

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

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Ιστολογική μελέτη εντέρου ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από παροχή βιολογικής και συμβατικής τροφής»**

Ροδάνθη Χ. Ζινδριλή

ΑΜ: 1475

Βόλος, Ιούλιος 2017

**Ιστολογική μελέτη εντέρου ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) μετά από παροχή βιολογικής και συμβατικής τροφής**

**Διμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**Έλενα Μεντέ**, Καθηγήτρια, Φυσιολογία θρέψης υδρόβιων ζωικών οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα

**Παναγιώτης Βερίλλης**, Επίκουρος καθηγητής, Μικροσκοπία και ανάλυση εικόνας στην ιστολογία και στους υδρόβιους οργανισμούς, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος

*Στους γονείς μου  
Λένα και Χριστόδουλο,  
Στον αγαπημένου μου αδερφό,  
Γιώργο  
Και στους ανθρώπους που με στήριξαν σε αυτό μου το εγχείρημα,  
Δήμητρα, Ναταλία, Αποστόλη, Ραφαήλ και Γιάννη*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου την επιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Έλενα Μεντέ, για την πολύτιμη βοήθεια της στο βιβλιογραφικό κομμάτι της έρευνας, την υποστήριξή της στο 38<sup>ο</sup> Συνέδριο Βιολογικών Ερευνών και την υποστήριξή της όλο το διάστημα που διήρκησε η εκπόνηση αυτής της εργασίας. Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή Παναγιώτη Βερίλλη για την καθοδήγηση στο πειραματικό τμήμα αυτής της διατριβής αλλά και τη γενικότερη συμβολή του στην επεξεργασία εικόνων και τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, την κυρία Χρυσούλα Αποστολογαύρου για την καθοριστική συμβολή της στην πειραματική διαδικασία. Τέλος, ένα ξεχωριστό ευχαριστώ θα ήθελα να πω στους γονείς μου που με στήριξαν οικονομικά και ψυχολογικά κατά τη διάρκεια των σπουδών μου, στον αγαπημένο μου αδερφό που μου έδινε δύναμη, στον καθηγητή Αθανάσιο Ι. Θεοδώρου που αποτελεί μέντορα μου και στους ανθρώπους που με αγαπούν και αυτή τους η αγάπη μου δίνει ώθηση και ψυχική ανάταση προκειμένου να ανταπεξέλθω σε οποιοδήποτε εγχείρημα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της ιστολογίας του εντέρου ιριδιζουσών πεστρόφων που είχαν τραφεί με δυο διαφορετικές τροφές. Οι τροφές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μια βιολογική με υψηλή αναλογία ιχθυάλευρου και ιχθυελαίου και μια συμβατική. 120 άτομα πέστροφας χωρίστηκαν σε δυο ομάδες και τα άτομα της κάθε ομάδας τοποθετήθηκαν σε τρεις δεξαμενές. Στην πρώτη ομάδα χορηγήθηκε η βιολογική τροφή και στην δεύτερη ομάδα η συμβατική τροφή. Η βιολογική τροφή (43% πρωτεΐνη και 23% λίπος) περιείχε μόνο βιολογικά πιστοποιημένα συστατικά (56% ιχθυάλευρο, 12% ιχθυέλαιο, αρακά και σόγια) και δεν είχε συνθετικά αμινοξέα. Η συμβατική τροφή (45% πρωτεΐνη και 21% λίπος) περιείχε 41% ιχθυάλευρο, 10% ιχθυέλαιο, φυτικό έλαιο, σόγια, αρακά, φυτικά άλευρα και άλευρα γλουτένης αραβοσίτου. Οι δυο τροφές χορηγήθηκαν για 5 εβδομάδες. Ο ειδικός ρυθμός αύξησης μεταξύ των δυο ομάδων δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές. 6 τυχαία άτομα (2 από κάθε δεξαμενή) θανατώθηκαν, αφαιρέθηκε το μεσαίο τμήμα του εντέρου, το οποίο και προετοιμάστηκε κατάλληλα για κλασική ιστολογική παρατήρηση (χρώση ηωσίνης-αιματοξυλίνης και μπλε της Αλσατίας). Δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικές αλλοιώσεις. Μετρήθηκε η μέγιστη διάμετρος των βλεννογόνων κυττάρων για τους ιχθύες που τράφηκαν με την βιολογική τροφή ( $18,3 \pm 4,3 \mu\text{m}$ ,  $n=124$ ) και για αυτούς που τράφηκαν με την συμβατική τροφή ( $21,9 \pm 6,7 \mu\text{m}$ ,  $n=112$ ). Η συμβατική τροφή εμφανίζεται να δημιουργεί στατιστικά μεγαλύτερα ( $p=1,19 \times 10^{-6}$ ) βλεννογόνα κύτταρα από ότι η βιολογική τροφή. Η διαφορά αυτή οφείλεται κατά κύριο λόγο στους αντιδιατροφικούς παράγοντες που περιέχουν τα φυτικά συστατικά της συμβατικής τροφής, δημιουργώντας έτσι μεγαλύτερη ποσότητα άπεπτου υλικού που αποβάλλεται μέσω του εντέρου, το οποίο πλέον παράγει περισσότερη βλέννα μέσω των βλεννογόνων κυττάρων.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the effects of different fish diets in the intestinal histology of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Two different diets, an organic one and a conventional one were offered to the fish for 5 weeks. The organic diet was a high marine fishmeal /fish oil diet (56% fishmeal, 12% fish oil). It had organic ingredients, organic trimmings from a sustainable certified Peruvian fishmeal, organic fish oil, organic peas, organic soya cake, no GM ingredients or synthetic amino acids. The crude protein content was 43% and the total lipid 23%. The conventional diet was a low marine fishmeal/fish oil diet (41% fishmeal, 10% fish oil) and also contained vegetable oil, soya cake, peas, wheat and corn gluten. The crude protein content was 45% and the total lipid 21%. 120 juvenile rainbow trout individuals were divided in two groups and each group was stocked in three tanks. The first group was fed the organic diet and the second group the conventional one. At the end of the experiment, fish were fasted for 24h. There were not statistically significant differences in specific growth rates in each group. Six random fish from each group, two fish from each tank, were sacrificed and midgut samples were prepared for histological examination (stained with H&E and Alcian blue). No histological alterations were observed. Digital images of midgut cross sections were selected in order to measure the mean diameter of the intestine's goblet cells. For the organic fed fish the goblet cells ( $18.3 \pm 4.3 \mu\text{m}$ , n=124) were statistically smaller ( $p=1.19 \times 10^{-6}$ ) than the ones from the conventional diet fed fish ( $21.9 \pm 6.7 \mu\text{m}$ , n=112). This can be explained as the conventional diet produced bigger amount of undigested materials because of the higher quantities of the plant ingredients (they are not digestible and contain anti - nutritional factors). Thus, more intestinal lubrication was needed and bigger goblet cells were formed.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
ABSTRACT.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.2 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	9
1.2.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	11
1.2.2 ΕΝΤΕΡΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	13
1.2.3 ΒΛΕΝΝΟΠΑΡΑΓΩΓΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (GOBLET CELLS).....	13
1.3 ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ.....	14
1.4 ΠΕΨΗ ΚΑΙ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ.....	16
1.5 ΧΟΡΗΓΗΘΕΙΣΕΣ ΤΡΟΦΕΣ.....	19
1.6 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ.....	20
1.7 ΣΚΟΠΟΣ.....	21
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΕΝΤΕΡΟ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ).....	21
2.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΙΣΤΟΚΙΝΕΤΑΣ.....	22
2.3 ΤΟΜΗ ΙΣΤΟΥ ΜΕ ΜΙΚΡΟΤΟΜΟ.....	24
2.4 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΧΡΩΣΗΣ.....	28
2.5 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ.....	30
2.6 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	31
2.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
5.1 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
5.2 ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
5.3 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ

Αναφορικά με τη φυλογενετική κατάταξη παρατίθεται ο πίνακας:

Ομοταξία	<i>Osteichthyes</i>
Υφομοταξία	<i>Actinopterygii</i>
Τάξη	<i>Clupeiformes</i>
Υπόταξη	<i>Salmonidae</i>
Οικογένεια	<i>Salmonidae</i>
Γένος	<i>Oncorhynchus</i>
Είδος	<i>Mykiss</i>

Ανήκει στα ψάρια των γλυκών υδάτων και παρουσιάζει ευρύτατη εκτροφή σε κλειστές υδατοσυλλογές. Εισήχθη από τη Β. Αμερική και η εξάπλωση της είναι εντυπωσιακή, μιας και εισήχθη σε όλα τα εσωτερικά νερά των ηπείρων με εξαίρεση την Ανταρκτική. Αξίζει να σημειωθεί πως εμφανίζει μεγάλη προσαρμοστικότητα σε θαλάσσια και υφάλμυρα νερά όταν το σωματικό της βάρος φτάσει τα 100g (Παπουτσόγλου,2008). Το σώμα της καλύπτεται από αρκετή βλέννα (Δόντας, 2010). Το σώμα της είναι επίμηκες και υπάρχει μια αναντιστοιχία με το μέγεθος του κεφαλιού, το οποίο αυξάνεται αναλογικά με την ανάπτυξη του ψαριού. Σημειώνεται πως εφόσον ανήκει στην οικογένεια των σαλμοειδών, σαν μορφολογικό χαρακτηριστικό είναι και το λιπώδες πτερύγιο. Με όρια τη βάση αυτού και την πλευρική γραμμή εκτείνονται 15-16 λέπια. Γενικά τα λέπια που καλύπτουν το σώμα του είναι πολύ μικρά. Αναφορικά με τους βραγχιάκανθες έχουν καταμετρηθεί 16-22 στο πρώτο βραγχιακό τόξο (Νεοφύτου, 2004).

Η ανάπτυξη της καθίσταται ταχεία εφόσον εφαρμόζεται κατάλληλη διατροφή τόσο αναφορικά με το ηλικιακό στάδιο όσο και με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επηρεάζουν την εκτροφή. Κατά τον πρώτο χρόνο το μήκος της ,υπό συνθήκες ευρωπαϊκής εκτροφής, φτάνει τα 10-15 cm (Νεοφύτου, 2004) ενώ στη φύση απαντάται με TL: 25-35 cm και μέγιστο καταγραφέν 70cm.



Η ιριδοειδής πέστροφα χαρακτηρίζεται ως ανάδρομο είδος. Περνά το μεγάλο μέρος της ζωής της στους ωκεανούς και επιστρέφει κατά την αναπαραγωγική περίοδο σε καλά οξυγονωμένα νερά ποταμών για να πραγματοποιήσει την ωαπόθεση-προϋπόθεση αποτελεί η ύπαρξη χαλικώδους πυθμένα-. Η γεννητική ωρίμανσή της πραγματοποιείται στο 3<sup>ο</sup> -4<sup>ο</sup> έτος της ζωής της. Έχει μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος το οποίο κυμαίνεται από 0-27°C ενώ ως βέλτιστες θερμοκρασίες χαρακτηρίζονται αυτές υπό των 21°C. Η φωτοκία πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες από 9-14°C γεγονός που καθιστά το ψάρι ψυχρόφιλο. Η περίοδος αναπαραγωγής εκτείνεται από Ιανουάριο- Μάιο, ενώ σε περιπτώσεις υβριδίων μπορεί να καταγραφεί όλο το χρόνο. Τα θηλυκά άτομα παράγουν 2000 αυγά/kg σωματικού βάρους, η διάμετρος των οποίων είναι 3-7mm (Κλαουδάτος, 2012).

Γενικά οι απαιτήσεις της σχετικά με τις φυσικοχημικές παραμέτρους του νερού εκτροφής, υποδηλώνουν πως έχει μεγάλη ανθεκτικότητα. Η ενεργός οξύτητα (pH) έχει ένα εύρος από 6,4-8,4 (ελαφρώς αλκαλικά νερά) με βέλτιστο το 7-7,5 (ουδέτερα νερά). Οι απαιτήσεις σε διαλυμένο οξυγόνο (D.O) είναι αυξημένες ενώ η μεγάλη της προσαρμοστικότητα σε θερμοκρασιακές διακυμάνσεις ευνοεί την ταχεία ανάπτυξη και επίτευξη εμπορικού μεγέθους. Επιπλέον εμφανίζει μεγάλη ανθεκτικότητα στις διακυμάνσεις της αλατότητας, από τα νερά των γλυκών υδάτων έως τα 35psu του θαλασσινού νερού.

