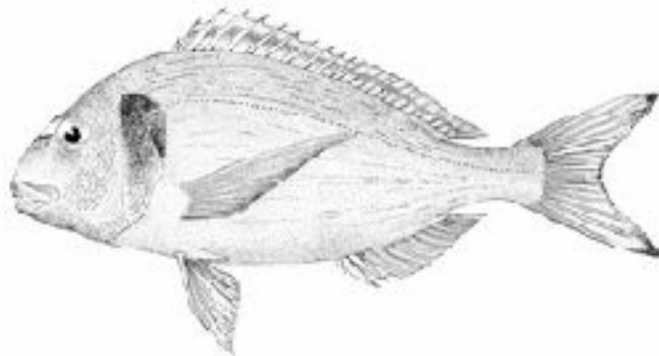


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΟΥ ΙΧΘΥΕΛΑΙΟΥ
ΑΠΟ ΤΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ *SCHIZOCHYTRIUM SP.* ΚΑΙ *NANNOCHLOROPSIS*
GADITANA* ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ (*SPARUS
***AURATA*)**

ΜΑΝΩΛΙΟΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ



Επιβλέπων: Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης Αν. Καθηγητής

ΒΟΛΟΣ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2022

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Η επίδραση της υποκατάστασης του διαιτητικού ιχθυελαίου από τα μικροφύκη *Schizochytrium sp.* και *Nannochloropsis gaditana* στην ιστολογία του ήπατος της τσιπούρας (*Sparus aurata*)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: **Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης**, Αν. Καθηγητής – Διατροφή
Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών
Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος,
Σχολή Γεωπονικών Επιστημών
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλος: Παναγιώτης Βερίλλης, Αναπληρωτής Καθηγητής – Μικροσκοπία και Ανάλυση Εικόνας στη
Ιστολογία και στους Υδρόβιους Οργανισμούς

Μέλος: Ελένη Γκολομάζου, Επίκουρη Καθηγήτρια – Προστασία-Ευζωία Ιχθύων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή ολοκληρώθηκε το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022, στα πλαίσια των προπτυχιακών σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος (Τ.Γ.Ι.Υ.Π.). Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Καραπαναγιωτίδη Ιωάννη επιβλέποντα καθηγητή της εργασίας αυτής, για την υπομονή και τη συνεχή καθοδήγηση του, όπως και τα λοιπά μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής για τις θετικές επισημάνσεις τους.

Ευχαριστώ επίσης το σύνολο του ανθρώπινου δυναμικού του (Τ.Γ.Ι.Υ.Π.) και όλους όσους βοήθησαν στην συνολική πορεία των σπουδών μου. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους οικείους μου για την κατανόηση που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης αυτής τη διατριβής αλλά και των συνολικών σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	i
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	ii
ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	iv
ΛΙΣΤΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	iv
ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	iv
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
1.....	ΕΙΣΑΓΩΓΗ 7
1.1 Βιολογία της τσιπούρας	7
1.2 Ήπαρ και έντερο των ιχθύων στη φυσιολογία θρέψης.....	11
1.3 Φυτικές πρωτεΐνες και φυτικά έλαια σε αντικατάσταση χρήση ιχθυάλευρου και ιχθυελαίου στις ιχθυοτροφές.....	13
1.4 Μικροφύκη και η σημασία τους στη διατροφή των ιχθύων	18
1.5 Επιδράσεις φυτικών πρωτεΐνες και φυτικών ελαίων	19
1.6 Μικροφύκη σε αντικατάσταση ιχθυάλευρου και ιχθυελαίου	21
1.7 Σκοπός και αντικείμενο της εργασίας.....	22
2.....	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 24
2.1 Δειγματοληψία (ψάρια και ιστοί: ήπαρ, πρόσθιο έντερο)	24
2.2 Προετοιμασία δειγμάτων για ιστολογική εξέταση	24
2.2.1 Απομόνωση των ιστών	24
2.2.2 Μονιμοποίηση των ιστών	25
2.2.3 Αφυδάτωση - Διαύγαση- Έγκλιση ιστού σε παραφίνη	25
2.2.4 Εμβάπτιση, εγκλεισμός σε παραφίνη.....	27
2.2.5 Τομή ιστού στην μικροτόμο.....	27
2.2.6 Αποπαραφίνωση και χρώση.....	29
2.2.7 Στερεοποίηση των τομών	31
2.2.8 Μελέτη των ιστολογικών τομών στο οπτικό μικροσκόπιο.....	31
2.3 Ιστολογία.....	32
3.....	Συμπεράσματα - Συζήτηση 37
4.....	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 38

ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Ταξονομική κατάταξη της τσιπούρας.....	8
Πίνακας 2. Στάδια και χρόνοι προετοιμασίας των ιστών.....	25
Πίνακας 3. Πρωτόκολλο χρώσης αιματοξυλίνης – ηωσίνης.....	30

ΛΙΣΤΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Ιχθυοπαραγωγή σε εκατομ. τόνους προερχόμενη από ιχθυοκαλλιέργειες και αλλίευση (Πηγή: Food and Agriculture Organization of the United Nations μετά από μεταποίηση)	14
---	----

ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Η εργαστηριακή ιστοκινέτα που χρησιμοποιήθηκε (Leica TP 1020)	26
Εικόνα 2. Στιγμιότυπα από την διαδικασία σκλήνωσης του ιστού μέσα σε μεταλλικά καλούπια.....	27
Εικόνα 3. α) μικροτόμος (SLEE MAINZ CUT 5062) β) υδατόλουτρο.....	28
Εικόνα 4. α) δοχείο χρώσης με αιματοξυλίνη β) δοχείο χρώσης με ηωσίνη	30
Εικόνα 5. Τυπική εικόνα ομάδας ελέγχου	33
Εικόνα 6. Εικόνα ομάδας ελέγχου σε μεγέθυνση	33
Εικόνα 7. Αιμορραγική εκφύλιση	35
Εικόνα 8. Θολερή εξοίδηση. Χαρακτηρίζει αντιστρεπτές βλάβες στα κύτταρα.....	35
Εικόνα 9. Αιμορραγική εκφύλιση σε μεγέθυνση.....	36
Εικόνα 10. Τομή στην οποία φαίνεται αιμορραγική εκφύλιση και θολερή εξοίδηση σε ομάδα κυττάρων	36

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε προκειμένου να γίνει εκτίμηση των ιστολογικών αλλοιώσεων, στο ήπαρ από τσιπούρες (*Sparus aurata*) που διατράφηκαν με σιτηρέσια, στα οποία έλαβε χώρα υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου με άλευρο από το είδος *Chlorella vulgaris*.

Οι ιχθύες που συμμετείχαν στη μελέτη, μέσου βάρους 15-20 g, αρχικά είχαν λάβει μέρος σε διατροφικό πείραμα διάρκειας 12 εβδομάδων, κατά τη διάρκεια του οποίου χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικά σιτηρέσια, καταρτισμένα με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι ισοενεργειακά (21 MJ/Kg) και ισοπρωτεϊνικά (52 % της τροφής). Η πρώτη διατροφική ομάδα αποτέλεσε το σιτηρέσιο μάρτυρα, στο οποίο το ιχθυάλευρο (100%) ήταν η κύρια πηγή πρωτεΐνης. Στις υπόλοιπες τρεις διατροφικές ομάδες έγινε μερική υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου με άλευρο από το *C. vulgaris* σε ποσοστά 10% (CM10), 20% (CM20) και 30% (CM30). Για τους σκοπούς της ιστολογικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε λήψη δειγμάτων ήπατος από 12 ψάρια ανά διατροφική ομάδα και ακολούθησε η απαραίτητη προετοιμασία αυτών. Αφού έγινε μονιμοποίηση των ιστών σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 10%, ακολούθησε η αφυδάτωση τους σε μια σειρά διαλυμάτων αιθανόλης, η διαύγαση σε ξυλόλη και ο εμποτισμός τους με παραφίνη, σύμφωνα με τη συνήθη ιστολογική τεχνική που ακολουθείται. Έπειτα πραγματοποιήθηκε εξαγωγή τομών στα 5μm, αποπαραφίνωση, ενυδάτωση, χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη και στερεοποίηση. Συνολικά 48 τομές ήπατος εξετάστηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη ιστολογική μελέτη, δεν παρουσίασαν σημαντικές αλλοιώσεις στο ήπαρ των ψαριών, για κάποια από τις διατροφικές ομάδες και συγκριτικά πάντα με το σιτηρέσιο-μάρτυρα. Η πλειοψηφία των πυρήνων εντοπίστηκε στο κέντρο των ηπατοκυττάρων και ο αριθμός των λιποσταγονιδίων ήταν μικρός, το ίδιο και το μέγεθος τους. Δεν σημειώθηκε κάποια σημαντική βλάβη στον ιστό όπως για παράδειγμα στεάτωση, νέκρωση ιστού, αιμορραγίες, φλεγμονή ή οίδημα. Στα παγκρεατικά νησίδια ήταν εμφανή τα κυψελοειδή κύτταρα με τα εκκριτικά προενζυμικά κοκκία. Μόνο τρία δείγματα από τις διατροφικές ομάδες CM20 και CM30

παρουσίασαν μικρές ιστολογικές αλλοιώσεις. Στην τρίτη διατροφική ομάδα (CM20) ένα ψάρι εμφάνισε υπερπλασία των τοιχωμάτων από δύο χοληφόρους πόρους και κοκκίωμα, ενώ στην τέταρτη διατροφική ομάδα (CM30) σε δύο δείγματα υπήρχε αυτόλυση του ιστού.

Συμπερασματικά η μερική υποκατάσταση ιχθυαλεύρου με άλευρο από το μικροφύκος του είδους *C. vulgaris* μπορεί να λάβει χώρα σε ποσοστό μέχρι 30% χωρίς αυτό να επηρεάζει την φυσιολογική ιστολογική κατάσταση του ήπατος στην τσιπούρα (*S. aurata*). Φυσικά υπάρχει ανάγκη για παραπάνω έρευνα προκειμένου να προσδιοριστεί η επίδραση των μικροφυκών στη σύσταση του σώματος αλλά και στο προφίλ των λιπαρών οξέων για την τσιπούρα (*S. aurata*).

Λέξεις Κλειδιά: Τσιπούρα, Sparus Aurata, ιστοπαθολογία ήπατος, Schizochytrium Sp., Nannochloropsis Gaditana

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιολογία της τσιπούρας

Γενικά χαρακτηριστικά του είδους *Sparus aurata*

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758), είναι ένα είδος από τους οστειχθύες των θαλάσσιων υδάτων και ανήκει στο γένος *Sparus* στην οικογένεια των Sparidae (Πιν. 1), η οποία περιλαμβάνει τα περισσότερα είδη ψαριών στην Ελλάδα της τάξης Perciformes (Jennifer et.al., 2004). Είναι ένα από τα πιο γνωστά ψάρια τόσο στην ελληνική αγορά όσο και στις γενικότερη μεσογειακή και έχει αυξημένη εμπορική αξία. Η πρότερη επιστημονική ονομασία της τσιπούρας (*Chrysphrys aurata*), είχε προκύψει από την χρυσή καμπύλη λωρίδα που εντοπίζεται κατά μήκος του μετώπου του ψαριού και που κυρίως στα ενήλικα έχει στα περιθώριά της δύο σκουρόχρωμες ζώνες. Η τσιπούρα χαρακτηρίζεται από ένα υψηλό και συμπιεσμένο πλευρικό σώμα, μεγάλα κτενοειδή λέπια, ένα μοναδικό ραχιαίο πτερύγιο αποτελούμενο εν μέρει από ακανθώδεις ακτίνες και ένα διχαλωτό ουραίο πτερύγιο. Το στόμα τους είναι ελαφρώς προεκτεινόμενο και τα δόντια τους ανόμοια προσαρμοσμένα για σαρκοφαγία. Πρόκειται για είδη ευρύθερμα και ευρύαλα που ζουν συχνότερα κοντά σε ακτές, μερικά δε είδη της οικογένειας αυτής διαβιούν μέσα στις λιμνοθάλασσες για μια περίοδο της ζωής τους. Τέλος, οι τσιπούρες ανήκουν στην κλάση των οστειχθύων και στην υπέρταξη των τελεοστέων και μαζί με τα συγγενή είδη απαρτίζουν την οικογένεια των sparidae (Ρογδάκης and Χώτος, 1992).

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*), είναι ευρύαλο και ευρύθερμο είδος των παράκτιων περιοχών κυρίως της μεσογείου θάλασσας ενώ θεωρείται περιορισμένη στην μαύρη θάλασσα και ποικίλης εντάσεως στις νότιες ακτές των βρετανικών νησιών καθώς και των δυτικών ακτών της Ευρώπης και της Βορείου Αφρικής και των Κανάριων νησιών. Αποτελεί είδος της υποτροπικής ζώνης με έντονη γεωγραφική εξάπλωση στη Μεσόγειο θάλασσα, καθώς είναι κοινό σε όλες σχεδόν τις παράκτιες περιοχές κυρίως συναντάτε κατά μήκος των ακτών του Ανατολικού Ατλαντικού από τη Μεγάλη Βρετανία έως τη Σενεγάλη (FAO 2019). Ενδημεί σε περιοχές ποικίλου βάθους και ποικίλης

συστάσεως πυθμένων (αμμώδεις, βραχώδεις, καλυμμένους με φύκια, λασπώδεις) και η ηθολογία διαβίωσης του χαρακτηρίζεται από την παρουσία σε όλη την υδάτινη στήλη. Τα νεαρά άτομα συνήθως βρίσκονται σε υδατοσυλλογές όχι μεγαλύτερου των 30m βάθους, ενώ τα ενήλικα άτομα βρίσκονται σε υδατοσυλλογές όχι μεγαλύτερου από τα 100-150 m, κατά την αναπαραγωγική περίοδο τους συγκροτούν αγέλες πολλών εκατοντάδων ατόμων. Εκτιμάται ότι το μέγιστο βάρος της τσιπούρας μπορεί να είναι 16-18 kg (μήκους περίπου 60-70 cm) και η μέγιστη ηλικία τους περίπου 10-15 ετών (Φειδάντσης Κ., 2012).

Η τσιπούρα σχηματίζει κοπάδια πολυμελή ή ολιγομελή, ενώ κάποιες φορές, μεγάλα θηλυκά άτομα μπορεί να βρεθούν να κυνηγούν μόνα τους για μια περίοδο. Τα βάρη που κινούνται συνήθως είναι μέχρι τα 40 μέτρα, ενώ το μεγαλύτερο βάθος που έχει εντοπιστεί ψάρι είναι τα 150 μέτρα. Παρ' όλα αυτά ψάρια 5 - 6 κιλά, είναι πιθανόν να τα βρούμε σε αρκετά ρηγά νερά, λιγότερο από 10 μέτρα. Το ψάρι είναι ευρύαλο και ευρύθερμο, αντέχει δηλαδή σε μεγάλες μεταβολές αλατότητας και θερμοκρασίας του νερού. Αυτό καθορίζει σε πολύ μεγάλο βαθμό τον τρόπο ζωής του, καθώς και που το συναντάμε. Πιο συγκεκριμένα, την τσιπούρα μπορούμε να τη βρούμε όχι μόνο στη θάλασσα, αλλά και κοντά σε εκβολές ποταμών, μέσα σε λιμνοθάλασσες και μέσα σε ποτάμια σε κοντινή απόσταση από τη θάλασσα. Πιο συγκεκριμένα βρίσκεται συνήθως σε επίπεδους βυθούς με τραγάνα, λάσπη ή φύκια καθώς και σε λιβάδια ποσειδωνίας. Προτιμά αυτούς τους βιοτόπους, γιατί εκεί βρίσκει πιο εύκολα την τροφή της η οποία αποτελείται από όστρακα κυρίως, όπως μύδια, στρείδια και κυδώνια, και πιο σπάνια από θαλάσσια φυτά και φύκη. Θα τη βρούμε επίσης να κινείται και σε βυθούς, με πέτρες και πλάκες (όπου μπορεί και να βραχώσει), που συνορεύουν με τα προαναφερθέντα περιβάλλοντα. Το σχήμα σώματος της τσιπούρας είναι ωοειδές, και συμπιεσμένο πλευρικά. Το προφίλ κεφαλής είναι κυρτό με μικρά μάτια. Το στόμα έχει την κάτω γνάθο μικρότερη από την άνω γνάθο (Fao Fishery Statistics, 2006). Τα βράγχια είναι κοντά με 11-13 βριαγχιακές άκανθες στο μεγάλο βραγχιακό τόξο και 7-8 μικρό βραγχιακό τόξο. Η πλευρική γραμμή έχει 75-85 λέπια. Το ραχιαίο πτερύγιο διαθέτει 11 σκληρές και 13 μαλακές ακτίνες (FAO, 2006). Το χρώμα της είναι ασημί-γκρι με ένα μεγάλο σκοτεινό σημείο στην αρχή της πλευρικής γραμμής που καλύπτει και το

άνω μέρος του λειτουργικού οστού. Μια χρυσή και μια μαύρη γραμμή βρίσκεται ανάμεσα στα μάτια, η χρυσή πάντα στενεύει στο κεντρικό τμήμα. Το ραχιαίο πτερύγιο είναι μπλε-γκρι με μια μαύρη γραμμή στην μέση. Το ουραίο πτερύγιο είναι γκριζωπό λευκό με μαύρες άκρες. Η *S. Aurata* διανέμεται κατά μήκος των ακτών του Ανατολικού Ατλαντικού από τη Μεγάλη Βρετανία στη Σενεγάλη και είναι σπάνια στη Μαύρη Θάλασσα. Απαντάται τόσο σε θαλάσσια όσο και σε υφάλμυρα ύδατα όπως οι παράκτιες λιμνοθάλασσες και οι εκβολές των ποταμών, ιδίως κατά τα αρχικά στάδια του κύκλου ζωής της. Πολύ ευαίσθητο είδος σε χαμηλές θερμοκρασίες (Aly, et al., 2019).

