργανα στοιχεία για την υγιή και φυσιολογική ανάπτυξη όλων των οργανισμών. Παρόλη την μικρή ποσότητα των ιχνοστοιχείων που απαιτείται από τα ζώα (συνήθως λιγότερο από 100 mg/kg ξηρής τροφής), είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική ανάπτυξη (Chanda et al., 2015). Με βάση την ποσότητα που απαιτείται στη διατροφή και την ποσότητα που υπάρχει στα ψάρια, μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες, τα μάκρο-ιχνοστοιχεία και τα μίκρο-ιχνοστοιχεία (Craig et al., 2017). Τα ιχνοστοιχεία, τα οποία αποτελούν την τέφρα βιολογικών υλικών που παραμένουν μετά την πλήρη καύση ή οξείδωση των οργανικών ουσιών στο σώμα όλων των ζώων, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών, είναι γνωστό ότι είναι απαραίτητα για τον κυτταρικό μεταβολισμό (Chanda et al., 2015). Οι συγκεντρώσεις και οι λειτουργικές μορφές των ιχνοστοιχείων πρέπει να διατηρούνται σε στενές κλίμακες για την ικανοποίηση των μεταβολικών δραστηριοτήτων σε κύτταρα και ιστούς (Watanabe et al., 1997). Η παρουσία ή η απουσία των ιχνοστοιχείων επηρεάζει τον ρυθμό ανάπτυξης των οργανισμών, το pH, την ωσμωρύθμιση, τις σκελετικές δομές, την μεταφορά ηλεκτρονίων αλλά συμμετέχουν και ως συστατικά ορμονών και των ενζύμων τα οποία ενεργοποιούν. Πολλά από τα απαραίτητα για τα ψάρια ιχνοστοιχεία προσλαμβάνονται άμεσα από το περιβάλλον μέσω των βραγχίων και του δέρματος ή ακόμα και από την διατροφή τους (Lall, 2002). Τα κοινά διαιτητικά μάκρο-ιχνοστοιχεία είναι το ασβέστιο, το νάτριο, το χλωριούχο, το κάλιο, το χλώριο, το θείο, ο φώσφορος και το μαγνήσιο. Τα κοινά μίκρο-ιχνοστοιχεία είναι ο σίδηρος, ο χαλκός, το χρώμιο, το ιώδιο, το μαγγάνιο, ο ψευδάργυρος και το σελήνιο (Craig et al., 2017).

1.5 Γενικά χαρακτηριστικά Ευρωπαϊκού λαβρακιού *Decentrarchus labrax*

Το λαβράκι, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) European seabass, (Εικόνα 5) αποτελεί τόσο ένα είδος-κλειδί για τις υδατοκαλλιέργειες της Μεσογείου, όσο και τον κύριο στόχο της επαγγελματικής, αλλά της ερασιτεχνικής αλιείας. Το 2012, η συνολική εμπορική παραγωγή ήταν πάνω από 160.000 τόνους εκ των οποίων το 95% προερχόταν από υδατοκαλλιέργειες (FAO, 2014). Θεωρείται ένα από τα αξιόλογα είδη εκτρεφόμενων ιχθύων όχι μόνο για την Ελλάδα αλλά και για όλες τις μεσογειακές και ευρωπαϊκές χώρες. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ευρύτατη συμμετοχή του στο διαιτολόγιο και στην σημαντική εμπορική αξία, ως αποτέλεσμα της μεγάλης ετήσιας ελεγχόμενης παραγωγής του σε συνδυασμό με την σχετικά προσιτή του τιμή (Παπουτσόγλου, 2008)

Το 2012, η αναφερόμενη παραγωγή λαβρακιού σε υδατοκαλλιέργειες έφτανε τους 153.000 τόνους. Όπως και με την αλιεία έτσι και στην υδατοκαλλιέργεια υπάρχουν ορισμένες διαφορές ανάμεσα στους αναφερόμενους και στους εκτιμώμενους αριθμούς. Έως σήμερα, το μεγαλύτερο ποσοστό των ιχθύων καλλιεργείται σε θαλάσσιους κλωβούς στη Μεσόγειο θάλασσα με πρωτοπόρες χώρες το 2012 την Τουρκία και την Ελλάδα με 65.000 και 42.500 τόνους αντίστοιχα. Η εντατική καλλιέργεια του είδους βασίζεται κυρίως σε θαλάσσιους κλωβούς, αλλά υπάρχουν και μερικά χερσαία συστήματα στην βορειότερη Ευρώπη. Το 2009, υπήρχαν περίπου

60 εκκολαπτήρια για λαβράκι και τσιπούρα στη λεκάνη της Μεσογείου, τα οποία παρήγαγαν γύρω στα 500.000.000 ιχθύδια ετησίως (FAO, 2014).

Εικόνα 5. Το Ευρωπαϊκό λαβράκι *Dicentrarchus labrax. (www.fishbase.com)*

Πίνακας 2. Συστηματική κατάταξη *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) European seabass**,**

Βασίλειο	**Animalia (Ζώα)**
Φύλο	**Chordata (Χορδωτά)**
Κλάση	**Actinopterygii (Ακτινοπτερύγιοι)**
Τάξη	**Perciformes (Περκόμορφα)**
Οικογένεια	**Moronidae (Μορονίδες)**
Γένος	***Dicentrarchus*** **(Δικέντραρχος)**
Είδος	***Dicentrarchus labrax*****, Linnaeus, 1758**

1.5.1 Η κατανομή του είδους

Το λαβράκι εντοπίζεται στα παράκτια ύδατα του βορειοανατολικού Ατλαντικού ωκεανού και τη Βαλτική θάλασσα, από τη νότια Νορβηγία έως και το ανατολικό Μαρόκο, αλλά και κατά μήκος της Μεσογείου και της Μαύρης θάλασσας (Froese and Pauly, 2013). Παρά την ευρεία εξάπλωσή του τόσο στον Ατλαντικό ωκεανό, όσο και στη θάλασσα της Μεσογείου, η πλειονότητα των ατόμων εμφανίζεται νότια της Βόρειας και της Ιρλανδικής θάλασσας (Picket and Pawson, 1994). Λόγω του φαινομένου της παγκόσμιας υπερθέρμανσης, υπήρξε μία πρόσφατη μετανάστευση προς το βορά (Pawson et al., 2007) κατά μήκος των ακτών της Νορβηγίας, αποικίζοντας τα φιόρδ του Όσλο (Colman et al., 2008). Το λαβράκι έχει εισαχθεί για καλλιέργειες στο Ισραήλ, τις Κανάριες Νήσους και σε λίγες χώρες του Περσικού κόλπου και της Αραβικής θάλασσας (Froese and Pauly, 2013)

Εικόνα 6. Κατανομή του είδους *Dicentrarchus labrax* (Froese and Pauly 2013).

1.5.2 Η βιολογία του είδους

Τα λαβράκια χαρακτηρίζονται από επίμηκες, ασημί-γκρίζο σώμα με δύο ξεκάθαρα διαφοροποιημένα ραχιαία πτερύγια. Το πρώτο αποτελείται από 8-10 σκληρές ακτίνες και το δεύτερο 12-13 μαλακές ακτίνες. Το ουραίο πτερύγιο είναι διχαλωτό με ίσους τους δύο λοβούς. Το μήκος του σώματος φτάνει το 1 m αλλά το κοινό μήκος κυμαίνεται στα 50 cm. Το χρώμα του λαβρακιού είναι ασημί – γκρι στις πλευρές ενώ γίνεται σκούρο προς την ραχιαία περιοχή. Τα νεαρά ιχθύδια εμφανίζουν σκούρες κηλίδες στο πάνω μέρος του σώματος οι οποίες όμως απουσιάζουν από τα ενήλικα άτομα. Το είδος ανήκει στην οικογένεια Moronidae και συγγενεύει στενά με το στικτό λαβράκι (*D. punctatus)* (www.fishbase.com).

Είναι κατεξοχήν ευρύαλο και ευρύθερμο είδος. Προσαρμόζεται και αναπτύσσεται εύκολα ακόμη και σε σχεδόν γλυκά νερά. Οι ιδανικές συνθήκες αλατότητας για άριστη ανάπτυξη είναι 20‰ - 30‰. Η θερμοκρασία στην οποία διατρέφεται είναι 7-30 ºC (άριστες 14-28 ºC), κάτω από 7 ºC σταματάει να τρώει, ενώ πεθαίνει όταν η θερμοκρασία κατέβει κάτω από 2 ºC (Χώτος και Ρογδάκης, 1992). Τα νεαρά άτομα (< 4-5 έτη) περνούν τον περισσότερο χρόνο τους σε ρηχά νερά προστατευόμενων ενδιαιτημάτων όπως εκβολές ποταμών και λιμνοθάλασσες, ή κατά μήκος της ανοικτής ακτογραμμής αλλά κοντά στην ακτή (Picket and Pawson, 1994). Τα ενήλικα άτομα ανήκουν στην κατηγορία των βενθοπελαγικών ιχθύων και μεταναστεύουν εποχικά, πιο συγκεκριμένα το καλοκαίρι εντοπίζονται σε παράκτια ύδατα και εκβολές ποταμών, αλλά ακόμη και σε γλυκά νερά, ενώ το χειμώνα κινούνται προς βαθύτερα και πιο ζεστά νερά για την ωοτοκία. Ο οικότοπος ποικίλλει από βραχώδεις, χλοώδεις, έως και λασπώδεις πυθμένες (Millot *et al*. 2011).

Τα λαβράκια είναι σαρκοφάγα αρπακτικά, τα οποία ευκαιριακά τρέφονται με σχεδόν οποιαδήποτε διαθέσιμη τροφή. Το μεγαλύτερο μέρος της δίαιτάς τους αποτελείται από καρκινοειδή και ψάρια που κινούνται στο βυθό ή στη στήλη του νερού (Picket and Pawson, 1994). Είναι θηρευτής που κυνηγά ατομικά στο επιφανειακό υδάτινο στρώμα αφού επιλέξει τη λεία του από κάτω επιτίθεται, την αρπάζει και φεύγει. Ο τύπος πέψεως, τα είδη των ενζύμων που εκκρίνονται στον πεπτικό σωλήνα και ο τύπος των δοντιών ερμηνεύουν απόλυτα αυτό το χαρακτηρισμό. Μετά από έρευνες που έχουν γίνει πάνω στη διατροφή του είδους σε σχέση με την ηλικία, την εποχή και το περιεχόμενο των στοιχείων, έχει διαπιστωθεί ότι η βάση της διατροφής του αποτελείται από καρκινοειδή με μικρού μεγέθους ψάρια, κυρίως αφρόψαρα όπως αθερίνες, σαρδέλες και μικρά κεφαλόπουλα μαλακά όστρακα, και έχει ιδιαίτερη αδυναμία στην γαρίδα (Χώτος και Ρογδάκης, 1992). Πιο συγκεκριμένα σε άτομα μικρότερα από 40 cm η διατροφή αποτελείται κατά 70 - 80 % από αμφίποδα και κατά 20-30% από διάφορες προνύμφες εντόμων (χειρονομίδες), ενώ τα άτομα με μέγεθος μεγαλύτερο από 40 cm, διατρέφονται κατά 80% από ψάρια και κατά 20% από καρκινοειδή και μαλάκια.

Το είδος είναι γονοχωριστικό, το οποίο σημαίνει πως τα δύο φύλα είναι διακριτά. Το φύλο καθορίζεται τόσο από γενετικούς, όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, με τις υψηλότερες θερμοκρασίες να λειτουργούν ευνοϊκά για τα αρσενικά. Η αναλογία φύλου των νεαρών ατόμων είναι ισορροπημένη. Στα γηραιότερα ενήλικα άτομα, ο λόγος κλίνει προς τα θηλυκά, τα οποία φτάνουν έως και το 70% (Vandeputte *et al*. 2009). Στις υδατοκαλλιέργειες, λόγω των υψηλότερων θερμοκρασιών, η πλειονότητα (75-100%) των ενήλικων ατόμων είναι αρσενικά (Piferrer *et al*. 2005). Αυτό δεν αποτελεί μία επιθυμητή κατάσταση, διότι τα θηλυκά είναι γενικά μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα αρσενικά της ίδιας ηλικίας (Fritsch *et al*. 2005).

Η αναπαραγωγική ωριμότητα των ατόμων επέρχεται μεταξύ του δεύτερου και του τέταρτου έτους της ηλικίας στη Μεσόγειο θάλασσα, και μεταξύ του τέταρτου και 20 έβδομου έτους για τα αρσενικά και του πέμπτου και όγδοου έτους για τα θηλυκά στον Ατλαντικό ωκεανό (Bauchot 1987). Κατά την περίοδο της ωοτοκίας, ένα ώριμο θηλυκό παράγει από ένα τέταρτο, μέχρι και μισό εκατομμύριο αυγά ανά κιλό σώματος. Τα αυγά είναι πελαγικά (Muus and Nielsen, 1999) και κυμαίνονται από 1,1 έως 1,5 mm σε διάμετρο. Οι πλαγκτονικές προνύμφες μπορούν να μείνουν στο νερό μέχρι 2-3 μήνες, μετά από τους οποίους πηγαίνουν στις περιοχές αναπαραγωγής (Jennnings and Pawson, 1992).

Η ωοτοκία συμβαίνει σε ομάδες και λαμβάνει χώρα σε βαθιά νερά από τον Ιανουάριο έως τον Μάρτιο στον Ατλαντικό ωκεανό και από τον Δεκέμβριο έως τον Μάρτιο στη Μεσόγειο θάλασσα (Jennnings and Pawson, 1992). Οι κύριες περιοχές αναπαραγωγής στον βορειοανατολικό Ατλαντικό ωκεανό εντοπίζονται στο Βισκαϊκό κόλπο (ωοτοκία: Ιανουριος-Μάρτιος), στη Μάγχη και στην Κελτική θάλασσα (Φεβρουάριος-Μάιος). Πρόσφατα, μία μελέτη που περιελάμβανε μηνιαίες δειγματοληψίες στη Βόρεια θάλασσα, προσδιόρισε τρεις πιθανές περιοχές αναπαραγωγής: μία στα ανοικτά των Βελγικών ακτών, μία στα ανοικτά των ακτών των Κάτω Χωρών και μία στη νοτιότερη Βόρεια θάλασσα. Επιπλέον, ωοτοκία έχει παρατηρηθεί και

1.6 Η επιρροή των σιτηρεσίων στην αύξηση, στην καταπόνηση και στην απόπτωση

Τα σιτηρέσια είναι γνωστό πως έχουν επίδραση στην αύξηση των εκτρεφόμενων ψαριών. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση των εναλλακτικών σιτηρεσίων, σχετικά με την αύξηση των ιχθύων η απόδοση τους ποικίλλει και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το ποσοστό αντικατάστασης του ιχθυάλευρου αλλά και το εκάστοτε εκτρεφόμενο είδος. Στο λαβράκι, η χορήγηση σιτηρεσίων με υψηλά ποσοστά αντικατάστασης ιχθυάλευρου με φυτικές πηγές πρωτεϊνών (>50%) δεν παρουσιάζει σημαντικό αντίκτυπο στα ποσοστά αύξησης των ψαριών, με το τελικό σωματικό βάρος και το μήκος αυτών να μην διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών καταστάσεων σίτισης σύμφωνα με τους Kaushik et al., 2004. Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει η μερική υποκατάσταση των ιχθυαλεύρων με άλευρα από έντομα. Οι St-Hilaire et al. (2007) χρησιμοποίησαν άλευρα βασισμένα σε προνύμφες και νύμφες της μύγας-μαύρου στρατιώτη και της κοινής μύγας για τη σίτιση της ιριδίζουσας πέστροφας. Ενώ σύμφωνα με τα αποτελέσματα, κανένα από τα προαναφερθέντα σιτηρέσια δεν προκαλεί σημαντικές διαφορές στο τελικό βάρος των ψαριών.

Παρά τις οδηγίες και τους κανονισμούς του Ευρωπαϊκού συμβουλίου για την καλή διαβίωση και ορθή μεταχείριση των ζώων, καθώς και τη μείωση της καταπόνησης, εντούτοις ακόμη και σήμερα τίθενται ερωτήματα σχετικά με την αξιολόγηση της ευζωίας αλλά και της καταπόνησης των ζώων και συγκεκριμένα των ψαριών. Έτσι, η κατανόηση της επίδρασης που έχουν οι διαφοροποιήσεις του διατροφικού καθεστώτος των εκτρεφόμενων οργανισμών, όπως π.χ. η ασιτία και η επανασίτιση, καθώς και τα εναλλακτικά σιτηρέσια, στη φυσιολογία θρέψης είναι αναγκαία. Ωστόσο, η πιθανή επίδραση τόσο των μεταβολικών, όσο και διατροφικών προκλήσεων στην ευζωία των ψαριών, αλλά και στην πιθανή πρόκληση καταπόνησης (stress) παραμένει αδιευκρίνιστη.