Οι διατροφικές απαιτήσεις της την κατατάσσουν στα σαρκοφάγα ψάρια. Καταναλώνει τροφές με υψηλό ποσοστό πρωτεϊνών (45-50%), υδατάνθρακες (έως 9%), λίπη (5-8%). Βέβαια, τα ποσοστά μπορεί να εμφανίζουν και μικρές διακυμάνσεις, μια και αναφέρεται ότι μπορεί να γίνει πέψη ακόμα και όταν οι υδατάνθρακες αποτελούν το 20-30% της συνολικής τροφής και τα λίπη 12-15%. Οι τιμές που μπορεί να πάρει ο δείκτης μετατρεψιμότητας τροφής (FCR) δεν είναι σταθερές. Σε ιδανικές συνθήκες εκτροφής το FCR= 1,5:1 αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις που το μοντέλο διατροφής είναι φτωχό σε πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να ανέρχεται στο 2:1.

## **1.2 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ**

Το πεπτικό σύστημα των ψαριών διαφέρει από εκείνο των πτηνών και των θηλαστικών. Βέβαια κάποια από τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την πέψη έρχονται σε συμφωνία με αυτά των ανώτερων σπονδυλωτών (Μεντέ και Νέγκας,

2011). Από τη στοματική κοιλότητα, ο πεπτικός σωλήνας εκτείνεται μέσα από το σώμα και αποτελείται από το φάρυγγα, τον οισοφάγο, το στομάχο, τα πλωρικά τυφλά και το έντερο (Βερίλλης και Μεντέ, 2017). Στην εν λόγω έρευνα εστιάζουμε στο έντερο. Σε αντίθεση με τα θηλαστικά δεν υπάρχει αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ του λεπτού και του παχέως εντέρου στους ιχθύες. Το έντερο (ιδιαίτερα αυτό των ιχθύων που δεν έχουν στομάχι) μπορεί να διακριθεί σε τέσσερα τμήματα με βάση τις φυσιολογικές του λειτουργίες:

- 1) Το πρόσθιο τμήμα (διογκωμένο τμήμα του εντέρου μέχρι την είσοδο του αγωγού της χολής).
- 2) Το κεντρικό τμήμα του μεσεντερίου (midgut).
- 3) Το ακραίο τμήμα του μεσεντερίου (midgut).
- 4) Το τελικό τμήμα (οπισθέντερο – hindgut) ή ορθό έντερο (μέχρι την έδρα).

Η εντερική επιφάνεια αυξάνεται μέσω της περιέλιξης. Το μήκος του εντέρου, στην οικολογία θρέψης, χρησιμοποιείται ως δείκτης του τροφικού επιπέδου. Οι παράγοντες που επηρεάζονται από αυτό είναι: το μέγεθος του ψαριού, το σχήμα σώματος, το ιστορικό τροφοληψίας (ασιτία/ παροχή γεύματος), της οντογένεσης και φυλογένεσης. Συγκεκριμένα, στα φυτοφάγα ψάρια το μήκος του εντέρου είναι χαρακτηριστικά αυξημένο λόγω της διεργασίας που απαιτούν για να πεμφθούν οι φυτικές ίνες που εμπεριέχονται στην τροφή τους. Το έντερο αποτελεί όργανο με πολλαπλό ρόλο. Είναι υπεύθυνο για την πέψη, απορρόφηση της τροφής, την ισορροπία στη σύσταση του νερού σε ηλεκτρολύτες, το μεταβολισμό και την ανοσοποίηση του οργανισμού. Το πρόσθιο μέρος του εντέρου επιτελεί ως κύριο ρόλο την απορρόφηση των μακρομορίων στα σαλμοειδή αλλά και σε άλλα είδη. Το μεσεντέριο εκτείνεται μεταξύ πρόσθιου τμήματος και πλωρού έχοντας ξεχωριστό επιθήλιο, απορροφητικά και εκκριτικά κύτταρα. Στο οπισθέντερο (τελικό τμήμα του εντέρου) ελαττώνονται σταδιακά οι λειτουργίες πέψης και απορρόφησης ενώ αυξάνεται η παραγωγή βλέννας (Wilson and Castro, 2011). Το pH του εντέρου κυμαίνεται μεταξύ 7-8 , αν πρόκειται για λεπτό έντερο και 7,5-9 , αν πρόκειται για παχύ. Τόσο το μεσαίο τμήμα όσο και το τελικό, αναφορικά με το επιθήλιο τους, χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη πολλών πτυχώσεων. Τα εντεροκύτταρα του παχέως εντέρου παρουσιάζουν έντονη ενδοκυτταρική δραστηριότητα στις μικρολάχνες.

Ως προς τα μεγέθη εντέρων, υπάρχουν διαφοροποιήσεις σχετικά με τον αριθμό των πτυχώσεων αλλά και με τη συνολική επιφάνεια αυτών. Το συμπέρασμα είναι πως οι διαφοροποιήσεις έγκεινται στους διαφορετικούς διατροφικούς τύπους των ψαριών (Παπουτσόγλου, 2008).

### **1.2.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΝΤΕΡΟΥ**

Τα τμήματα του εντέρου διακρίνονται κατά κύριο λόγο βάσει των λειτουργιών που επιτελούν, μιας και η διάκριση με παρατήρηση ιστολογικών-δομικών χαρακτηριστικών είναι δυσχερέστερη. Το έντερο των ψαριών που διαθέτουν στομάχι διακρίνεται σε εμπρόσθιο, μέσο και οπίσθιο. Το εμπρόσθιο/ πρόσθιο έντερο χαρακτηρίζεται ως λεπτό έντερο, αρχίζει από τον πυλωρό και σε αρκετές περιπτώσεις εκτείνεται ως την έδρα (Παπουτσόγλου, 2008). Η αύξηση του μήκους του είναι ανάλογο με τη σωματική αύξηση. Όπως προαναφέρθηκε η ευπεπτότητα της τροφής (λόγου χάρι η απουσία φυτικών ινών) είναι ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει το μήκος. Οι διακυμάνσεις στο μήκος εντέρου συνδέονται και με το μήκος στομάχου. Τα δύο μήκη είναι αντιστρόφως ανάλογα.

. Το επιθήλιο του εντέρου χαρακτηρίζεται ως κυλινδρικό. Κατά κύριο λόγο στο έντερο συναντώνται δύο τύποι κυττάρων ανάλογα με το ρόλο που επιτελούν, Αυτά είναι τα απορροφητικά -ή εντεροκύτταρα- και τα βλεννοπαραγωγά. Κατά την διενέργεια απορροφητικών διαδικασιών παρατηρείται επικοινωνία των υγρών που υπάρχουν στους ιστούς με τα εντεροκύτταρα μέσω της περιοδικά ημιδιαπερατής κυτταρικής τους μεμβράνης. Τα συστατικά που λαμβάνουν τα κύτταρα αυτά είναι περισσότερα όταν παρατηρείται σμίκρυνση των επιθηλιακών κυττάρων, διότι έτσι αυξάνεται η εκκριτική επιφάνεια από την οποία προέρχονται. Τα βλεννοπαραγωγά ή καλκοειδή κύτταρα (goblet cells) είναι ο δεύτερος τύπος που συναντάται στο εντερικό επιθήλιο και όταν υπάρχουν σε πληθώρα διευκολύνεται η αφοδευση. Τα λεμφοκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα είναι αυτά που παρατηρούνται δευτερογενώς στο έντερο. Τα μεν λεμφοκύτταρα εδράζουν στο εντερικό επιθήλιο ενώ πραγματοποιούν και μεταναστευτικές κινήσεις προς τις ψυκτροειδείς παρυφές. Τα δε κοκκιοκύτταρα βρίσκονται σε μεγαλύτερο αριθμό στον υποβλεννογόνο χιτώνα, δεν μεταναστεύουν σε άλλους ιστούς και ορισμένες φορές εντοπίζονται στο συνδετικό ιστό μεταξύ των μυών και στον ορογόνο χιτώνα. Συμπληρωματικά, υπάρχει και μια τρίτη κατηγορία κυττάρων που εμφανίζονται σπανίως, είναι εύκολα αναγνωρίσιμα λόγω των κυτταροπλασματικών πτυχώσεων και του σφειροειδούς πυρήνα αλλά ο

ρόλος τους δεν έχει προσδιοριστεί (Παπουτσόγλου, 2008). Ο υποεπιθηλιακός χιτώνας, συμπαγές στρώμα (stratum combactum) στην οικογένεια των σαλμοειδών ενέχεται στον υποβλεννογόνο. Ο μυϊκός χιτώνας αποτελείται από ένα εσωτερικό κυκλικό και από ένα εξωτερικό διαμήκες στρώμα. Αναφορικά με την ιστολογία του λεπτού εντέρου, παρατηρούνται τέσσερις χιτώνες. Κινούμενοι από τα έσω προς τα έξω, ο πρώτος είναι ο βλεννογόνος, ακολουθεί ο υποβλεννογόνος, ο μυϊκός και τέλος ο ορογόνος (Wilson and Castro, 2011).

Ο βλεννογόνος χιτώνας αποτελείται από το επιθήλιο, το χόριο του βλεννογόνου (lamina propria) -συγκαταλέγεται στο συνδετικό ιστό- και το μυϊκό βλεννογόνο το οποίο είναι ένα λεπτό διπλό στρώμα αποτελούμενο από λείους μυς εξυπηρετώντας την κίνηση της βλέννας. Το μυϊκό βλεννογόνο δεν υπάρχει πάντα. Ο υποβλεννογόνος συντίθεται από συνδετικό ιστό, αιμοφόρα αγγεία και νεύρα και συμβάλλει στην κινητικότητα της βλέννας. Ο τρίτος τύπος χιτώνα έχει διττό ρόλο, μια και προωθεί την τροφή (περίσταση) και συμβάλλει στην ανάμιξη της με τα πεπτικά ένζυμα. Σχετικά με τον ορογόνο, συχνά συγχέεται ο συνδετικός ιστός που τον αποτελεί με το συνδετικό ιστό γειτονικών δομών και όταν περιβάλλεται από το περιτόναιο καλείται ορός (serosa). Ο ορογόνος περιλαμβάνει αγγεία, νεύρα και λέμφο.

Στο βλεννογόνο χιτώνα παρατηρούνται ιστολογικές διαφοροποιήσεις αλλά και επιθηλιακά κύτταρα. Οι βασικοί κυτταρικοί τύποι που διακρίνονται στον εν λόγω χιτώνα είναι: 1) τα εντεροκύτταρα (ή απορροφητικά) και 2) τα βλενοπαραγωγά κύτταρα (ή καλυκοειδή/ goblet cells). Αναφέρεται πως το εντερικό επιθήλιο αποτελείται από ένα μόνο στρώμα κυλινδρικών απορροφητικών κυττάρων με ξεχωριστές κωνικές ψυκτροειδείς παρυφές και καλυκοειδή κύτταρα. Λεμφοκύτταρα, εντεροενδοκρινή και κυλινδρικά κύτταρα (rodlet cells) παρεμβάλλονται του επιθηλίου. Ο ρόλος των κυλινδρικών κυττάρων είναι τόσο εκκριτικός όσο και ανοσολογικός. Επίσης, στο βλεννογόνο χιτώνα συναντώνται κοκκιοκύτταρα, κύτταρα συνθέσεως ουσιών με ορμονική δράση και αδιαφοροποίητα κύτταρα στη βάση των λαχνών (Wilson and Castro, 2011).