Το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής της τσιπούρας όπως και άλλων σπαροειδών προέρχεται από θαλασσοκαλλιέργειες και πιο συγκεκριμένα από καλλιέργειες σε κλωβούς. Αποτελεί ένα αλματωδώς αυξανόμενο σε παραγωγή προϊόν και ένα από τα κυριότερα εξαγωγίμα προϊόντα σε εθνικό επίπεδο. Ενδεικτικά αναφέρεται από σχετική κλαδική μελέτη¹ πως το 2020 η παραγωγή (εξαλιεύσεις) τσιπούρας και λαβρακιού ανήλθε σε 117.000 τόνους (65.000 τόνοι τσιπούρας και 52.000 τόνοι λαβρακιού) συνολικής αξίας 546,26 εκατ. ευρώ (ΣΕΘ). Σε σχέση με το 2019 παρατηρείται πτώση σχεδόν 3% ως προς τον όγκο παραγωγής και οριακή αύξηση 0,1% προς την αξία πωλήσεων (ΣΕΘ). Η μείωση του όγκου παραγωγής οφείλεται σε μειωμένη τοποθέτηση γόνου το προηγούμενο έτος. Η τσιπούρα αντιστοιχεί στο 56% του όγκου παραγωγής και το λαβράκι στο 44%. Ανά είδος, η παραγωγή τσιπούρας παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητη παρουσιάζοντας οριακή μείωση 0,5% ενώ το λαβράκι παρουσίασε μείωση 5,8 % σε σχέση με το προηγούμενο έτος. Το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής πραγματοποιείται σε μεγάλους τετράγωνους ή στρογγυλούς κλωβούς που μπορεί να φτάνουν τα 120 μέτρα σε περίμετρο και να περιέχουν σχεδόν 250-300 τόνους ψαριών (Φειδάντσης Κ., 2012). Η περίοδος αύξησης διαφέρει από τόπο σε τόπο, ανάλογα κυρίως με τις θερμοκρασίες του νερού, ενώ μπορεί να χρειαστούν 12 έως 24 μήνες για να φτάσουν τα ψάρια σε εμπορικό μέγεθος.

Πίνακας 1. Ταξονομική κατάταξη της τσιπούρας

Υποδιαίρεση	Κατάταξη
Βασίλειο	Animalia
Συνομοταξία	Chordata
Ομοταξία	Osteichthyes
Υφομοταξία:	Acanthopterygii
Υπέρταξη	Teleostei
Τάξη	Perciformes
Υπόταξη	Percoides
Οικογένεια	Sparidae
Γένος	Sparus
Είδος	S.Aurata

Είναι ένα πρώτανδρο είδος με εποχή αναπαραγωγής που κυμαίνεται από τον Οκτώβριο μέχρι τον Δεκέμβριο. Είναι αρσενικό στα πρώτα δύο χρόνια και σε μεγέθη άνω των 30 cm γίνονται θηλυκά. Μετά την ωοτοκία, τα ωάρια, που είναι σφαιρικά και διαφανή, έχουν διάμετρο ελαφρώς μικρότερη από 1 mm και έχουν ένα ενιαίο μεγάλο σταγονίδιο ελαίου (Robbins, 2012).

Επιπλέον, αντέχει σε σχετικά μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (4 έως 30 °C) αλλά ο μέγιστος αριθμός ανάπτυξης επιτυγχάνεται μεταξύ 22 και 24 °C, ενώ τα όρια αλατότητας στα οποία επιβιώνει μπορεί να φτάσει μέχρι του επιπέδου του 40‰ , με μέγιστη ανάπτυξη να παρατηρείται σε νερά αλατότητας από 28‰ έως 32‰ (Παπούτσογλου, 2008). Αποτελεί είδος που προσαρμόζεται εύκολα στην αιχμαλωσία, χαρακτηρίζεται από γρήγορη ανάπτυξη, ανθεκτικότητα στις μεταβολές των φυσικοχημικών παραμέτρων των υδάτινων μαζών και παρέχει καλή ποιότητα κρέατος (Χώτος και Ρογδάκης, 2010). Η τσιπούρα (*S. aurata*) είναι ένα είδος βενθοπελαγικό της υποτροπικής ζώνης και ζει σε παράκτιες περιοχές με αμμώδεις πυθμένες και φυκιάδες φτάνοντας σε βάθη από 30-150 m, ανάλογα με την ηλικία τους (Palma, et al., 1998). Κυρίως, επιλέγει να ζει σε παράκτια θαλάσσια και υφάλμυρα περιβάλλοντα, όπως είναι οι λιμνοθάλασσες και οι περιοχές εκβολών ποταμών, ιδίως κατά τα αρχικά στάδια της ζωής του.

Βασικό βιολογικό γνώρισμα της τσιπούρας αποτελεί ο πρωτανδρικός ερμαφροδιτισμός της. Έτσι η πρώτη γεννητική της ωριμότητα κατά το(πρώτο ή το δεύτερο έτος της ηλικίας). Οι γεννητικοί αδένες στα πρώτα ηλικιακά στάδια αποτελούνται από ένα νωτιαίο τμήμα ωοθηκικού ιστού και μία ραχιαία ορχική ζώνη που διαχωρίζονται μεταξύ τους από ένα λεπτό τοίχωμα συνδετικού ιστού (Pauletto, et al., 2018). Παρατηρείται μόνο σε αρσενικά άτομα τα οποία στη συνέχεια (δεύτερο τρίτο έτος) της ηλικίας του καθίστανται θηλυκά (Παπούτσογλου, 2008). Οι περιβαλλοντικοί και οι βιολογικοί παράγοντες που μετέχουν στην αλλαγή του φύλου της τσιπούρας δεν έχουν ακόμη διευκρινισθεί πλήρως. Πιστεύεται ωστόσο ότι η εμπλοκή της ηλικίας σε συνδυασμό με το σωματικό της μέγεθος αποτελούν τους πιο κυρίαρχους παράγοντες (Loukonitis, et al., 2011). Σε άλλες περιπτώσεις, έχει συμπεραθεί πως η έκθεση των ψαριών σε διάφορους βιοχημικούς παράγοντες περιορίζει ή και ακυρώνει την μετάβαση των φύλων στην τσιπούρα (García Hernández, et al., 2020) Στο τέλος του πρώτου χρόνου της ζωής της το 80% των ατόμων είναι άρρενα, στη συνέχεια, το ποσοστό των αρρένων ατόμων ελαττώνεται με ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού των θηλέων ατόμων. Σε σύνολα γεννητόρων που διατηρούνταν απομονωμένα για μεγάλο χρονικό διάστημα, η αναλογία των φύλων διατηρούνταν αναλλοίωτη. Δηλαδή μικρός αριθμός ατόμων υφίστατο αναστροφή φύλου, έχοντας ως αποτέλεσμα ορισμένα άτομα να παραμένουν άρρενα σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους (Meiri, et al., 2002). . Γενικά, η αναπαραγωγική της περίοδος (με συνεχή παραγωγή γεννητικού υλικού) εκδηλώνεται από τον Οκτώβριο έως τον Δεκέμβριο σε νερά ανοιχτής θαλάσσης στα οποία κατευθύνεται εγκαταλείποντας συνήθως τις ημίκλειστες υδατοσυλλογές των λιμνοθαλασσών. Αποτελεί πολλαπλό εναποθέτη αυγών και ανήκει στα ασύγχρονα είδη, δηλαδή η ωοθήκη της φέρει ωκύτταρα διαφορετικών φάσεων ανάπτυξης (Hadj-Taieb, et al., 2013), (Todd, et al., 2016).

1.2 Ήπαρ και έντερο των ιχθύων στη φυσιολογία θρέψης

Το πεπτικό σύστημα αποτελείται κυρίως από τον πεπτικό σωλήνα, αυτός εκτείνεται μέσα στο σώμα και αποτελείται από τον φάρυγγα, τον οισοφάγο, τον στόμαχο, τα πυλωρικά τυφλά και το έντερο, με κυριότερα όργανα του πεπτικού συστήματος να είναι με το ήπαρ και το έντερο. Η ανατομία του πεπτικού σωλήνα είναι αρκετά ομοιογενής στις πρωτόγονες οικογένειες ιχθύων, αλλά στις εξελιγμένες οικογένειες εμφανίζει διαφορετικά χαρακτηριστικά, ανάλογα με την προσλαμβανόμενη τροφή (Παπούτσογλου, 2010). Υπάρχουν ιχθύες που δεν έχουν στόμαχο, άλλοι που το μήκος του οισοφάγου τους και του εντέρου τους ποικίλλει, ενώ σε κάποια είδη τα πυλωρικά τυφλά απουσιάζουν και σε άλλα ο αριθμός τους υπερβαίνει τα χίλια (Βερίλλης and Μεντέ, 2017). Στα ψάρια με στομάχι, και μόνο σ' αυτά, μεταξύ της πυλωρικής βαλβίδας του στομάχου και του προσθίου μέρους του εντέρου εντοπίζονται τυφλά (κλειστά στην άκρη) εγκολπώματα. Αυτά ονομάζονται πυλωρικά τυφλά. Ο αριθμός αυτών των τυφλών ποικίλλει από μηδέν μέχρι δεκάδες ή εκατοντάδες και φθάνει σχεδόν τα χίλια στους μπακαλιάρους. Πριν από πάνω από 2000 χρόνια, ο Αριστοτέλης περιέγραψε λεπτομερώς, και αναγνώρισε την διάκρισή από τον απομακρυσμένο εντερικό σωλήνα των πτηνών και θηλαστικών. Διαμόρφωσε την εικασία ότι η λειτουργία τους ήταν «να αποθηκεύεται φαγητό» (Munshi & Dutta 1996).

Το ήπαρ είναι πάντα ανεπτυγμένο σχεδόν σε όλα τα ψάρια, το ήπαρ των ιχθύων βρίσκεται εντός της περιτοναϊκής κοιλότητας, είναι τοποθετημένο κοντά στην περιοχή του στομάχου και πάντοτε καλά ανεπτυγμένο (Rønnestad, et al., 2013), (Pereira, et al., 2019), (Le, et al., 2019). Στο ήπαρ εντοπίζεται η χοληδόχος κύστη που σπανίως λείπει στους χονδροιχθύς και μερικούς οστεϊχθύς (Bočina, et al., 2017). Το ήπαρ είναι ένα όργανο που αποτελεί ένα ευμεγέθη αδένω που σε ορισμένα είδη μπορεί να φτάσει το 20% του σωματικού του βάρους και βρίσκεται είτε επάνω είτε γύρω από το στομάχι. Η λειτουργικότητά του περιλαμβάνει την έκκριση της χολής, την αποθήκευση γλυκογόνου και πολλές άλλες βιοχημικές λειτουργίες (Faccioli, et al., 2014). Το γλυκογόνο είναι ένας από τους πολυσακχαρίτες και αποτελεί αποταμιευτική ουσία των ζώων και των μυκήτων αποτελείται από μόρια γλυκόζης, που σχηματίζουν διακλαδισμένες αλυσίδες. Στα σπονδυλωτά αποθηκεύεται στο

ήπαρ και στους μυς. Όταν διασπάται, αποδίδει μόρια γλυκόζης, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας. Η αποδόμηση του γλυκογόνου ονομάζεται γλυκογονόλυση και ελέγχεται από δύο ορμόνες: τη γλυκαγόνη και την αδρεναλίνη. Το υγρό αυτό συμβάλει στην πέψη και απορρόφηση των λιπών καθώς εμπλέκεται στη γαλακτωματοποίηση τους, διευκολύνοντας έτσι τη δράση των παγκρεατικών λιπασών που βρίσκονται στο έντερο. Επιπλέον ουδετεροποιεί το pH του όξινο χυλού που μεταφέρεται από το στόμαχο στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου (Sales, et al., 2017).

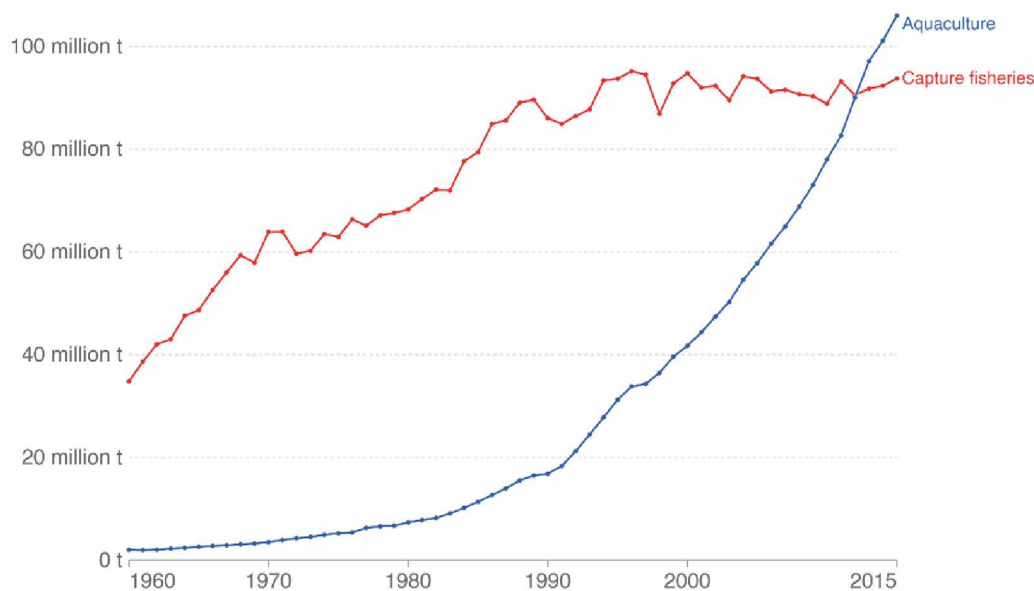
Σύνθετες βιοχημικές διεργασίες συμβαίνουν στο συκώτι όπου πραγματοποιείται παραγωγή χοληστερόλης, εκ νέου λιπογένεση και σύνθεση πρωτεϊνών του πλάσματος (όπως η αλβουμίνη και το ινωδογόνο), ενώ ταυτόχρονα αποτελεί κύρια αποθήκη λίπους, σακχάρων με τη μορφή γλυκογόνου, σιδήρου αλλά και κάποιων βιταμινών όπως οι A, D και B12 (Vicentini, et al., 2005), (Marcon, et al., 2015).