Η έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού πλήγματος (Hsps) ως δείκτες κυτταρικής καταπόνησης (στρες), αλλά και δείκτες επαγόμενοι από διαφορετικές διατροφικές προκλήσεις αποτελεί μια αρκετά υποσχόμενη προοπτική (Antonopoulou et al., 2013). Επίσης, κοινό δείκτη για την εκτίμηση της κυτταρικής αντίδρασης σε ποικίλες περιβαλλοντικές διαταραχές, όπως π.χ. η θερμοκρασία συνιστά και η φωσφορυλίωση των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (MAPKs). Μέλη της οικογένειας των MAPKs φαίνεται να επηρεάζονται και από διαφορετικές διατροφικές προκλήσεις, όπως π.χ. την ασιτία και επανασίτιση, τα διαφορετικά λιπιδικής περιεκτικότητας σιτηρέσια, τα σιτηρέσια μερικής υποκατάστασης με άλευρα σόγιας και παράλληλη χορήγηση ταυρίνης (Feidantsis et al., 2014).

Μεταξύ των πρωτεϊνικών οικογενειών των Hsps, οι Hsp70 και Hsp90 είναι από τις επικρατέστερες ομάδες με παρουσία σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και εξαιρετικά συντηρημένες μεταξύ των φύλων. Η επαγωγή της έκφρασης των Hsps μπορεί να προκληθεί από μια ποικιλία στρεσσογόνων παραγόντων όπως η υπερθερμία, το ωσμωτικό στρες, η έκθεση σε βαρέα μέταλλα, τα χημικά και το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από υποξία ή ανοξία (Gornati et al., 2004). Στις κυτταρικές λειτουργίες αυτών των πρωτεϊνών περιλαμβάνονται η αναδίπλωση και η μετατόπιση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών καθώς και η επανενεργοποίηση μετουσιωμένων πρωτεϊνών, ενώ συγκεκριμένα για μέλη της οικογένειας Hsp70 έχει βρεθεί ότι συμβάλουν στην αποκατάσταση της κυτταρικής λειτουργίας κατά την ανάρρωση από το στρες, απομακρύνοντας μετουσιωμένες πρωτεΐνες εντός του κυττάρου (Joyeux-Faure et al., 2003). Οι Hsps είναι κομβικής σημασίας για την ενεργοποίηση πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων, ενώ ακόμα αλληλεπιδρούν με σηματοδοτικά μόρια του κυτταρικού κύκλου και των μονοπατιών του κυτταρικού θανάτου. Επίσης, τα μεταβαλλόμενα επίπεδα των Hsps στα κύτταρα (ως αντίδραση στο στρες) μπορούν να αλλάξουν τη συνολική αντίδραση σε φυσιολογικά σήματα, ενώ ακόμα έχουν συσχετιστεί και με μειωμένες συγκεντρώσεις των μεταβολικών ενεργειακών αποθεμάτων (Werner et al., 2006).

Ένας από τους κύριους ρυθμιστές του μεταβολισμού τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε επίπεδο οργανισμού στους ευκαρυώτες είναι η πρωτεϊνική κινάση AMP (AMPK). Θα μπορούσε να παρομοιαστεί με έναν ενεργειακό αισθητήρα που ενεργοποιείται όταν τα επίπεδα ATP στο εσωτερικό του κυττάρου είναι χαμηλά. Η απόκριση της στα ενεργειακά επίπεδα του κυττάρου έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση καταβολικών σηματοδοτικών μονοπατιών που θα οδηγήσουν στην παραγωγή περισσότερου ATP, και την παρεμπόδιση αναβολικών μονοπατιών. Ο λιπώδης ιστός θεωρούνταν απλώς ως όργανο αποθήκευσης ενέργειας, ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ο ενεργός ενδοκρινικός του ρόλος. Τα λιποκύτταρα εκκρίνουν πρωτεΐνες, γνωστές ως αδιποκίνες, που μετέχουν στη ρύθμιση της όρεξης και του μεταβολισμού. Η AMPK ρυθμίζει τόσο τη λιπογένεση όσο και τη λιπόλυση στον λιπώδη ιστό. Τέλος, φαίνεται να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην διατήρηση των ενεργειακών αποθεμάτων, σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών κατά τις εποχιακές διαφορές, στους ενδόθερμους οργανισμούς. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης και απενεργοποίησης της ίδιας αλλά και των καθοδικών της στόχων

Όσον αφορά την υπεροικογένεια των MAPKs, αυτή παίζει ένα σημαντικό ρόλο στα κύτταρα στη μεταγωγή ποικίλων εξωκυτταρικών σημάτων στο εσωτερικό του κυττάρου και τον πυρήνα και επομένως στην επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης, τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου και την απόπτωση. Τρεις υποοικογένειες των MAPKs έχουν περιγραφεί λεπτομερώς: οι ERKs (p44/42 MAPK), οι JNKs και η p38 MAPK. Το μονοπάτι των ERKs ενεργοποιείται είτε από πολλαπλασιαστικά σήματα, ή από αυξητικούς παράγοντες, ενώ αυτά των JNKs και p38MAPK από προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες και μια ποικιλία στρεσογόνων περιβαλλοντικών παραγόντων (Urushibara et al., 2009). Πέραν των θηλαστικών τα παραπάνω γεγονότα που αφορούν τις MAPKs έχουν αναφερθεί και σε θαλάσσιους οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων των ψαριών, ενώ υπάρχουν επίσης αναφορές για ενεργοποίηση των MAPKs από επαγωγή των Hsps σε ιστούς θηλαστικών (Rafiee et al., 2003) και ερυθροκύτταρα τσιπούρας υπό την επίδραση θερμικού σοκ (Feidantsis et al., 2012).

Ο θάνατος των ευκαρυωτικών κυττάρων μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με νέκρωση, είτε με απόπτωση. Η νέκρωση, που θεωρείται διαχρονικά ως ο παθητικός και μη ελεγχόμενος τύπος κυτταρικού θανάτου, είναι το τελικό αποτέλεσμα μιας βιοενεργητικής καταστροφής που οφείλεται στην εξάντληση των αποθεμάτων ATP σε τέτοιο επίπεδο που δεν συμβαδίζει με την επιβίωση του κυττάρου. Αιτίες της νέκρωσης αποτελούν διάφορες διαταραχές του κυτταρικού περιβάλλοντος όπως αυξημένες συγκεντρώσεις τοξινών και φυσικές βλάβες. Μορφολογικά, η νέκρωση χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό κενοτοπίων στο κυτταρόπλασμα, διάσπαση της πλασματικής μεμβράνης και εμφάνιση φλεγμονής γύρω από το νεκρό κύτταρο η οποία οφείλεται στην απελευθέρωση από το κύτταρο του κυτταρικού περιεχομένου και διάφορων προφλεγμονοδών μορίων. Τέλος, συχνά παρατηρούνται αλλαγές και στη μορφολογία του πυρήνα του κυττάρου, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται συμπύκνωση της χρωματίνης και κατακερματισμός του DNA (Edinger & Thompson 2004).

Από την άλλη μεριά, η απόπτωση θεωρείται ως ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος καθώς αποτελεί έναν ενδογενή μηχανισμό του κυττάρου, ο οποίος ρυθμίζεται από μια ποικιλία κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Κατά τον αποπτωτικό θάνατο παρατηρούνται συμπύκνωση της χρωματίνης και κατακερματισμός του DNA σε κομμάτια 200 bp, πακετάρισμα των νεκρών κυττάρων σε αποπτωτικά σωμάτια, δεν συμβαίνει διάσπαση της πλασματικής μεμβράνης, ενώ δεν παρατηρείται και σχηματισμός φλεγμονής γύρω από το νεκρό κύτταρο, όπως στην νέκρωση. Λόγω της ρύθμισης στην οποία υπόκειται, η απόπτωση είναι μια διεργασία που απαιτεί ενέργεια υπό μορφή ATP για την πραγματοποίησή της (Edinger & Thompson 2004).

Ο αποπτωτικός μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου χαρακτηρίζεται από δύο διακριτά μονοπάτια, το εξωγενές και το ενδογενές. Το εξωγενές μονοπάτι ενεργοποιείται από ένα σύμπλοκο, στο σχηματισμό του οποίου συμμετέχουν εξωτερικοί υποδοχείς, διάφορες πρωτεΐνες καθώς και οι κασπάσες 8 και 10, ενώ το ενδογενές ενεργοποιείται από πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και είναι εξαρτώμενο από τα μιτοχόνδρια. Παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA ή αναστέλλουν την επιδιόρθωσή του, επάγουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (πρωτεΐνη μεταφορέας ηλεκτρονίων) από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα (Chen & Wang 2002, Lalier et al., 2007). Όπως αναφέρθηκε, οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 είναι υπεύθυνες για τον έλεγχο του ενδογενούς μονοπατιού του αποπτωτικού μηχανισμού. Ειδικότερα, η εν λόγω οικογένεια αποτελείται τόσο από προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες (Bax, Bad), όσο και από αντι-αποπτωτικές (Bcl-2, Bcl-xl), με την ίδια την Bcl-2 να έχει αναφερθεί ότι παρεμποδίζει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα, αναστέλλοντας εν μέρει την απόπτωση (Yang et al., 1997, Lalier at al., 2007).

Ο μηχανισμός της απόπτωσης έχει μελετηθεί εκτεταμένα στο νηματώδη *Caenorhabitis elegans* και στο έντομο *Drosophila melanogaster*, αλλά και στα θηλαστικά συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, λόγω κυρίως της διασύνδεσης της απόπτωσης με την ανάπτυξη του καρκίνου και διάφορων εκφυλιστικών νόσων. Μέχρι πρόσφατα δεν υπήρχαν αναφορές για μελέτη του αποπτωτικού μηχανισμού σε κάποιο μη-θηλαστικό σπονδυλωτό, ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές έρευνες πάνω στο εν λόγω θέμα σε μια μεγάλη ομάδα σπονδυλωτών, αυτή των ψαριών. Μάλιστα, τα ψάρια φαίνεται να μοιράζονται τα ίδια βασικά χαρακτηριστικά του αποπτωτικού μηχανισμού με τα θηλαστικά, ενώ είναι πολύ πιθανό και τα κεντρικά μονοπάτια του κυτταρικού θανάτου να είναι υψηλά διατηρημένα μεταξύ των σπονδυλωτών. Λαμβάνοντας υπόψη και το γεγονός ότι το zebrafish (*Danio rerio*) αποτελεί έναν οργανισμό-μοντέλο στην έρευνα της βιολογίας των σπονδυλωτών, τα ψάρια φαίνεται να έχουν όλα τα χαρακτηριστικά για να αποτελέσουν σημείο αναφοράς στην μελέτη της απόπτωσης στα σπονδυλωτά (Krumschnabel & Podrabsky 2009).

1.7 Ένζυμα του βασικού μεταβολισμού

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που καταλύουν χημικές αντιδράσεις (ενζυμικές αντιδράσεις) στους οργανισμούς και συμμετέχουν στον μεταβολισμό τους. Ως καταλύτες επιταχύνουν τις χημικές αντιδράσεις μειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης. Τα ένζυμα παρουσιάζουν διαφόρων βαθμών εξειδίκευση προς το αντιδρών.

Ορισμένα ένζυμα που συμμετέχουν σε διεργασίες του βασικού μεταβολισμού είναι τα παρακάτω:

- **Η αφυδρογονάση γαλακτικού οξέος (L-LDH)**, είναι το κυτταροπλασματικό ένζυμο που καταλύει την αντιστρεπτή μετατροπή του γαλακτικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ στον κύκλο της γλυκόλυσης. Σε περίπτωση διατάραξης της ομοιόστασης εντοπίζονται αυξημένα επίπεδα LDH στο αίμα, από περιβαλλοντικός ή παθολογικούς παράγοντες. Ο ρόλος της γαλακτικής αφυδρογονάσης είναι η κατάλυση του πυροσταφυλικού σε γαλακτικού οξέος ενώ παράλληλα των το NAD+ σε NADH και αντίστροφα.

πυροσταφυλικό οξύ NADH→NAD+ ↔ γαλακτικό οξύ

Σε περίπτωση παρουσίασης υψηλών συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος στον οργανισμό, το ένζυμο αναστέλλεται μέσα από το φαινόμενο της αντίστροφης ανάδρασης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού μετατροπής του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό.

- **Η συνθετάση του κιτρικού (CS)**, δρα στο πρώτο από τα οκτώ βήματα του του κιτρικού οξέος ή κύκλου Krebs, βοηθά την ακετυλομάδα του ακέτυλο-CoA μεταφέρεται στο οξαλοξικό κατά την μετατροπή του κιτρικού οξέος 13 σε ισοκιτρικό. Η δράση του σχετίζεται την κατάλυση της αντίδρασης συμπύκνωσης δύο ατόμων άνθρακα, χάρη στο ακετυλο-CoA και ένα μόριο τεσσάρων ατόμων άνθρακα οξαλοξικού οξέος, που περιέχει, για το σχηματισμό κιτρικού με έξι άτομα άνθρακα.

ακετυλ-CoA + oxaloacetate + H2O → κιτρικό + CoA-SH

- **Η αφυδρογονάση του β-υδροξυακυλο-CoA (HOAD)**, συμμετέχει στο τρίτο βήμα της β-οξείδωσης των λιπαρών οξέων, στην οξείδωση του L-3- υδροξυακυλ CoA από NAD+.

(S)-3-υδροξυακυλ-CoA + NAD+ ↔ 3-oxoacyl-CoA + NADH + H

2. Σκοπός

Η περιορισμένη διαθεσιμότητα συστατικών στις τροφές υδατοκαλλιέργειας είναι ζωτικής σημασίας προκειμένου να διατηρηθούν οι αυξανόμενες απαιτήσεις στη βιομηχανία της υδατοκαλλιέργειας (Gamboa-Delgado & Márquez-Reyes 2018). Ωστόσο, για να διασφαλιστεί η αειφόρος εκμετάλλευση των φυσικών πόρων, η χρήση ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίου με βάση την αλιεία δέσμευσης πρέπει να μειωθεί στις συμβατικές τροφές ψαριών (Tacon & Metian, 2015).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της χορήγησης διαφορετικών σιτηρεσίων στην καταπόνηση, την ενεργειακή ομοιόσταση και σε μεταβολικά ένζυμα σε άτομα λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*). Οι επιμέρους στόχοι που τέθηκαν στα πλαίσια της εργασίας του μεταπτυχιακού προγράμματος ήταν οι εξής : 1. να μελετηθεί η επιρροή του μεταβολισμού και της φυσιολογίας των ιχθύων μετά την χορήγηση των διαφορετικών σιτηρεσίων. 2. Επιπλέον, να διερευνηθεί η δυνητική διατροφική καταπόνηση που υφίστανται τα ψάρια ως αποτέλεσμα της σίτισης με τα σιτηρέσια αυτά μέσα από την μελέτη της έκφρασης των Hsp και της φωσφορυλίωσης των MARKs. 3. Να εξεταστεί η επίδραση των σιτηρεσίων στις διεργασίες απόπτωσης και αυτοφαγίας μέσα από την μελέτη της έκφρασης των σχετιζόμενων πρωτεϊνών.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού προγράμματος FutureEuAqua πραγματοποιήθηκαν τρία διαφορετικά πειράματα, ένα στο Γαλαξίδι και δύο στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., χρησιμοποιώντας ως πειραματικό οργανισμό το Ευρωπαϊκό λαβράκι. Τα πειράματα χρηματοδοτήθηκαν από τη δράση Καινοτομία Horizon 2020 (European Union’s Horizon 2020 Innovation Action) της Ευρωπαϊκής ένωσης, FutureEuAqua, βάση της συμφωνίας επιχορήγησης αρ. 817737.