### 1.2.2 ΕΝΤΕΡΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα εντεροκύτταρα είναι γενικά ψηλά και στενά με επιμηκυμένο πυρήνα στο κέντρο του κυττάρου και μιτοχόνδρια διαταγμένα τόσο σε κωνικές όσο και βασικές περιοχές, έχουν καλά αναπτυγμένες ψυκτροειδείς παρυφές και δομές που διατρέχουν την πλασματική μεμβράνη. Η κωνική μεμβράνη των εντεροκυττάρων χαρακτηρίζεται από την παρουσία μικροσκοπικών τριχοειδών πτυχώσεων (microvilli), οι οποίες σχηματίζουν ψυκτροειδείς παρυφές εμφανείς στο μικροσκόπιο. Οι παρυφές αυτές συμβάλλουν στην αύξηση της εντερικής επιφάνειας περισσότερο από 90% και έχουν πολύ σημαντικό πεπτικό και απορροφητικό ρόλο (Wilson and Castro, 2011). Σε αυτό το λειτουργικό «μικροπεριβάλλον» εμπλέκονται ένζυμα στη διάσπαση τροφής, στην απορρόφηση και μεταφορά των θρεπτικών συστατικών. Αυτά είναι τα εξής: η αλκαλική φωσφατάση, οι δισακχαριδάσες, η λευκίνη-αμινοπεπτιδάση, οι τριπεπτιδάσες και οι διπεπτιδάσες που παράγονται στα επιθηλιακά κύτταρα καθώς και η παγκρεατική λιπάση, η εστεράση, η α' αμυλάση και η καρβοξυπεπτιδάση που απορροφώνται από τις μικροσκοπικές ψυκτροειδείς πτυχώσεις. Σε περιόδους ασυμπίεσης οι πτυχώσεις αυτές μικραίνουν ή εξαφανίζονται, ενώ παρατηρείται μικρότερη πυκνότητα αυτών στο οπίσθιο μέρος του εντέρου. Η γενική εικόνα των εντεροκυττάρων υποδηλώνει τον απορροφητικό τους ρόλο.

Ως μεταβολικοί δείκτες για τη δραστηριότητα που παρατηρείται στα ηπατοκύτταρα χρησιμοποιούνται: α) ο αριθμός αυτών, β) η επιφάνεια τους, γ) η περιοχή που καταλαμβάνει ο πυρήνας και δ) η περιεκτικότητα γλυκογόνου και λιπιδίων στο κυτταρόπλασμα αυτών.(Raskovic, 2011).

### 1.2.3 ΒΛΕΝΝΟΠΑΡΑΓΩΓΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (GOBLET CELLS)

Αυτός ο τύπος κυττάρων είναι που υπερτερεί. Ο πυρήνας τους τοποθετείται σε ένα προστατευμένο άκρο το οποίο διευρύνεται και σχηματίζει κωνικό πόρο. Μέσω του κωνικού πόρου απελευθερώνεται η βλέννα. Η πλειονότητα των καλυκοειδών κυττάρων περιέχει όξινο υποβλεννογόνο πολυσακχαρίτη (sialomucin) με σιαλικό οξύ και βλέννα με σουλφιδικούς εστέρες (sulfomucin). Στη βλέννα περιέχονται ένζυμα και πεπτιδία με αντιμικροβιακή και ανοσολογική δράση. Το στρώμα που σχηματίζει η βλέννα ανανεώνεται συνεχώς λόγω της έκκρισης γλυκοπρωτεϊνών ,υψηλού μοριακού βάρους, από τα βλεννοπαραγωγά κύτταρα του επιθηλίου. Τα καλυκοειδή κύτταρα διαφοροποιούνται σε κρύπτες του πρόσθιου και οπίσθιου τμήματος του εντέρου και

σταδιακά μεταναστεύουν στις ψυκτροειδείς παρυφές ή στο βλεννογόνο χιτώνα (Ringo, 2003).

Ο υποβλεννογόνος χιτώνας γενικά αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό που περιέχει αιμοφόρα αγγεία και πορευτικά κύτταρα. Σε πολλούς ιχθύες κάτω από τον υποβλεννογόνο εντοπίζεται ένα μη κυτταρικό στρώμα όπου ινοβλάστες διανθίζονται κάθετα ανάμεσα σε κολλαγόνες ίνες. Το στρώμα αυτό ονομάζεται *stratum compactum* (Βερίλλης και Μεντέ, 2017) Ο μυϊκός χιτώνας αποτελείται από ένα εσωτερικό κυκλοτερές και ένα εξωτερικό επίμηκες στρώμα από λείες μυϊκές ίνες, τα οποία αμφότερα αυξάνουν σε πάχος καθώς προχωρούν προς τα πίσω. Στην πλειονότητα των ιχθύων, η μυϊκή στιβάδα (λεία μυϊκά κύτταρα) του εντέρου έχει αναπτυχθεί καταλλήλως ώστε να διασφαλιστεί η περισταλτική κίνηση. Η εξώτερη στιβάδα του εντέρου αποτελεί τον ορογόνο χιτώνα (Βερίλλης και Μεντέ, 2017).

### **1.3 ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ**

Η ιριδοειδής πέστροφα χαρακτηρίζεται ως σαρκοφάγο ψάρι. Λόγω, αυτής της διατροφικής της προτίμησης η ύπαρξη πρωτεολυτικών ενζύμων καθίσταται σαφώς μεγαλύτερη έναντι της ύπαρξης καρβουϊδρασών που συμβάλλουν στην πέψη των υδατανθράκων. Βέβαια, το συγκεκριμένο είδος ενδέχεται να παρουσιάσει διατροφική προσαρμοστικότητα ως προς την πρόσληψη υδατανθράκων στην περίπτωση που είναι μικρού μοριακού βάρους αλλά και σε ορισμένες συνθήκες εκτροφής (Παπουτσόγλου, 2008).

Μια και τα βέλτιστα ποσοστά πρωτεϊνών, υδατανθράκων και λιπιδίων έχουν προαναφερθεί κρίνεται απαραίτητο να δοθεί περεταίρω σημασία σε ορισμένα λιπαρά οξέα που είναι απαραίτητα για την ευζωϊα του ψαριού. Για τους ιχθύες των γλυκών υδάτων το λινολενικό (18:3 $\omega$ 3) και το λινολεϊκό (18:2 $\omega$ 6) είναι απαραίτητο να λαμβάνονται από την τροφή και να αποτελούν το 20-10% των συνολικών λιπών στη σύσταση αυτής. Από τη στιγμή προσλήψεως αυτών, υπάρχει η δυνατότητα επιμήκυνσης της ανθρακικής τους αλυσίδας και βιοσύνθεσης του εικοσιπεντενοϊκού

(EPA, 20:5 $\omega$ <sub>3</sub>) και του εικοσιδυοεξενικού (DHA, 22:6 $\omega$ <sub>3</sub>). Σημαντικός είναι και ο λόγος  $\omega_3/\omega_6$  και για τα ψάρια γλυκών υδάτων η βέλτιστη τιμή προσεγγίζει το 0,37.

Άλλος σημαντικός παράγοντας στη σύσταση του καταλληλότερου σιτηρεσίου για την ιριδίζουσα πέστροφα αποτελεί η παρουσία απαραίτητων αμινοξέων. Από τα δέκα απαραίτητα αμινοξέα τέσσερα είναι αυτά των οποίων η απουσία συντελεί ανασταλτικό παράγοντα ως προς την ανάπτυξη του ψαριού. Αυτά τα αμινοξέα είναι, η λυσίνη, η τρυπτοφάνη, η αργινίνη και η μεθειονίνη.

	Απαιτήσεις σε απαραίτητα αμινοξέα (% σε ξηρά τροφή)
Arg	1,2-2,5
Meth	1,3 -2,9
Lys	0,5- 2,14
Tryp	0,25

**Πίνακας 1:** Απαιτήσεις ιριδίζουσας πέστροφας σε απαραίτητα αμινοξέα (Πηγή: Μεντε Ε., Νέγκας Ι., (2011) Στοιχεία φυσιολογίας θρέψεως και εφαρμοσμένη διατροφή ιχθύων και καρκινοειδών).

Όσον αφορά στις βιταμίνες, παρέχονται στην πέστροφα μέσω της τροφής. Οι βιταμίνες διαχωρίζονται σε υδατοδιαλυτές (11 στον αριθμό, λ.χ. βιταμίνες συμπλέγματος Β κ.α) και λιποδιαλυτές (3 στον αριθμό, βιταμίνες Α, Ε, Κ). Η αναλογία τους εξαρτάται από το περιβάλλον αλλά και την ηλικία του ψαριού ( Φώτης και Αγγελίδης, 2003).

Επειδή ένα σιτηρέσιο δεν είναι ολοκληρωμένο αν δεν περιέχονται ανόργανα στοιχεία κρίνεται απαραίτητη η αναφορά των απαιτήσεων της πέστροφας σε αυτά. Ειδικότερα, κύρια στοιχεία που θα πρέπει να περιέχονται στις ιχθυοτροφές είναι το ασβέστιο (Ca), το κάλιο (K), το μαγνήσιο (Mg) και ο φώσφορος (P). Σημαντική είναι η αναλογία Ca/ P που για την ιριδοειδή πέστροφα αριθμητικά αποδίδεται 0,8/1 ( Φώτης και Αγγελίδης, 2003). Αναντίρρητη κρίνεται και η παρουσία μικροστοιχείων όπως ο σίδηρος (Fe), το ιώδιο (I) και ο ψευδάργυρος ( Zn), μια και χωρίς αυτά εμφανίζονται παθογένειες. Επιπροσθέτως, στην τροφή πρέπει να περιέχονται ιχνοστοιχεία όπως το σελήνιο (Se), μαγγάνιο (Mn), κοβάλτιο (Co) και ο χαλκός (Cu). Το κοβάλτιο έχει βέλτιστη περιεκτικότητα 0,05mg/kg , μια και είναι απαραίτητο για τη σύνθεση της B<sub>12</sub> (κυανοκοβαλαμίνης), ενώ ο χαλκός 4mg/kg μια και είναι απαραίτητος στη

σύσταση της αιμοσφαιρίνης. Αν ο χαλκός υπερβεί το προαναφερθέν όριο, η δράση του είναι τοξική.

#### **1.4 ΠΕΨΗ ΚΑΙ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ**

Πέψη, ορίζεται ως η διαδικασία τροποποίησης ή και υδρόλυσης των πολυμερών της τροφής σε μόρια και στοιχεία που μπορούν να απορροφηθούν απ' τα εντερικά τοιχώματα (Bakke, 2011).

Οι δίαιτες ποικίλουν ανάλογα με το είδος του ψαριού και το φυσικό περιβάλλον. Ο πεπτικός σωλήνας είναι ο άμεσος αποδέκτης της τροφής και συνδέει το εξωγενές και το ενδογενές περιβάλλον του ψαριού. Ως προς την προτίμηση της τροφής τα λαρβικά στάδια είναι σαρκοφάγα, ενώ η πλειονότητα των ενήλικων ψαριών είναι παμφάγα με προτίμηση στη σαρκοφαγία. Τα περισσότερα βέβαια είναι αριβιστικοί θηρευτές ανάλογα με τον οικοθώκο τους. Η σύλληψη της τροφής εξαρτάται από: τη γεωγραφική περιοχή, την οικολογία, το κλίμα, τον κύκλο ζωής, τις εποχιακές διακυμάνσεις αλλά και τις ημερήσιες διακυμάνσεις. Σε οποιοσδήποτε μεταβολές των άνωθεν παραγόντων τα επιθηλιακά κύτταρα ανταποκρίνονται άμεσα μιας και είναι δυναμικά, γρήγορα ανανεώσιμα και προσαρμοστικά. Έτσι, δεν παρακωλύεται η πέψη (Παπουτσόγλου, 2008).