Το αποθηκευμένο λίπος στο σώμα των ιχθύων σχηματίζεται από το πλεόνασμα θερμίδων στην τροφή, αν και οι αλλαγές στη φυσιολογική δραστηριότητα παίζουν και αυτές ρόλο (π.χ. ωρίμανση γονάδων). Το γλυκογόνο είναι ένας από τους πολυσακχαρίτες και αποτελεί αποταμιευτική ουσία των ζώων και των μυκήτων. Αποτελείται από μόρια γλυκόζης, που σχηματίζουν διακλαδισμένες αλυσίδες. Στα σπονδυλωτά αποθηκεύεται στο ήπαρ και στους μυς. Όταν διασπάται, αποδίδει μόρια γλυκόζης, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας. Η αποδόμηση του γλυκογόνου ονομάζεται γλυκογονόλυση και ελέγχεται από δύο ορμόνες: τη γλυκαγόνη και την αδρεναλίνη. Το ήπαρ είναι το κύριο μεταβολικό όργανο, αποτελεί «όργανο στόχο» για τη μελέτη των επαγόμενων αποτελεσμάτων της διατροφής και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσοαπόκριση των ιχθύων (Marcon, et al., 2015). Από την αρχή των φυσιολογικών μελετών στο πάγκρεας τα ψάρια έχουν χρησιμοποιηθεί ως πειραματικά υποκείμενα. Η ινσουλίνη των ψαριών ήταν μια από τις πρώτες ινσουλίνες σπονδυλωτών που απομονώθηκαν και από τις πρώτες ινσουλίνες των οποίων αναφέρθηκαν οι πρωτογενείς και έπειτα τριτογενείς δομές. Στα περισσότερα ψάρια δεν αποτελεί ξεχωριστό όργανο, ενώ συνήθως εντοπίζεται με τη μορφή διάσπαρτων νησιδίων εντός της

περιτοναϊκής κοιλότητας, ως μέρος του σπλήνα ή ως ένα εξωτερικό στρώμα γύρω από την πυλαία φλέβα του ήπατος. Επίσης, ο παγκρεατικός ιστός αποτελείται από δυο είδη αδένων, τον εξωκρινή και τον ενδοκρινή, η δομή των λοβίων του εξωκρινούς παγκρεατικού ιστού είναι παρόμοια με εκείνη των θηλαστικών και αποτελείται από κυψελοειδή κύτταρα. Ενώ, ενδοκρινούς αδένες του παγκρέατος υπάρχουν τα νησιδία του Langerhans, Τα Β κύτταρα, που παράγουν ινσουλίνη, προάγουν τη μεταφορά γλυκόζης στις μεμβράνες των κυττάρων, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος. Η γλυκαγόνη, που παράγεται από τα Α κύτταρα, προάγει την απελευθέρωση του αποθηκευμένου γλυκογόνου, αυξάνοντας τη γλυκόζη στο πλάσμα του αίματος. Επίσης, μπορεί να υπάρχουν στο ενδοκρινές πάγκρεας τα κύτταρα D και τα κύτταρα X, που παράγουν ορμόνες. Υπάρχει συνήθως σημαντική αλλαγή στο μέγεθος των νησιδίων σε περιόδους ωοτοκίας, κατά την πάροδο των χρόνων (γήρας) και κατά τις διατροφικές αλλαγές (Fortin, et al., 2015), (Nejedli and Tlak Gajger, 2013). Η εξωκρινής δράση του παγκρέατος σχετίζεται κυρίως με την έκκριση πεπτικών ενζύμων και διττανθρακικών ιόντων. Τα πεπτικά ένζυμα εκκρίνονται από τα παραπάνω κύτταρα στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου μέσω των παγκρεατικών πόρων, με σκοπό τη διάσπαση των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των υδατανθράκων .

1.3 Φυτικές πρωτεΐνες και φυτικά έλαια σε αντικατάσταση χρήση ιχθυάλευρου και ιχθυελαίου στις ιχθυοτροφές

Οι ιχθυοκαλλιέργειες, σαν μορφή εκμετάλλευσης του ζωικού κεφαλαίου εντατικοποιήθηκαν την τελευταία δεκαετία, με ρυθμό περίπου 3–4% αύξησης το χρόνο (Naylor, et al., 2021).



Διάγραμμα 1. Ιχθυοπαραγωγή σε εκατομ. τόνους προερχόμενη από ιχθυοκαλλιέργειες και αλλίευση (Πηγή: Food and Agriculture Organization of the United Nations μετά από μεταποίηση)

Εκτιμάται, ότι μέχρι το 2030, πάνω από το ήμισυ των ψαριών που καταναλώνονται παγκοσμίως, θα παράγονται από την υδατοκαλλιέργεια. Η συνολική παραγωγή αυξήθηκε από 10 εκατ. τόνους το 1984, σε 70 εκατ. τόνους το 2014. Οι προβλέψεις δίνουν ένα ποσοστό 89% μέχρι το 2025 (FAO 2021) σε μια αγορά 375 δις δολαρίων.

Η μεγάλη ανάπτυξη των ιχθυοκαλλιεργειών συνοδεύεται παράλληλα από ανάλογα μεγάλη αύξηση της ζήτησης για ιχθυοτροφές και λόγω του υψηλού οικονομικού ενδιαφέροντος, στην έρευνα και για τεχνητά υποκατάστατα με μικρότερο κόστος παραγωγής. Η συνεχής αναζήτηση εναλλακτικών ιχθυοτροφών και η παραγωγή τους οδηγεί στην μείωση της παραγωγής των ιχθυοαποθεμάτων που προορίζονται για ιχθυάλευρα (Shannon and Waller, 2021). Οι ιχθυοτροφές των εκτρεφόμενων ειδών στην Ευρώπη εμπεριέχουν μεγάλες ποσότητες ιχθυάλευρων (Malcorps, et al., 2021). Το ιχθυάλευρο είναι ένα υψηλής ποιότητας, πολύ εύπεπτο συστατικό των ιχθυοτροφών που ευνοεί τη διατροφή των ψαριών. Από όλες τις πρωτεΐνες, οι ζωικές αποτελούν την κύρια πηγή πρωτεΐνης στα ψάρια (προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας με περιεκτικότητα 32-82%, πλούσια σε λυσίνη, ενώ οριακά μπορεί να είναι η μεθειονίνη και η κυστίνη). Το ιχθυάλευρο αποτελεί τη σημαντικότερη πρωτεϊνική πηγή των ιχθυοτροφών. Περιέχει από 56 έως 76% πρωτεΐνη, ανάλογα την ποιότητα, ενώ είναι πλούσιο σε ενέργεια (κατά μέσο όρο 4941 kcal/kg ιχθυάλευρου), σε απαραίτητα

λιπαρά οξέα, ιχνοστοιχεία και είναι ιδιαίτερα εύγευστο για τα ψάρια. Παράγεται μετά από πολτοποίηση και βράσιμο των ψαριών, άσκηση πίεσης για να αφαιρεθεί το νερό και το λάδι που περιέχεται και κατόπιν ξήρανση (Miles and Chapman, 2021). Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιούνται κυρίως οι ρέγγες, οι σαρδέλλες και οι αντσούγιες και μέλη των οικογενειών όπως Engrailidae, Clupeidae, Gadidae, Osmeridae, Scombridae. Είναι μία πλούσια πηγή ενέργειας και μεταλλικών στοιχείων, με μεγάλη πεπτικότητα και ευγευστότητα για τα περισσότερα ψάρια (Ponnusamy, et al., 2012). Το ιχθυάλευρο από θαλασσινά ψάρια περιέχει επίσης και 1-2,5% Ω3 λιπαρά οξέα, τα οποία είναι βασικά για το μεταβολισμό των ψαριών. Ένα σημαντικό και ολοένα αυξανόμενο ποσοστό των ιχθυαλεύρων αποδίδεται στα παρεμπίπτοντα αλιεύματα, και στα υποπροϊόντα που δημιουργούνται κατά την επεξεργασία (π.χ. φιλέτα ψαριών και κονσερβοποιία) των διαφόρων θαλασσινών προϊόντων που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο (Ido and Kaneta, 2020). Η ποιότητα του ιχθυαλεύρου εξαρτάται από την αλίευση (τρόπος, τόπος, εποχή, θερμοκρασία), τον χρόνο και τον τρόπο αποθήκευσης πριν την επεξεργασία, αλλά και τη σύνθεση των αλιευμάτων. Το ιχθυάλευρο μπορεί να χαρακτηριστεί από ένα είδος, όταν αυτό περιλαμβάνεται σε ποσοστό τουλάχιστον 50%. Η ολική σύσταση των σημαντικότερων ιχθυαλεύρων που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοτροφές καθώς και η σύστασή τους σε απαραίτητα αμινοξέα. Ακόμη, πρώτη ύλη για την παρασκευή ιχθυοτροφών μπορούν να αποτελέσουν και τα υποπροϊόντα καρκινοειδών, με χαμηλότερη ωστόσο περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (30- 40%), αλλά υψηλή περιεκτικότητα σε ιχνοστοιχεία και καροτενοειδή που αποτελούν φυσικές χρωστικές ουσίες. Τέλος, πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης που προέρχονται από παραγωγικά χερσαία ζώα (με εξαίρεση τα αιματάλευρα και τα υδρολυμένα πτηνάλευρα και περάλευρα) απαγορεύεται να χρησιμοποιούνται ως συστατικά των ιχθυοτροφών στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, σύμφωνα με τον κανονισμό Νο 999/2001.

Η βιομηχανία της ιχθυοκαλλιέργειας κάνει χρήση των ιχθυαλεύρων για τροφή τόσο σαρκοφάγων και παμφάγων ιχθύων όσο και φυτοφάγων, κυρίως στα πρώτα στάδια της ζωής τους. Περίοδος κατά την οποία τα απαιτούμενα επίπεδα πρωτεΐνης και απαραίτητων αμινοξέων είναι υψηλά. Το υψηλό επίπεδο πρωτεΐνης που διαθέτουν σε συνδυασμό με το ιδανικό προφίλ αμινοξέων

που παρέχουν, την υψηλή πεπτικότητα, την υψηλή γευστικότητα, την έλλειψη αντιδιατροφικών παραγόντων και το γεγονός ότι μέχρι πριν λίγα χρόνια ήταν άμεσα διαθέσιμα και οικονομικά για τους παραγωγούς, αποτελούν το λόγο για τον οποίο έχουν αποδειχθεί τόσο αποτελεσματικά στον συγκεκριμένο τομέα (Mullon, et al., 2009). Αξίζει να σημειωθεί πως το 2010 το ποσοστό αυξήθηκε σημαντικά, στο 60% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής (FAO 2012). Όμως, δεδομένου του γεγονότος ότι η διαθεσιμότητα του ιχθυαλεύρου παρέμεινε στο ίδιο επίπεδο (6,5 εκατομμύριο τόνους ετησίως), για περίπου 25 χρόνια, η συνεχιζόμενη αύξηση της ζήτησής του για την ιχθυοκαλλιέργεια, σε ότι αφορά τα επίπεδα παραγωγής, γίνεται με το χρόνο προβληματική (Kok, et al., 2020).

Στην κυκλική σχέση αναγκαιότητας στην οποία τα ψάρια για να παραχθούν, χρειάζονται ψάρια για να τραφούν, η έρευνα στρέφει την αναζήτηση σε εναλλακτικές τροφές για χρήση στην ιχθυοκαλλιέργεια. Προκειμένου τα φυτικά άλευρα να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατα του ιχθυαλεύρου, θα πρέπει να εξετάζεται η καταλληλότητά τους με κύριο γνώμονα την ανάπτυξη που προσδίδουν στους εκτρεφόμενους ιχθύς σε συνδυασμό με τη διαθεσιμότητα και τη τιμή διάθεσής τους στο εμπόριο (Hua, et al., 2019). Βέβαια, η αντικατάσταση των ιχθυαλεύρων από εναλλακτικές φυτικές πηγές πρωτεϊνών είναι σήμερα επιτακτική ανάγκη. Ωστόσο, η χρήση τους σε βιομηχανικό επίπεδο δεν είναι η επιθυμητή, εξαιτίας της χαμηλής περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνη και της έλλειψης αμινοξέων. Επίσης, οι πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης συχνά έχουν μειωμένη γευστικότητα και περιέχουν αντιδιατροφικούς παράγοντες, που επιφέρουν ορισμένα προβλήματα πεπτικότητας στα ψάρια. Τα υποπροϊόντα αυτά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και ως πηγή φτηνής και εύκολα διαθέσιμης πρωτεΐνης. Από την άποψη της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη μπορούν να διακριθούν σε χαμηλού πρωτεϊνικού περιεχομένου με ποσοστό <20% και υψηλού με >20%. Τα χαμηλού ποσοστού πρωτεΐνης φυτικά υποπροϊόντα που περιλαμβάνουν τα άλευρα της αλευροποιίας και τα μη επεξεργασμένα άλευρα των δημητριακών, περιέχουν συνήθως περί τα 12% πρωτεΐνες, 65% υδατάνθρακες, 5% ίνες, 0,07% Ca και 0,35% φώσφορο. Η δεύτερη κατηγορία φυτικών προϊόντων έχει περιεκτικότητα πρωτεϊνών >20% και είναι συνήθως υποπροϊόντα υγρής άλεσης και ζύμωσης (υποπροϊόντα ζυθοποιίας κριθαριού, βρώμης, κ.ά.), πλούσια σε ινώδεις ουσίες, ή υπολείμματα

εκχύλισης ελαίων (π.χ. βαμβακόπιτα, ηλιάλυρο, αραχιδάλυρο, σησαμαύλυρο, άλυρο σπόρων ελαιοκράμβης, κ.ά.). Τα όσπρια θεωρούνται από τις καλύτερες φυτικές πηγές πρωτεϊνών γιατί είναι πλούσια σε λυσίνη. Η σόγια και τα προϊόντα της (πίτα σόγιας, σογιέλαιο) είναι από τα πιο δημοφιλή συστατικά των ζωοτροφών γενικότερα, ενώ χρησιμοποιούνται επίσης κουκιά, φασόλια, λούπινα, μπιζέλια, ρεβύθια, κ.ά. (Egerton, et al., 2020) (Gupta, et al., 2020). Πηγές πρωτεϊνών αυτού του τύπου έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία και σε άλλα εκτρεφόμενα είδη όπως οι γαρίδες (Malcorps, et al., 2019). Σε άλλες περιπτώσεις αναφέρθηκε με επιτυχία η ολική αντικατάσταση των ιχθυάλυρων με πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης σε εκτρεφόμενα πελαγικά είδη ψαριών (Davidson, et al., 2016), (Iqbal, et al., 2014).

Παραταύτα, τα φυτικά άλυρα υστερούν συγκριτικά με τα ιχθυάλυρα όσον αφορά τα επίπεδα πρωτεΐνης και ορισμένων απαραίτητων αμινοξέων. Επιπλέον, περιέχουν διάφορες αντιδιατροφικές ουσίες που είναι αναγκαίο να αδρανοποιηθούν μέσω κατάλληλης επεξεργασίας αλλιώς είναι δυνατόν να προκαλέσουν τοξικότητες, μείωση της ανάπτυξης και προβλήματα υγείας στους διατρεφόμενους ιχθύς (Oliveira and Vasconcelos, 2020). Σε αρκετές περιπτώσεις, οι φυτικής προέλευσης πρωτεΐνες περιέχουν αρκετούς αντιδιατροφικούς παράγοντες (όπως για παράδειγμα οι αναστολείς της τρυψίνης που μπορούν να απενεργοποιηθούν μετά από θερμική επεξεργασία, ενώ κάποιοι άλλοι παράγοντες, όπως το φυτικό οξύ, παραμένουν αναλλοίωτοι) . Επίσης, οι τανίνες, τα αλκαλοειδή, τα φυτικά οιστρογόνα και άλλες ενώσεις αποτελούν δυνητικούς αντιδιατροφικούς παράγοντες των ιχθυοτροφών στα ψάρια. Κατά περιπτώσεις έχουν αναφερθεί σημαντικές διαφορές στην ανάπτυξη, στα ένζυμα της πέψης, στην μικροχλωρίδα και πανίδα του εντέρου και στο ανοσοποιητικό σύστημα των εκτρεφόμενων ψαριών (Liu, et al., 2020).