3.1.1. Γαλαξίδι

Το πείραμα στο Γαλαξίδι είχε διάρκεια 11 μήνες. Έγινε χρήση εμπορικών και βιολογικών τροφών (ερευνητικό πρόγραμμα FutureEUAqua) σε ιχθυοκλωβούς λαβρακιού. Για κάθε δίαιτα υπήρξαν 3 επαναλήψεις. Τα λαβράκια είχαν αρχικό μέσο βάρος 60 g το καθένα. Οι τροφές από το πρόγραμμα FutureEUAqua περιείχαν υποκατάστατα ιχθυαλεύρου όπως πρωτεΐνη μαγιάς, πρωτεΐνη μπιζελιού, καλαμάρι και κρίλλ. Η σίτιση γινόταν καθημερινά δύο φορές την ημέρα. Ενώ έγινε και λήψη δείγματος πριν την χορήγηση εμπορικών και βιολογικών τροφών. Ήταν διατροφικά ισορροπημένες, ενώ έγινε χρήση τόσο διάφορων μικροστοιχείων όσο και μακροστοιχείων. (Vasilaki et al., 2022) (FutureEUAqua deliverable 2.3).

3.1.2. HCMR organic seabass

Κατά την διάρκεια του πειράματος στο HCMR (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) χρησιμοποιήθηκαν 30 ψάρια για κάθε δεξαμενή με χωρητικότητα 250 L και τρείς δεξαμενές για κάθε δίαιτα. Το αρχικό βάρος των ψαριών ήταν 14,4±2,4 g. Η θερμοκρασία του νερού ήταν σταθερή στους 22^{o}C±1.

Τα μείγματα των τροφών περιείχαν νέες δυνητικές βιολογικές πηγές με ιχθυάλευρα, βακτηριακές πρωτεΐνες, και αλεύρι μαγιάς. Πιο συγκεκριμένα η Δίαιτα 1, καθορίζεται ως η δίαιτα ελέγχου (Control) και περιέχει βιολογικά ιχθυάλευρα, ιχθυέλαια και σογιάλευρο. Ενώ στη δίαιτα 3 και 4 έχει γίνει αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου σε ποσοστό 25%, 30% αντίστοιχα (Vasilaki et al., 2022)

3.1.3. HCMR conventional seabass

Κατά την διάρκεια του τρίτου πειράματος στο HCMR χρησιμοποιήθηκαν λαβράκια με αρχικό σωματικό βάρος 5,72±0,72 g, το ζύγισμα τους έγινε μετά την χρήση του αναισθητικού γαριφαλέλαιου, τόσο πριν όσο και μετά την χορήγηση τροφών. Το τάισμα γινόταν δύο φορές την ημέρα και στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 10 διαφορετικές δίαιτες με τα ποσοστά των βιολογικών και συμβατικών τροφών να διαφέρουν. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι τρεις από αυτές καθώς και η δίαιτα ελέγχου (Δίαιτα 1) (Πίνακας 3) (Vasilaki et al., 2022)

Πίνακας 3. Συστατικά τροφής και θρεπτική σύνθεση των πειραματικών τροφών %.

Δίαιτα	1	2	3	4
Ιχθυάλευρο	20	-	-	10
Ιχθυέλαιο	5.5	-	-	2.7
Trimmings FM	-	10	-	-
Trimmings FO	-	7.9	10.3	5.15
Βακτηριακή πρωτείνη	-	7	14	7
Αλεύρι μαγιάς	-	3	6	3
Μικροφύκη	-	3.7	7.5	3.7
Ηλιάλευρο	-	6.4	11.6	6.4
Σίτος	19.3	9.6	-	9.64
Λεκιθίνη Σόγιας	1.3	1.9	2.6	1.9
Κραμβέλαιο	9.5	5.5	1.6	5.5
Γλουτένη Σίτου	13.5	11.7	10	11.7
SPC	17	17	17	17
Γλουτένη καλαμποκιού	11.5	11.5	11.5	11.5

3.2 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστικότητας HOAD, CS, LDH

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε εφαρμόστηκε σε ιστό ήπατος από δείγματα λαβρακιού των τριών πειραμάτων, στα ποία είχε χορηγηθεί διαφορετικός τύπος τροφής όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες 100–1.000 μl, ομογενοποιητής, ζυγαριά ακριβείας, φυγόκεντρος, πλαστική κυψελίδα και tubes καθώς και πολλά αναλώσιμα. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία ομογενοποιήματος για τον προσδιορισμό των παρακάτω δραστικοτήτων των ενζύμων:

- Αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (L-LDH)
- Συνθετάση του κιτρικού οξέος (CS)
- Αφυδρογονάση του β-υδροξυάκυλο-CoA (HOAD)

Το διάλυμα ομογενοποίησης για τον προσδιορισμό της δραστικότητας των ενζύμων αποτελείται απο:

- 1 mM EDTA
- 2 mM $MgCl^2$
- 50 mM ιμιδαζολίου, σε pH=7,6 στους 24°C, το οποίο διατηρείται σε ψυγείο

Το ομογενοποίημα έπειτα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 7.000 στροφές.

Με βάση το μοριακό βάρος των παραπάνω ουσιών και της γραμμομοριακότητας τους, σε 0,1 λίτρο διαλύματος αντιστοιχούν:

- EDTA: 0,037224 gr
- $MgCl^2$: 0,04066 gr
- Ιμιδαζολίο: 0,3404 gr

Το διάλυμα ομογενοποίησης διατηρείται σε θερμοκρασία 4-8 ºC, όσο λαμβάνει χώρα η ομογενοποίηση των ιστών παραμένει σε πάγο. Για τον προσδιορισμό της δραστικότητας των ενζύμων οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε γυάλινο ομογενοποιητή ο οποίος περιείχε τετραπλάσιο όγκο διαλύματος ομογενοποίησης. Όσον αφορά την L-LDH η αραίωση ήταν 1:6. Το ομογενοποίημα στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 7.000 στροφές. Στην περίπτωση της L-LDH, το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται για 15min στους 5°C στις 13.000 στροφές σε ψυχώμενη φυγόκεντρο.

Το υπερκείμενο αφότου συλλεχτεί, χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της δραστικότητας των ενζύμων. Ρυθμίζεται το φωτόμετρο ως προς τη θερμοκρασία και το μήκος κύματος, και τοποθετούνται τα αντιδραστήρια του πρωτοκόλλου στην πλαστική κυψελίδα και αναδεύουμε με γυάλινη πιπέτα Pasteur. Στο τέλος προστίθεται το διάλυμα του ομογενοποιημένου ιστού στην κυψελίδα. Έπειτα λαμβάνει χώρα η φωτομέτρηση και ο προσδιορισμός της δραστικότητας του ενζύμου.

- ***Αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (L-LDH)***

Μέρος του υπερκειμένου αραιώθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης, με αραίωση 1:30 (Boutilier et al. 1993). Η μέγιστη δραστικότητα της L-LDH προσδιορί-στηκε σε σπεκτροφωτόμετρο (Pharmacia LKB - Ultrospec III) στα 340nm (ε340=6,22), από τη μεταβολή (πτώση) της απορρόφησης, εξαιτίας της οξείδωσης του NADH, σύμφωνα με την αντίδραση:

$$\text{πυροσταφυλικό οξύ NADH} + H^{+} \xleftrightarrow{\text{L-LDH}} NAD^{+} + \text{L- γαλακτικό οξύ}$$

Στην κυψελίδα τελικού όγκου 1 ml προστέθηκαν 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζόλης (50 mM, pH=7 στους 37°C), 0,01 ml NADH (0,15 mM), 0,02 ml πυροσταφυλικού οξέος (1 mM), 0,02 ml KCN (1 mM), 0,002 ml δείγματος ιστού και 0,448 ml απιονισμένου H2O. Στο μάρτηρα δεν προστέθηκε πυροσταφυλικό οξύ. Ο χρόνος αντίδρα-σης ήταν 5 min (Kanatous, et al. 2002). Η φωτομέτρηση έγινε στα 340 nm για 5 λεπτά.

ml	Δραστική ουσία
0.5ml	Imidazole Buffer 50mM (pH=7 Θ=37ºC)
0.01ml	NADH 0,15mM
0.02ml	Pyruvate 1mM
0.02ml	KCN 1mM
0.002ml	δείγμα
0.448ml	2d-H2O

- ***Συνθετάση του κιτρικού οξέος (CS)***

Το CoA μειώνει στοιχειομετρικά το αντιδραστήριο του Ellman διθειο-1,4-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB), αυξάνοντας έτσι την απορρόφηση, λόγω παραγωγής του 2-νιτρο-5-θειο-βενζοϊκού οξέος (NTB), το οποίο έχει έντονο κίτρινο χρώμα. Στην κυψελίδα τελικού όγκου 1ml προστέθηκαν 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζόλης (50mM, pH=7,5 στους 37°C), 0,02ml DTNB (0,25mM), 0,02ml οξαλοξικού οξέος (0,5mM), 0,01ml ακετυλ-CoA (0,4mM), 0,02ml KCN (1mM), 0,02ml δείγματος ιστού και 0,410ml 2d-H2O. Στον μάρτυρα δεν προστέθηκε οξαλοξικό οξύ. Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 2 λεπτά (Kanatous et al. 2002). Η φωτομέτρηση έγινε στα 412 nm για 2 λεπτά.

ml	Δραστική ουσία
0.5ml	Imidazole Buffer 50mM (pH=7 Θ=37ºC)
0.02ml	DTNB 0.25mM
0.01ml	ακετυλ-CoA 0.4
0.02ml	oxaloacetate 0.5mM
0.02ml	KCN 1mM
0.02ml	δείγμα
0.410ml	2d-H2O

- ***Αφυδρογονάση του β-υδροξυακυλο-CoA (HOAD)***

Η μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα 340nm, από την πτώση της απορρόφησης, λόγω της οξείδωσης του NADH, σύμφωνα με την αντίδραση

Ακετοακετυλ-CoA + NADH + H^+ $\xleftrightarrow{\text{HOAD}}$ b-υδροξυακυλο-CoA + NAD^+

Στην κυψελίδα τελικού όγκου 1ml προστέθηκαν 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζόλης (50mM, pH=7 στους 37°C), 0,01ml NADH (0,15mM), 0,02ml EDTA (1mM), 0,01ml ακετοακετυλ-CoA (0,1mM), 0,02ml KCN (1mM), 0,02ml δείγματος ιστού και 0,420ml απιονισμένου H2O. Στο μάρτυρα δεν προστέθηκε ακετοακετυλ-CoA. Η φωτομέτρηση έγινε στα 340nm για 10 λεπτά.

ml	Δραστική ουσία
0.5ml	Imidazole Buffer 50mM (pH=7 Θ=37^{o}C)
0.01ml	NADH 0.15mM
0.02ml	EDTA 1mM
0.01ml	ακετοακυλ-CoA 0.1mM
0.02ml	KCN 1mM
0.02ml	δείγμα
0.420ml	2d-H2O

3.3 Ανοσοαποτύπωση κατά western

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αποτελεί τη δημοφιλέστερη μέθοδο ποσοτικοποίησης και διαχωρισμού των πρωτεϊνών ενός δείγματος. Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δις-ακρυλαμίδης (MBA). Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι τα καταλληλότερα για ηλεκτροφόρηση καθώς αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και σχηματίζονται εύκολα. Επίσης, το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμίδης και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του APS και του TEMED, το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Γενικά, όσο πιο μικρή είναι η συγκέντρωση της πολυακρυλαμίδης τόσο μεγαλύτεροι πόροι δημιουργούνται στο πήκτωμα και αντιστρόφως.

Η πιο συχνή μέθοδος ηλεκτροφόρησης είναι αυτή που πραγματοποιείται σε αποδιατακτικές συνθήκες όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος (SDS-PAGE). Το απορρυπαντικό SDS, μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και προσδίδει σε αυτές αρνητικό φορτίο. Υπό αυτές τις συνθήκες οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση τη μοριακή τους μάζα με αποτέλεσμα οι μικρότερες πρωτεΐνες να μετακινούνται ταχύτερα προς το θετικό ηλεκτρόδιο και οι μεγαλύτερες πιο αργά.

Η πειραματική διαδικασία του στυπώματος κατά western ξεκινά με την ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-SDS. Αρχικά ετοιμάζουμε το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-SDS, το οποίο αποτελείται από δύο ξεχωριστά πηκτώματα. Αυτά είναι:

- **Πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) 10% ακρυλαμίδη**

Πήκτωμα διαχωρισμού 10% (5ml)	
ml	**Δραστική ουσία**
1.67ml	Acrylamide 30%
2.05ml	ddH_2O
1.23ml	1.5 M Tris-HCL pH 8.8
25μl	20% SDS
20μl	10% APS
10μl	TEMED

- **Πήκτωμα συμπύκνωσης (stacking gel) 4% ακρυλαμίδη**

Πήκτωμα συμπύκνωσης 4% (2.5ml)	
ml	**Δραστική ουσία**
425μl	Acrylamide 30%
1.428ml	ddH_2O
625μl	0.5 M Tris-HCL pH 6.8
12.5μλ	20% SDS
10μl	10% APS
5μl	TEMED

Τα βήματα για την παρασκευή του πηκτώματος είναι τα εξής:

1. Γίνεται η επιλογή του τζαμιού με το επιθυμητό πάχος (συνήθως 1 mm) και τα αντίστοιχα πάχους χτενάκια με τον επιθυμητό αριθμό θέσεων. Στη συνέχεια,

τοποθετούνται τα τζάμια στην αντίστοιχη συσκευή, ώστε να είναι έτοιμα να υποδεχτούν τα διάλυμα του πηκτώματος.

2. Παρασκευάζεται το πήκτωμα όπου θα διαχωριστούν οι πρωτεΐνες προσθέτοντας σε falcon 15 ml τα διαλύματα Acrylamide 30%, ddH_2O, 1.5 M Tris-HCL pH 8.8, 20% SDS, 10% APS, TEMED. Συνήθως, πρώτα προστίθεται το απιονισμένο νερό, ενώ πάντα στο τέλος προστίθεται τα πολυμεριστικά APS και TEMED.
3. Μετά την προσθήκη των πολυμεριστικών μεταφέρεται άμεσα το διάλυμα για το πήκτωμα διαχωρισμού στο εσωτερικό των τζαμιών και εν συνεχεία προσθέτουμε 500 μL ισοπροπανόλη για να ευθυγραμμιστεί το πήκτωμα και να απαλλαγεί από τυχόν φυσαλίδες.
4. Μετά το πέρας 15 λεπτών, το διάλυμα έχει πολυμεριστεί και έχει πήξει. Αφαιρείται η ισοπροπανόλη και στην συνέχεια γίνεται η την παρασκευή του πηκτώματος συμπύκνωσης.
5. Αφού γίνει η παρασκευή του, τότε το προσθέτουμε στα τζάμια που περιέχουν ανάμεσα τους το πήκτωμα διαχωρισμού και αμέσως τοποθετούμε τα χτενάκια πριν αυτό πολυμεριστεί. Αυτό το πήκτωμα διασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φτάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού.

Παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο των 1000 ml. Προσθήκη 100 mL10XEL Buffer, 5 mL 20 % SDS και 895 mL dH2O. Πριν γίνει η φόρτωση των δειγμάτων, ξεπλένονται οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων με τη βοήθεια μιας σύριγγας και στη συνέχεια γίνεται ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος στα 100 V για 15 λεπτά (PRE-RUN), αφού έχει φορτωθεί 2 μL 2X διαλύματος φόρτωσης σε κάθε πηγαδάκι προαιρετικά. Στη συνέχεια, επωάζονται τα δείγματα για 5 λεπτά στους 100^{o}C, φυγοκεντρούνται για 1 λεπτό σε 13000 rpm, επωάζονται σε πάγο και τα φορτώνουμε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης χρησιμοποιώντας παράλληλα 5μL πρωτεϊνικού μάρτυρα (Page Ruler Prestained Protein Ladder 10 250 kDa, 26620) για να μπορούμε να υπολογίσουμε το μέγεθος των πρωτεϊνών. Τέλος, γίνεται ηλεκτροφόρηση στα 100 V μέχρι να περάσουν τα δείγματα το πήκτωμα.

Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Transfer)

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) σε ογκομετρικό κύλινδρο των 1000mL προσθέτοντας τα εξής:

- 200 mL μεθανόλη
- 100 mL 10X EL Buffer
- 2 mL 20 % SDS
- 698 mL ddH_2O

Σε γυάλινο δοχείο όπου έχει προστεθεί το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, τοποθετείται το πήκτωμα πάνω στο οποίο έχει εφαρμοστεί η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ανάμεσα σε τέσσερα διηθητικά χαρτιά Whatman που έχουν εμποτιστεί με το διάλυμα, μέσα στην ειδική θήκη μεταφοράς. Η μεμβράνη κόβεται σε μέγεθος όμοιο με αυτό του πηκτώματος, τοποθετείται εφαπτόμενη στην επιφάνεια του, και εν συνεχεία τοποθετούνται στη συσκευή μεταφοράς με την ακόλουθη διάταξη: αρνητικός πόλος, σφουγγάρι, 2 φύλλα χαρτιού Whatman, πήκτωμα, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, 2 φύλλα χαρτιού Whatman, σφουγγάρι, θετικός πόλος. Στη συνέχεια, τοποθετούμε τη συσκευή μεταφοράς όπου θα πραγματοποιηθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στην νιτροκυτταρίνη, προσθέτουμε το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και ρυθμίζουμε την τροφοδοτική συσκευή στα 300, για 1 ώρα.