Μερικές φορές οι διαφορές στο μέγεθος στόματος και στη μορφολογία υποδηλώνουν ανάλογη διατροφή (χωρίς αυτό να επιβεβαιώνεται πάντα). Βέβαια, η επικάλυψη οικοθέσεων μειώνει τον ανταγωνισμό για τροφή ανάμεσα στα είδη. Ανάμεσα στα φυτοφάγα και σαρκοφάγα ψάρια παρατηρείται διαφορά στη συγκέντρωση πρωτεϊνών και λιπιδίων στην τροφή τους αντίστοιχα. Συγκεκριμένα στα σαρκοφάγα ψάρια πηγές πρωτεϊνών και λιπιδίων αποτελούν τα αμινοξέα και τα λιπαρά οξέα. Τα φυτοφάγα μπορεί να καλύψουν το διατροφικό αυτό προφίλ από τα θρεπτικά που τους παρέχονται μέσω της δράσης συμβιωτικής μικροχλωρίδας. Στα φυτοφάγα παρουσιάζεται αυξημένη δραστηριότητα των καρβοϋδρασών αμυλάσης και λαμιναράσης, ενώ στα σαρκοφάγα παρουσιάζεται αυξημένη δραστηριότητα χιτινάσης. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τις στρατηγικές πρόσληψης τροφής είναι: κύκλος ζωής (βιορυθμοί, συχνότητα ταΐσματος), αναπτυξιακοί παράμετροι, περιβαλλοντικοί παράμετροι και αποδοτικότητα τροφής (Παπουτσόγλου, 2008).



Οι εκκρίσεις του πεπτικού σωλήνα είναι ζωτικής σημασίας για τους εξής λόγους: βοηθούν στη μεταφορά και ανάμιξη της τροφής μέσω των ενζύμων και των συστατικών του χυμού, διαλυτοποιούν θρεπτικά για την επίτευξη βέλτιστης πέψης, τη μεταφορά και την απορρόφησή τους στην εντερική βλέννα, προστατεύουν την εντερική βλέννα από την οξύτητα του ίδιου του πεπτικού καναλιού με την έκκριση βασικών ενώσεων και ενζύμων και προστατεύουν ολόκληρο τον οργανισμό από τυχόν μικρόβια και χημικά. Οι βιολογικές εκκρίσεις κατά την πέψη περιλαμβάνουν νερό, ιόντα, πεπτικά ένζυμα, πρωτεΐνες καθώς και βιολογικά ενεργά σύμπλοκα. Τα βλεννογόνα κύτταρα που παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην πέψη, διαφοροποιούνται ανάλογα με το τμήμα του πεπτικού καναλιού που απαρτίζουν. Οι προνύμφες αποκτούν βλεννογόνα κύτταρα απ' τη στιγμή που ξεκινά η εξωγενής διατροφή (Φώτης και Αγγελίδης, 2003). Στη βλέννα περιέχονται ένζυμα και πεπτίδια με αντιμικροβιακή και ανοσολογική δράση!

Τα βλεννογόνα κύτταρα υπάρχουν παρατεταγμένα στο στομάχι, όπως τα οξινοπεπτικά, οι αδένες και το στομάχι στα ψάρια ( όπου υπάρχει ) είναι υπεύθυνο για την αρχή μηχανικής πέψης και ενζυμικής διάσπασης της τροφής. Το pH του στομάχου κυμαίνεται μεταξύ 1 και 4, αλλά σε περιπτώσεις ύπαρξης διττανθρακικών κυμαίνεται μεταξύ 7 και 8 (Bakke, 2011).

Αναφορικά με το πάγκρεας, περιλαμβάνει κωνικά κ/ρα με ζυμογόνα μόρια τα οποία παράγουν και αποθηκεύουν πεπτικά ένζυμα. Μέσα στα ένζυμα συγκαταλέγονται και οι λιπάσες , οι οποίες ενώ βρίσκονται σε αφθονία στους εξελικτικά ανώτερους οργανισμούς, στα ψάρια διατελούν τροποποιημένες και περιορισμένες λειτουργίες. Συγκεκριμένα για την ιριδοειδή πέστροφα είναι γνωστή η δράση της colipase. Η ύπαρξη λιπάσης είναι χαρακτηριστική των τοιχωμάτων του πεπτικού σωλήνα και ο πιο σημαντικός ρόλος τους μετά την έκκρισή τους απ' το εξωκρινές πάγκρεας είναι η μεταφορά θρεπτικών στοιχείων στην εντερική κοιλότητα. Η δράση της, περιορίζεται σημαντικά όταν υπάρχει πάνω από 60% άμυλο στην παρεχόμενη τροφή (Φώτης και Αγγελίδης, 2003). Από το πάγκρεας εκκρίνονται και οι πρωτεάσες που συμβάλλουν στη διάσπαση των πρωτεϊνών στα επιμέρους δομικά τους υλικά. Οι πρωτεΐνες διασπώνται δύσκολα και έχουν μικρή πεπτικότητα. Ένζυμα που εκκρίνονται για διάσπαση υδατανθράκων, όπως η αμυλάση, διακρίνονται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σαρκοφάγα ψάρια , όπως η ιριδοειδής πέστροφα.

Τα χολικά άλατα ,τα οποία είναι όξινα στεροειδή παράγονται από τα ηπατοκύτταρα και εκκρίνονται από τη χοληδόχο κύστη. Συμβάλλουν στην πέψη μιας και διασπών λιπίδια, λιποδιαλυτές βιταμίνες και ενισχύουν τη λιποδιαλυτική δράση της λιπάσης. Τα πρωτογενή χολικά άλατα με τη βοήθεια βακτηριακών ενζύμων μετατρέπονται σε δευτερογενή.

Οι δίαιτες ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του ψαριού και το ενδιαίτημα του. Ο πεπτικός σωλήνας είναι ο άμεσος αποδέκτης της τροφής και συνδέει το εξωγενές και το ενδογενές περιβάλλον του ψαριού (Halver and Hardy, 2002).

Αναφορικά με την προτίμηση ως προς το είδος της καταναλισκόμενης τροφής τα ψάρια κατά το λαρβικό στάδιο είναι σαρκοφάγα και η πλειονότητα αυτών εξακολουθεί και κατά το στάδιο των ενηλίκων. Στις μεταβολές σίτισης τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου αντιδρούν άμεσα, μιας και είναι δυναμικά, γρήγορα ανανεώσιμα και προσαρμοστικά. Έτσι, δεν παρακωλύεται η πέψη. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό πρόσληψης τροφής είναι : ο κύκλος ζωής του ψαριού (βιορυθμοί, συχνότητα ταΐσματος), αποδοτικότητα τροφής, αναπτυξιακοί και περιβαλλοντικοί παράμετροι (Μεντέ και Νέγκας, 2011).

Οι εκκρίσεις του πεπτικού σωλήνα είναι μείζουσας σημασίας για τους εξής λόγους : α) βοηθούν στη μεταφορά και ανάμιξη της τροφής μέσω των ενζύμων και των συστατικών του χυμού, β) διαλυτοποιούν θρεπτικά για την επίτευξη πέψης. Οι βιολογικές εκκρίσεις περιλαμβάνουν νερό, ιόντα, πεπτικά ένζυμα, πρωτεΐνες καθώς και βιολογικά ενεργά σύμπλοκα. Τονίζεται ότι, ειδικά για την πέστροφα η βιολογική ενεργότητα των ενζύμων είναι αυξημένη στα πυλωρικά τυφλά και μειώνεται προοδευτικά όσο «προχωράει» κανείς στο λεπτό (ή πρόσθιο) έντερο (Mommensen, 2003).

Στην πέψη σημαντικό ρόλο παίζουν τα βλεννογόνα κύτταρα, που διαφοροποιούνται ανάλογα με το τμήμα του πεπτικού καναλιού στο οποία ανήκουν. Αξίζει να σημειωθεί πως οι προνύμφες των ψαριών αποκτούν βλεννογόνα κύτταρα όταν ξεκινά η εξωγενής διατροφή.

Στον τομέα της υδατοεκτροφής έχουν οι μέθοδοι αξιολόγησης πεπτικότητας έχουν ιδιαίτερη σημασία. Ο ρόλος τους είναι διττός. Πρώτον, συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση της χρησιμοποίησης των θρεπτικών συστατικών από τα ψάρια ,συνεπώς στη διασφάλιση ευζωίας, και δεύτερον στη μείωση της άπεπτης ύλης που καταλήγει στο περιβάλλον προκαλώντας υποβάθμιση (Guillame, 2001).

## 1.5 ΧΟΡΗΓΗΘΕΙΣΕΣ ΤΡΟΦΕΣ

Οι τροφές που χορηγήθηκαν στις δύο ομάδες παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές ως προς τη σύσταση ενώ είχαν όμοιο ποσοστό περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και λίπη. Οι βασικές τους διαφορές αφορούν στο ποσοστό ιχθυαλεύρου, ιχθυελαίου και άλλων συμπληρωματικών συστατικών. Οι διαφορές τους, είναι αυτές που διαχωρίζουν τους δύο χειρισμούς σε βιολογικής και συμβατικής προσέγγισης.

Αναφορικά με τη βιολογική τροφή, τα ποσοστά ιχθυαλεύρου κυμαίνονται στο 56% και ιχθυελαίου στο 12%. Ενώ, όσον αφορά στη συμβατική τροφή το ιχθυάλευρο προσεγγίζει το ποσοστό του 41% και το ιχθυέλαιο το 10%. Η διαφορά αυτών έγκειται σε πολύ μικρές ποσοστιαίες μονάδες, οι οποίες είναι αρκετές στο να παρατηρηθεί ιστοφυσιολογική διαφοροποίηση στα έντερα που μελετήθηκαν. Επιπλέον, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη διάκριση μεταξύ των δύο διαφορετικών τύπων κλωβών είναι και η διαφορά βιολογικής- συμβατικής ως προς τα δευτερεύοντα συμπληρωματικά συστατικά που περιέχονται. Συγκεκριμένα, η βιολογική τροφή συντίθεται από αρακά και σόγια ενώ απουσιάζουν συνθετικά αμινοξέα. Από την άλλη πλευρά στη συμβατική τροφή περιέχονται αρακάς, σόγια, φυτικό έλαιο, άλευρα γλουτένης και αραβόσιτος. Η διαφορετική τους σύσταση είχε και διαφορετικό απότοκο ως προς την πέψη και απορρόφηση.

	Τροφές που χορηγήθηκαν	
Συστατικά	Βιολογική	Συμβατική
Πρωτεΐνη (%)	Ισοπρωτεϊνικές	
Λίπος (%)	Ισολιπιδιακές	
Ιχθυάλευρο (%)	56	41
Ιχθυέλαιο (%)	12	10
Άλλα συστατικά	αρακάς, σόγια, απουσία συνθετικών αμινοξέων	αρακάς, σόγια, φυτικό έλαιο, άλευρα γλουτένης και αραβόσιτου

Πίνακας 1: Σύσταση βιολογικής και συμβατικής τροφής.

## 1.6 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Για να γίνονται ορατοί οι ιστοί στο μικροσκόπιο ακολουθείται συγκεκριμένη ιστολογική τεχνική. Το δείγμα μπορεί να ληφθεί από πρόσφατη θανάτωση ή από ιχθύ νεκρό που βρισκόταν σε μονιμοποιητικό μέσο. Οι λάρβες και τα ιχθύδια μπορεί να εισαχθούν ολόκληρα στο μονιμοποιητικό μέσο. Από τα μεγαλύτερα ψάρια χρησιμοποιούνται ιστοτεμαχίδια που δεν πρέπει να ξεπερνούν τα 3mm. Κατά τη μονιμοποίηση το δείγμα του ιστού δεν πρέπει να ξεπερνά το 1/10 του διαλύματος ιστού-μονιμοποιητικού μέσου. Το στάδιο της μονιμοποίησης θεωρείται ως το πιο καθοριστικό για την παραγωγή καλών ιστολογικών τομών (Mumford et al. 2007). Ευρύτατα χρησιμοποιημένο μονιμοποιητικό μέσο είναι η φορμόλη, η οποία χρησιμοποιείται μαζί με ρυθμιστικό διάλυμα. Οι ώρες διείσδυσης ανά ιστό εξαρτώνται από το πάχος της τομής. Συγκεκριμένα αν το πάχος του ιστού είναι ίσο με 2mm τότε οι απαιτούμενες ώρες είναι τέσσερις ενώ αν πρόκειται για ιστό 10mm χρειάζονται 24 ώρες. Στη συνέχεια ακολουθεί αφαίρεση του ιστού ή τμήματος αυτού και η τοποθέτηση αυτού σε κασετίνα ώστε να γίνει αφυδάτωση μέσω των εμβαπτίσεων σε διαλύματα αλκοολών διαφορετικών συγκεντρώσεων. Η αφυδάτωση είναι προαπαιτούμενη ώστε να διεκπεραιωθεί ο εγκλεισμός σε παραφίνη. Αυτό συμβαίνει μιας και η παραφίνη δεν είναι διαλυτή στο νερό που εμπεριέχεται στους ιστούς. Με το πέρας της αφυδάτωσης, που διενεργείται με εμβάπτιση σε υδατικά διαλύματα οινόπνευματος, το δείγμα υφίσταται την επίδραση ξυλόλης (= ισχυρός

οργανικός διαλύτης που μπορεί να αναμιχθεί με τηγμένη παραφίνη). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται διαύγαση, μιας και καθιστά το δείγμα διαφανές (Βερίλλης, 2015). Μετά την παραφίνωση, ακολουθούν οι τομές με μικροτόμο, το άπλωμα σε αντεικιμενοφόρο, η αποπαραφίνωση, η ενυδάτωση και η χρώση. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι τύποι χρώσεων είναι: α) Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (H&E) και β) Giemsa. Η πρώτη είναι ιδανική για την παρατήρηση τμημάτων ιστών αλλά και ενδοκυτταρικών δομών ενώ η δεύτερη για την παρατήρηση βακτηρίων και παρασίτων (Mumford et al. 2007). Τέλος, τοποθετείται καλυπτρίδα προσεκτικά ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα μεταξύ δείγματος και καλυπτρίδας και ξεκινά η μικροσκοπική παρατήρηση.