Οι αρνητικές επιπτώσεις επίσης μπορούν να εντοπιστούν στο γεγονός ότι με τη χρησιμοποίηση φυτικών πρωτεϊνών υπάρχει μια σημαντική ανησυχία που έγκειται στην παρουσία των γενετικά τροποποιημένων προϊόντων που χρησιμοποιούνται σήμερα στη γεωργία και ιδιαίτερα εκείνων που προέρχονται από σόγια και καλαμπόκι (Sissener, et al., 2011). Όμως, η μερική ή ακόμη

και η ολική υποκατάσταση των ιχθυαλεύρων με φυτικές πηγές πρωτεϊνών αποτελεί επιτακτική ανάγκη και ήδη σε επίπεδο πειραματικής εκτροφής έχει επιτευχθεί σε κάποια είδη ψαριών. Μάλιστα, τα ψάρια χαμηλότερου τροφικού επιπέδου με χορτοφαγικές διατροφικές συνήθειες και απαιτήσεις ανταποκρίνονται καλύτερα από εκείνα υψηλού τροφικού επιπέδου. Ορισμένες μελέτες έχουν διεξαχθεί με δίαιτες χωρίς την παρουσία ιχθυαλεύρου, αλλά σε γενικές γραμμές έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια των αναπτυξιακών επιδόσεων των ιχθύων (Hansen, et al., 2007), (Daniel, 2018). Τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια είναι τα δύο κύρια συστατικά των ιχθυοτροφών που χρησιμοποιούνται ως κύριες πηγές πρωτεϊνών και λιπιδίων, αντίστοιχα. Το ιχθυέλαιο είναι η κύρια φυσική πηγή των n-3 των υψηλά πολυακόρεστων οξέων λίπους (n-3 LC-PUFA), όπως το DHA (22:6n-3) και το EPA (20:5n-3), τα οποία έχουν κυρίαρχο ρόλο στην βιομηχανία παραγωγής των θαλάσσιων ιχθυοκαλλιεργειών (Tacon and Metian, 2008 & Turchini, et al., 2009). Οι τιμές, παραταύτα, των ιχθυελαίων λόγω της αυξημένης ζήτησης και περιορισμένης παραγωγής, σε διεθνές επίπεδο, αυξάνονται. Για λόγους οικονομικής διαχείρισης των ιχθυοκαλλιεργειών κρίνεται αναγκαία η εξεύρεση εναλλακτικών πηγών ώστε να εξασφαλίζεται η βιώσιμη παραγωγή των ιχθυοκαλλιεργειών (Izquierdo, et al., 2001). Τα θαλάσσια μικροφύκη είναι μια από τις πρωταρχικές φυσικά παραγωγικές πηγές των n-3 LC-PUFA στη θαλάσσια τροφική αλυσίδα και χρησιμοποιούνται κοινότητα, σαν πηγή των n-3 LC-PUFA, βιταμινών και αμινοξέων στην διατροφή των ζωοπλακτονικών ειδών που μετέπειτα διατρέφουν τον γόνο πολλών εκτρεφόμενων ειδών ιχθύων (Muller-Feuga, 2000). Η έρευνα έχει σε ένα βαθμό στραφεί στη βιομηχανική παραγωγή μικροφυκών για χρήση τους για βιοκαύσιμο και παραιατρικών σκευασμάτων διατροφής. Σε αρκετές περιπτώσεις, έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην παραγωγή εναλλακτικών πηγών n-3 LC-PUFA από μικροφύκη (Ergalçin, et al., 2015 & Ganuza, et al., 2008) και βιομάζα προερχόμενη από κάποια είδη μονοκύτταρων και οι οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες σαν επιπλέουσα σκόνη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ιχθυοτροφή θαλάσσιων καλλιεργειών. Στα αποτελέσματα κάποιων μελετών φαίνεται να έχουν με επιτυχία χρησιμοποιηθεί πηγές n-3 LC-PUFA από μικροφύκη σαν εναλλακτική πηγή το ιχθυέλαιο (Atalah, et al., 2007), (Miller, et al., 2007 & Ganuza, et al., 2008). Ενώσω το κόστος παραγωγής για μονοκύτταρα LC-PUFA

δεν είναι ακόμα ανταγωνιστικό με τις τιμές των ιχθυελαίων (Pulz and Gross, 2004 & Spolaore, et al., 2006) η παραγωγή των μικροφυκών για βιοκαύσιμο (Markou and Nerantzis, 2013) και τη βιομηχανία τροφών μπορεί να φέρει το κόστος παραγωγής τους ανταγωνιστικό με τις συνεχείς αυξήσεις στις τροφές που περιέχουν ιχθυέλαιο.

1.4 Μικροφύκη: σημασία τους στη διατροφή των ιχθύων και η χρήση του στην αντικατάσταση του ιχθυάλευρου και του ιχθυελαίου

Τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια είναι τα δύο κύρια συστατικά των ιχθυοτροφών που χρησιμοποιούνται ως κύριες πηγές πρωτεϊνών και λιπιδίων, αντίστοιχα. Το ιχθυέλαιο είναι η κύρια φυσική πηγή των n-3 των υψηλά πολυακόρεστων οξέων λίπους (n-3 LC-PUFA), όπως το DHA (22:6n-3) και το EPA (20:5n-3), τα οποία έχουν κυρίαρχο ρόλο στην βιομηχανία παραγωγής των θαλάσσιων ιχθυοκαλλιεργειών (Tacon and Metian, 2008 & Turchini, et al., 2009). Οι τιμές, παραταύτα, των ιχθυελαίων λόγω της αυξημένης ζήτησης και περιορισμένης παραγωγής, σε διεθνές επίπεδο, αυξάνονται. Για λόγους οικονομικής διαχείρισης των ιχθυοκαλλιεργειών κρίνεται αναγκαία η εξεύρεση εναλλακτικών πηγών ώστε να εξασφαλίζεται η βιώσιμη παραγωγή των ιχθυοκαλλιεργειών (Izquierdo, et al., 2001).

Τα θαλάσσια μικροφύκη είναι μια από τις πρωταρχικές φυσικά παραγωγικές πηγές των n-3 LC-PUFA στη θαλάσσια τροφική αλυσίδα και χρησιμοποιούνται κοινότερα, σαν πηγή των n-3 LC-PUFA, βιταμινών και αμινοξέων στην διατροφή των ζωοπλακτονικών ειδών που μετέπειτα διατρέφουν τον γόνο πολλών εκτρεφόμενων ειδών ιχθύων (Muller-Feuga, 2000). Η έρευνα έχει σε ένα βαθμό στραφεί στη βιομηχανική παραγωγή μικροφυκών για χρήση τους για βιοκαύσιμο και παραιατρικών σκευασμάτων διατροφής. Σε αρκετές περιπτώσεις, έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην παραγωγή εναλλακτικών πηγών n-3 LC-PUFA από μικροφύκη (Ergalçin, et al., 2015 & Ganuza, et

al., 2008) και βιομάζα προερχόμενη από κάποια είδη μονοκύτταρων και οι οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες σαν επιπλέουσα σκόνη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ιχθυοτροφή θαλάσσιων καλλιεργείων. Στα αποτελέσματα κάποιων μελετών φαίνεται να έχουν με επιτυχία χρησιμοποιηθεί πηγές n-3 LC-PUFA από μικροφύκη σαν εναλλακτική πηγή το ιχθυέλαιο (Atalah, et al., 2007), (Miller, et al., 2007 & Ganuza, et al., 2008). Ενόσω το κόστος παραγωγής για μονοκύτταρα LC-PUFA δεν είναι ακόμα ανταγωνιστικό με τις τιμές των ιχθυελαίων (Pulz and Gross, 2004 & Spolaore, et al., 2006) η παραγωγή των μικροφυκών για βιοκαύσιμο (Markou and Nerantzis, 2013) και τη βιομηχανία τροφών μπορεί να φέρει το κόστος παραγωγής τους ανταγωνιστικό με τις συνεχείς αυξήσεις στις τροφές που περιέχουν ιχθυέλαιο.

Το είδος *Nannochloropsis gaditana* είναι ένα φωτοτροπικά στιγματόφυτο που χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην εκτροφή προνυμφών, ειδικά για παραγωγή τροχόζωων και για την εκτροφή προνυμφών με την τεχνική greenwater. Το *N. gaditana* είναι πλούσιο σε EPA (20:5n-3), παρέχει υψηλά επίπεδα EPA και πρωτεΐνης (Hoffmann, et al., 2010), (Rocha, et al., 2003), (Ferreira, et al., 2009). Η *Cryptocodinium cohnii* (Seligo) είναι ένα ετεροτροφικό μαστιγοφόρο πλούσιο σε οξέα DHA (22:6n-3). Χρησιμοποιείται σαν πηγή αυτού του λιπαρού οξέος και χρησιμοποιείται σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς των υδατοκαλλιέργειών (Ucko, et al., 1997), (Rodolfi, et al., 2003), Μπορεί να παράγει υψηλά ποσοστά DHA (κοντά στο 10% ξηρό βάρος και 40% ολικά λιπαρά οξέα στη βιομάζα) και παρουσιάζει χαμηλά ποσοστά σε μικρής αλυσίδας, κορεσμένα λιπαρά οξέα. (Alves, et al., 2018), (Molino, et al., 2019 & Cristina and Señor, 2021). Η χρώση στις τομές πραγματοποιείται εφόσον απομακρυνθεί η ρητίνη και να ενυδατωθεί ο ιστός. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται χαρακτηρίζονται ως υδατοδιαλυτές. Στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιείται η χρωστική αιματοξυλίνη- ηωσίνη με διαδικασία που αναφέρεται αναλυτικά στον πίνακα (2.2). Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με το προσκολλημένο επάνω τους δείγμα ιστού, τοποθετήθηκαν σε ειδικές πλαστικές θήκες των 20 υποδοχών και με αυτόν τον τρόπο ήταν δυνατή η βύθιση των εκάστοτε δειγμάτων στα διαλύματα και τους χρόνους που όριζε το πρωτόκολλο για χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης. Στο πρώτο στάδιο το οποίο είναι η αποπαραφίνωση, τα δείγματα βυθίστηκαν διαδοχικά

για 15 λεπτά σε δύο δοχεία τα οποία περιείχαν ζυλόλη. Έπειτα εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 100% για δύο λεπτά και ακολούθησε επανάληψη αυτού του βήματος σε νέο διάλυμα αιθανόλης ίδιας συγκέντρωσης. Στο δεύτερο στάδιο το οποίο είναι η ενυδάτωση τα δείγματα τοποθετούνται διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 96% για δύο λεπτά, αμέσως μετά σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 80% για ένα λεπτό και κατόπιν σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 70% για ένα λεπτό. Η διαδικασία της ενυδάτωσης έληξε αφού πρώτα οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλύθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης για ένα λεπτό. Μετά το δεύτερο στάδιο, ακολουθεί η χρώση των ιστών, Η θήκη τοποθετήθηκε στο δοχείο χρώσης που περιείχε αιματοζυλίνη για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό βρύσης για δύο λεπτά, εμβαπτίστηκαν τρεις φορές μέσα στο επόμενο δοχείο που περιείχε διάλυμα όξινης αλκοόλης 1% και ξανά ξεπλύθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης για πέντε λεπτά. Για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της χρώσης τα δείγματα, τοποθετήθηκαν στην ηωσίνη για τρία λεπτά και μετά το πέρας αυτού του χρόνου ξανά ξεπλύθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης για τριάντα δευτερόλεπτα. Τελευταίο στάδιο είναι να γίνει η αφυδάτωση των ιστών, οπότε τα δείγματα, παρέμειναν στο διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 70% για τριάντα δευτερόλεπτα, έπειτα σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 80% για τριάντα δευτερόλεπτα και κατόπιν σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 90% για 30 δευτερόλεπτα. Για την αποτελεσματική αφυδάτωση τους οι ιστοί εμβαπτίστηκαν διαδοχικά σε δύο διαλύματα αιθανόλης συγκέντρωσης 100% για δύο λεπτά στο καθένα. Κατά το τελικό στάδιο που περιλάμβανε τη διαδικασία διαύγασης τα ιστολογικά παρασκευάσματα βυθίστηκαν μέσα σε ζυλόλη για δύο λεπτά και επανατοποθετήθηκαν σε δοχείο με νέα ζυλόλη για πέντε επιπλέον λεπτά.

1.5 Επιδράσεις φυτικών πρωτεΐνες και φυτικών ελαίων

Αρχικά, η επιλογή των σιτηρεσίων που χρησιμοποιούνται για την εκτροφή των ψαριών στις υδατοκαλλιέργειες αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην επιτυχή εκτροφή του είδους. Έτσι, πρέπει να είναι γνωστές τόσο οι διατροφικές απαιτήσεις των εκάστοτε ειδών που εκτρέφονται, καθώς και το αποτέλεσμα που μπορεί να έχει το σιτηρέσιο στο ίδιο το είδος όπως είναι η κατανάλωση και η

αποδοτικότητα που επιφέρει στην ανάπτυξη, αλλά και η πιθανή πρόκληση φλεγμονών και ασθενειών (Blazer, 1992) Το κύριο συστατικό των ιχθυοτροφών παγκοσμίως τις τελευταίες δεκαετίες είναι το ιχθυάλευρο καθώς περιέχει πολύ καλή ποιότητα πρωτεϊνών απαραίτητων για την αύξηση των ψαριών, είναι γευστικό και ενισχύει την πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών, την πέψη και την απορρόφηση (FAO 2001; Takon & Metian 2008). Ωστόσο, η αυξανόμενη ζήτηση και η υψηλή τιμή που επέρχεται ως αποτέλεσμα της ραγδαίας ανάπτυξης των υδατοκαλλιεργειών, η περιορισμένη διαθεσιμότητα αλλά και οι περιορισμοί που δημιουργούνται από τη χρήση άγριων πληθυσμών ψαριών ως τροφή για τα ψάρια των υδατοκαλλιεργειών έστρεψαν την έρευνα στην αναζήτηση εναλλακτικών πηγών πρωτεϊνών (FAO 2001). Έτσι, μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί αρκετές εναλλακτικές πηγές που έχουν αντικαταστήσει τα ιχθυάλευρα σε μικρότερο ή μεγαλύτερο ποσοστό, όπως είναι οι ζωικές πρωτεΐνες από απομεινάρια σφαγείων, οι φυτικές πηγές πρωτεϊνών και τα έντομα (Alexis & Nengas, 2001, Yang et al., 2004, FAO, 2013). Οι φυτικές πηγές Εισαγωγή 18 πρωτεϊνών αποτελούν σημαντικό υποψήφιο για την μερική αντικατάσταση των ιχθυαλεύρων και έχουν αποτελέσει αντικείμενο αρκετών ερευνών, καθώς είναι διαθέσιμες στη φύση και έχουν χαμηλό κόστος. Το μειονέκτημα τους είναι ότι έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε μερικά απαραίτητα αμινοξέα, ενέργεια και ιχνοστοιχεία ιδιαίτερα σε φώσφορο, σε σύγκριση με τις ζωικές πηγές πρωτεϊνών (Alexis & Nengas, 2001), ενώ μπορεί να προκαλέσουν μείωση της όρεξης και φλεγμονή στο έντερο, ιδιαίτερα όταν η αντικατάσταση γίνεται σε μεγάλο ποσοστό (Blazer, 1992 & Francis et al., 2001). Η πιο αποδεκτή πηγή φυτικών πρωτεϊνών για την αντικατάσταση των ιχθυαλεύρων, τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά, είναι η σόγια που έχει χρησιμοποιηθεί για τη διατροφή αρκετών ειδών ψαριών συμπεριλαμβανομένου και του κρانيού (Chatzifotis και et al., 2008, Estevez et al., 2011, Velazco-Vargas et al., 2013). Το ασκορβικό οξύ είναι υδατοδιαλυτή βιταμίνη απαραίτητη για την κανονική ανάπτυξη και φυσιολογική λειτουργία των ψαριών τα οποία δεν έχουν τη δυνατότητα να το συνθέσουν από μόνα τους με αποτέλεσμα να εξαρτώνται από εξωγενή χορήγηση, μέσω της τροφής. Η βιταμίνη C έχει αντιοξειδωτική δράση και συμμετέχει σε ποικίλες ενζυμικές αντιδράσεις. Για παράδειγμα, δρα συνεργατικά με τη βιταμίνη E και το σελήνιο για να διατηρήσουν την ενζυμική

δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως της υπεροξειδάσης της γλουταθείονης (GPx) και δισμουτάσης της σουπεροξειδάσης (SOD). Είναι επίσης απαραίτητη για τη σύνθεση της κορτιζόλης, ενώ λόγω της συμμετοχής της στη σύνθεση του κολλαγόνου είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική λειτουργία του επιθηλίου αλλά και για την επούλωση τραυμάτων (Blazer, 1992). Σημαντική ανεπάρκεια βιταμίνης C στα ψάρια μπορεί να οδηγήσει σε σκολίωση και λόρδωση, αιμορραγίες, παραμόρφωση στα βράγχια, διάβρωση πτερυγίων, αναιμία, ανορεξία και αυξημένη θνησιμότητα (Alexis et.al., 1997). Για την εκτροφή του κρaniuού μέχρι σήμερα χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο σιτηρέσια που χρησιμοποιούνταν για την εκτροφή άλλων ειδών όπως η τσιπούρα και το λαβράκι. Με τη χρήση όμως συγκεκριμένων σιτηρεσίων, περιορίζεται η ικανότητα που έχει ο κρaniuός για υψηλό ρυθμό αύξησης, και έχει επιπτώσεις τόσο στην εμφάνιση, όσο και στην ποιότητα του κρέατός του (Poli et.al., 2003). Η μη ύπαρξη εξειδικευμένων τροφών για την εκτροφή του κρaniuού αποδίδεται στην έλλειψη γνώσης σχετικά με τις διατροφικές του απαιτήσεις. Μέχρι Εισαγωγή 19 σήμερα δεν είναι γνωστές οι απαιτήσεις του σε απαραίτητα λιπαρά οξέα, αμινοξέα, βιταμίνες και μέταλλα τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο για την καλή ανάπτυξη του είδους, την ποιότητα του κρέατος, αλλά και για την εμφάνιση ασθενειών. Έρευνες ωστόσο μέχρι σήμερα έχουν δείξει πως στις απαιτήσεις του κρaniuού περιλαμβάνονται υψηλή περιεκτικότητα σε διαιτητικές πρωτεΐνες (περίπου 50%) και χαμηλότερη σε διαιτητικά λιπίδια (περίπου 17%) (Chatzifotis et.al., 2010 & 2012).