<u>Δέσμευση μη ειδικών θέσεων για το αντίσωμα (Blocking)</u>

Συνεχίζουμε τη διαδικασία αφού ελέγξουμε ότι η μεταφορά πραγματοποιήθηκε επιτυχώς, σύμφωνα με την εμφάνιση των ζωνών του πρωτεϊνικού μάρτυρα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Έπειτα, παρασκευάζουμε διάλυμα 5 % w/v γάλα (AppliChem, Non-fat dried milk powder) / PBST (PBS, 0,1 % Tween 20). Το PBS-T ενισχύει τις ειδικές αλληλεπιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος, ενώ οι πρωτεΐνες του γάλακτος δεσμεύουν τις μη ειδικές θέσεις στις οποίες μπορεί να δεσμευθεί το αντίσωμα. Τοποθετείται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στο διάλυμα και επωάζουμε για 45 λεπτά σε RT υπό ήπια ανάδευση.

<u>Προσθήκη 1ου αντισώματος</u>

Παρασκευάζεται διάλυμα 1 % w/v γάλα/PBS-T και προστίθεται σε αυτό το πρωτογενές αντίσωμα που είναι ειδικό για την κάθε πρωτεΐνη που μελετάται. Έπειτα, γίνεται τεμαχισμός της μεμβράνης στις περιοχές που αναμένεται να βρίσκονται οι πρωτεΐνες που εξετάζονται και επωάζεται η κάθε μεμβράνη με το αντίστοιχο αντίσωμά της υπό ανάδευση, στους 4 ºC για 16 ώρες.

<u>Προσθήκη 2ου αντισώματος</u>

Την επόμενη μέρα (μετά το πέρας των 16 ωρών) απομακρύνεται το πρωτογενές αντίσωμα. Πριν την προσθήκη του 2ου αντισώματος είναι απαραίτητες οι πλύσεις κάθε μεμβράνης υπό ανάδευση σε RT, με ποσότητα PBS-T ικανή για να καλυφθεί το κομμάτι της νιτροκυτταρίνης. Η συνολική διάρκεια των πλύσεων είναι 30 λεπτά και πραγματοποιούνται ως εξής: 1 πλύση για 15 λεπτά ακολουθούμενη από 3 πλύσειςς διάρκειας 5 λεπτών. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται 1 % w/v γάλα/PBST στο οποίο προσθέτουμε το δευτερογενές αντίσωμα με αραίωση 1:10000. Το δευτερογενές αντίσωμα προέρχεται από διαφορετικό οργανισμό από αυτόν από τον οποίο έχουν απομονωθεί οι πρωτεΐνες, είναι ειδικό για τη βαριά αλυσίδα του πρώτου αντισώματος. Επωάζονται οι μεμβράνες με το δευτερογενές αντίσωμα σε RT για 1 ώρα υπό ανάδευση.

<u>Διαδικασία εμφάνισης σε φιλμ</u>

Μετά το πέρας της επώασης η μεμβράνη ξεπλένεται ξανά για συνολικό χρόνο 30 λεπτών όπως και μετά από το πρωτογενές αντίσωμα αλλά με τη διαφορά ότι η τελευταία πλύση των 5 λεπτών γίνεται με PBS αντί για PBS-T. Αφού ολοκληρωθούν οι πλύσεις προστίθενται , ανάλογα με το μέγεθος του κομματιού της μεμβράνης, από 400-1000 μl από το μείγμα φθορισμού ECL (H2O2 και Luminol) και αφήνουμε 2-3 λεπτά το κομμάτι της μεμβράνης που έχει επωαστεί με το αντίσωμα. Η λουμινόλη (Luminol) είναι ο δότης ηλεκτρονίων και οξειδώνεται. Η διεγερμένη λουμινόλη μεταπίπτει σε σταθερή κατάσταση μετά την εκπομπή φωτονίων.Φτάνοντας προς το τέλος της διαδικασίας απομακρύνουμε την περίσσεια του ECL και καλύπτουμε τη νιτροκυτταρίνη με διαφανή μεμβράνη αφού την έχουμε μεταφέρει στην κασετίνα εμφάνισης. Η διαδικασία ολοκληρώνεται στο δωμάτιο εμφάνισης όπου καλύπτεται η νιτροκυτταρίνη με το φιλμ εμφάνισης για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, το οποίο στη συνέχεια το τοποθετείται στο μηχάνημα εμφάνιση.

3.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα Graphpad Prism 5.0 To post test που χρησιμοποιήθηκε για τα αποτελέσματα είναι το Bonferroni ενώ το chi square test (X2) που πραγματοποιήθηκε για τα κατηγορικά δεδομένα έγινε με το σταστιστικό πρόγραμμα SPPS 20. Τα στατιστικά σημαντικά ($P<0,05$) αποτελέσματα σημειώνονται στα διαγράμματα.

4. Αποτελέσματα

4.1 Επίδραση στη δραστικότητα των μεταβολικών ενζύμων

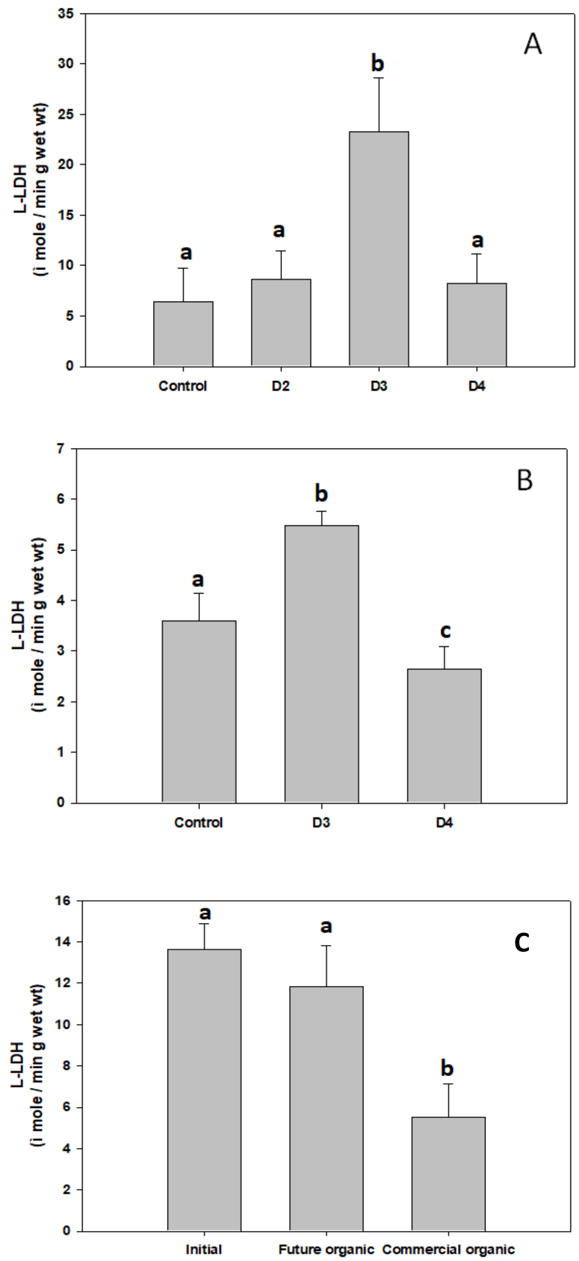
4.1.1 Αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (L-LDH)

Στην *Εικόνα 7* παρουσιάζεται η δραστικότητα της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος (L-LDH) από δείγματα λαβρακιού και συγκεκριμένα από ιστό ήπατος.

Στο πρώτο πείραμα (A.Conventional sea bass) παρατηρείται εντυπωσιακή αύξηση στην έκφραση του μεταβολικού ενζύμου στην δίαιτα D3 ($p < 0.05$). Ενώ αντίθετα, στο αρχικό δείγμα, στην δίαιτα D2 και στην δίαιτα D4 δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους, το p είναι μεγαλύτερο του 0,05 και τα επίπεδα έκφρασης φαίνονται να είναι στην ίδια τιμή.

Στο πείραμα που αφορά το βιολογικό λαβράκι (B.Organic sea bass) παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ και των τριών τροφών ($p < 0.05$). Ιδιαίτερα αυξημένη τιμή της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος παρατηρείται στην δίαιτα D3, ενώ χαμηλότερη εμφανίζει η δίαιτα D4.

Όσον αφορά την έκφραση της δραστικότητας της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος στο πείραμα Γαλαξίδι (Γ. Γαλαξίδι sea bass), είναι εντυπωσιακά μικρή στην δίαιτα με την εμπορική τροφή, ενώ έχει αυξηθεί σημαντικά στην τροφή με τα βιολογικά συστατικά του προγράμματος future ($p < 0.05$).



Εικόνα 7. Δραστικότητα της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος (L-LDH) στο ήπαρ του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax)* στις ομάδες σιτηρεσίων, των πειραμάτων A. Conventional sea bass, B. Organic sea bass, Γ. Γαλαξίδι sea bass.

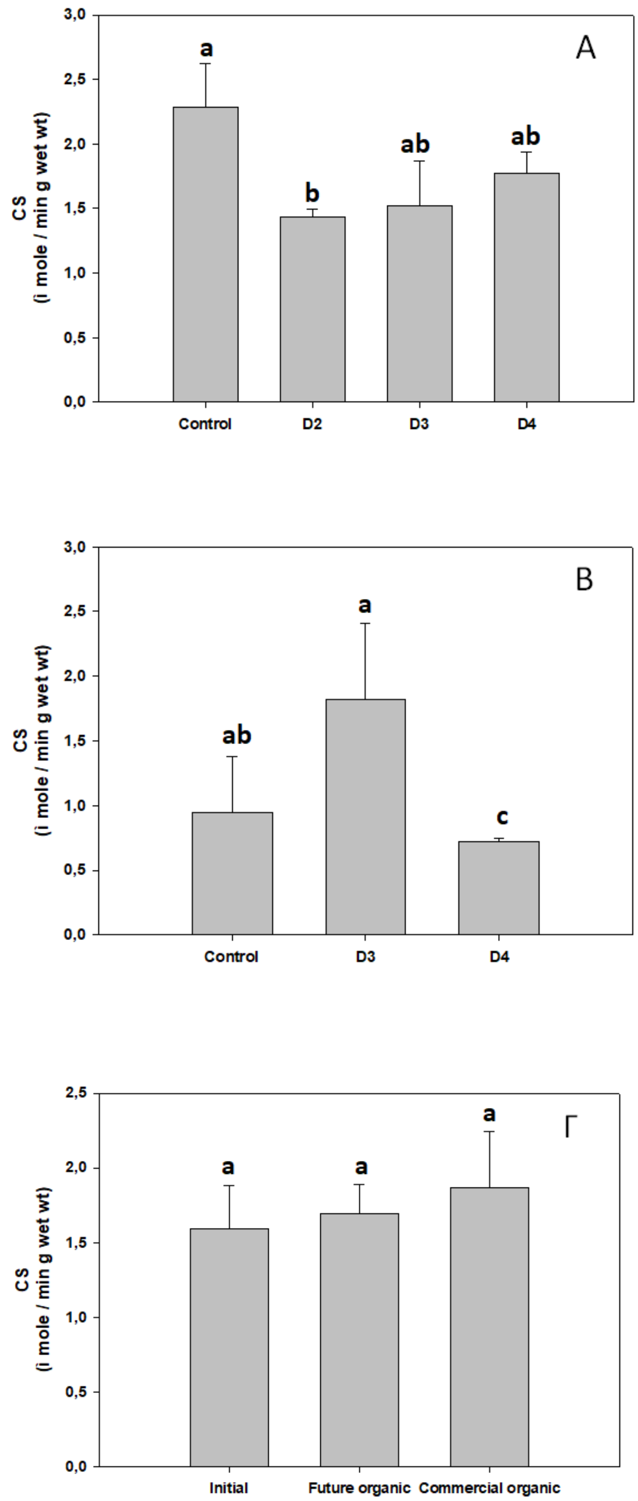
Στην *Εικόνα 8* απεικονίζεται η έκφραση της δραστικότητας της συνθετάσης του κιτρικού οξέος (CS) από δείγματα λαβρακιού των τριών πειραμάτων, ο ιστός που εξετάστηκε ήταν το ήπαρ.

Στο πρώτο πείραμα (A. Conventional sea bass) η CS κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα στις τρείς πειραματικές δίαιτες με ελάχιστη αύξηση στην δίαιτα D4. Η δίαιτα που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (control) παρουσιάζει την μεγαλύτερη αύξηση στην έκφραση του κιτρικού οξέος.

Στο πείραμα με το βιολογικό λαβράκι (B. Organic sea bass) παρατηρείται ιδιαίτερα αυξημένη δραστικότητα της CS στη δίαιτα D3 ενώ σημαντικά χαμηλή τιμή εμφανίζεται στην δίαιτα D4 ($p < 0.05$).

Σχετικά με την έκφραση της συνθετάσης του γαλακτικού οξέος στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο Γαλαξίδι (Γ. Γαλαξίδι) οι τρείς δίαιτες (control, organic, commercial) παρουσιάζουν παρόμοιά επίπεδα έκφρασης του ενζύμου. Συνεπώς, δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των τριών διαιτών, καθώς το $p > 0.05$.

4.1.2 Συνθετάση του κιτρικού οξέος (CS)



Εικόνα 8. Δραστικότητα της συνθετάσης του κιτρικού οξέος (CS) στο ήπαρ του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax)* στις ομάδες σιτηρεσίων, των πειραμάτων Α. Conventional sea bass, Β. Organic sea bass, Γ. Γαλαξίδι sea bass.

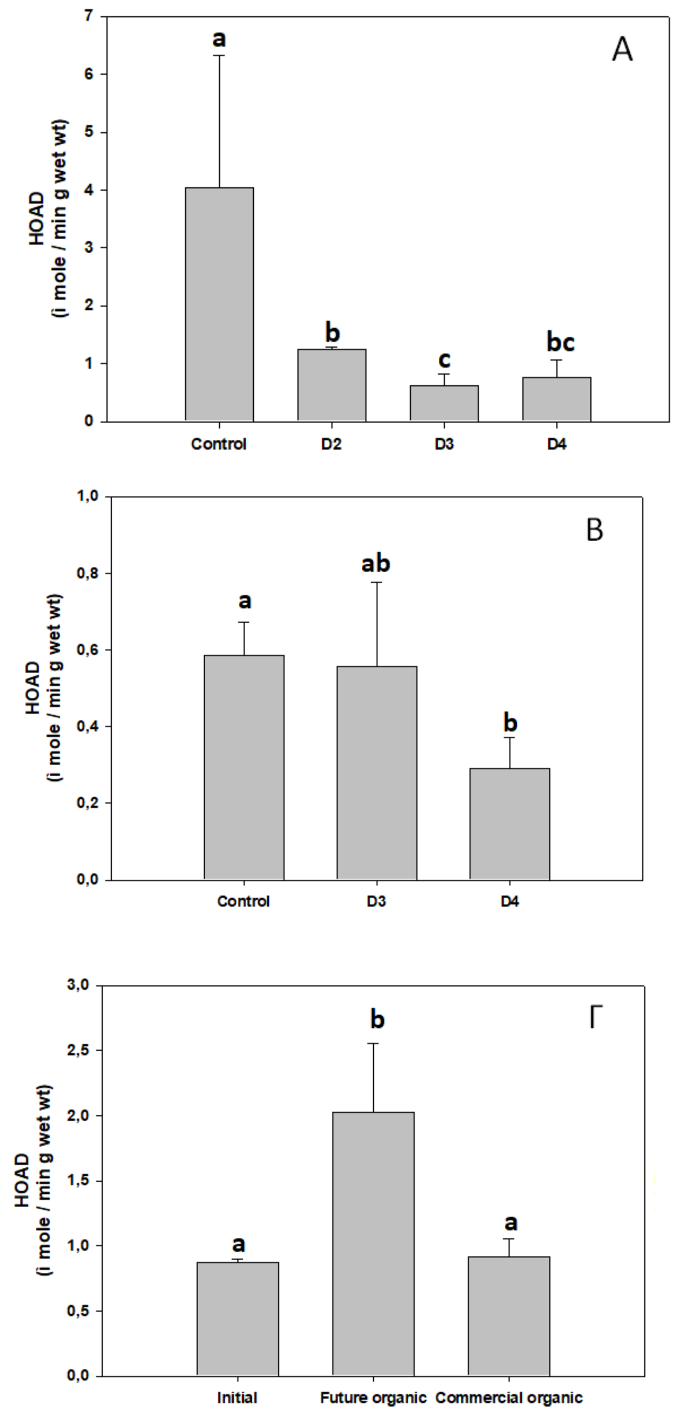
Στην *Εικόνα 9* εμφανίζεται η έκφραση της δραστικότητας της αφυδρογονάσης του β-υδροξυακυλο-CoA (HOAD) στα δείγματα λαβρακιού των τριών πειραμάτων, ο ιστός που εξετάστηκε ήταν το ήπαρ.