## **1.7 ΣΚΟΠΟΣ**

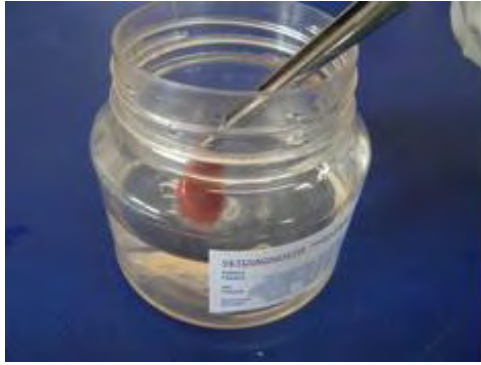
Το εν λόγω πείραμα εκπονήθηκε προκειμένου να υπογραμμιστούν τυχόν διαφοροποιήσεις που προκύπτουν στη φυσιολογία του εντέρου ιριδιζουσας πέστροφας μετά τη χορήγηση τροφών διαφορετικής σύστασης. Συγκεκριμένα, ο σκοπός του πειράματος ήταν η διερεύνηση του τρόπου επίδρασης της βιολογικής ή συμβατικής ιχθυοτροφής στα βλεννοπαραγωγά κύτταρα του εντέρου και στη γενικότερη ιστοφυσιολογία του.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΕΝΤΕΡΟ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ (*Oncorhynchus mykiss*)**

Στο πείραμα τα δείγματα προήλθαν από εκατόν είκοσι (120) άτομα τα οποία στη συνέχεια χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Σε κάθε ομάδα αντιστοιχούσαν τρεις δεξαμενές, επομένως η χορήγηση των διαφορετικών τροφών ελέγχθηκε σε έξι δεξαμενές συνολικά. Στην πρώτη ομάδα χορηγήθηκε βιολογική τροφή ενώ στη δεύτερη συμβατική. Η συνολική διάρκεια παροχής τροφής πριν τη θανάτωση των υποκειμένων ήταν πέντε εβδομάδες.

Επιλέχθηκαν έξι τυχαία άτομα, δύο ανά δεξαμενή, θανατώθηκαν και αποσπάστηκε το μεσαίο τμήμα του εντέρου (midgut). Η επιλογή δειγμάτων καθίσταται τυχαία ώστε να είναι τα αποτελέσματα όσο πιο ακριβή γίνεται.



**Εικόνα 1 :** Μονιμοποίηση ιστού σε διάλυμα φορμαλίνης 10% (Πηγή: Vetdiagnostic post mortem principles for clinical veterinarians)

Μετά την επιλογή ακολουθεί κλασσική ιστολογική τεχνική για την απομόνωση συγκεκριμένου τμήματος του εντέρου, τομή, χρώση και μικροσκοπική παρατήρηση αυτού. Στο πέρας και της παρατήρησης ακολούθησε στατιστική επεξεργασία για την τελική ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

## 2.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΙΣΤΟΚΙΝΕΤΑΣ

Τα συστατικά των κυττάρων και η μεσοκυττάρια ουσία γίνονται δύσκολα διακριτά μια και είναι διαφανή. Εν προκειμένω, κάποια κύτταρα ήταν ευδιάκριτα και με γυμνό οφθαλμό. Μετά τη θανάτωση του οργανισμού από τον οποίο αφαιρούμε τον ιστό, εν προκειμένω ιριδοειδείς πέστροφες, ακολουθείται μια διαδικασία κατά την οποία διατηρείται η στερεοδομή του. Υπό κανονικές συνθήκες θα επέρχονταν σήψη του ιστού και διάλυση των δομών που τον χαρακτηρίζουν. Η διαδικασία συντήρησης του ιστού σε τέτοιο βαθμό ώστε να διατηρούνται σε καλή κατάσταση τα επιμέρους κύτταρα και στοιχεία που τον αποτελούν, ονομάζεται μονιμοποίηση (fixation). Γενικά, ως μονιμοποιητικά μέσα χρησιμοποιούνται ειδικές χημικές ουσίες που συμβάλλουν στην αρχιτεκτονική του ιστού μετά την απόσπαση από τον οργανισμό αλλά και στην αναστολή των διεργασιών σήψης (Βερίλλης, 2015). Οι ειδικές αυτές χημικές ουσίες είναι είτε το υγρό του Bouin, αποτελούμενο από υδατικό διάλυμα φορμόλης, πικρικό και οξικό οξύ, είτε η φορμόλη (ή φορμαλίνη). Για τη μονιμοποίηση στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκε 10% κατ' όγκο διάλυμα φορμαλίνης σε φυσιολογικό ορό ή σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7,5 (Κουσουλάκος, 2007).

Ο βιολογικός ιστός μια και περιέχει νερό δυσχεραίνει την παρατήρηση του σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο γι αυτό και ακολουθείται το πρωτόκολλο αφυδάτωσης, αμέσως μετά τη μονιμοποίηση. Για να πραγματοποιηθεί η αφυδάτωση του ιστού μετά τη μονιμοποίηση, γίνεται εισαγωγή σε πλαστικές κασετίνες. Σε αυτές τις κασετίνες

πρέπει να αναγράφεται ο κωδικός του εκάστοτε δείγματος. Ο κωδικός αυτός υποδηλώνει τον ιστό από τον οποίο αποσπάστηκε το δείγμα και τον χειρισμό που ακολουθήθηκε. Εν προκειμένω, αναγραφόταν το έντερο και το είδος της τροφής, βιολογική ή συμβατική αντίστοιχα. Οι κασετίνες με τον ιστό βυθίζονται διαδοχικά σε διαλύματα αλκοολών με τις ακόλουθες συγκεντρώσεις : 70%, 80%, 95% και 100%. Στη συνέχεια για να διατηρηθεί στην ολότητα του πραγματοποιείται εγκλεισμός σε παραφίνη. Με αυτόν τον τρόπο ο ιστός μπορεί να συντηρηθεί, χωρίς να υπάρχουν μεταβολές μέχρι τη στιγμή που θα γίνουν οι τομές Τελικό βήμα για το στάδιο της αφυδάτωσης, αποτελεί η βύθιση σε ξυλόλη για διάστημα τεσσάρων (4) ωρών. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η παραφίνωση (paraffin embedding) κατά την οποία ο αφυδατωμένος ,πλέον, ιστός παραμένει στην παραφίνη (στερεός κεκορεσμένος υδρογονάνθρακας, αδρανής ένωση που δεν αναμιγνύεται με το νερό και το σημείο τήξης της αυξάνει αναλογικά του μοριακού βάρους). Ο ιστός τοποθετείται σε μίγμα ξυλόλης-παραφίνης αναλογίας 1:1 για δύο (2) ώρες και σε ξυλόλη-παραφίνη 1:2 για ακόμα δύο (2) ώρες. Το πρωτόκολλο της ιστοκινέτας διαρκεί δεκαεννιά (19) ώρες.



**Εικόνα 2:** Μηχάνημα διαδοχικής εμβάπτισης ιστών σε αλκοόλες (Πηγή : PST)

Διαλύματα	Χρόνος (h)
Αιθανόλη 70%	1
Αιθανόλη 80%	1
Αιθανόλη 95%	1
Αιθανόλη 95%	2
Αιθανόλη 100%	1
Αιθανόλη 100%	1
Αιθανόλη 100%	2
Ξυλόλη	2
Ξυλόλη	2
Παραφίνη	2
Παραφίνη	4

**Πίνακας 2:** Πρωτόκολλο ιστοκινέτας.

### 2.3 ΤΟΜΗ ΙΣΤΟΥ ΜΕ ΜΙΚΡΟΤΟΜΟ

Με τη χρήση ειδικού υποδοχέα (ομοιάζοντα με κάνουλα) ρίχνουμε λίγη παραφίνη στο «καλουπάκι» όπου περιέχεται ο ιστός. Με το πέρας αυτού, τοποθετούμε την κανάτα της ιστοκινέτας με την τηγμένη παραφίνη και τα δείγματα στο φούρνο, στους 60°C και κάνουμε σκλήνωση σε καλούπια με βρυσάκι. Μόλις αρχίσει να πήζει η παραφίνη προσανατολίζουμε τον ιστό. Εν προκειμένω κάθετα ώστε να γίνουν οι τομές και να πάρουμε εγκάρσια την ιστολογική εικόνα που επικρατεί στο έντερο. Με τη στερεοποίηση της παραφίνης πρέπει να επέλθει γρήγορη ψύξη. Αυτό συμβάλλει στο σχηματισμό μικρών και πολλών παγοκρυστάλλων που διευκολύνουν την τομή. Με τη χρήση ζεστού ξυραφιού περιποιούμαστε τον κύβο της παραφίνης ώστε να σχηματιστεί κόλουρη πυραμίδα.

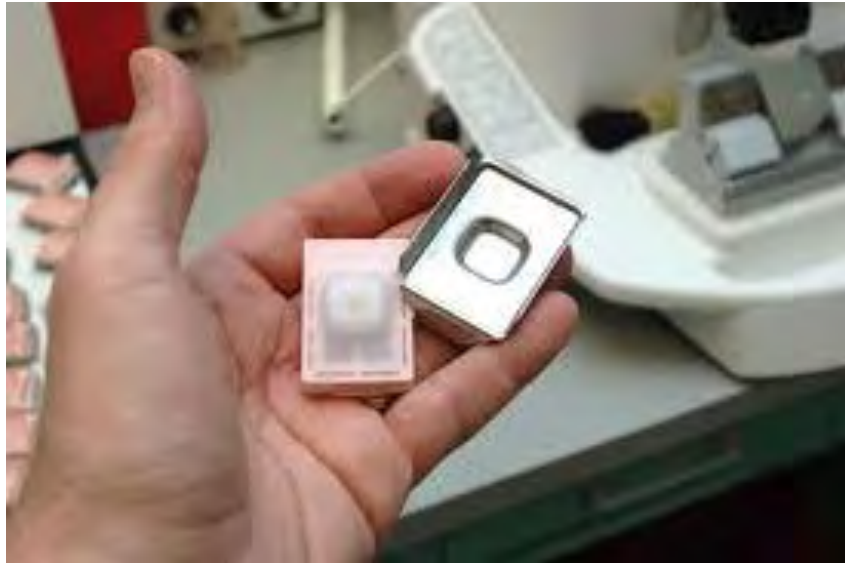




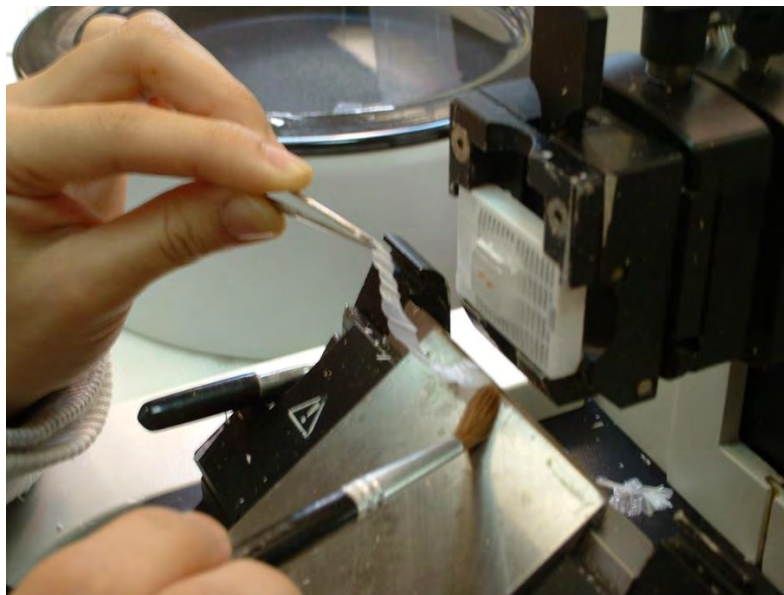
**Εικόνα 3:** Εγκλεισμός ιστού σε παραφίνη (Πηγή : Histology OLM 4.0)