1.6 Σκοπός και αντικείμενο της εργασίας.

Οικονομικά και διαχειριστικά κίνητρα ωθούν την έρευνα για την ανάπτυξη τεχνογνωσίας στη βελτιστοποίηση και αντικατάσταση των κλασικών ιχθυαλεύρων και και ιχθυελαίων των ιχθυοτροφών. Η ζήτηση προϊόντων ιχθυοκαλλιεργειών αυξάνεται, ενώ οι διαθέσιμοι πόροι παραγωγής ιχθυάλευρων και ιχθυελαίου παραμένουν σταθεροί και περιβαλλοντικά οχληροί. Σε αντικατάσταση των πρωτεϊνών και ελαίων στις ιχθυοτροφές, αναζητήθηκαν εναλλακτικές λύσεις με προσθήκες υλικών με φυτική χερσαία προέλευση, όσο και θαλάσσια χλωρίδα με κύριο εκπρόσωπο

τα μικροφύκη, τα οποία αποτελούν και φυσική πηγή πρωτεΐνης και λίπους για τα ψάρια. Εκτός των προβλημάτων που σε ένα αριθμό περιπτώσεων προκλήθηκαν από την αλλαγή αυτή στο σιτηρέσιο και σχετίζονται με την μείωση των αποδόσεων στο τελικό προϊόν, αναφέρθηκαν και περιπτώσεις που παρατηρήθηκαν ιστολογικού τύπου κακοήθειες στα όργανα που είναι τμήμα του πεπτικού συστήματος και πρωτίστως στο συκώτι (Psofakis, et al., 2021 & Estruch, et al., 2018).

Σε παραλληλισμό με τις ερευνητικές τάσεις αυτές, η παρούσα εργασία, αποτελεί τμήμα μιας συλλογικότερης ερευνητικής προσπάθειας εκτίμησης των αποτελεσμάτων αντικατάστασης τμήματος του σιτηρεσίου της εκτρεφόμενης τσιπούρας με μικροφύκη. Τα προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκτροφές τις τσιπούρας προέρχονταν από τα μικροφύκη *Schizochytrium* sp. και *Nannochloropsis Gaditana*. Στόχος της παρούσας είναι να παρουσιάσει την διαδικασία παραγωγής των τελικών δειγμάτων για ιστολογική μικροσκοπική εξέταση και τα αποτελέσματα της επισκόπησης σε μια σειρά από δείγματα ήπατος τσιπούρας. Για τη μικροσκοπική ανατομική μελέτη του ήπατος και του εντέρου χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές ιστολογίας οι οποίες περιλαμβάνουν τα εξής στάδια:

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

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1 Δειγματοληψία (ψάρια και ιστοί: ήπαρ, πρόσθιο έντερο)

Η θανάτωση των τσιπούρων πραγματοποιήθηκε στις 12/4/2017 έπειτα από 84 ημέρες διεξαγωγής πειράματος. Η θανάτωση προκλήθηκε, με αναισθητικό και έπειτα σε παγωμένο νερό. Στην συνέχεια, αφού τα ψάρια εισήχθησαν στον χώρο του εργαστηρίου έγινε η δειγματοληψία στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου και του ήπατος με σκοπό την ιστολογική ανάλυση τους. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν τα ψάρια τα οποία είχαν σιτιστεί με την αντικατάσταση του ιχθυελαίου κατά 50% και 100% των μικροφυκών *Schizocitrium sp.* και *Nannocloropsis sp.* Το πρόσθιο τμήμα του εντέρου και το ήπαρ τοποθετήθηκαν σε ειδικά πλαστικά δοχεία χωρητικότητας 25 ml που περιείχαν υδατικό διάλυμα φορμόλης 10% και τα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (-20 °C) μέχρι τη στιγμή της ιστολογικής τους εξέτασης.

2 Προετοιμασία δειγμάτων για ιστολογική εξέταση

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

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

2.2.1 Απομόνωση των ιστών

Αρχικά, προηγήθηκε η τομή των ψαριών και στην συνέχεια η απομόνωση των ιστών με λεπτές κινήσεις, έγινε πρώτα η δειγματοληψία ολόκληρου του εντέρου όπως και επιλέχθηκε το πρόσθιο τμήμα και στην συνέχεια έγινε η συλλογή του ήπατος. Αρχικά, προηγήθηκε η τομή των ψαριών και στην συνέχεια η απομόνωση των ιστών με λεπτές κινήσεις, έγινε πρώτα η δειγματοληψία ολόκληρου του εντέρου όπως και επιλέχθηκε το πρόσθιο τμήμα και στην συνέχεια έγινε η συλλογή του ήπατος.

2.2.2 Μονιμοποίηση των ιστών

Οι ιστοί τοποθετήθηκαν άμεσα υγρό διάλυμα φορμόλης (10%). Για να γίνει η νομιμοποίηση των ιστών πρέπει να διαρκέσουν 48 ώρες εντός του διαλύματος. Σε όλη τη διαδικασία μονιμοποίησης τα δείγματα παρέμειναν σε ειδικούς διάτρητους ανθεκτικούς υποδοχείς, αφού πρώτα αυτοί σημάνθηκαν με μολύβι με την ημερομηνία και τον κωδικό αριθμό του δείγματος. Οι ιστοί τοποθετήθηκαν άμεσα υγρό διάλυμα φορμόλης (10%). Για να γίνει η νομιμοποίηση των ιστών πρέπει να διαρκέσουν 48 ώρες εντός του διαλύματος. Σε όλη τη διαδικασία μονιμοποίησης τα δείγματα παρέμειναν σε ειδικούς διάτρητους ανθεκτικούς υποδοχείς, αφού πρώτα αυτοί σημάνθηκαν με μολύβι με την ημερομηνία και τον κωδικό αριθμό του δείγματος.

2.2.3 Αφυδάτωση - Διάγυαση- Έγκλιση ιστού σε παραφίνη

Μετά την παραμονή των ιστών στο διάλυμα φορμόλης ακολουθήθηκε η σταδιακή αφυδάτωση, ο καθαρισμός (διάγυαση) και η έγκλιση του ιστού σε παραφίνη. Αυτή η διαδικασία έγινε με τη βοήθεια ειδικής συσκευής που καλείται ιστοκινέτα. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στην συσκευή είχε συνολική διάρκεια 19 ωρών. Όλη η διαδικασία φαίνεται στον παρακάτω πίνακα: Μετά την παραμονή των ιστών στο διάλυμα φορμόλης ακολουθήθηκε η σταδιακή αφυδάτωση, ο καθαρισμός (διάγυαση) και η έγκλιση του ιστού σε παραφίνη. Αυτή η διαδικασία έγινε με τη βοήθεια

ειδικής συσκευής που καλείται ιστοκινέτα. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στην συσκευή είχε συνολική διάρκεια 19 ωρών.

Πίνακας 2. Στάδια και χρόνοι προετοιμασίας των ιστών

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

Όλη η διαδικασία φαίνεται στον παρακάτω πίνακα: πως φαίνεται στον παραπάνω Πίνακα 2 βυθίστηκαν διαδοχικά σε βαθμιαία σειρά υδατικών διαλυμάτων αλκοόλης, συγκεντρώσεων 70%, 80%, 95% και 100% (κατά αύξοντα αριθμό) προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή αφυδάτωση τους. Αρχικά, τα δείγματα βυθίστηκαν στο δοχείο της αλκοόλης 70% για μια ώρα, έπειτα για το ίδιο χρονικό διάστημα τοποθετήθηκαν στην αλκοόλη 80%, ενώ μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας τα δείγματα εισήχθησαν για δύο ώρες στην αλκοόλη 95% και τέλος, για να ολοκληρωθεί το πρώτο στάδιο της ιστοκινέτας που καλείται αφυδάτωση τα δείγματα ήταν συνολικά για τρεις ώρες σε αλκοόλη 100%. Για να πραγματοποιηθεί το δεύτερο στάδιο δηλαδή ο καθαρισμός (διαύγαση) χρειάστηκαν συνολικά 4 ώρες όπου τα δείγματα ήταν μέσα σε ξυλόλη ώστε να επιτευχθεί ο καλύτερος καθαρισμός των ιστών από την διαδικασία της αφυδάτωσης. Τελευταίο στάδιο, είναι ο εμποτισμός με παραφίνη όπου χρειάστηκαν συνολικά έξη ώρες. Κατά τη διάρκεια όλης της διαδικασίας στην ιστοκινέτα πραγματοποιούνταν ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε τα διαλύματα να διεισδύσουν ευκολότερα στον ιστό του δείγματος. Με ήπια περιοδική ανακίνηση η διαδικασία επιταχύνονταν, ενώ επίσης εξασφαλιζόνταν η ομοιογενής επεξεργασία των δειγμάτων.

Για αυτό τον λόγο, η ιστοκινέτα ρυθμίστηκε ώστε η ανάδευση και η ανάλλαξη των σταδίων να γίνεται αυτόματα.

2.2.4 Εμβάπτιση, εγκλεισμός σε παραφίνη.

Οι κασετίνες με τους αφυδατωμένους ιστούς τοποθετούνταν σε ειδικό δοχείο με υγρή παραφίνη προς αποφυγή πήξης της είδη υπάρχουσας παραφίνης που είχε παραμείνει από την προηγούμενη διαδικασία τού εμποτισμού. Η διαδικασία της εγκλεισης γίνεται είτε σε μηχανήμα σκλήνωσης είτε χειροκίνητα. Στο συγκεκριμένο πείραμα όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε χειροκίνητα. Οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε ειδικό καλούπι, το οποίο γεμίζει με υγρή παραφίνη και μεταφέρθηκαν στην ψυχρή πλάκα όπου στερεοποιείται η παραφίνη. Η εγκλειση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 60 °C, ενώ τα μπλοκάκια παρέμειναν στην παγωμένη πλακά μέχρι να παγώσουν και στην συνέχεια αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη μέχρι την ημέρα που θα γινόταν η τομή.

2.2.5 Τομή ιστού στην μικροτόμο.

Αφού πραγματοποιήθηκε η εμβάπτιση και ο εγκλεισμός στην παραφίνη τα δείγματα ήταν έτοιμα για να πραγματοποιηθεί η τομή τους. Αρχικά, πριν την τομή καθαρίστηκα με ξυλόλη η λεπίδα και γενικότερα όλο το μηχανήμα (μικροτόμος), ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα παραφίνης από προηγούμενη χρήση του και για την απολύμανση αυτού. Στην συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν κάθετα στην ειδική υποδοχή της μικροτόμου ρυθμισμένη στα 5μm για την εξαγωγή εγκάρσιων τομών ήπατος, αυτή η διαδικασία γίνεται με την χρήση

διαδοχικών τομών με συνεχή επανάληψη ώστε ο ιστός να πάρει μια λεπτή και ομοιόμορφης σειράς



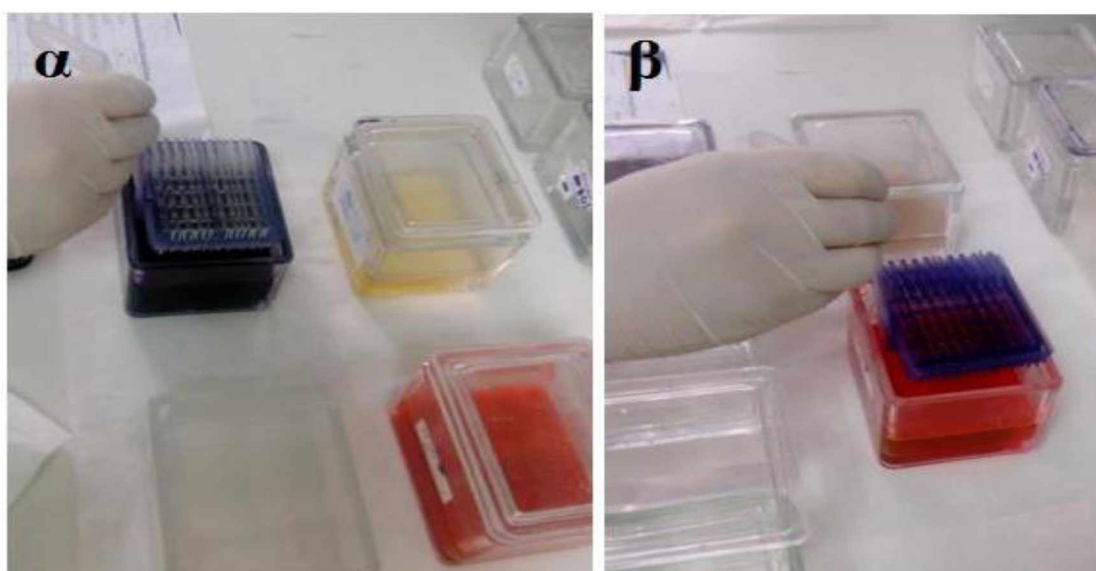
Με πολύ προσοχή η ιστολογική τομή εισέρχεται μέσα στο υδατόλουτρο με θερμοκρασία νερού 40 οC και μετά έγινε η επικόλληση αυτής στην αντικειμενοφόρο πλάκα όπου πάνω σε αυτή αναγράφτηκε ο κωδικός του δείγματος. Η διαδικασία ακολουθήθηκε για όλα τα δείγματα. Τέλος, για να γίνει η εξάτμιση του νερού από τις αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθ Αφού πραγματοποιήθηκε η εμφύσηση και ο εγκλεισμός στην παραφίνη τα δείγματα ήταν έτοιμα για να πραγματοποιηθεί η τομή τους. Αρχικά, πριν την τομή καθαρίστηκα με ξυλόλη η λεπίδα και γενικότερα όλο το μηχάνημα (μικροτόμος), ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα παραφίνης από προηγούμενη χρήση του και για την απολύμανση αυτού. Στην συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν κάθετα στην ειδική υποδοχή της μικροτόμου ρυθμισμένη στα 5μm για την εξαγωγή εγκάρσιων τομών ήπατος, αυτή η διαδικασία γίνεται με την χρήση διαδοχικών τομών με συνεχή επανάληψη ώστε ο ιστός να πάρει μια λεπτή και ομοιόμορφης σειράς ιστολογικών τομών. Με πολύ προσοχή η ιστολογική τομή εισέρχεται μέσα στο υδατόλουτρο με θερμοκρασία νερού 40 οC και μετά έγινε η επικόλληση αυτής στην αντικειμενοφόρο πλάκα όπου πάνω σε αυτή αναγράφτηκε ο κωδικός του δείγματος. Η διαδικασία ακολουθήθηκε για

όλα τα δείγματα. Τέλος, για να γίνει η εξάτμιση του νερού από τις αντικειμενοφόρες πλάκες ετήθηκαν σε θερμενόμενη πλάκα για όσο χρόνο χρειάστηκε.