Στο πρώτο πείραμα (A. Conventional sea bass) η δίαιτα που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας εμφανίζει την μεγαλύτερη έκφραση του ενζύμου HOAD, ενώ υπάρχει σημαντική μείωση της στις υπόλοιπες τρεις δίαιτες (D2, D3, D4), με την μικρότερη τιμή να παρατηρείται στην δίαιτα D3 ($p > 0.05$).

Η έκφραση της αφυδρογονάσης του β–υδροξυακυλο–CoA κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα μεταξύ των τριών διαιτών στο πείραμα που αφορά το βιολογικό λαβράκι (B. Organic sea bass) με μια μικρή μείωση να εμφανίζεται στην δίαιτα D4, ενώ η δίαιτα control και η D3 εμφανίζουν όμοιες τιμές.

Στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο Γαλαξίδι (Γ. Γαλαξίδι sea bass), όπως φαίνεται στην εικόνα, η έκφραση του ενζύμου είναι εντυπωσιακά μεγάλη στην δίαιτα με τα βιολογικά συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν. Αντίθετα, στις δίαιτες control (initial) και commercial είναι μειωμένη η έκφραση της HOAD ($p < 0.05$)

4.1.3 Αφυδρογονάση του β-υδροξυακυλο - CoA (HOAD)



Εικόνα 9. Δραστικότητα της αφυδρογονάσης του β-υδροξυακυλο – CoA (HOAD) στο ήπαρ του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax)* στις ομάδες σιτηρεσίων, των πειραμάτων A. Conventional sea bass, B. Organic sea bass, Γ. Γαλαξίδι sea bass.

4.2 Επίδραση στην έκφραση των πρωτεϊνών

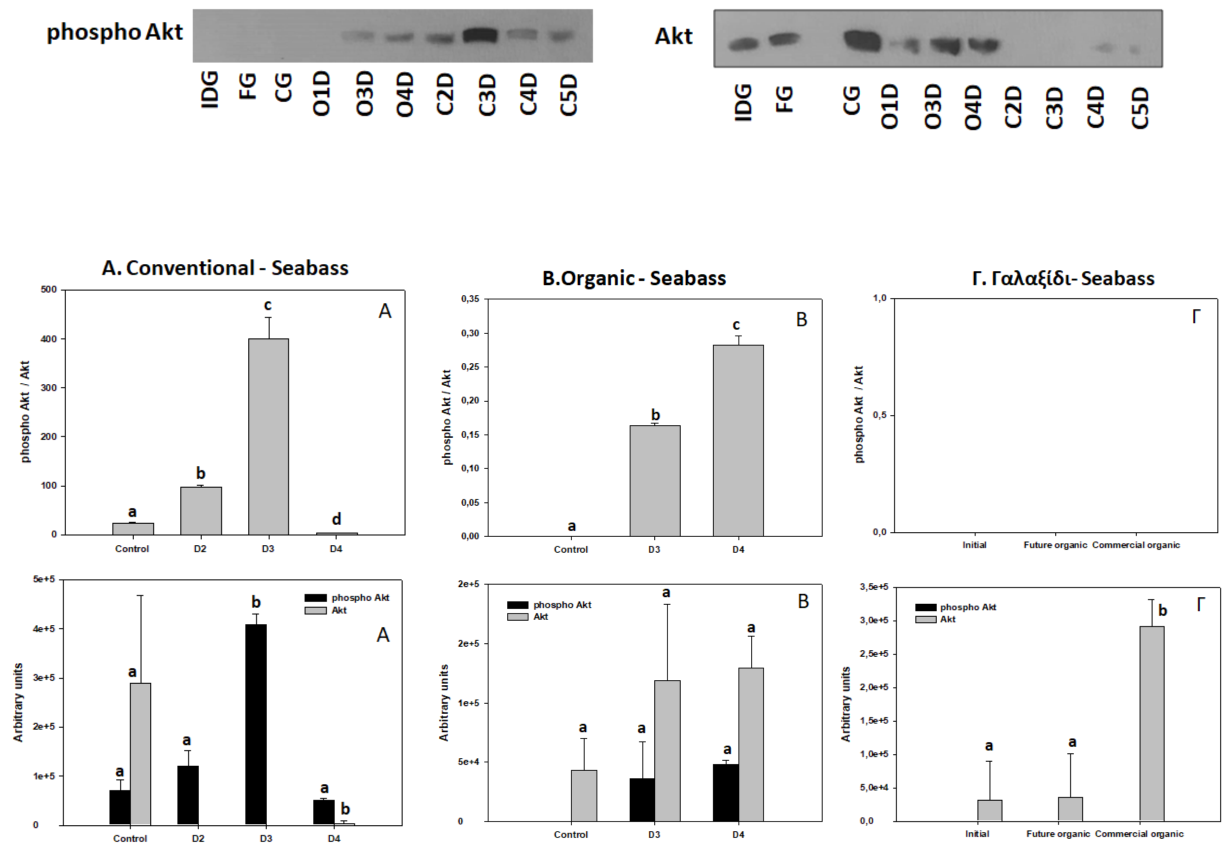
4.2.1 Επίδραση στην φωσφορυλίωση των Akt (pAkt), AMPK (pAMPK), MAPKs (p38 MAPK)

Στην *Εικόνα 10* παρουσιάζεται η Akt και η φωσφορυλίωση της pAkt στον εξεταζόμενο ιστό, ήπαρ, στα τρία πειράματα.

Στο πρώτο πείραμα (A. Conventional sea bass) στα λαβράκια που χορηγήθηκε η τροφή D3 εμφανίζουν σημαντική αύξηση της pAkt, ενώ αντίθετα στις υπόλοιπες δίαιτες η έκφραση της παρατηρείται σε πολύ χαμηλά επίπεδα ($p < 0.05$).

Στο δεύτερο πείραμα (B. Organic sea bass) στις δίαιτες D3 και D4 παρατηρείται αύξηση της pAkt, και συγκεκριμένα στα λαβράκια που χορηγήθηκε η D4 η pAkt είναι σε υψηλότερα επίπεδα. Αντίθετα, στη δίαιτα control δεν εμφανίζεται καθόλου η φωσφορυλυωμένη μορφή της akt.

Στο τελευταίο πείραμα στο Γαλαξίδι (Γ. Γαλαξίδι sea bass) δεν εμφανίζεται καθόλου η pAkt στις δίαιτες που δόθηκαν στα λαβράκια. Ενώ, η total Akt παρουσιάζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα στην εμπορική τροφή και σε πολύ χαμηλότερα στην βιολογική τροφή (future) ($p < 0.05$).



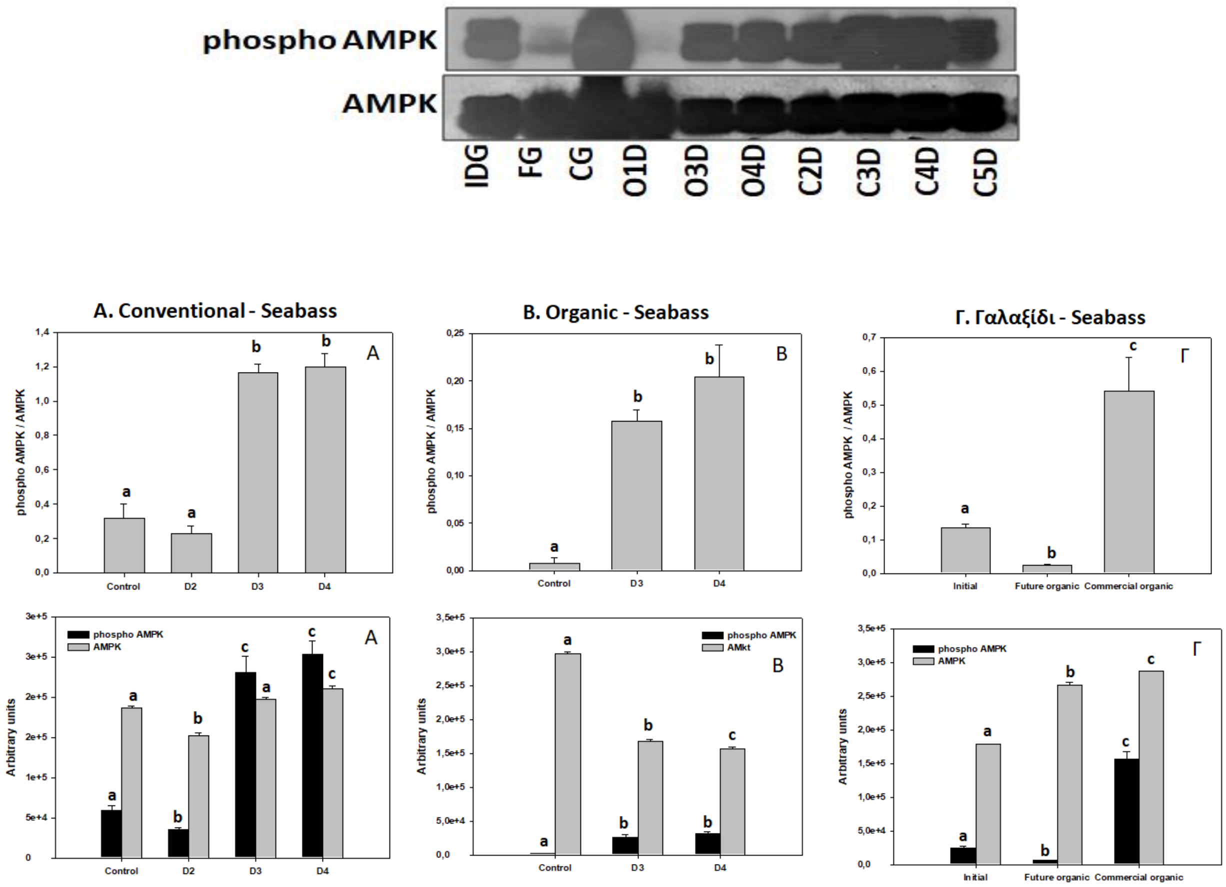
Εικόνα 10. Έκφραση της Akt, Akt/pAkt στο ήπαρ του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax)* των πειραμάτων A. Conventional sea bass, B. Organic sea bass, Γ. Γαλαξίδι sea bass.Οι ανοσοαποτυπώσεις μετρήθηκαν με πυκνομέτρηση και τα αποτελέσματα δόθηκαν σε διαγράμματα. Οι τιμές είναι οι μέση όροι των μετρήσεων.

Στην *Εικόνα 11* παρουσιάζεται η AMPK και η φωσφορυλίωση της AMPK στον εξεταζόμενο ιστό, ήπαρ, στα τρία πειράματα.

Στο πρώτο πείραμα (A. Conventional sea bass) στα λαβράκια που χορηγήθηκε η τροφή D3 και D4 εμφανίζουν σημαντική αύξηση της AMPK στο ήπαρ των δειγμάτων, ενώ αντίθετα στην δίαιτα D2 η έκφραση της παρατηρείται σε πολύ χαμηλά επίπεδα ($p < 0.05$).

Στο δεύτερο πείραμα (B. Organic sea bass) στις δίαιτες D3 και D4 παρατηρείται μικρή εμφάνιση της pAMPK. Αντίθετα, στη δίαιτα control δεν εμφανίζεται καθόλου η φωσφορυλυωμένη μορφή της AMPK.

Στο τελευταίο πείραμα στο Γαλαξίδι (Γ. Γαλαξίδι sea bass) η AMPK εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στην εμπορική τροφή (commercial). Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης στις υπόλοιπες δίαιτες είναι πολύ χαμηλά ($p < 0.05$).



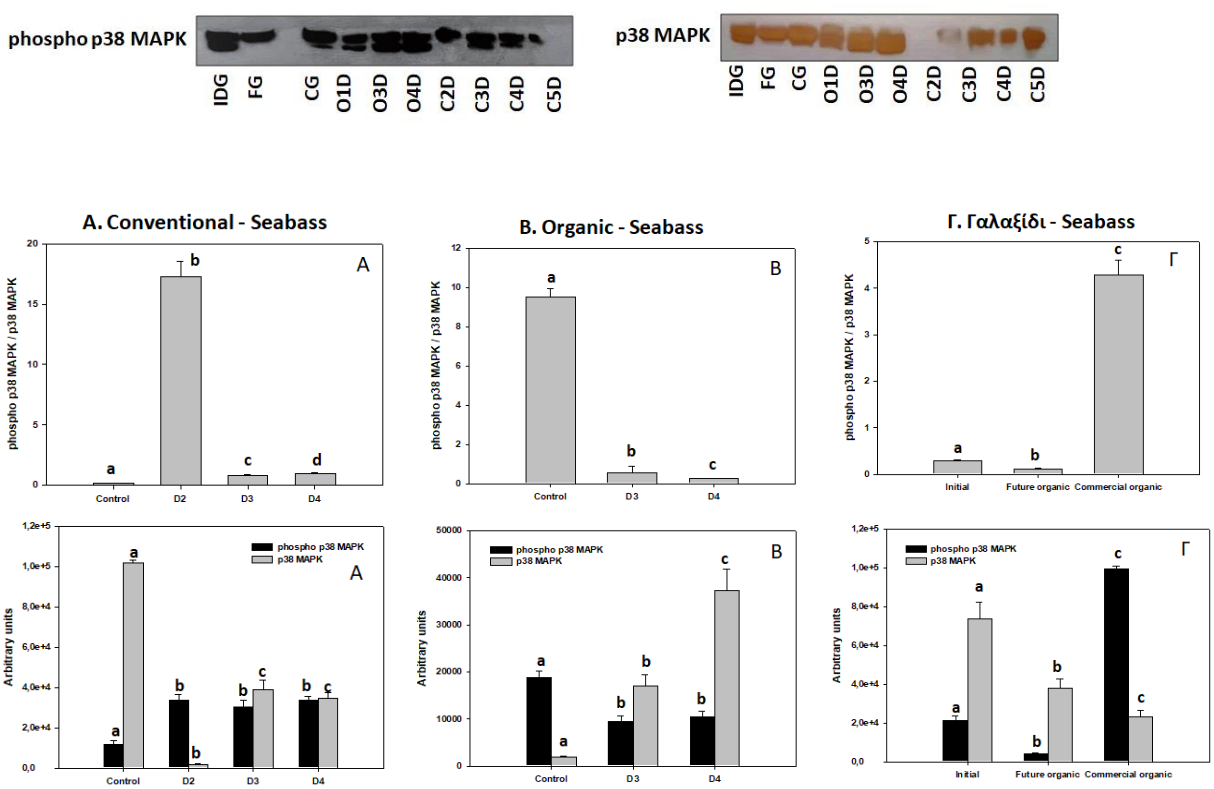
Εικόνα 11. Φωσφορυλίωση της AMPK στο ήπαρ του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax)* των πειραμάτων Α. Conventional sea bass, B. Organic sea bass, Γ. Γαλαξίδι sea bass.Οι ανοσοαποτυπώσεις μετρήθηκαν με πυκνομέτρηση και τα αποτελέσματα δόθηκαν σε διαγράμματα. Οι τιμές είναι οι μέση όροι των μετρήσεων.

Στην *Εικόνα 12* παρουσιάζεται η p 38 MAPK και η φωσφορυλίωση της p38 MAPK στον εξεταζόμενο ιστό, ήπαρ, στα τρία πειράματα.

Στο πρώτο πείραμα (A. Conventional sea bass) μεταξύ των τριών πειραματικών διαιτών παρατηρείται η εμφάνιση της φωσφορυλιωμένης μορφής MAPK ($p > 0.05$). Ενώ εμφανίζεται σε μειωμένα επίπεδα στην δίαιτα control.

Σε αντίθεση με το πρώτο πείραμα, στο δεύτερο (B. Organic sea bass) η p38 MAPK παρουσιάζεται σε ψηλά επίπεδα στην δίαιτα control και σε χαμηλότερα στη D3 και D4 δίαιτα ($p < 0.05$) .

Στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο Γαλαξίδι (Γ. Γαλαξίδι sea bass) στην εμπορική τροφή (commercial) η έκφραση της p38 MAPK βρίσκεται σε πολύ υψηλά επίπεδα, ιδιαίτερα σε σύγκριση με την βιολογική τροφή (future) ($p < 0.05$).



Εικόνα 12. Φωσφορυλίωση της MAPK p38 στο ήπαρ του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax)* των πειραμάτων A. Conventional sea bass, B. Organic sea bass, Γ. Γαλαξίδι sea bass.Οι

ανοσοαποτυπώσεις μετρήθηκαν με πυκνομέτρηση και τα αποτελέσματα δόθηκαν σε διαγράμματα. Οι τιμές είναι οι μέση όροι των μετρήσεων.

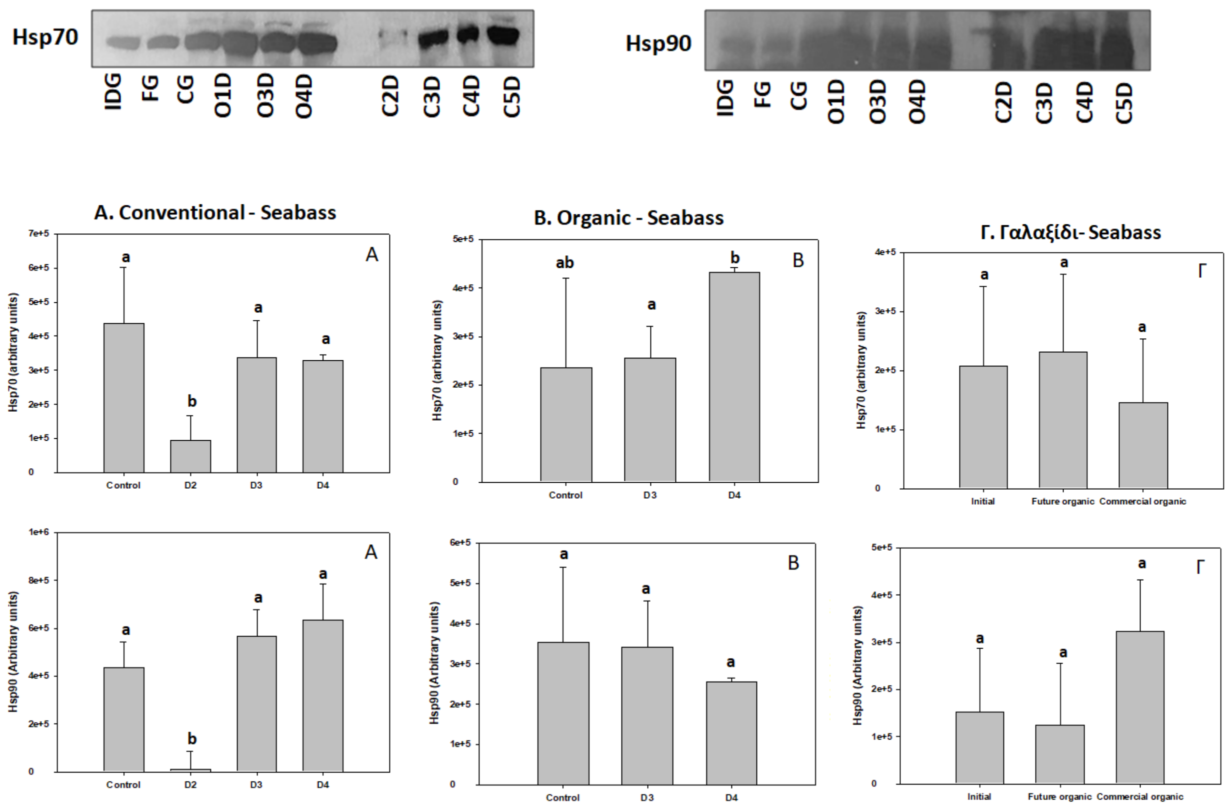
4.2.2 Επίδραση στην έκφραση πρωτεϊνών θερμικού πλήγματος Hsp70, Hsp90

Η πρωτεϊνική έκφραση της Hsp70 και Hsp90 παρουσιάζεται στην *Εικόνα 13* στον ιστό ήπαρ του λαβρακιού, στα τρία πειράματα.

Στο πρώτο πείραμα (A. Conventional sea bass) στα λαβράκια που χορηγήθηκε πειραματική τροφή εμφανίζεται σε υψηλά επίπεδα η έκφραση της Hsp70 τόσο στις δίαιτες D3, D4 όσο και στην control ($p > 0.05$). Αντίθετα, στην δίαιτα D2 η Hsp70 παρουσιάζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα ($p < 0.05$). Παρόμοια επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται και για την πρωτεΐνη Hsp90, με την δίαιτα D2 να εμφανίζει πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης συγκριτικά με τις υπόλοιπες δίαιτες.

Στο πείραμα Organic sea bass η Hsp70 εκφράζεται σε υψηλό βαθμό στα λαβράκια που χορηγήθηκε η τροφή D4. Ενώ οι δύο δίαιτες D3 και control εμφανίζουν παρόμοια έκφρασης της πρωτεΐνης. Όσον αφορά την έκφραση της Hsp90 στο συγκεκριμένο πείραμα οι τρείς δίαιτες παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές, αυτό σημαίνει πως δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά και το $p > 0.05$.

Στα λαβράκια του πειράματος στο Γαλαξίδι στα οποία χορηγήθηκε τόσο η εμπορική όσο και η βιολογική τροφή παρουσιάζουν σχεδόν ίδια επίπεδα έκφρασης της Hsp70 και της Hsp90 ($p > 0.05$). Στα δείγματα που χορηγήθηκε η τροφή ελέγχου παρατηρούμε την ίδια έκφραση των πρωτεϊνών Hsp70 και Hsp90 με τις πειραματικές δίαιτες.



Εικόνα 13. Έκφραση της Hsp70 και Hsp90 στο ήπαρ του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax)* των πειραμάτων Α. Conventional sea bass, Β. Organic sea bass, Γ. Γαλαξίδι sea bass.Οι ανοσοαποτυπώσεις μετρήθηκαν με πυκνομέτρηση και τα αποτελέσματα δόθηκαν σε διαγράμματα. Οι τιμές είναι οι μέση όροι των μετρήσεων.

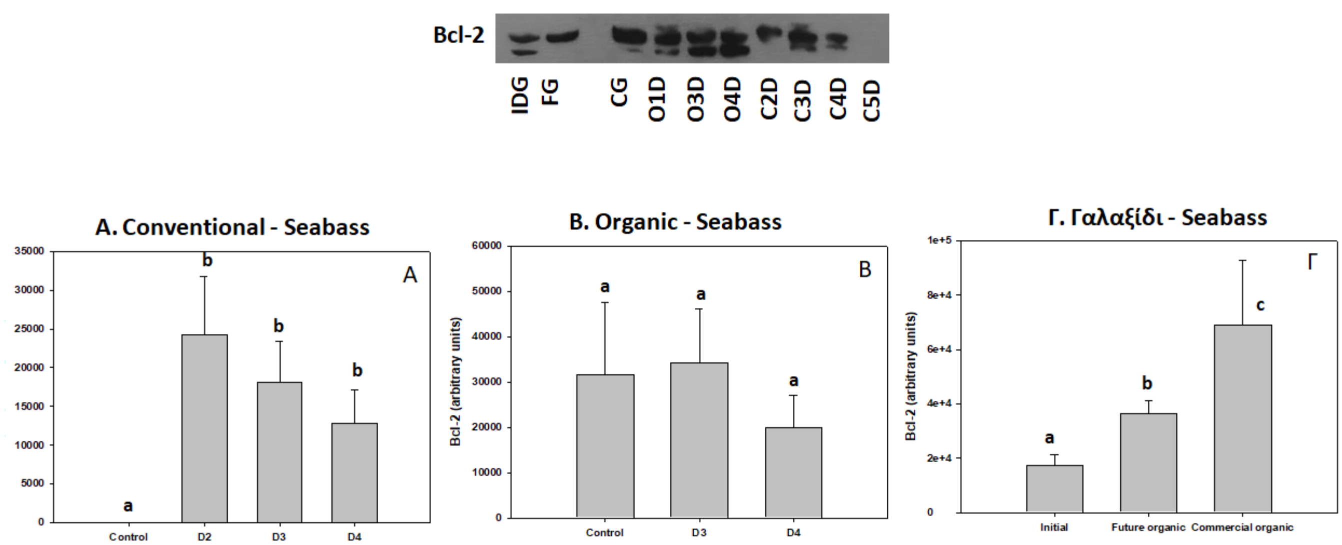
4.2.3 Επίδραση στην απόπτωση και στην αυτοφαγία (Bcl-2)

Η πρωτεϊνική έκφραση της Bcl-2 παρουσιάζεται στην *Εικόνα 14* για τον ιστό ήπαρ του λαβρακιού, στα τρία πειράματα.

Στο πρώτο πείραμα (A. Conventional sea bass) στην ομάδα ελέγχου δεν εμφανίζεται η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2. Σε αντίθεση με την δίαιτα control, οι υπόλοιπες D2, D3 και D4 παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης της Bcl-2 ($p > 0.05$).

Στα λαβράκια του δεύτερου πειράματος (B. Organic sea bass) τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης είναι παρόμοια και για τις τρείς πειραματικές δίαιτες (control, D3, D4) ($p > 0.05$).

Αντίθετα στο τρίτο πείραμα παρατηρούνται διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της Bcl-2. Συγκεκριμένα, η χρήση εμπορικής τροφής έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης στο υψηλότερο επίπεδο, ενώ στη δίαιτα με τα βιολογικά συστατικά (future) η έκφραση γίνεται σε χαμηλότερα επίπεδα.



Εικόνα 14. Έκφραση της Bcl-2 στο ήπαρ του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax)* των πειραμάτων A. Conventional sea bass, B. Organic sea bass, Γ. Γαλαξίδι sea bass.Οι

ανοσοαποτυπώσεις μετρήθηκαν με πυκνομέτρηση και τα αποτελέσματα δόθηκαν σε διαγράμματα. Οι τιμές είναι οι μέση όροι των μετρήσεων.

5 Συζήτηση

Η σωστή και ισορροπημένη σίτιση των οργανισμών στις ιχθυοκαλλιέργειες είναι απαραίτητη για την παραγωγή τελικών προϊόντων υψηλής ποιότητας. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας διερευνήθηκε η επίδραση της χορήγησης διαφορετικών σιτηρεσίων στην καταπόνηση, στην ενεργειακή ομοιόσταση και στα μεταβολικά ένζυμα σε άτομα λαβρακιού. Δεδομένης της έντονης πίεσης που έχει ασκηθεί στις υδατοκαλλιέργειες για μεγιστοποίηση της παραγωγής τους η εύρεση εναλλακτικών πηγών πρωτεϊνών είναι πλέον μονόδρομος. Η μείωση των ιχθυοαποθεμάτων που συμβάλλει στην αύξηση του κόστους των ιχθυοτροφών και η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση παραγωγής των μονάδων υδατοκαλλιέργειας, είναι από τους σημαντικότερους λόγους που καθιστούν επιτακτική την εύρεση εναλλακτικών πηγών πρωτεΐνης και λιπών για την παρασκευή των σιτηρεσιών (Tacon & Metian, 2008). Τα κύρια συστατικά που χρησιμοποιούνται σήμερα για την παρασκευή των ζωοτροφών είναι τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια.

Η υδατοκαλλιέργεια είναι ο ταχύτερα αναπτυσσόμενος κλάδος παραγωγής τροφίμων στον κόσμο, συμβάλλοντας σχεδόν στο ήμισυ στην παγκόσμια κατανάλωση ψαριών. Στα συστήματα ζωικής παραγωγής για ανθρώπινη διατροφή, τα εκτρεφόμενα ψάρια σε σχέση με τα χερσαία ζώα, μπορούν να μετατρέπουν αποτελεσματικότερα τις ίδιες ποσότητες τροφής για μεγαλύτερη ανάπτυξη (Subasinghe et al., 2009). Μία βιώσιμη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας συνεπάγεται τη διαμόρφωση κατάλληλων τροφών, που θα περιέχουν όλα τα απαραίτητα θρεπτικά και θα είναι φιλικές προς το περιβάλλον, ως εναλλακτική λύση στη χρήση υψηλών ποσοτήτων πρωτεϊνών και λιπιδίων που προέρχονται απευθείας από τη θαλάσσια αλιεία (Tacon & Metian, 2015).

Τα εναλλακτικά συστατικά, και ιδιαίτερα τα φυτικά συστατικά, είναι αυτά που έχουν μελετηθεί ευρέως, ιδιαίτερα στην Ευρώπη καθώς η χρήση μεταποιημένων ζωικών συστατικών απαγορεύτηκε από το 1990 (Moutinho et al., 2017). Οι πηγές που προέρχονται από φυτικές πρωτεΐνες και έλαια έχουν εξετασθεί τόσο μεμονωμένα όσο και συνδυαστικά ως κατάλληλα υποκατάστατα του ιχθυαλεύρου και ιχθυελαίου στις δίαιτες των εκτρεφόμενων ψαριών.

Σήμερα, η υδατοκαλλιέργεια βασίζεται σε μία ομάδα κοινών συστατικών φυτικών πρωτεϊνών όπως τα άλευρα σόγιας, η γλουτένη καλαμποκιού, η γλουτένη σίτου και το άλευρο ηλιόσπορου. Η σόγια αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές εναλλακτικές πηγές φυτικών πρωτεϊνών εξαιτίας της σύνθεσης των αμινοξέων (Parma et al., 2016). Παρόλα αυτά, υπάρχουν προβλήματα που προκαλούν οι εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών και είναι απαραίτητο να αντιμετωπισθούν. Για παράδειγμα το άλευρο σόγιας έχει βρεθεί ότι επάγει μια ποικιλία ιστολογικών και λειτουργικών μεταβολών στα γαστρεντερικά τμήματα πολλών ειδών, όπως η εντερίτιδα του απομακρυσμένου επιθηλιακού βλεννογόνου, συμπεριλαμβανομένων μορφολογικών μεταβολών και φλεγμονής (Krogdahl et al., 2010).

Η αντικατάσταση των ιχθυαλεύρων και των ελαίων με φυτικές πρωτεΐνες όπως σόγια και μπιζέλι, μπορεί να έχει σημαντικές συνέπειες σε διαφορετικά επίπεδα (λειτουργικό, παραγωγικό, θρεπτικό, περιβαλλοντικό, οικονομικό). Μια φυτική διατροφή μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το διατροφικό προφίλ του τελικού προϊόντος μειώνοντας την αναλογία ω-3/ω-6. Τα ψάρια μπορεί να οδηγηθούν σε μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης και συνεπώς χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να αποκτήσουν εμπορικό μέγεθος με αποτέλεσμα την αύξηση του κόστους παραγωγής το οποίο θα επιβαρύνει τους καταναλωτές.

Τα προϊόντα βακτηριακής προέλευσης, οι ζύμες καθώς και τα μικροφύκη φαίνεται να αποκτούν σταδιακά σημαντική θέση στη βιομηχανία ιχθυοτροφών για τα σαρκοφάγα είδη εκτροφής όπως ο σολομός, το λαβράκι και η τσιπούρα. Μια σημαντική πτυχή για ορισμένα από αυτά τα προϊόντα είναι η μέθοδος παραγωγής τους, που πραγματοποιείται με τη χρήση διαφορετικών αποβλήτων και με τον τρόπο αυτό συνεισφέρουν στην οικονομία ανακυκλώνοντας χρήσιμα θρεπτικά συστατικά. Αναμφίβολα ο κλάδος της υδατοκαλλιέργειας βρίσκεται σε ένα κομβικό σημείο και ο τομέας της έρευνας διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη εξέλιξη του. Η εξάρτηση της βιομηχανίας ιχθυοτροφών από τις πρώτες ύλες θαλάσσιας προέλευσης δεν είναι πλέον η πρώτη επιλογή εξαιτίας της υπεραλίευσης και της σταδιακής επιβάρυνσης τους περιβάλλοντος.