κατά την μικροσκοπική παρατήρηση μια και είναι περισσότερο εστιασμένες στην προς μελέτη περιοχή. Οι τομές βγαίνουν από τη μικροτόμο σαν διαφανές λεπτό τσαλακωμένο φύλλο και για να «ανοίξουν» τοποθετούνται σε νερό, θερμοκρασίας 40° C και αποσπώνται με μια λαβίδα. Σ αυτό το στάδιο απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή προκειμένου να μην «τραυματιστούν» οι τομές. Στη συνέχεια απλώνονται σε γυάλινα πλακίδια. Τα πλακίδια με τις τομές αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμαινόμενη πλάκα (40° C) για 12-15 ώρες. Τέλος, η θερμοκρασία ανέρχεται στους 60° C για να «κολλήσουν» στην πλάκα όσο το δυνατόν καλύτερα οι τομές.

Μονιμοποιημένος ιστός τοποθετείται κάθετα στη μικροτόμο και τέμνεται σε διαδοχικά τμήματα έως ότου σχηματίσει τομές με τη μορφή λεπτής ταινίας. Το μέγεθος των τομών κυμάνθηκε μεταξύ 2 έως 5μm, με τις λεπτότερες τομές να εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία και περισσότερες λεπτομέρειες



**Εικόνα 4:** Ιστός εγκλεισμένος σε παραφίνη (Πηγή: Protocols online)



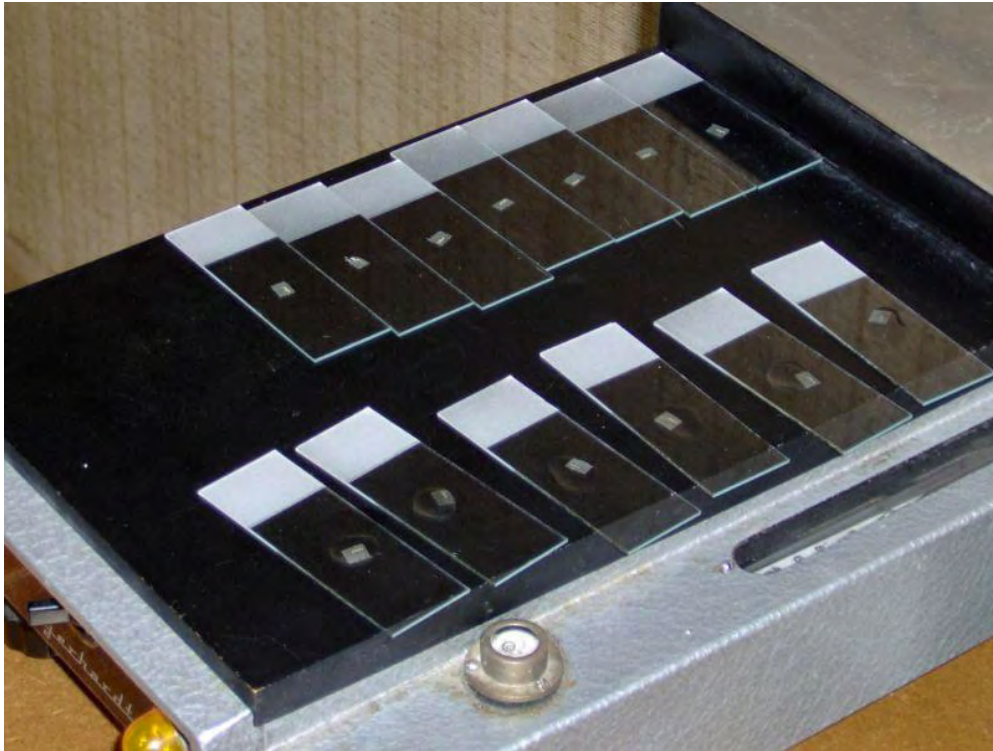
**Εικόνα 5:** Τομή με μικροτόμο (Πηγή: Pinterest)



**Εικόνα 6:** Άπλωμα τομών και διαχωρισμός τους (Πηγή: Brunel Microscopes)



**Εικόνα 7:** Προσκόλληση τομής με πλακίδιο (Πηγή: suggest-keywords/paraffin sectioning)



**Εικόνα 8:** Τομές σε πλακίδια στεγνώνουν σε θερμαινόμενη επιφάνεια (Πηγή: photomacrography.net)

## 2.4 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΧΡΩΣΗΣ

Η χρώση στις τομές πραγματοποιείται εφόσον απομακρυνθεί η ρητίνη και ενυδατωθεί ο ιστός. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται χαρακτηρίζονται ως υδατοδιαλυτές. Με το πέρας του πρωτοκόλλου χρώσης η τομή αφυδατώνεται εκ νέου ώστε να επανέλθει ως προς τη διαύγεια (Βερίλλης, 2015). Στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιείται η χρωστική αιματοξυλίνη- ηωσίνη με διαδικασία που αναφέρεται αναλυτικά ως προς τη χρήση των αντιδραστηρίων αλλά και το χρόνο έκθεσης στο καθένα από αυτά.

Αναφορικά με την αιματοξυλίνη, αποτελεί φυσική χρωστική που περιέχεται από το ξύλο του φυτού *Haematoxylon campechianum*. Το χρωματικό αποτέλεσμα εξαρτάται από το υλικό και το pH του εκάστοτε διαλυτικού μέσου. Το οπτικό αποτέλεσμα που παίρνει κανείς μετά τη χρώση με αιματοξυλίνη είναι ιώδες. Ειδικότερα, αν πρόκειται για ένα διαλυτικό μέσο με χαμηλό pH (λόγω της αυξημένης περιεκτικότητας σε

οξέα), όπως είναι τα δεοξυριβονουκλεοτίδια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και ο πυρήνας τότε το χρωματικό αποτέλεσμα είναι μπλε.

Ετυμολογικά, η ηωσίνη πήρε το όνομά της από το χρώμα της ηούς , δηλαδή το χρώμα που αποκτά ο ουρανός με την ανατολή του ηλίου (Βερίλλης, 2015). Η ηωσίνη, συμπληρωματικά, δίνει ένα χρωματικό αποτέλεσμα σε αποχρώσεις του πορφυρού ή ροζ. Οι περισσότερες πρωτεΐνες που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα χαρακτηρίζονται ως βασικές και παίρνουν κόκκινο ή ροζ χρώμα. Οι μόνες δομές που δεν χρωματίζονται είναι τα λιπίδια γι' αυτό και κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση εμφανίζονται λευκά ή διαυγή (Halver and Hardy, 2002). Τα κυτταρικά στοιχεία που χρωματίζονται με αιματοξυλίνη ονομάζονται βασεόφιλα ενώ αυτά που χρωματίζονται με ιωσίνη, οξεόφιλα. Τέλος, επάνω στην χρωματισμένη πλέον τομή εγχέεται ρητινώδες επικαλυπτικό υλικό και τοποθετείται η καλυπτρίδα ώστε να μην υπάρξει «τραυματισμός» της τομής και να διευκολυνθεί η μικροσκοπική παρατήρηση.

Διαλύματα	Χρόνος
Ξυλόλη	15min
Ξυλόλη	15min
Απόλυτη Αλκοόλη	2min
Απόλυτη Αλκοόλη	2min
Αλκοόλη 96°	2min
Αλκοόλη 96°	1min
Αλκοόλη 70°	1min
Νερό	2min
Αιματοξυλίνη	3min
Νερό	5min
Όξινη αλκοόλη 1%	1-3 εμβαπτίσεις
Νερό	5min
Ηωσίνη	3min
<b>Ξεπλένουμε με νερό</b>	
Αλκοόλη 70°	20 sec
Αλκοόλη 96°	20sec
Αλκοόλη 96°	20sec
Απόλυτη Αλκοόλη	2min
Απόλυτη Αλκοόλη	2min
Ξυλόλη	2min
Ξυλόλη	5min

Ενδεικτικά, κάποια δείγματα χρωματίστηκαν με τη χρώση μπλε της Αλσατίας (Alcian blue). Το δεύτερο αυτό πρωτόκολλο χρώσης εφαρμόστηκε, ώστε να υπάρχει μια πιο σφαιρική εικόνα των βλεννοπαραγωγών κυττάρων και της αρχιτεκτονικής του εντέρου. Με τη χρήση αυτής, χρωματίζονται η βλεννίνη (όξινο πολυσακχαρίτης που παράγεται από τους ινοβλάστες) και το βλεννογόνο. Αποτελεί μια πολυδύναμη βασική χρωστική που είναι διαλυτή στο νερό. Το μπλε της χρώμα οφείλεται στην ύπαρξη χαλκού στο μόριο της. Το όξινο διάλυμα συγκεντρώσεως 3% χρωματίζει τόσο τις γλυκοπρωτεΐνες όσο και τους πολυσακχαρίτες που περιέχονται στη βλέννα. Χρησιμοποιείται σε τομές προερχόμενες από το λεπτό έντερο, τη σκωληκοειδή απόφυση και το απευθυσμένο. Το οπτικό αποτέλεσμα που παίρνει κανείς από τη χρώση είναι ένα μπλε χρώμα για τα συστατικά της βλέννας και ένα ερυθροπόροζ για τους πυρήνες.

## **2.5 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ**

Μετά τη χρώση είναι πλέον ευκρινή στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τα κύτταρα που αποτελούν το έντερο. Ως επί το πλείστον χρησιμοποιούνται αντικειμενικοί φακοί με μεγεθύνσεις x4 και x10. Τονίζεται, πως όλοι οι αντικειμενικοί φακοί στο μικροσκόπιο χαρακτηρίζονται ως ισοεστιακοί (Γκομπόιτσος, 2002). Εν προκειμένω, στο μικροσκόπιο υπήρχε συνδεδεμένη κάμερα και τα προς παρατήρηση πλακίδια εμφανίζονταν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Το γεγονός αυτό κατέστη βέλτιστη την παρατήρηση και καταγραφή των διαμέτρων των βλεννοπαραγωγών κυττάρων. Για να προκύψει η τελική εικόνα και να είναι έτοιμη για επεξεργασία περνάνε κάποια στάδια αλληλεπίδρασης δείγματος και απεικονιστικού συστήματος. Αρχικά, γίνεται ψηφιοποίηση της εικόνας, ακολουθεί η αποθήκευση αυτής στον σκληρό δίσκο και η διαδικασία ολοκληρώνεται με την ψηφιακή επεξεργασία για εξαγωγή αποτελεσμάτων.