2.2.6 Αποπαραφίνωση και χρώση

Η χρώση στις τομές πραγματοποιείται εφόσον απομακρυνθεί η ρητίνη και να ενυδατωθεί ο ιστός. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται χαρακτηρίζονται ως υδατοδιαλυτές. Στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιείται η χρωστική αιματοξυλίνη- ηωσίνη με διαδικασία που αναφέρεται αναλυτικά στον πίνακα (2.2). Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με το προσκολλημένο επάνω τους δείγμα ιστού, τοποθετήθηκαν σε ειδικές πλαστικές θήκες των 20 υποδοχών και με αυτόν τον τρόπο ήταν δυνατή η βύθιση των εκάστοτε δειγμάτων στα διαλύματα και τους χρόνους που όριζε το πρωτόκολλο για χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης . Στο πρώτο στάδιο το οποίο είναι η αποπαραφίνωση, τα δείγματα βυθίστηκαν διαδοχικά για 15 λεπτά σε δύο δοχεία τα οποία περιείχαν ξυλόλη. Έπειτα εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 100% για δύο λεπτά και ακολούθησε επανάληψη αυτού του βήματος σε νέο διάλυμα αιθανόλης ίδιας συγκέντρωσης. Στο δεύτερο στάδιο το οποίο είναι η ενυδάτωση τα δείγματα τοποθετούνται διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 96% για δύο λεπτά, αμέσως μετά σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 80% για ένα λεπτό και κατόπιν σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 70% για ένα λεπτό. Η διαδικασία της ενυδάτωσης έληξε αφού πρώτα οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλύθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης για ένα λεπτό. Μετά το δεύτερο στάδιο, ακολουθεί η χρώση των ιστών, Η θήκη τοποθετήθηκε στο δοχείο χρώσης που περιείχε αιματοξυλίνη για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο νερό βρύσης για δύο λεπτά, εμβαπτίστηκαν τρεις φορές μέσα στο επόμενο δοχείο που περιείχε διάλυμα όξινης αλκοόλης 1% και ξανά ξεπλύθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης για πέντε λεπτά. Για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της χρώσης τα δείγματα, τοποθετήθηκαν στην ηωσίνη για τρία λεπτά και μετά το πέρας αυτού του χρόνου ξανά ξεπλύθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης για τριάντα δευτερόλεπτα. Τελευταίο στάδιο είναι να γίνει η αφυδάτωση των ιστών, οπότε τα δείγματα,

παρέμειναν στο διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 70% για τριάντα δευτερόλεπτα, έπειτα σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 80% για τριάντα δευτερόλεπτα και κατόπιν σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 90% για 30 δευτερόλεπτα. Για την αποτελεσματική αφυδάτωση τους οι ιστοί εμβαπτίστηκαν διαδοχικά σε δύο διαλύματα αιθανόλης συγκέντρωσης 100% για δύο λεπτά στο καθένα. Κατά το τελικό στάδιο που περιλάμβανε τη διαδικασία διαύγασης τα ιστολογικά παρασκευάσματα βυθίστηκαν μέσα σε ξυλόλη για δύο λεπτά και επανατοποθετήθηκαν σε δοχείο με νέα ξυλόλη για πέντε επιπλέον λεπτά.



Εικόνα 3. α) δοχείο χρώσης με αιματοξυλίνη β) δοχείο χρώσης με ηωσίνη

Πίνακας 3. Πρωτόκολλο χρώσης αιματοξυλίνης – ηωσίνης

α/α	ΔΙΑΛΥΤΗΣ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΣΤΑΔΙΟΥ	ΣΤΑΔΙΟ
1	Ξυλόλη	15 min	ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗ
2	Ξυλόλη	15 min	
3	Αιθανόλη 100%	2 min	ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΞΥΛΟΛΗΣ
4	Αιθανόλη 100%	2 min	
5	Αιθανόλη 96%	2 min	ΕΝΥΔΑΤΩΣΗ
6	Αιθανόλη 80%	1 min	
7	Αιθανόλη 70%	1 min	
8	Τρεχούμενο νερό βρύσης	2 min	

9	Διάλυμα Αιματοξυλίνης	5 έως 15 min	ΧΡΩΣΗ
10	Ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό βρύσης	2 min	
11	Αμμωνιούχο νερό (Acid Alcohol 1%)	1-3 DIPS	
12	Ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό βρύσης	2 min	
13	Διάλυμα Ηωσίνης	3 min	
14	Ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό βρύσης	30 sec	
15	Αιθανόλη 70%	30 sec	ΑΦΥΔΑΤΩΣΗ
16	Αιθανόλη 80%	30 sec	
17	Αιθανόλη 96%	30 sec	
18	Αιθανόλη 100%	2 min	
19	Αιθανόλη 100%	2 min	
20	Ξυλόλη	2 min	ΔΙΑΥΓΑΣΗ
21	Ξυλόλη	5 min	

2.2.7 Στερεοποίηση των τομών

Για την προστασία και τη διατήρηση της ποιότητας των παρασκευασμάτων έγινε προσθήκη διάφανης συνθετικής ουσίας (DPX), η οποία απλώθηκε επάνω από τις ιστολογικές τομές και ακολούθησε απευθείας επικάλυψη των τομών με καλυπτρίδα διαστάσεων 25X50 mm, προσεκτικά για να μην παγιδευτούν φυσαλίδες.

2.2.8 Μελέτη των ιστολογικών τομών στο οπτικό μικροσκόπιο

Μετά την ολοκλήρωση της εξαγωγής και επεξεργασίας των ιστολογικών τομών ήπατος, ακολούθησε η μελέτη τους σε οπτικό μικροσκόπιο (Bresser Science TRM 301) σε μεγέθυνση X10, X40. Οι απεικονίσεις κάθε παρασκευάσματος φωτογραφήθηκαν μέσω ειδικής προσαρμοσμένης στο μικροσκόπιο ψηφιακής κάμερας (Bresser Mikro Cam 5.0 MP). Έπειτα, η εξέταση των ιστολογικών παρασκευασμάτων του ήπατος πραγματοποιήθηκε με βάση ένα συνδυασμό κριτηρίων όπως αυτά αναφέρονται σε πρόσφατες έρευνες, προκειμένου να αξιολογηθεί η κατάσταση του για κάθε διατροφική ομάδα, συγκριτικά πάντα με το σιτηρέσιο-μάρτυρα. Ένα από τα βασικότερα σημεία της δομής του ιστού στο οποίο επικεντρώθηκε η προσοχή, για την ύπαρξη πιθανών μεταβολών που θα ήταν αναμενόμενο να παρατηρηθούν στον ιστό εξαιτίας της υποκατάστασης που πραγματοποιήθηκε, ήταν η κατάσταση των ηπατοκυττάρων (έλεγχος για

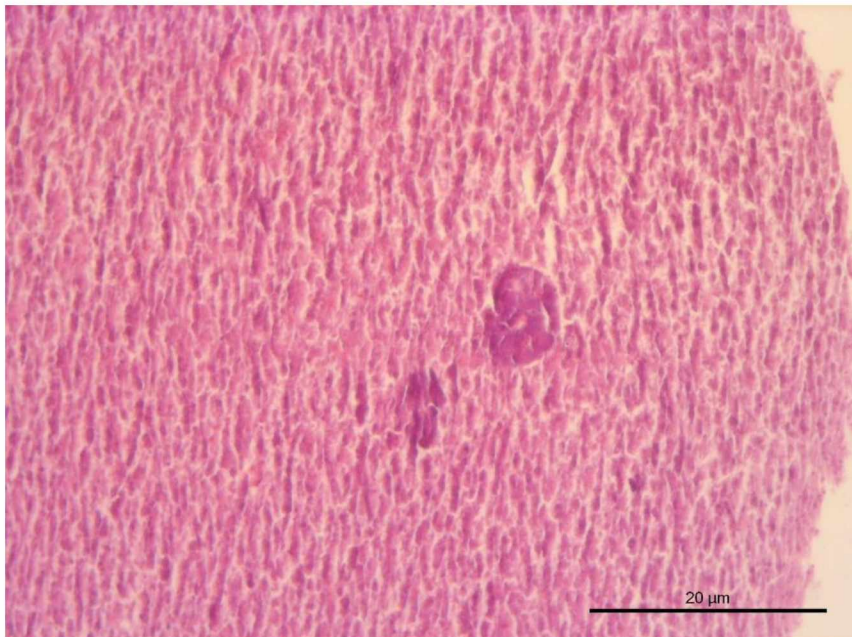
μετατόπιση του πυρήνα των ηπατοκυττάρων και παρουσία κενοδοπίων στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων). Επίσης, οι τομές ήπατος αξιολογήθηκαν ως προς το επίπεδο λιπώδους εκφύλισης του (παρουσία λιποσταγονιδίων, μέγεθος αυτών, εκτεταμένη παρουσία τους ως ένδειξη στεάτωσης), καθώς επίσης και για την εμφάνιση αιμορραγιών, νεκρωτικών περιοχών, φλεγμονών, οιδήματος ή κοκκιώματος.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την ιστολογική ανάλυση δειγμάτων ήπατος από τσιπούρες, στη διατροφή των οποίων πραγματοποιήθηκε υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου, με άλευρο από το μικροφύκος του είδους *C. vulgaris*, συνοψίζονται στα εξής:

Από τη συμμετοχή του παραπάνω αλεύρου σε επίπεδο της τάξης του 10%, 20% και 30% δεν σημειώθηκε κάποια σημαντική επαναλαμβανόμενη αλλοίωση στον ιστό του ήπατος, ούτε ένδειξη παθολογικής κατάστασης για κάποια από τις διατροφικές ομάδες. Το σύνολο των κυττάρων εμφανιζόταν με τον αναμενόμενο φυσιολογικό τρόπο έχοντας έκδηλο ετεροχρωματισμό και ευκρινή πυρήνα. Τα συσσωματώματα των λιπιδίων ήταν σπάνια και σχετικά μικρά σε μέγεθος. Δεν παρατηρήθηκαν συστηματικές ζώνες στεάτωσης, αιμορραγικά σύνδρομα, ζώνες νέκρωσης, φλεγμονές, οιδήματα. Οι επιπτώσεις που παρατηρήθηκαν σε μεμονωμένα δείγματα, ήταν μικρής έντασης και αιτιολογικά δεν είχαν να κάνουν με τη διατροφική πρακτική που ακολουθήθηκε. Επομένως η προαναφερθείσα υποκατάσταση κρίνεται δυνατή και ασφαλής για την τσιπούρα (*S. aurata*) σε ποσοστό μέχρι 30%, έως αποδείξεως του αντιθέτου. Τέλος, όλα τα δείγματα από τα υποκείμενα στις ομάδες διατροφικών μεταχειρίσεων χαρακτηρίστηκαν σαν υγιή και χωρίς σοβαρές παθολογένειες.

Σφάλμα! Χρησιμοποιήστε την καρτέλα "Κεντρική σελίδα", για να εφαρμόσετε το Heading 1 στο κείμενο που θέλετε να εμφανίζεται εδώ.

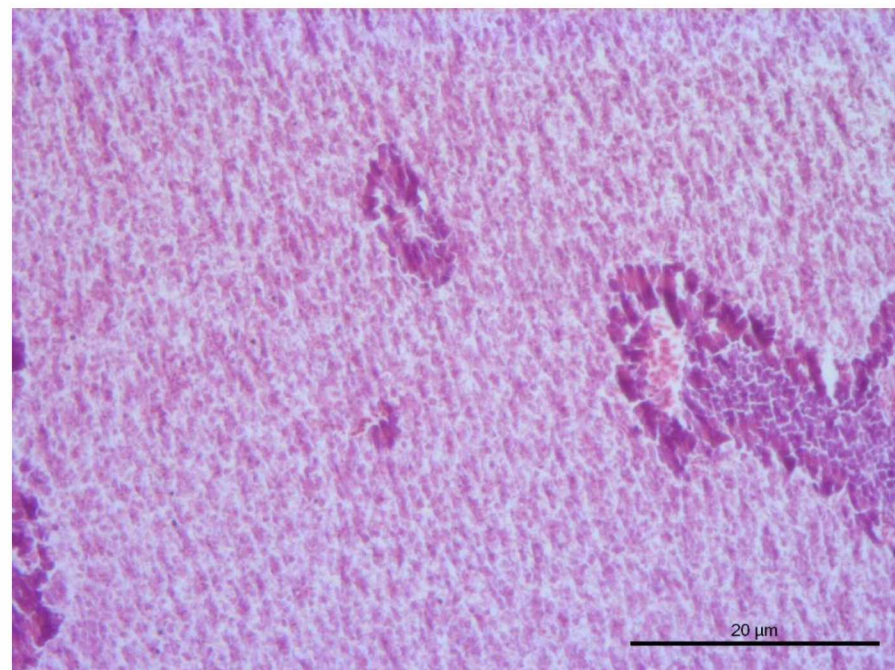
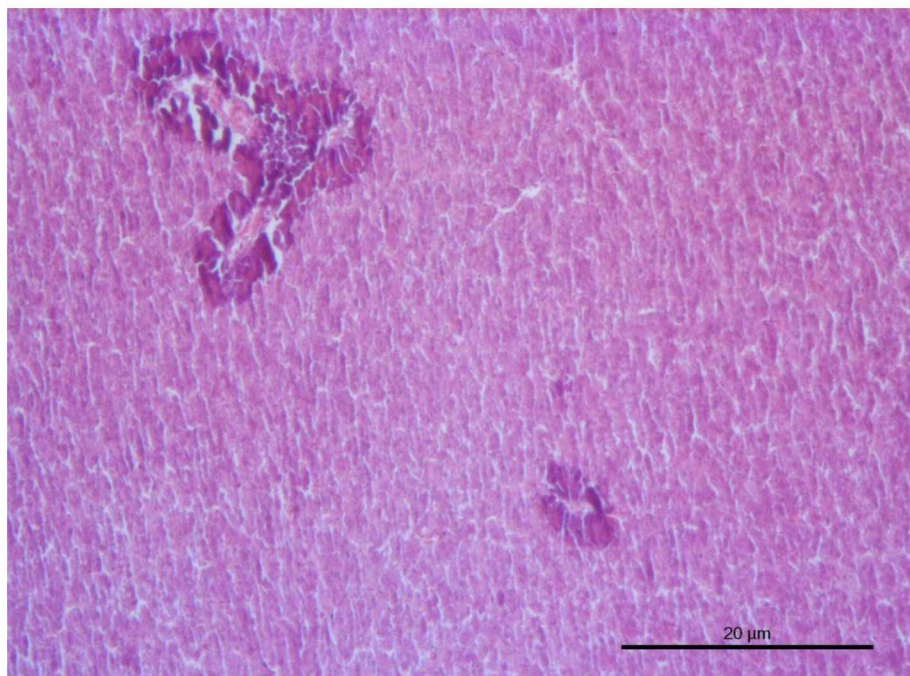