Οι καινοτόμες πρώτες ύλες βρίσκονται στο επίκεντρο του κλάδου. Το απολιπομένο μικροφύκος *Nannochloropsis sp.* έχει αξιολογηθεί ως πηγή πρωτεΐνης στο λαβράκι και βρέθηκε δυνατότητα αντικατάστασης του ιχθυαλεύρου έως 9,4% χωρίς να επηρεαστούν οι παράμετροι ανάπτυξης και η σύσταση σώματος (Valente et al. 2019). Σύγχρονες διαδικασίες και η καλλιέργεια φυκών σε φωτοβιοαντιδραστήρες ή συστήματα ζύμωσης μπορούν να δημιουργήσουν προϊόντα φυκών στη μορφή αλεύρου, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν με τον ίδιο τρόπο όπως το ιχθυάλευρο για την παραγωγή ιχθυοτροφών.

Παράλληλα, η χρήση των εντομάλευρων ως πηγή πρωτεΐνης στους εκτρεφόμενους ιχθύες έχει ερευνηθεί εκτενώς. Η θρεπτική αξία των εντόμων στη διατροφή των ιχθύων διαφέρει ανάλογα με το είδος, την ηλικία, την μέθοδο επεξεργασίας και του υποστρώματος όπου η λάρβα του εντόμου θα παραχθεί (Aniebo and Owen 2010). Η χρήση του εντομάλευρου, από το είδος (*Tenebrio molitor*), στη διατροφή του λαβρακιού έδειξε ότι στο συγκεκριμένο είδος ιχθύος μπορεί να συμπεριληφθεί σε ποικίλα ποσοστά χωρίς αρνητικές επιδράσεις στις παραμέτρους ανάπτυξης (Mastoraki et al., 2022, Gasco et al. 2016). Όπως φαίνεται με βάση την βιβλιογραφία ένας από τους βασικούς στόχους είναι να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή βιομάζας των εντόμων (προνυμφών) και ταυτόχρονα να μειωθεί ο χρόνος ανάπτυξης τους καθώς τα έντομα σύμφωνα με αποτελέσματα ερευνών δείχνουν να είναι αρκετά ενθαρρυντικές εναλλακτικές πηγές για την αντικατάσταση των ιχθυαλεύρων, στις ζωοτροφές εκτρεφόμενων οργανισμών. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, οι ιχθυοτροφές που χρησιμοποιούνται στην υδατοκαλλιέργεια εξακολουθούν να περιέχουν μεγάλο ποσοστό ιχθυάλευρων, που συνήθως προέρχονται από μικρά πελαγικά ψάρια. Για την παραγωγή ενός κιλού ιχθυάλευρου απαιτούνται 4,5 κιλά ολόκληρα ψάρια, ενώ για την παραγωγή ενός κιλού ιχθυελαίου απαιτούνται περίπου 20 κιλά ολόκληρα ψάρια (Shepherd & Jackson 2013).

Η μετάβαση στην εκτροφή ψαριών χαμηλότερου τροφικού επιπέδου, η οποία θα επιτευχθεί με την χρήση εναλλακτικών πηγών πρωτεϊνών (φυτικών ή ζωικών), θα είναι περισσότερο φιλική προς το περιβάλλον και δεν θα γίνεται κατάχρηση των αλιευτικών πόρων. Αντίθετα, αυτοί θα είναι διαθέσιμοι για άμεση κατανάλωση από τον ανθρώπινο πληθυσμό. Η έρευνα για εναλλακτικές πηγές ιχθυοτροφών και βιώσιμων λύσεων και στρατηγικών συνεχίζεται με σκοπό την εύρεση τροφών φιλικών προς το θαλάσσιο περιβάλλον. Η ικανότητα την προνυμφών του *T. molitor* να καταναλώνουν λιγότερη ενέργεια και πόρους για την ανάπτυξή τους, να αναπτύσσονται σε μικρό χώρο σε σύντομο χρονικό διάστημα, να έχουν υψηλή αναπαραγωγική ικανότητα, να έχουν μεγάλο ρυθμό ανάπτυξης και υψηλή θρεπτική αξία τα καθιστούν μια σημαντική εναλλακτική λύση για το περιβάλλον. Η μετατρεψιμότητα των γεωργικών και βιομηχανικών παραπροϊόντων σε υψηλής ποιότητας τροφής πλούσια σε πρωτεΐνες και λίπη σε σύντομο χρονικό διάστημα επηρεάζεται από τις συνθήκες ανάπτυξης τους (Andreadis et al., 2021). Συνεπώς, για να πετύχουμε την μέγιστη καλλιέργεια των εντόμων με ικανοποιητικό ρυθμό αύξησης πρέπει να λάβουμε υπόψη τις συνθήκες εκτροφής, το είδος του υποστρώματος και πιθανόν να γίνει χρήση υποστρωμάτων εμπλουτισμένα με υπολείμματα απόσταξης ή έκθλιψης αιθέριων ελαίων (Andreadis et al. 2022 & Antonopoulou et al. 2022).

Σύμφωνα με τους Antonopoulou et al., (2013) όπου μελέτησαν την επίδραση της μακροχρόνιας στέρησης τροφής (1 μήνας σίτιση - 3 μήνες ασιτία) και της ασιτίας/επανασίτησης (2 μήνες ασιτία - 2 μήνες σίτιση) στο κυτταρικό στρες και την αντιοξειδωτική άμυνα σε τέσσερις ιστούς στο λαβράκι, παρατήρησαν αυξημένη φωσφορυλίωση των ERKs στις δύο αυτές καταστάσεις σε σχέση με τα λαβράκια της ομάδας ελέγχου (4 μήνες κανονικής σίτισης) στο έντερο. Στο ήπαρ και τον ερυθρό μυ της ασιτίας/επανασίτισης παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα της Hsp70 και της φωσφορυλιωμένης p38MAPK, ενώ αντίθετα αυξημένα επίπεδα της Hsp90. Στους ίδιους ιστούς στην κατάσταση ασιτίας, τα επίπεδα της Hsp70 αυξήθηκαν, ενώ η φωσφορυλιωμένη p38MAPK ελαττώθηκε μόνο στο ήπαρ. Τέλος, στον λευκό μυ τα επίπεδα της Hsp90 μειώθηκαν, ενώ αυξήθηκαν της φωσφορυλιωμένης p38MAPK τόσο στην ασιτία, όσο και στην ασιτία/επανασίτιση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Οι Feidantsis et al. (2014) μελέτησαν την επίδραση εμπλουτισμένων με ταυρίνη σιτηρεσίων στην ενεργοποίηση των Hsps και MAPKs στο λαβράκι. Συγκεκριμένα, τα σιτηρέσια που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν ταυρίνη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις [0.2% (T 0.2), 0.5% (T 0.5) και 1.0% (T 1.0) w/w], ενώ στην ομάδα ελέγχου χορηγήθηκε σιτηρέσιο χωρίς ταυρίνη. Παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα Hsp70 και φωσφορυλιωμένης p38MAPK στο ήπαρ και στις 3 καταστάσεις σίτισης με ταυρίνη, ενώ αύξηση στην φωσφορυλίωση των ERKs σημειώθηκε στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου στις καταστάσεις σίτισης με τα σιτηρέσια T 0.2 και T 0.5.

A. Conventional sea bass

Όπως φάνηκε στην έκθεση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας, στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο HCMR (A. HCMR Conventional sea bass) στις πειραματικές τροφές (D2, D3, D4) η έκφραση της HOAD ήταν πολύ χαμηλή σε αντίθεση με την CS η οποία έφτασε σε πολύ υψηλά επίπεδα και στις τρείς δίαιτες. Ενώ όσον αφορά την αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (L-LDH) στην δίαιτα D3 εκφράζεται εντυπωσιακά υψηλή. Αυτό πιθανόν να σημαίνει ότι η ομοιόσταση στον οργανισμό έχει διαταραχθεί με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση του ενζύμου.

Παράλληλα, κατά την μελέτη των πρωτεϊνών φαίνεται ότι οι δείκτες κυτταρικής καταπόνησης, δηλαδή οι πρωτεΐνες θερμικού πλήγματος (Hsp70, Hsp90), εκφράζονται τόσο στην δίαιτα D3 όσο και στην D4 σε πολύ μεγάλο ποσοστό. Ενώ στην δίαιτα control φαίνεται ότι δεν υπάρχει έντονα το φαινόμενο της καταπόνηση στα κύτταρα σύμφωνα με τον δείκτη που μετρήθηκε. Όπως αναφέρθηκε, οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 είναι υπεύθυνες για τον έλεγχο του ενδογενούς μονοπατιού του αποπτωτικού μηχανισμού. Οι δίαιτες D2, D3, D4 εκφράζουν σε υψηλό βαθμό την πρωτεΐνη Bcl-2 με την δίαιτα D2 να έχει το μεγαλύτερο ποσοστό, σε αντίθεση με την control στην οποία δεν εντοπίζεται καθόλου η πρωτεΐνη. Αυτό σημαίνει ότι η αντικατάσταση του ιχθυάλευρου πιθανόν να επηρεάζει σημαντικά τον αποπτωτικό μηχανισμό.

Ο κύριος ρυθμιστής του μεταβολισμού τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε επίπεδο οργανισμού στους ευκαρυώτες είναι η πρωτεϊνική κινάση AMP (AMPK). Θα μπορούσε να παρομοιαστεί με έναν ενεργειακό αισθητήρα που ενεργοποιείται όταν τα επίπεδα ATP στο εσωτερικό του κυττάρου είναι χαμηλά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων, παρατηρούμε πως η δίαιτα D3 έχει πολύ υψηλά ποσοστά έκφρασης της phosphor Akt προς την Akt. Γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με την έκφραση των άλλων πρωτεϊνών. Ενώ η φωσφορυλίωση της AMPK συμβαίνει τόσο στην δίαιτα D3 όσο και στην D4 σε εντυπωσιακά υψηλά επίπεδα. Τέλος είναι αξιοσημείωτη η απουσία της p38 MARK σε αυτές τις δύο δίαιτες (D3, D4).

B. Organic sea bass

Στο πείραμα (B. Organic sea bass) όπου χρησιμοποιήθηκαν βιολογικές τροφές με ποσοστά αντικατάστασης 25% και 30% παρατηρούμε πως στα ένζυμα του μεταβολισμού τα επίπεδα έκφρασης τους είναι σχετικά σταθερά. Συγκεκριμένα, η HOAD εκφράζεται σε παρόμοιο βαθμό μεταξύ των τριών πειραματικών διατροφών. Ενώ αντίθετα, θα λέγαμε ότι στην L-LDH και στην CS υπάρχει αξιοσημείωτη διαφορά στην δίαιτα όπου έγινε αντικατάσταση του ιχθυάλευρου σε ποσοστό 25%, με το ένζυμο να εκφράζεται σε πολύ μεγάλο ποσοστό.

Οι πρωτεΐνες ελέγχου του αποπτωτικού μηχανισμού (Bcl-2) καθώς και οι πρωτείνες θερμικού πλήγματος (Hsp70, Hsp90) δεν παρουσιάζουν διαφορά στην έκφραση τους μεταξύ των δύο ποσοστών αντικατάστασης του ιχθυάλευρου. Με εξαίρεση την Hsp70 η οποία εκφράζεται περισσότερο σε οργανισμούς όπου χορηγήθηκε δίαιτα με ποσοστό αντικατάστασης 30%.

Μεγάλο ενδιαφέρον έχει η εμφάνιση των πρωτεϊνών στο συγκεκριμένο πείραμα. Η παρουσία της Akt είναι αυξημένη στις δίαιτες όπου έχει γίνει αντικατάσταση, με το ποσοστό 30% να αυξάνεται ακόμη περισσότερο. Ενώ αντίθετα, η p38 MAPK εμφανίζεται σε πολύ μικρό ποσοστό στις δίαιτες που έγινε η αντικατάσταση και αυξάνεται στην control που περιέχει ιχθυάλευρο και ιχθυέλαιο. Τέλος η AMPK εντοπίζεται στις τρείς καταστάσεις σε διαφορετικά επίπεδα με το υψηλότερο να βρίσκεται στην δίαιτα με τα ιχθυάλευρα (control) και το χαμηλότερο στο υψηλότερο ποσοστό αντικατάσταση 30%.

Γ. Γαλαξίδι sea bass

Η σύγκριση των βιολογικών με τις συμβατικές τροφές του εμπορίου παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και είναι μια πρόκληση για τους ερευνητές με σκοπό να μελετηθούν οι ευεργετικές ιδιότητες των βιολογικών τροφών. Να σημειωθεί πως η πλήρη σύσταση της τροφής των εμπορικών διαιτών δεν είναι γνωστή, εκτός από τα βασικά συστατικά που είναι διαθέσιμα για την ενημέρωση του καταναλωτή. Στο πείραμα που εκπονήθηκε στο Γαλαξίδι έγινε σίτιση σε άτομα λαβρακιού με τροφή του εμπορίου (συμβατική) και με τροφή που χρησιμοποιήθηκαν βιολογικά καινοτόμα συστατικά όπως η πρωτεΐνη μαγιάς, η πρωτεΐνη μπιζελιού, το καλαμάρι κλπ. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην έκφραση ορισμένων ενζύμων μεταβολισμού μεταξύ των δύο διαιτών. Η CS φαίνεται να κυμαίνεται στο ίδιο επίπεδο τόσο στους οργανισμούς που τράφηκαν με την εμπορική τροφή όσο και σε αυτούς που χορηγήθηκε βιολογική τροφή. Η HOAD και η L-LDH είναι σε πολύ υψηλότερα επίπεδα στην μεταχείριση με την βιολογική τροφή σε σύγκριση με την εμπορική.

Τα ψάρια που τράφηκαν με την εμπορική τροφή παρουσιάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό την έκφραση του δείκτη αποπτωτικού μηχανισμού Bcl-2 σε σύγκριση με αυτά με την βιολογική τροφή όπου το ποσοστό έκφρασης είναι χαμηλότερο. Οι πρωτεΐνες θερμικού πλήγματος δεν παρουσιάζουν διαφορές στην έκφραση τους τόσο στις βιολογικές όσο και στις συμβατικές τροφές. Είναι πολύ ενδιαφέρον ή απουσία της pAkt από πείραμα καθώς δεν εμφανίζεται καθόλου η πρωτεΐνη στις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν. Αντίθετα, η φωσφορυλιωμένη μορφή της AMPK και της p38 MAPK είναι σημαντικά αυξημένες στους οργανισμούς που έλαβαν την εμπορική τροφή και πολύ χαμηλή στα ψάρια που χορηγήθηκε η βιολογική τροφή.

Συμπερασματικά, θα έλεγε κανείς πως με τις βιολογικές τροφές οι ερευνητές έχουν την ευκαιρία να μελετήσουν εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών και θρεπτικών συστατικών, καθώς βλέπουμε πως τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά και με την κατάλληλη διαχείριση θα μπορούσαν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν στον κλάδο των υδατοκαλλιεργειών.

Χρηματοδότηση

Τα πειράματα χρηματοδοτήθηκαν από τη δράση Καινοτομία Horizon 2020 (European Union’s Horizon 2020 Innovation Action) της Ευρωπαϊκής ένωσης, με το ερευνητικό πρόγραμμα «FutureEUAqua», βάση της συμφωνίας επιχορήγησης με αρ. 817737.

6. Βιβλιογραφία

- **Andreadis, S.S., Panteli, N., Mastoraki, M., Rizou, E., Stefanou, V., Tzentilasvili, S., Sarrou, E., Chatzifotis, S., Krigas, N. Antonopoulou, E., (2021).** ***Towards Functional Insect Feeds: Agri-Food By-Products Enriched with Post-Distillation Residues of Medicinal Aromatic Plants in Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae) Breeding.*** **Antioxidants, 11(1): 68.**
- **Anastasiou S., Nengas I. (2005)** ***A general review on the use of alternative protein sources in diets for Mediterranean fish.*** **Cahiers Options Méditerranéennes (63): 121-126. http://om.ciheam.org/om/pdf/c63/05600072.pdf**
- **Antonopoulou E., Kentepozidou E., Feidantsis K., Roufidou C., Despoti S., Chatzifotis S., (2013).** ***Starvation and re-feeding affect Hsp expression, MAPK activation and antioxidant enzymes activity of European Sea Bass (Dicentrarchus labrax).*** **Comparative Biochemistry and Physiology (165): 79–88.**
- **Antonopoulou E., Kousidou E., Tserga E., Feidantsis K., Chatzifotis S. (2014*****). Dietary lipid levels in meagre (Argyrosomus regius): Effects on biochemical and molecular indicators of liver.*** **Aquaculture (428-429) : 265-271.**
- **Ashley P.J. (2007).** ***Fish welfare: current issues in aquaculture.*** **Applied Animal Behaviour Science (3-4): 199-235.**
- **Bergleiter S., Berner N., Censkowsky U., Julià-Camprodon G. (2009).** ***Organic aquaculture 2009 –production and markets.*** **Organic Services, Naturland (120).**
- **Biswas A., Takakuwa F., Yamada S., Matsuda A., Saville R.M., LeBlanc A., Silverman J. A., Sato N., Tanaka H. (2020).** ***Methanotroph (Methylococcus capsulatus, Bath) bacteria meal as an alternative protein source for Japanese yellowtail, Seriola quinqueradiata.*** **Aquaculture (529) 735-700.**
- **Chen M. & Wang J., (2002).** ***Initiator caspases in apoptosis signaling pathways.*** **Apoptosis (7): 313-319.**
- **Colman J.E., Pawson M.G., Holmen J., Haugen T.O. (2008).** ***European sea bass in the North Sea; past, present and future status, use and management challenges.*** **Global Challenges in Recreational Fisheries: Development, management and science,**

Blackwell Scientific.