## 2.6 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

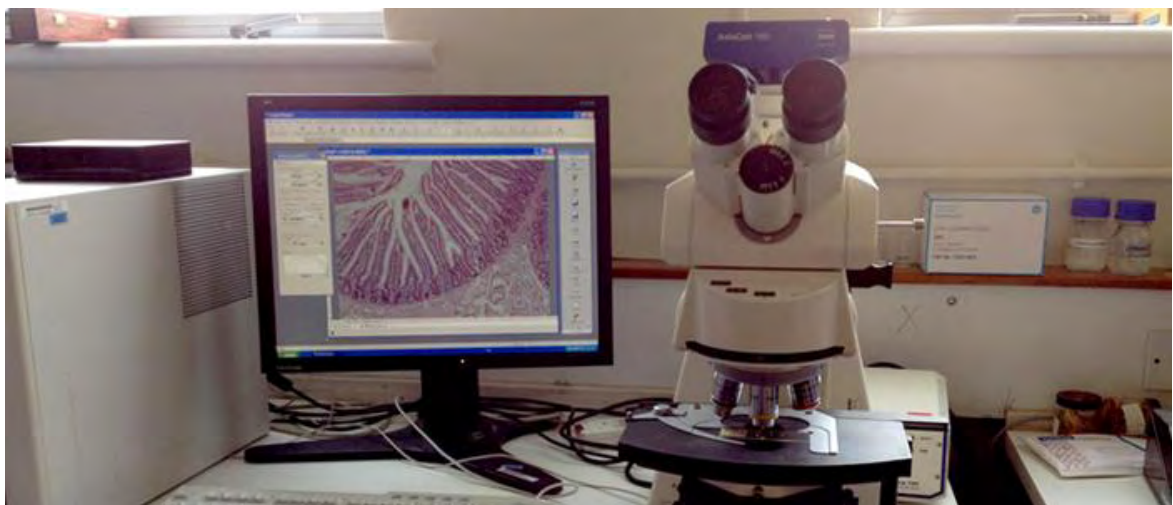
Τα δείγματα από τη στιγμή που αποθηκεύονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη μορφή ψηφιακής εικόνας υπόκεινται σε επεξεργασία για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων. Η επεξεργασία της κάθε εικόνας πραγματοποιείται με το πρόγραμμα Image J (Image Processing and Analysis in Java). Το Image J είναι ένα πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων, του οποίου η λειτουργία βασίζεται στη γλώσσα προγραμματισμού Java. Θεωρείται ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για επεξεργασία εικόνων προερχόμενων από μικροσκοπική παρατήρηση και χρησιμοποιείται ευρέως από Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας. Με τη χρήση αυτού καθίσταται εφικτή η προβολή, επεξεργασία και αποθήκευση εικόνων τύπου 8-bit με χρώμα ή σε σέπια του γκρι (grayscale), 16-bit ακέραιες (16-bit integer) καθώς και 32-bit floating point, που έχουν την υψηλότερη δυνατή ευκρίνεια.

## 2.7 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα δείγματα μετά την μικροσκοπική παρατήρηση και την καταγραφή των διαμέτρων των βλεννοπαραγωγών κυττάρων, υπόκεινται σε έλεγχο με τη χρήση στατιστικών τεστ. Αυτό το βήμα είναι απαραίτητο για να ελεγχθεί η ύπαρξη -ή μη- κανονικής κατανομής σε πρώτη φάση. Στη συνέχεια, υποδεικνύεται η ύπαρξη στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων. Χρησιμοποιούνται μη παραμετρικά τεστ μια και δεν υπήρχε βεβαιότητα εξ' αρχής για τον τύπο κατανομής των δειγμάτων (Χάλκος, 2011). Διαφορετικά αυτού του είδους τα τεστ καλούνται, ελεύθερης κατανομής και συνήθως υστερούν ,σε μικρό βαθμό, σε σχέση με τα παραμετρικά τεστ. Από την άλλη, ως πλεονέκτημα των μη παραμετρικών μεθόδων είναι πως βασίζονται στη διάταξη των δεδομένων που προέκυψαν από μετρήσεις και όχι στις μετρήσεις αυτές καθ' αυτές (Χάλκος, 2011). Κλασικά παραδείγματα μη παραμετρικών τεστ είναι το Shapiro-Wilk, το Kolmogorov – Smirnov, το Kruskal Wallis κ.α. Εν προκειμένω, χρησιμοποιήθηκε μέσω του στατιστικού προγράμματος Origin (λογισμικό της OriginLab) το Shapiro- Wilk και το Kolmogorov- Smirnov για

την ανάδειξη κανονικής κατανομής ανάμεσα στη διάμετρο των βλεννοπαραγωγών κυττάρων που εκτέθηκαν στους δύο διαφορετικούς τύπους δίαιτας.

Για να βγει συμπέρασμα περί στατιστικής σημαντικότητας διενεργήθηκε t-test μεταξύ των δύο χειρισμών. Οι παράμετροι που υπολογίστηκαν ήταν το μέσο, η τυπική απόκλιση και το τυπικό σφάλμα των μέσων (SEM = Standard error of mean). Ουσιαστικά με το t-test γίνεται υπολογισμός των μέσων των δύο ομάδων που διενεργήθηκε η δειγματοληψία. Χρησιμοποιείται για να συγκριθούν συνεχείς μεταβλητές (continuous variables), δηλαδή μεταβλητές οι οποίες θεωρητικά μπορούν να πάρουν άπειρες τιμές.

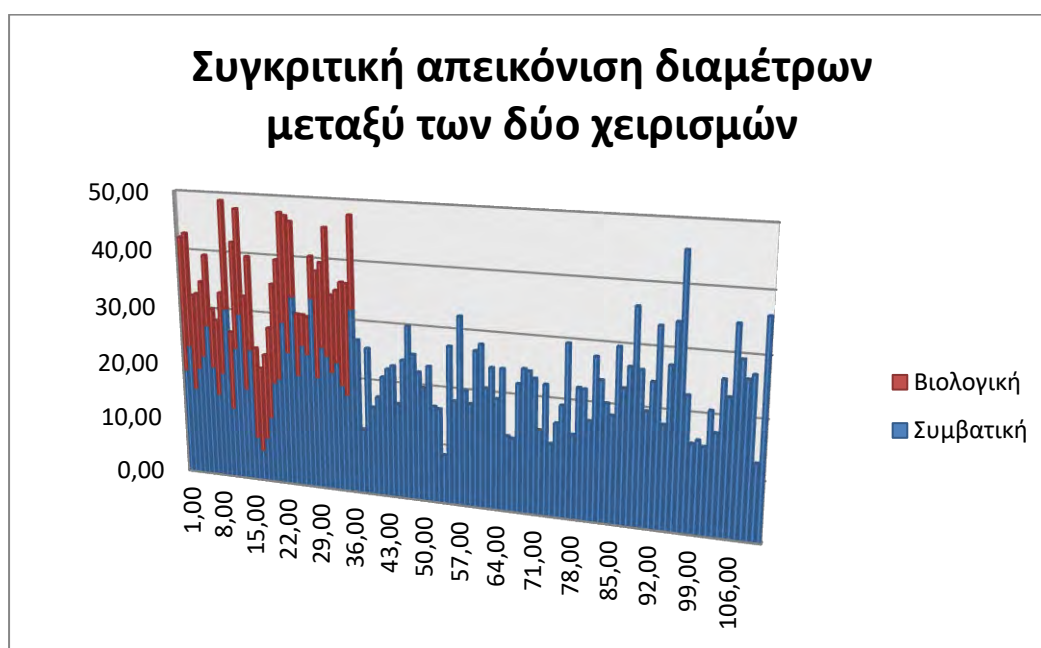


**Εικόνα 9:** Παρατήρηση τομών σε οπτικό μικροσκόπιο (Πηγή: University of Glasgow, Histology Lab)



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

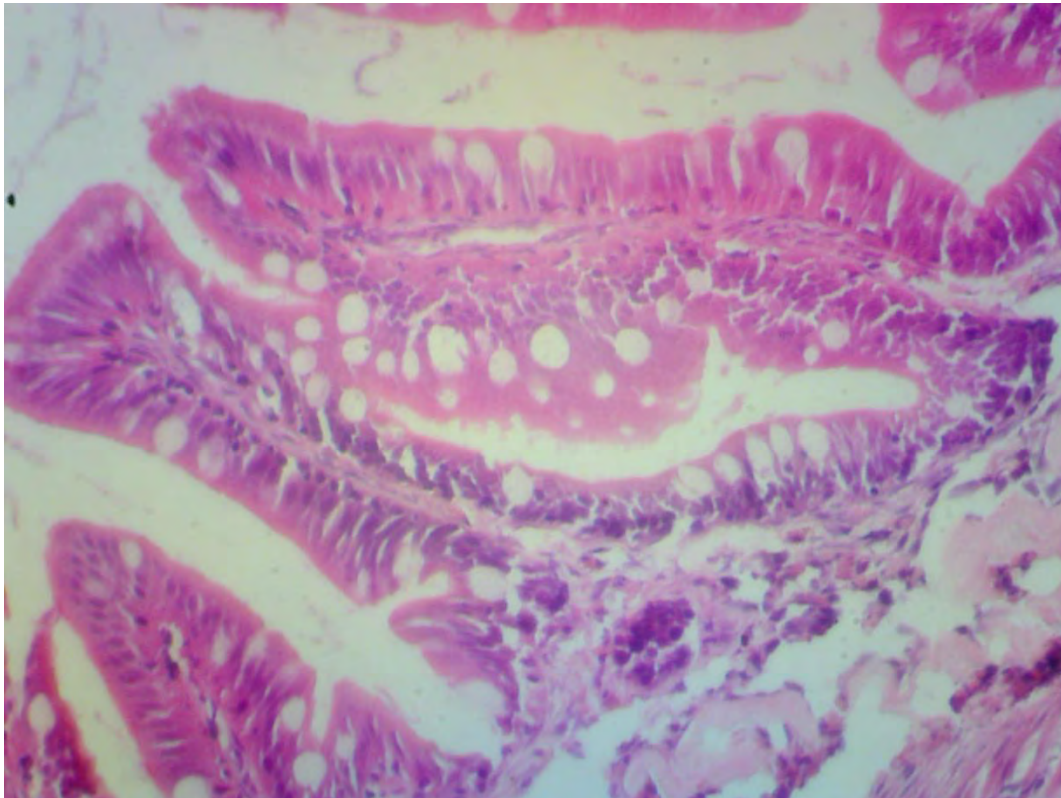
Το πειραματικό μέρος της εργασίας ολοκληρώνεται με τη λήψη και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Τα πλακίδια που έφεραν τομές εντέρων προερχόμενων από δύο διαφορετικούς χειρισμούς παρουσίασαν διαφορές. Αρχικά, οι διαφορές διαφαίνονται ποιοτικά με τη μέτρηση των διαμέτρων των βλεννοπαραγωγών κυττάρων. Εκ πρώτης όψεως παρατηρούνται αυξημένες διαμέτροι σε πέστροφες που διατρέφθηκαν με τη συμβατική διαίτα.