Εικόνα 4. Τυπική εικόνα ομάδας ελέγχου

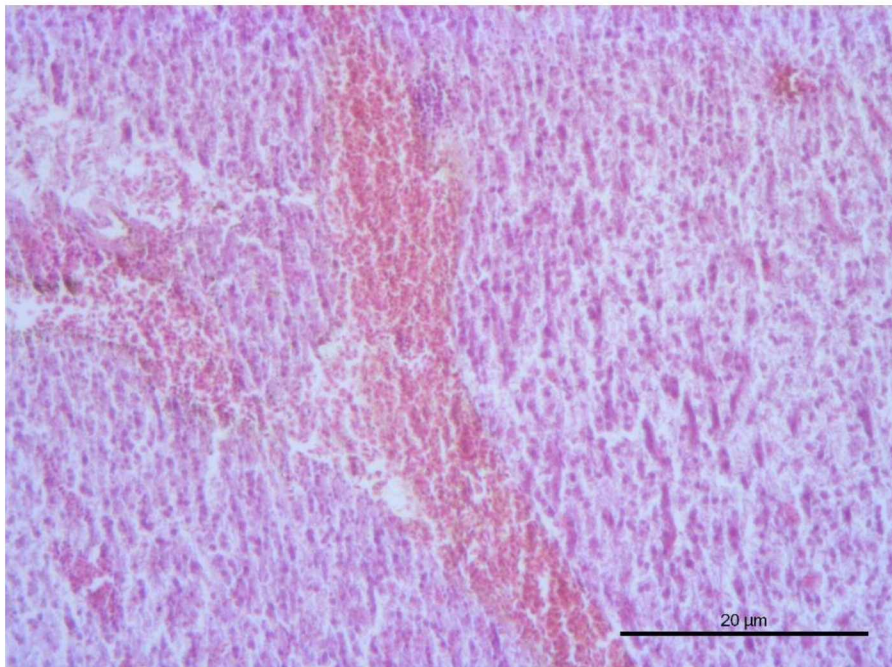


Εικόνα 5. Εικόνα ομάδας ελέγχου σε μεγέθυνση

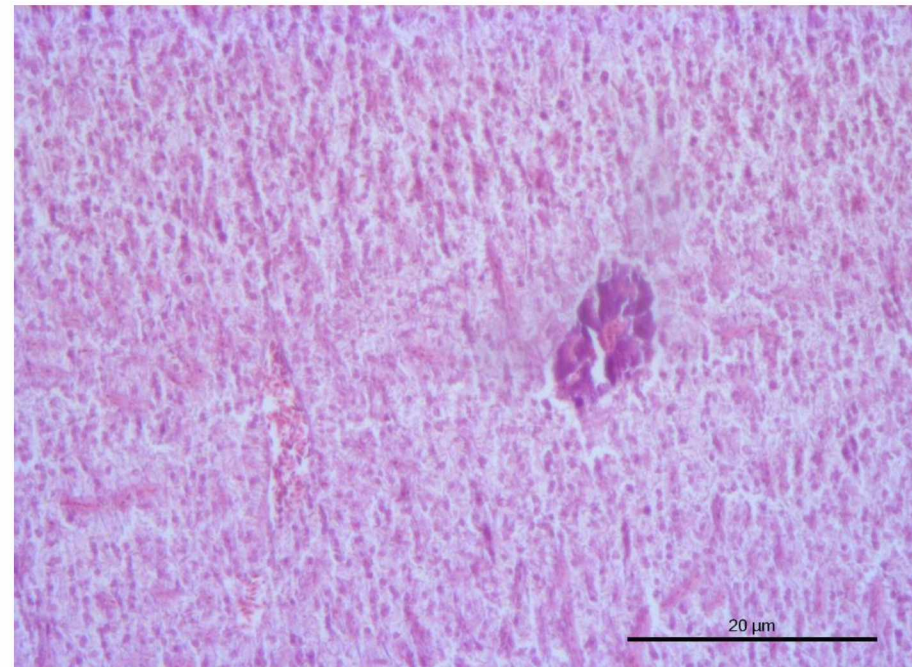
Σφάλμα! Χρησιμοποιήστε την καρτέλα "Κεντρική σελίδα", για να εφαρμόσετε το Heading 1 στο κείμενο που θέλετε να εμφανίζεται εδώ.



Σφάλμα! Χρησιμοποιήστε την καρτέλα "Κεντρική σελίδα", για να εφαρμόσετε το Heading 1 στο κείμενο που θέλετε να εμφανίζεται εδώ.

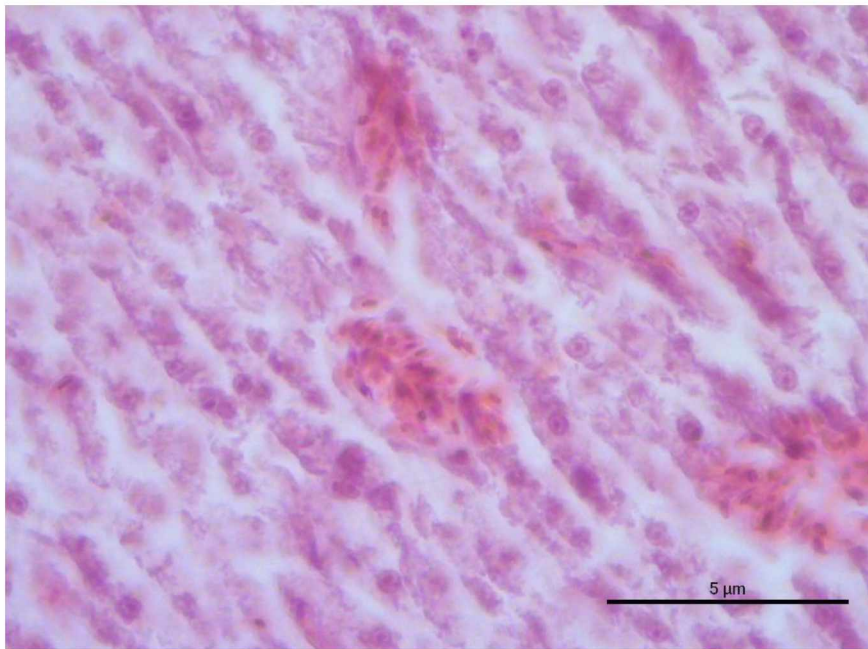


Εικόνα 6. Αιμορραγική εκφύλιση

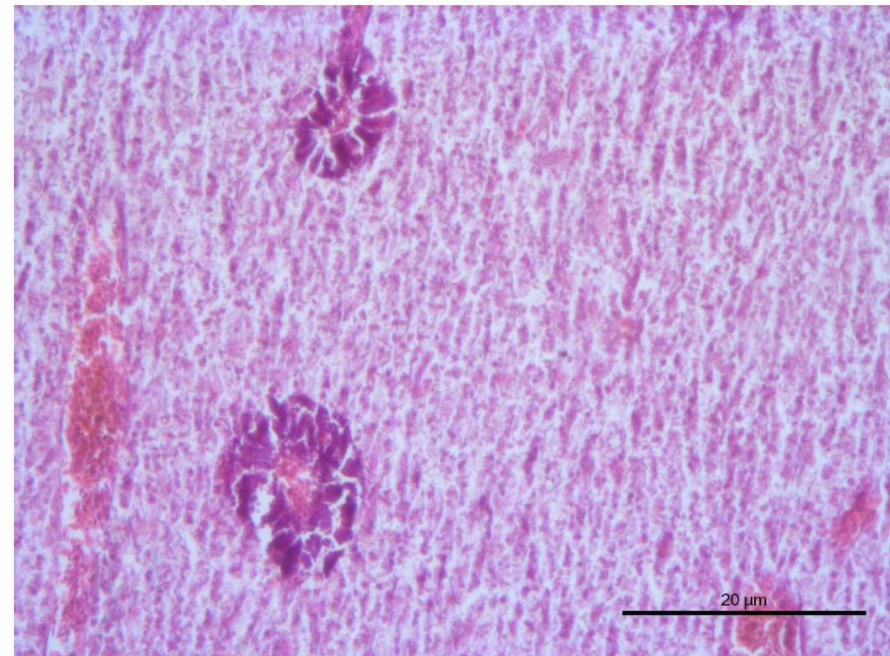


Εικόνα 7. Θολερή εξοίδηση. Χαρακτηρίζει αντιστρεπτές βλάβες στα κύτταρα.

Σφάλμα! Χρησιμοποιήστε την καρτέλα "Κεντρική σελίδα", για να εφαρμόσετε το Heading 1 στο κείμενο που θέλετε να εμφανίζεται εδώ.



Εικόνα 8. Αιμορραγική εκφύλιση σε μεγέθυνση



Εικόνα 9. Τομή στην οποία φαίνεται αιμορραγική εκφύλιση και θολερή εξοίδηση σε ομάδα κυττάρων

4. Συζήτηση- Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδηλώνουν πως η ποσοστιαία αντικατάσταση ιχθυάλευρου, σαν τροφή στην βιομηχανική παραγωγή ιχθύων, με υποκατάστατα μικροφύκη (*Schizochytrium* Sp. και *Nannochloropsis* sp.) δεν φαίνεται να έχει παθολογική επίδραση στην ιστολογία του ήπατος των παραγόμενων υποκειμένων. Ανάλογα συμπεράσματα έχουν ουσιαστικό οικονομικό ρόλο στην διαχείριση της παραγωγής ανάλογων βιομηχανιών αλλά και στην ποιότητα των παραγόμενων αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα προγενέστερων ερευνών όπως των Eryalçin, et al., (2013), που σε ανάλογη πειραματική διαδικασία αντικατάστασης τμήματος του συσσιτίου με μικροφύκη βιομηχανικά εκτρεφόμενης τσιπούρας, συμπέραναν ότι σε όλες τις μεταχειρίσεις τα υποκείμενα παρουσίασαν καλή ανάπτυξη χωρίς ιστολογικού τύπου αλλοιώσεις στο πεπτικό και το ήπαρ, για το σύνολο του πειραματικού κύκλου. Σημειώνουν πάντως την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση για την ποσοτική βελτιστοποίηση των αποδόσεων στις καλλιέργειες.

Σε μετέπειτα από την παρούσα πειραματική διαδικασία, οι Carvalho, et al., (2021), μελέτησαν τις επιπτώσεις αντικατάστασης ιχθυελαίου με μείγμα μικροφυκών και ζωικού λίπους από πουλερικά σε αναλογία. Διαπίστωσαν πως η χρήση του λίπους πουλερικών στην διατροφή της τσιπούρας, σε αναλογία, δεν παρουσίασε συστηματικά αρνητικά αποτελέσματα ηπατοπαθειών στα υποκείμενα. Συστηματικότερες επιδράσεις της αντικατάστασης, με αυξημένες συγκεντρώσεις λιπιδίων και επιπτώσεις στην

ηπατική λειτουργία παρατηρήθηκαν στις ομάδες με πλήρη αντικατάσταση του λίπους στην τροφή από λίπος πουλερικών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

Alexis MN. & Nengas I., 2001. Current state of knowledge concerning the use of soy products in diets for feeding sea bass and sea bream. Needs for future research. Publ. American Soybean Assn., Brussels, Belgium. No. 5, pp 32

Alves, S. P. *et al.* (2018) ‘Nannochloropsis oceanica, a novel natural source of rumen-protected eicosapentaenoic acid (EPA) for ruminants’, *Scientific Reports*, 8(1), pp. 2–11. doi: 10.1038/s41598-018-28576-7.

Aly, S., Sharaf, S. and Griesh, A. (2019) ‘Seasonal Reproductive Biology of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*)’, *Suez Canal Veterinary Medicine Journal. SCVMJ*, 24(1), pp. 67–76. doi: 10.21608/scvmj.2019.59206.

Atalah, E. *et al.* (2007) ‘Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricornutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*)’, *Aquaculture*, 270(1–4), pp. 178–185. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.009.

Blazer V., 1992. Nutrition and disease resistance in fish. Annual rev. of fish diseases. pp 309-323

Bočina, I. *et al.* (2017) ‘Histology of the digestive system of the garfish *Belone belone* (Teleostei: Belonidae)’, *European Zoological Journal*. Taylor & Francis, 84(1), pp. 89–95. doi: 10.1080/11250003.2016.1276977.

Caballero, M. J. *et al.* (2002) ‘Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*’, *Aquaculture*, 214(1–4), pp. 253–271. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00852-3.

Carvalho, M. *et al.* (2020) ‘Effective complete replacement of fish oil by combining poultry and microalgae oils in practical diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fingerlings’, *Aquaculture*. Elsevier, 529(April), p. 735696. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735696.

Carvalho, M. *et al.* (2021) ‘Hepatic biochemical, morphological and molecular effects of feeding microalgae and poultry oils to gilthead sea bream (*Sparus aurata*)’, *Aquaculture*. Elsevier B.V., 532(October 2020), p. 736073. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.736073.

- Chatzifotis S., Panagiotidou M., Divanach P., 2012. Effect of protein and lipid dietary levels on the growth of juvenile meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquacult. Int.* 20: 91-98.
- Chatzifotis S., Panagiotidou M., Papaioannou N., Pavlidis M., Nengas I., Mylonas C., 2010. Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre. *Aquaculture*, 307: 65-70.
- Cristina and Señor, F. J. (2021) 'Biobased Solvents for Pressurized Liquid Extraction of', *Marine Drugs*, 19(107), pp. 2–14.
- Daniel, N. (2018) 'A review on replacing fish meal in aqua feeds using plant protein sources', *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(2), pp. 164–179. Available at: www.fisheriesjournal.com.
- Davidson, J. *et al.* (2016) 'Effects of feeding a fishmeal-free versus a fishmeal-based diet on post-smolt Atlantic salmon *Salmo salar* performance, water quality, and waste production in recirculation aquaculture systems', *Aquacultural Engineering*. Elsevier B.V., 74, pp. 38–51. doi: 10.1016/j.aquaeng.2016.05.004.
- Egerton, S. *et al.* (2020) 'Replacing fishmeal with plant protein in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diets by supplementation with fish protein hydrolysate', *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–16. doi: 10.1038/s41598-020-60325-7.
- Eryalçin, K. M. *et al.* (2013) 'Fish oil replacement by different microalgal products in microdiets for early weaning of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.)', *Aquaculture Research*, 44(5), pp. 819–828. doi: 10.1111/j.1365-2109.2012.03237.x.
- Eryalçin, K. M. *et al.* (2015) 'Nannochloropsis gaditana and *Cryptocodinium cohnii*, two microalgae as alternative sources of essential fatty acids in early weaning for gilthead seabream', *Hidrobiologica*, 25(2), pp. 193–202.
- Estevez A., Treviño L., Kotzamanis Y., Karacostas I. Tort L., Gisbert E., 2011. Effects of different levels of plant proteins on the on-growing of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles at low temperatures. *Aquaculture nutrition*. 17: 572-582
- Estruch, G. *et al.* (2015) 'Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on the gastrointestinal microbiota determined by pyrosequencing the 16S rRNA gene', *PLoS ONE*, 10(8), pp. 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0136389.
- Estruch, G. *et al.* (2018) 'Long-term feeding with high plant protein based diets in gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) leads to changes in the inflammatory and immune related gene expression at intestinal level', *BMC Veterinary Research*. BMC Veterinary Research, 14(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s12917-018-1626-6.

Faccioli, C. K. *et al.* (2014) ‘Morphology and histochemistry of the liver of carnivorous fish hemisorubim platyrhynchos’, *International Journal of Morphology*, 32(2), pp. 715–720. doi: 10.4067/S0717-95022014000200055.

FAO (2006) *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS*. Rome.

FAO (2013). Edible insects: Future prospects for food and feed security. FAO forestry paper 171. FAO (2001). Report of the conference on Aquaculture in the Third Millennium Bangkok. Thailand 20-25 February, 2000. FAO fish Rep., 661, 92

Ferreira, M. *et al.* (2009) ‘Enriching rotifers with “Premium” microalgae. *Nannochloropsis gaditana*’, *Marine Biotechnology*, 11(5), pp. 585–595. doi: 10.1007/s10126-008-9174-x.

Fortin, J. S. *et al.* (2015) ‘Research open access anatomic and molecular characterization of the endocrine pancreas of a teleostean fish: Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*)’, *Zoological Studies*, 54(JAN). doi: 10.1186/s40555-014-0093-4.

Fountoulaki, E. *et al.* (2009) ‘Fish oil substitution by vegetable oils in commercial diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.); effects on growth performance, flesh quality and fillet fatty acid profile. Recovery of fatty acid profiles by a fish oil finishing diet under fluctuati’, *Aquaculture*. Elsevier B.V., 289(3–4), pp. 317–326. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.01.023.