- **Cowey C. B. (1995).** ***Intermediary metabolism in fish with reference to output of end products of nitrogen and phosphorus.*** **Water Science and Technology (10): 21-28.**
- **Craig S., Helfrich L.A., Kuhn D., Schwarz M.H.(2017).** ***Understanding fish nutrition,feeds, and feeding.*** **Aquaculture Nutrition.**
- **Edinger A.L., Thompson C.B., (2004).** ***Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy.*** **Current Opinion in Cell Biology (16): 663-669.**
- **FAO. 2021. Food and Agriculture Organization of the United Nations.** ***National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets:*** **Greece. In FAO Fisheries and Aquaculture Department FAO: Rome, Italy, 2021.**
- **FAO. 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in Action; FAO: Rome, Italy, 2020.**
- **FAO. 2014. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Fisheries information, Data and statistics Unit. FishStatJ version 2.1.1. Universal software for fisheries statistics time series. Rome.**
- **Feidantsis K., Kaitetzidou E., Mavrogiannis N., Michaelidis B., Kotzamanis Y., Antonopoulou E.,(2014).** ***Effect of taurine-enriched diets on the Hsp expression, MAPK activation and the antioxidant defence of the European sea bass (Dicentrarchus labrax).*** **Aquaculture Nutrition (20): 431-442.**
- **Feidantsis K., Portner H.O., Markou T., Lazou A., Michaelidis B. (2012).** ***Involvement of p38MAPK in the induction of Hsp70 during acute thermal stress in red blood cells of the gilthead seabream, Sparus aurata*****. Journal of the Experimental Zoology (317): 303-310.**
- **FGM (Federation of Greek Maricultures).** ***Aquaculture in Greece: Annual Report*****. 2020, p. 16. https://www.fgm.com.gr/uploads/file/FGM_20_ENG_PRINT**
- **Fritsch M. (2005).** ***Biology and exploitation of sea bass Dicentrarchus labrax (L.) in the French fisheries of the English Channel and the Bay of Biscay*****. Ph.D. thesis, University de Bretagne Occidentale.**
- **Froese R., Pauly D. (2013). FishBase. http://www.fishbase.org.**

- **Glencross B.D. (2009).** ***Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species.*** **Reviews in Aquaculture 1(2), 71-124.**
- **Gornati R., Papis E., Rimoldi S., Terova G., Saroglia M., Bernardini G. (2004).** ***Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (Dicentrarchus labrax L.).*** **Gene (341): 111-118.**
- **Lembo, G. & Mente E.(2019).** ***Organic aquaculture: Impacts and future developments*****. Springer.**
- **Hodar R., Vasava R.J., Mahavadiya D.R., Joshi N.H. (2020).** ***Fish meal and fish oil replacement for aqua feed formulation by using alternative sources:a review.*** **Journal of Experimental Zoology (23): 13-21. www.connectjournals.com**
- **Houlihan D., Boujard T., Jobling M. (2008*****). Food intake in fish*****.**
- **Jackson A. (2006)** ***The importance of fishmeal and fish oil in aquaculture diets.*** **International Aquafeed.**
- **Jackson T. (2009)** ***Prosperity without Growth. Economics for a finite planet earthscan, London, New York.***
- **Jennings S., Pawson M.G. (1992).** ***The origin and recruitment of bass, Dicentrarchus labrax, larvae to nursery areas.*** **Journal of the Marine Biological Assossiation of the UK (72): 199-212.**
- **Joyeux-Faure M., Arnaud C., Godin-Ribuot D., Ribuot C., (2003).** ***Heat stress preconditioning and delayed myocardial protection: what is new?*** **Cardiovascular Research (60): 469-477.**
- **Kabeya N., Yamamoto Y., Cummins S.F., Elizur A., Yazawa R., Takeuchi Y. (2015).** ***Polyunsaturated fatty acid metabolism in a marine.*** **Biochemistry and Molecular Biology (188) 37-45.**
- **Kamalam B.S., Medale F., Panserat S. (2017).** ***Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies.*** **Aquaculture (467) 3-27.**
- **Kaushik S.J., Coves D., Dutto G., Blanc D. (2004*****)*****. Almost total replacement of fishmeal by plant protein sources in the diet of a marine, the European seabass, Dicentrarchus labrax. Aquaculture (230): 391-404.**

- **Krogdahl A., Penn M., Thorsen J., Refstie S., Bakke, A.M. (2010). *Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids.* Aquaculture Research 41(3): 333-344.**
- **Krumschnabel G., Podrabsky J.E. (2009). *Fish as model systems for the study of vertebrate apoptosis.* Apoptosis (14): 1-21.**
- **Lalier L., Cartron P.F., Juin P., Nedelkina S., Manon S., Bechinger B., Vallette F.M. (2007). *Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis*. Apoptosis (12): 887-896.**
- **Lall S.P., Dumas, A. (2015). *Nutritional requirements of cultured fish: Formulating nutritionally adequate feeds.* Feeding Practices in Aquaculture :53-109.**
- **Le Plénier S., Walrand S., Noir R., Cynober L., Moinard C. (2012). *Effects of leucine and citrulline versus non-essential amino acids on muscle protein synthesis in fasted rat: a common activation pathway*. Amino Acids, 43(3): 1171-1178.**
- **Lembo G., Μεντέ Ε. (2010). Βιολογική υδατοκαλλιέργεια. Impacts and Future Developments. ISBN 978-3-030-05603-2. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05603-2**
- **Liland N.S., Biancarosa I., Araujo P., Biemans D., Bruckner C.G., Waagbo R. Torstensen B.E., Lock E.J. (2017). *Modulation of nutrient composition of black soldier fly (Hermetia illucens) larvae by feeding seaweed-enriched media.* https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183188**
- **Mastoraki, M., Ferrándiz, P.M., Vardali, S.C., Kontodimas, D.C., Kotzamanis, Y.P., Gasco, L., Chatzifotis, S. and Antonopoulou, E., (2020). A comparative study on the effect of fish meal substitution with three different insect meals on growth, body composition and metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.).* Aquaculture: (528) 735511.**
- **Martin A., Brufau j., Tacon A. (1999) *Feed manufacturing in the Mediterranean region: Recent advances in research and technology*. Zaragoza (37): 123-128.**
- **Miles R.D, Chapman F.A. (2006) *Benefits of fishmeal in aquaculture diets.* IFAS Extension. University of Florida.**
- **Millot S., Pιan S., Chatain B., Bιgout M.L. (2011). *Self-feeding behavior changes induced by a first and a second generation of domestication or selection for growth in***

the European sea bass, Dicentrarchus labrax. **Aquatic Living Resources (24): 53–61.**

- **Moutinho S., Martínez-Llorens S., Tomás-Vidal A., Jover-Cerdá M., Oliva-Teles A., Peres H. (2017).** ***Meat and bone meal as partial replacement for fish meal in diets for gilthead seabream (Sparus aurata) juveniles: Growth, feed efficiency, amino acid utilization, and economic efficiency.*** **Aquaculture, (468): 271-277.**
- **Muus B.J., Nielsen J.G. (1999). Sea fish. Scandinavian Fishing Year Book.**
- **NRC, N. (2011).** ***Nutrient requirements of fish and shrimp*****. Washington, DC: National Academy Press.**
- **Oliva-Teles A. (2012).** ***Nutrition and health of aquaculture fish*****. Journal of Fish Diseases 35(2): 83-108.**
- **Pagliarino E., Tron S. (2012).** ***Progetto Sanpei: sano come un pesce biologico italiano.***
- **Parma L., Candela M., Soverini M., Turroni S., Consolandi C., Brigidi P. (2016).** ***Next-generation sequencing characterization of the gut bacterial community of gilthead sea bream (Sparus aurata) fed low fishmeal based diets with increasing soybean meal levels.*** **Animal Feed Science and Technology (222): 204-216**
- **Pawson M.G., Kupschus S, Pickett G.D.(2007).** ***The status of sea bass (Dicentrarchus labrax) stocks around England and Wales, derived using a separable catch-at-age model, and implications for fisheries management.*** **ICES Journal of Marine Science (64): 346–356.**
- **Peres H., Oliva-Teles A. (1999).** ***Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization by European sea bass juveniles (Dicentrarchus labrax).*** **Aquaculture 179(1-4): 325-334.**
- **Pickett G.D., Pawson G. (1994). Sea Bass: Biology. Springer Science & Business Media :342.**
- **Piferrer F., Blαzquez M., Navarro L., Gonzαlez A. (2005).** ***Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (Dicentrarchus labrax L.).*** **General and Comparative Endocrinology (142): 102–10.**
- **Rafiee P., Shi Y., Pritchard K.A., Ogawa H., Eis A.L.W., Komorowski R.A., Fitzpatrick C.M., Tweddell J.S., Litwin S.B., Mussatto K., Jaquiss R.D., Bakre J.A. (2003).** ***Cellular***

redistribution of inducible hsp70 protein in human and rabbit heart in response to the stress of chronic hypoxia. **The Journal of Biological Chemistry (278): 43636-43644.**

- **Rasmussen R.S. (2001).** ***Quality of farmed salmonids with emphasis on proximate composition, yield and sensory characteristics.*** **Aquaculture Research 32(10): 767-786.**
- **Ren W., Yin Y., Liu G., Yu X., Li Y., Yang G., & Wu G. (2012).** ***Effect of dietary arginine supplementation on reproductive infection.*** **Amino Acids 42(6): 2089-2094.**
- **Sanchez-Muros M.J., Barroso F., Manzano-Agugliaro F.(2014).** ***Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review.*** **Journal of Cleaner Production (65): 16-27. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.11.068**
- **Sargent J.R., Tocher D.R., Bell J.G., (2002*). The lipids.*** **Fish Nutrition (3): 181–257.**
- **Schipp G. (2008).** ***Is the use of fishmeal and fish oil in aquaculture diets sustainable.*** **No:124. Northern Territory Government of Australia, Department of Primary Industry, Fisheries and Mines, Darwin.**
- **Shearer K.D. (2001).** ***The effect of diet composition and feeding regime on the proximate composition of farmed fishes*****. Farmed Fish Quality (2): 31-41.**
- **St-Hilaire S., Sheppard C., Tomberlin J.K., Irving S., Newton L., McGuire M.A., Mosley E.E., Hardy R.W., Sealey W.M. (2007).** ***Fly prepupae as a feedstuff for rainbow trout, Oncorhynchus mykiss.*** **Journal of the World Aquaculture Society, (38).**
- **Subasinghe R., Doris S., Jiansan J. (2009).** ***Global aquaculture and its role in sustainable development.*** **Reviews in Aquaculture (1): 2–6.**
- **Skrede A., Mydland L.T., Ahlstrøm O., Reitan K.I., Gislerød H.R. (2011).** ***Evaluation of microalgae as sources of digestible nutrients for monogastric animals.*** **Journal of Animal and Feed Sciences (1): 131-142.**
- **Tacon A.G.J., Metian M. (2009).** ***Fishing for Aquaculture: Non-Food Use of Small Pelagic Forage Fish. A Global Perspective.*** **Reviews in Fisher View Science (3): 305-317. https://doi.org/10.1080/10641260802677074**
- **Tacon A.G., Metian M. (2008).** ***Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects.*** **Aquaculture (1-4): 146-158.**
- **Tacon A.G., Metian M. (2015).** ***Feed matters: satisfying the feed demand of***

aquaculture. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture (1): 1-10.**

- **Tocher D.R. (2003*). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish*. Reviews in Fisheries Science (2): 107-184.**
- **Trichet V. (2010). *Nutrition and immunity: an update.* Aquaculture Research 41(3): 356-372.**
- **UNDESA. Department of Economic and Social Affairs Social Inclusion United Nations 2020.**
- **Urushibara N., Mitsuhashi S., Sasaki T., Kasai H., Yoshimizu M., Fujita H., Oda A., 2009. *JNK and p38MAPK are independently involved in tributyltin-mediated cell death in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) RTG-2 cells*. Comparative Biochemistry and Physiology (149): 468-475.**
- **Vandeputte M., Dupont Nivet M., Haffray P., Chavanne H., Cenadelli S., Parati K., Vidal O.M., Vergnet A., Chatain B. (2009). *Response to domestication and selection for growth in the European sea bass (Dicentrarchus labrax) in separate and mixed tanks.* Aquaculture (286): 20–27.**
- **Watanabe T. (2002) *Strategies for future development of aquatic feeds.* Fisheries Science (68): 242-252. https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2002.00418.x**
- **Werner I., Viant M.R., Rosenblum E.S., Gantner A.S., Tjeerdema R.S., Johnson M.L., (2006). *Cellular responses to temperature stress in steelhead trout (Oncorhynchus mykiss) with different rearing histories*. Fish Physiology and Biochemistry (32): 261-273.**
- **Wilson R.P. (2003). *Amino acids and proteins*. Fish Nutrition (3): 143- 179.**
- **Wu G. (2009). *Amino acids: metabolism, functions, and nutrition.* Amino acids 37(1): 1-17.**
- **Wu G. (2013). *Amino acids: biochemistry and nutrition*. CRC Press.**
- **Wu G.(2014). *Dietary requirements of synthesizable amino acids by animals: a paradigm shift in protein nutrition.* Journal of Animal Science and Biotechnology (1): 34.**
- **Wu G., Wu Z., Dai Z., Yang Y., Wang W., Liu, C. (2013). *Dietary requirements of "nutritionally non-essential amino acids" by animals and humans.* Amino acids, (4):**

1107-1113.

- **Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., Peng T.I., Jones D.P., Wang X., (1997*). Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from Mitochondria Blocked.* Science 275 (5303): 1129-1132.**
- **Yu Y. M., Yang R.D., Matthews D.E., Wen Z. M., Burke J. F., Bier D. M., Young V.R. (1985). *Quantitative aspects of glycine and alanine nitrogen metabolism in postabsorptive young men: effects of level of nitrogen and dispensable amino acid intake.* The Journal of nutrition 115(3): 399-410.**
- **Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 710/2009 της Επιτροπής της 5ης Αυγούστου για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 889/2008 σχετικά με τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 834/2007 του Συμβουλίου όσον αφορά τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων για τη βιολογική παραγωγή ζώων υδατοκαλλιέργειας και φυκιών**
- **Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 834/2007 του Συμβουλίου της 28ης Ιουνίου 2007 για τη βιολογική παραγωγή και την επισήμανση των βιολογικών προϊόντων και την κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ.2092/91**
- **Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 889/2008 της Επιτροπής της 5ης Σεπτεμβρίου 2008 σχετικά με τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 834/2007 του Συμβουλίου για τη βιολογική παραγωγή και την επισήμανση των βιολογικών προϊόντων όσων αφορά τον βιολογικό τρόπο παραγωγής, την επισήμανση και τον έλεγχο των προϊόντων**
- **Κανονισμός (ΕΕ) 2018/848 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 30ής Μαΐου 2018, για τη βιολογική παραγωγή και την επισήμανση των βιολογικών προϊόντων και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 834/2007 του Συμβουλίου (ΕΕ L 150 της 14.6.2018, σ. 1–92).**
- **ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) 2020/1693 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 11ης Νοεμβρίου 2020 σχετικά με την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΕ) 2018/848 για τη βιολογική παραγωγή και την επισήμανση των βιολογικών προϊόντων όσον αφορά την ημερομηνία εφαρμογής του και ορισμένες άλλες ημερομηνίες που αναφέρονται στον εν λόγω κανονισμό.**

- **Χώτος Γ., Ρογδάκης Ι. (1992). Υδατοκαλλιέργειες ευρύαλων ψαριών Λαβράκι και τσιπούρα, τεχνικές αναπαραγωγής και πάχυνσης. Εκδόσεις ΙΩΝ Αθήνα. Σελ. 26-30**
- **Παπουτσόγλου Ε.Σ. (2008).** ***Διατροφή των ιχθύων.***