Ganuzza, E. *et al.* (2008) ‘Crypthecodinium cohnii and Schizochytrium sp. as potential substitutes to fisheries-derived oils from seabream (*Sparus aurata*) microdiets’, *Aquaculture*, 277(1–2), pp. 109–116. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.02.005.

García Hernández, M. P. *et al.* (2020) ‘17 α -ethynylestradiol prevents the natural male-to-female sex change in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)’, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 10(1), pp. 1–15. doi: 10.1038/s41598-020-76902-9.

Gupta, S. K. *et al.* (2020) ‘Impact of varied combinatorial mixture of non-fishmeal ingredients on growth, metabolism, immunity and gut microbiota of Lates calcarifer (Bloch, 1790) fry’, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 10(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41598-020-72726-9.

Hadj-Taieb, A. *et al.* (2013) ‘Proporción de sexos, reproducción y crecimiento de la dorada, *sparus aurata* (pisces: Sparidae), en el Golfo de Gabes, Túnez’, *Ciencias Marinas*, 39(1), pp. 101–112. doi: 10.7773/cm.v39i1.2146.

Hansen, A. C. *et al.* (2007) ‘Total replacement of fish meal with plant proteins in diets

- for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) I - Effects on growth and protein retention', *Aquaculture*, 272(1–4), pp. 599–611. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.08.034.
- Henry, M. A., Nikolopoulou, D. and Alexis, M. N. (2012) 'In vitro effect of peas, *Pisum pisum*, and chickpeas, *Cicer arietinum*, on the immune system of gilthead seabream, *Sparus aurata*', *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 48(7), pp. 407–412. doi: 10.1007/s11626-012-9528-6.
- Hoffmann, M. *et al.* (2010) 'TFA and EPA productivities of *Nannochloropsis salina* influenced by temperature and nitrate stimuli in turbidostatic controlled experiments', *Marine Drugs*, 8(9), pp. 2526–2545. doi: 10.3390/md8092526.
- Hua, K. *et al.* (2019) 'The Future of Aquatic Protein: Implications for Protein Sources in Aquaculture Diets', *One Earth*. Elsevier Inc., 1(3), pp. 316–329. doi: 10.1016/j.oneear.2019.10.018.
- Ido, A. and Kaneta, M. (2020) 'Fish oil and fish meal production from urban fisheries biomass in Japan', *Sustainability (Switzerland)*, 12(8), pp. 1–13. doi: 10.3390/SU12083345.
- Iqbal, K. J. *et al.* (2014) 'Effect of plant-fishmeal and plant by-product based feed on growth, body composition and organoleptic flesh qualities of *Labeo rohita*', *Pakistan Journal of Zoology*, 46(1), pp. 253–260.
- Izquierdo, M. S., Fernández-Palacios, H. and Tacon, A. G. J. (2001) 'Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish', *Aquaculture*, 197(1–4), pp. 25–42. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00581-6.
- Jennifer R. Ovenden, John Salini, Sally O'Connor, Raewyn Street 'Pronounced genetic population structure in a potentially vagile fish species (*Pristipomoides multidens*, Teleostei; Perciformes; Lutjanidae) from the East Indies triangle, 26 May 2004
- Kok, B. *et al.* (2020) 'Fish as feed: Using economic allocation to quantify the Fish in - Fish-out ratio of major fed aquaculture species', *Aquaculture*. Elsevier, 528, p. 735474. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735474.
- Le, H. T. M. D. *et al.* (2019) 'Intestinal function of the stomachless fish, ballan wrasse (*Labrus bergylta*)', *Frontiers in Marine Science*, 6(MAR), pp. 1–15. doi: 10.3389/fmars.2019.00140.
- Liu, X. *et al.* (2020) 'Replacement of fishmeal with soybean meal affects the growth performance, digestive enzymes, intestinal microbiota and immunity of *Carassius auratus gibelio*♀ × *Cyprinus carpio*♂', *Aquaculture Reports*. Elsevier B.V., 18, p.

100472. doi: 10.1016/j.aqrep.2020.100472.
- Loukovitis, D. *et al.* (2011) ‘Quantitative Trait Loci involved in sex determination and body growth in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) through targeted genome scan’, *PLoS ONE*, 6(1). doi: 10.1371/journal.pone.0016599.
- Malcorps, W. *et al.* (2019) ‘The sustainability conundrum of fishmeal substitution by plant ingredients in Shrimp Feeds’, *Sustainability (Switzerland)*, 11(4), pp. 1–19. doi: 10.3390/SU11041212.
- Malcorps, W. *et al.* (2021) ‘Nutritional Characterisation of European Aquaculture Processing By-Products to Facilitate Strategic Utilisation’, *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5(October), pp. 1–12. doi: 10.3389/fsufs.2021.720595.
- Marcon, L. *et al.* (2015) ‘Histological and Histometric Evaluation of the Liver in *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae), Exposed to Different Concentrations of an Organochlorine Insecticide’, *Anatomical Record*, 298(10), pp. 1754–1764. doi: 10.1002/ar.23196.
- Markou, G. and Nerantzis, E. (2013) ‘Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions’, *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 31(8), pp. 1532–1542. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.07.011.
- Meiri, I. *et al.* (2002) ‘Physiological changes in the spawning gilthead seabream, *Sparus aurata*, succeeding the removal of males’, *Journal of Experimental Zoology*, 292(6), pp. 555–564. doi: 10.1002/jez.10072.
- Metsoviti, M. N. *et al.* (2018) ‘THE EFFECT OF OF FISHMEAL FISHMEAL AND FISH OIL REPLACEMENT BY DIETARY THE DIETARY MICROALGAE SPECIES SPECIES ON ON LIVER LIVER HISTOLOGY HISTOLOGY IN GILTHEAD SEABREAM MICROALGAE 3rd International’, in *3rd International Congress on Applied Ichthyology*, pp. 148–151.
- Miles, R. D. and Chapman, F. A. (2021) *The Benefits of Fish Meal in Aquaculture Diets I*. Available at: <https://edis.ifas.ufl.edu>.
- Miller, M. R., Nichols, P. D. and Carter, C. G. (2007) ‘Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium* sp. L oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L) diets’, *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 148(2), pp. 382–392. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.05.018.
- Molino, A. *et al.* (2019) ‘Eicosapentaenoic acid extraction from nannochloropsis

- gaditana using carbon dioxide at supercritical conditions’, *Marine Drugs*, 17(2). doi: 10.3390/md17020132.
- Montero, D. *et al.* (2005) ‘Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: A time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet’, *Aquaculture*, 248(1–4), pp. 121–134. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.03.003.
- Mourente, G. and Bell, J. G. (2006) ‘Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over a long term growth study: Effects on muscle and liver fatty acid composition and effectiv’, *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 145(3–4), pp. 389–399. doi: 10.1016/j.cbpb.2006.08.012.
- Muller-Feuga, A. (2000) ‘The role of microalgae in aquaculture: Situation and trends’, *Journal of Applied Phycology*, 12(3–5), pp. 527–534. doi: 10.1023/a:1008106304417.
- Mullon, C. *et al.* (2009) ‘Modeling the global fishmeal and fish oil markets’, *Natural Resource Modeling*, 22(4), pp. 564–609. doi: 10.1111/j.1939-7445.2009.00053.x.
- Naylor, R. L. *et al.* (2021) ‘A 20-year retrospective review of global aquaculture’, *Nature*. Springer US, 591(7851), pp. 551–563. doi: 10.1038/s41586-021-03308-6.
- Nejedli, S. and Tlak Gajger, I. (2013) ‘Hepatopancreas in some sea fish from different species and the structure of the liver in teleost fish, common pandora, *Pagellus erythinus* (Linnaeus, 1758) and whiting, *Merlangius merlangus euxinus* (Nordmann, 1840).’, *Veterinarski arhiv*, 83(4), pp. 441–452.
- Oliveira, M. and Vasconcelos, V. (2020) ‘Occurrence of mycotoxins in fish feed and its effects: A review’, *Toxins*, 12(3), pp. 1–25. doi: 10.3390/toxins12030160.
- Palma, J. *et al.* (1998) ‘Morphometric characters in gilthead sea bream, *Sparus aurata*, red porgy, *Pagrus pagrus* and their hybrids (sparidae)’, *Italian Journal of Zoology*, 65, pp. 435–439. doi: 10.1080/11250009809386861.
- Pauletto, M. *et al.* (2018) ‘Genomic analysis of *Sparus aurata* reveals the evolutionary dynamics of sex-biased genes in a sequential hermaphrodite fish’, *Communications Biology*. Springer US, 1(1). doi: 10.1038/s42003-018-0122-7.
- Pereira, T. S. B. *et al.* (2019) ‘Anatomical characterization of the digestive system of the pufferfish (*Chilomycterus spinosus spinosus*)’, *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 41(1), pp. 1–6. doi: 10.4025/actascibiolsci.v41i1.44645.

- Poli B.M., Parisi G., Zampacavallo G., Iurzan F., Mecatti M., Lupi P., Bonelli A., 2003. Preliminary results on quality and quality changes in reared meagre 128 (*Argyrosomus regius*): body and fillet traits and freshness changes in refrigerated commercial-size fish. *Aquaculture International*. 11: 301–311.
- Ponnusamy, K., Ambasankar, K. and Ponniah, A. G. (2012) ‘Production and marketing of fish meal in India - a study’, *Indian Journal of Fisheries*, 59(1), pp. 147–149.
- Psafakis, P. *et al.* (2021) ‘Effects of dietary fishmeal replacement by poultry by-product meal and hydrolyzed feather meal on liver and intestinal histomorphology and on intestinal microbiota of gilthead seabream (*Sparus aurata*)’, *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(19). doi: 10.3390/app11198806.
- Pulz, O. and Gross, W. (2004) ‘Valuable products from biotechnology of microalgae’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), pp. 635–648. doi: 10.1007/s00253-004-1647-x.
- Robbins, P. (2012) ‘Marine Science’, *Encyclopedia of Environment and Society*, 69, pp. 41–50. doi: 10.4135/9781412953924.n678.
- Robles, R. *et al.* (2012) ‘Practical Feeds Without Fishmeal Suitable For Gilthead Sea Bream’, *Global Aquaculture Advocate*, (September), pp. 46–47. Available at: pdf.gaalliance.org/pdf/GAA-Robles-Sept12.pdf.
- Rocha, J. M. S., Garcia, J. E. C. and Henriques, M. H. F. (2003) ‘Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*’, *Biomolecular Engineering*, 20(4–6), pp. 237–242. doi: 10.1016/S1389-0344(03)00061-3.
- Rodolfi, L. *et al.* (2003) ‘Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation’, *Biomolecular Engineering*, 20(4–6), pp. 243–248. doi: 10.1016/S1389-0344(03)00063-7.
- Rønnestad, I. *et al.* (2013) ‘Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: Current knowledge, and gaps and bottlenecks in research’, *Reviews in Aquaculture*, 5(SUPPL.1). doi: 10.1111/raq.12010.
- Sales, C. F. *et al.* (2017) ‘Nós descrevemos e comparamos a histologia do fígado e do baço de *Geophagus brasiliensis* (Perciformes)’, *Neotropical Ichthyology*, 15(1), pp. 1–12. doi: 10.1590/1982-0224-20160041.
- Sánchez-Lozano, N. B. *et al.* (2009) ‘Effect of high-level fish meal replacement by pea and rice concentrate protein on growth, nutrient utilization and fillet quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.)’, *Aquaculture*, 298(1–2), pp. 83–89. doi:

10.1016/j.aquaculture.2009.09.028.

Santigosa, E., Brambilla, F. and Milanese, L. (2021) 'Microalgae Oil as an Effective Alternative Source of EPA and DHA for Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Aquaculture', *Animals*, 11(971), pp. 1–17. doi: 10.3390/ani11040971.

Savonitto, G. *et al.* (2021) 'Fishmeal replacement by periphyton reduces the fish in fish out ratio and alimentation cost in gilthead sea bream *Sparus aurata*', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 11(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-021-00466-5.

Shannon, L. and Waller, L. (2021) 'A cursory look at the fishmeal/oil industry from an ecosystem perspective', *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9(April), pp. 1–9. doi: 10.3389/fevo.2021.645023.

Sissener, N. H. *et al.* (2011) 'Genetically modified plants as fish feed ingredients', *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 68(3), pp. 563–574. doi: 10.1139/F10-154.

Sitjà-Bobadilla, A. *et al.* (2005) 'Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)', *Aquaculture*, 249(1–4), pp. 387–400. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.03.031.

Spolaore, P. *et al.* (2006) 'Commercial applications of microalgae', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), pp. 87–96. doi: 10.1263/jbb.101.87.

Tacon, A. G. J. and Metian, M. (2008) 'Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects', *Aquaculture*. Elsevier B.V., 285(1–4), pp. 146–158. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.08.015.

Todd, E. V. *et al.* (2016) 'Bending Genders: The Biology of Natural Sex Change in Fish', *Sexual Development*, 10(5–6), pp. 223–241. doi: 10.1159/000449297.

Turchini, G. M., Torstensen, B. E. and Ng, W. K. (2009) 'Fish oil replacement in finfish nutrition', *Reviews in Aquaculture*, 1(1), pp. 10–57. doi: 10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x.

Ucko, M. *et al.* (1997) 'A cryptothecodinium cohnii-like dinoflagellate feeding myzocytotically on the unicellular red alga porphyridium sp.', *European Journal of Phycology*, 32(2), pp. 133–140. doi: 10.1080/09670269710001737059.

Velazco-Vargas J., Mortines-Llorens S., Jovier Erda M., Tomsd-vidal A., 2013. Evaluation of soybean as protein source for *Argyrosomus regius* (Asso, 1801),.

- Scianidae. *International Journal of fisheries and aquaculture*. 5(3): 35-44.
- Vicentini, C. A. *et al.* (2005) ‘Morphological Study of the Liver in the Teleost *Oreochromis niloticus*’, *International Journal of Morphology*, 23(3), pp. 211–216. doi: 10.4067/s0717-95022005000300003.
- Xu, H. *et al.* (2020) ‘Are fish what they eat? A fatty acid’s perspective’, *Progress in Lipid Research*. Elsevier Ltd, 80, p. 101064. doi: 10.1016/j.plipres.2020.101064.
- Yang Y., Yu X. 2003. “Regulation of apoptosis: the ubiquitous way”. *FASEB Journal* 17: 790-799
- Zaragoza, P. *et al.* (2020) ‘Study of fishmeal substitution on growth performance and shelf-life of giltheadsea bream (*Sparusaurata*)’, *Fishes*, 5(2). doi: 10.3390/fishes5020015.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- Βερίλλης, Π. and Μεντέ, Έ. (2017) *Ιστοφυσιολογία ιχθύων και καρκινοειδών*. Edited by Ε. ΕΜΒΡΥΟ.
- Παπούτσογλου, Ε. . (2008) *Διατροφή ιχθύων*. Θεσσαλονίκη: Σταμούλης.
- Ρογδάκης, Γ. and Χώτος, Ι. (1992) *ΥΔΑΤΟΚΑΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΥΡΥΑΛΩΝ ΨΑΡΙΩΝ. Λαβράκι-Τσιπούρα. Τεχνικές της αναπαραγωγής και πάχυνσης*. Αθήνα.
- Φειδάντσης Κ., 2012. «Εποχιακές Βιοχημικές και Φυσιολογικές Αποκρίσεις της Τσιπούρας (*Sparus aurata*). Συσχέτιση με τη θερμοκρασία της θάλασσας και την κλιματική αλλαγή». Διδακτορική Διατριβή Α.Π.Θ.
- Χώτος, Γ. and Ρογδάκης, Ι. (2010) *Λαβράκι και Τσιπούρα. Τεχνικές αναπαραγωγής και πάχυνσης*. Edited by ΙΩΝ. Αθήνα.

ΔΙΑΔΥΚΤΙΟΓΡΑΦΙΑ

- <https://www.fgm.com.gr/>
- https://fishfromgreece.com/wp-content/uploads/2021/11/HAPO_AR21_PRESS.pdf
- <https://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>
- <https://www.globenewswire.com/news-release/2021/01/13/2158043/0/en/Global-Fish-Farming-Market-to-Reach-376-48-billion-by-2025-AMR.html>