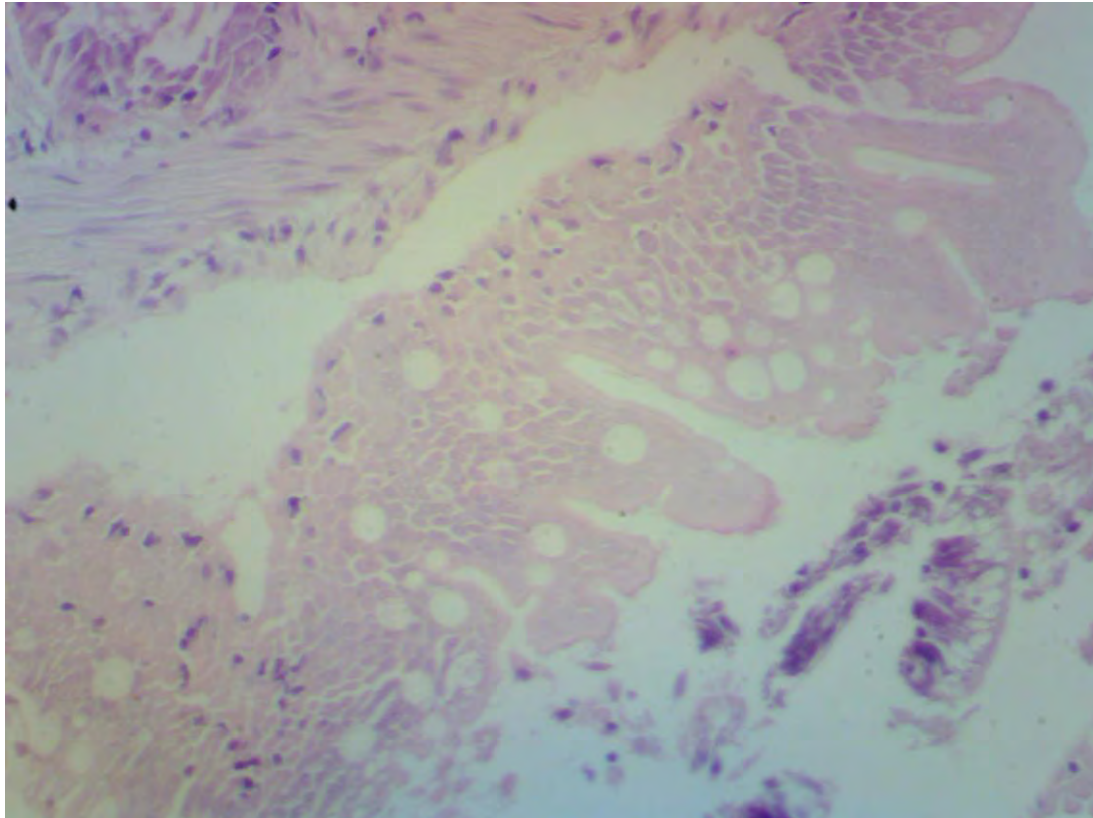
Εικόνα 10: Διαγραμματική συγκριτική απεικόνιση.

Στη συνέχεια παρατίθενται εικόνες που λήφθηκαν από κάμερα συνδεδεμένη στο οπτικό μικροσκόπιο. Οι εικόνες αυτές προέρχονται από πειραματόζωα συμβατικής εκτροφής μια και τα βιολογικής αποτελούν δευτερογενή δεδομένα προηγούμενου

πειράματος. Ο αριθμός δείγματος λ.χ. 1D0H(B) υποδηλώνει την ημέρα λήψης του δείγματος με το χαρακτήρα 1D, τις ώρες που πέρασαν μετά την παροχή τροφής 0H (μηδέν ώρες) και ο χαρακτήρας (B) δείχνει πως είναι η δεύτερη τομή που πήραμε από το ίδιο έντερο. Επομένως είχαμε ουσιαστικά 3 τυχαία δείγματα από τη συμβατική εκτροφή και 3 από την βιολογική, από το σύνολο των 120 πειραματόζωων. Μία εκ των τομών χρωματίστηκε με Alcian blue για να υπάρχει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα ως προς τη χρωματική απόδοση. Η βλέννα παρουσιάζει έντονο μπλε χρώμα ενώ τα βλεννοπαραγωγά κύτταρα έχουν ένα ελαφρύ κυανό.

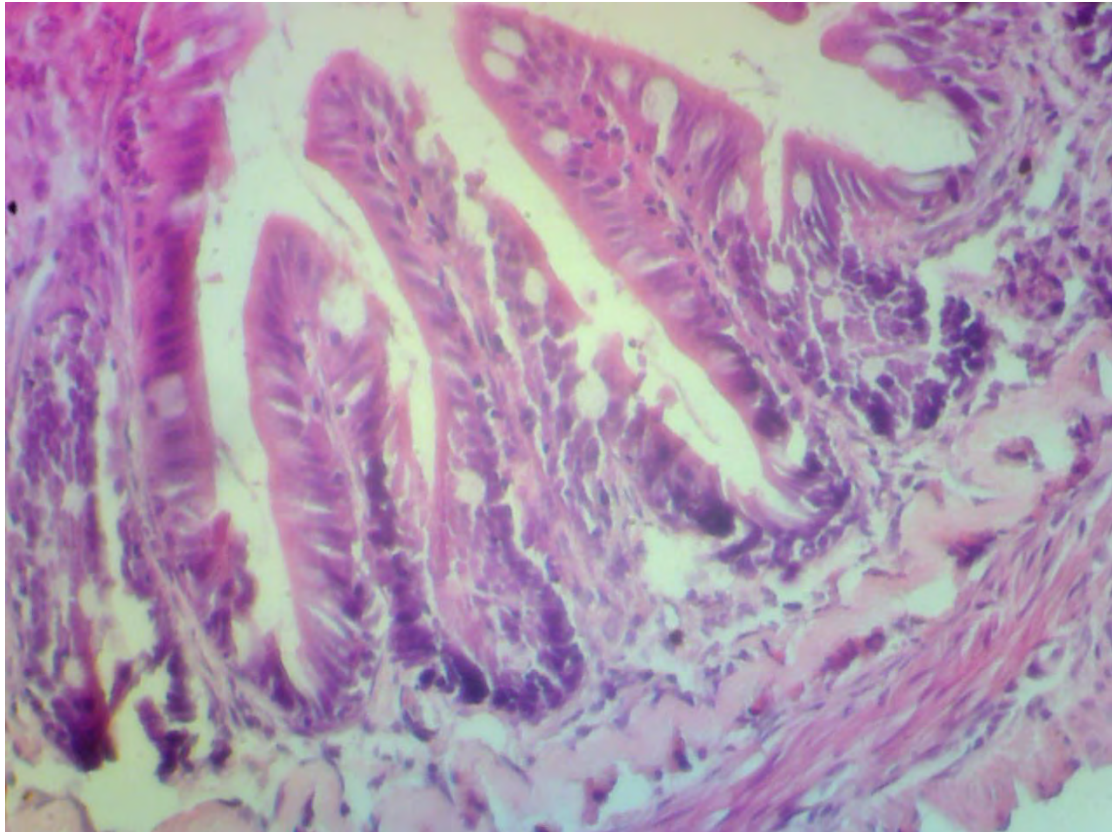


**Εικόνα 11:** Δείγμα 1D10H (B) χρώση αιματοξυλίνη-ηωσίνη ,μεγέθυνση x10,με 4 εντερικές λάχνες.

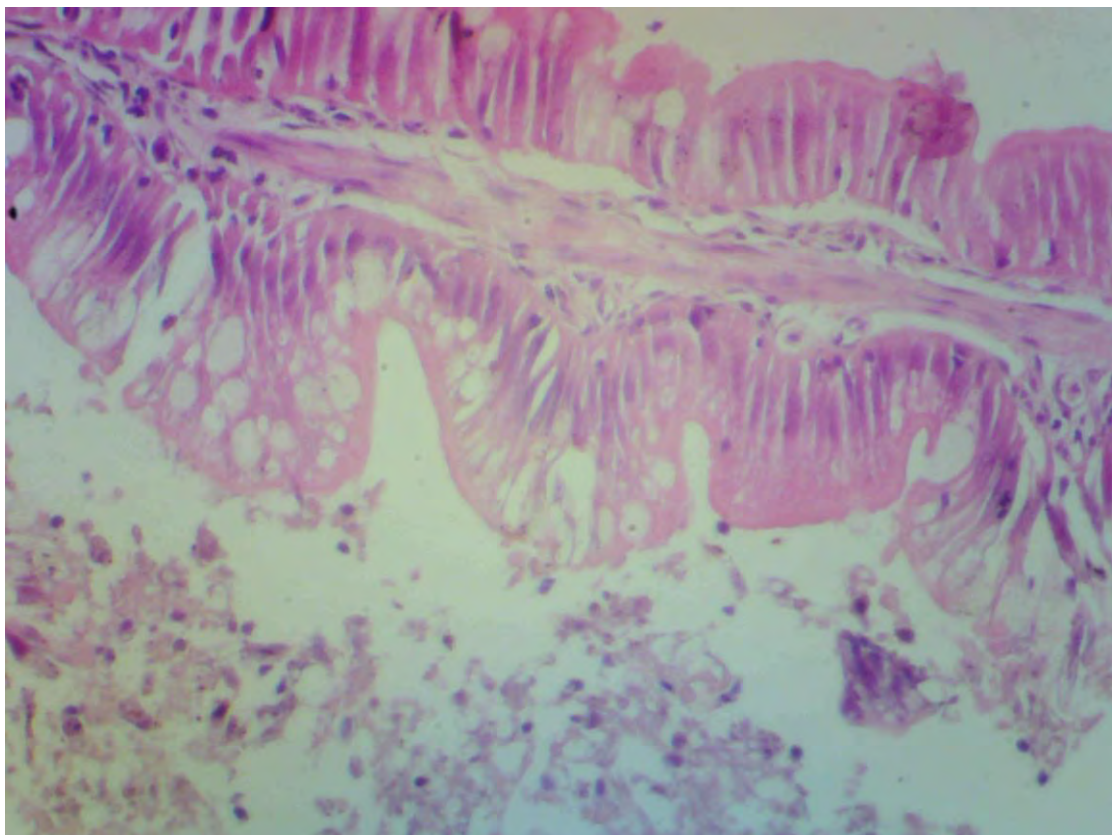


**Εικόνα 12:** Δείγμα 1D20H (A), χρώση αιματοξυλίνη -ηωσίνη, μεγέθυνση x10, με μία εντερική λάχνη.

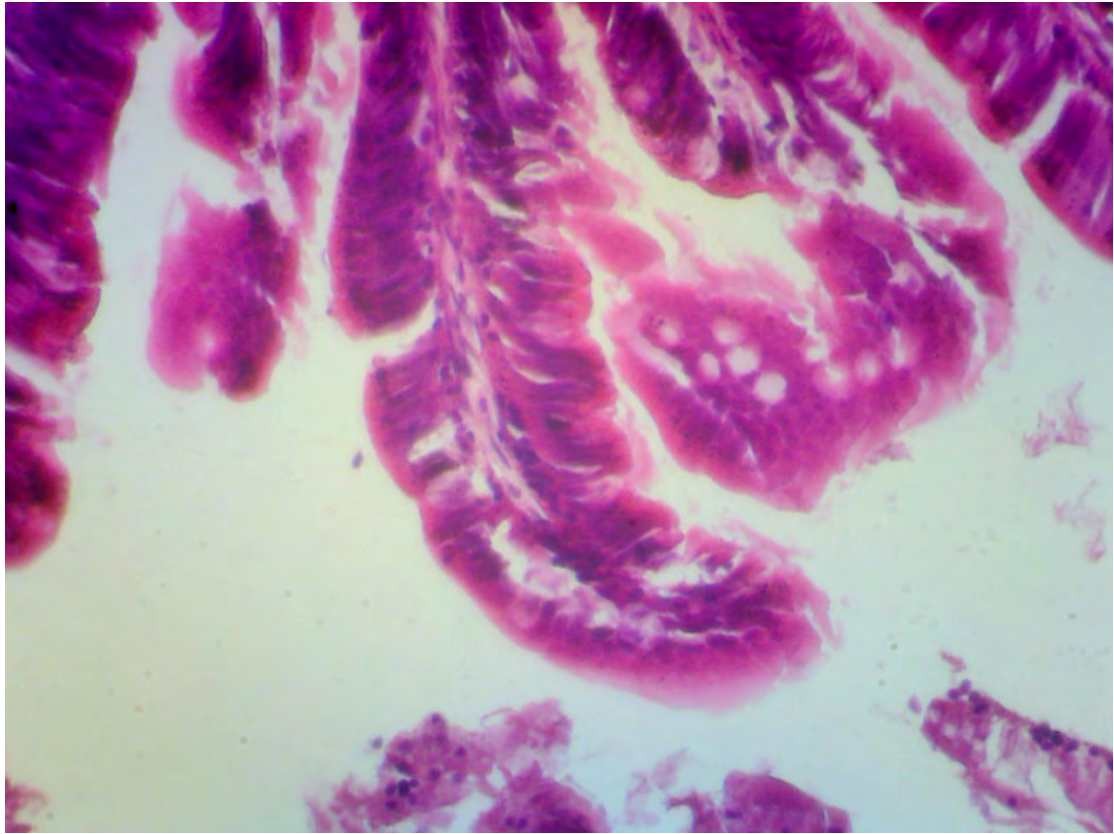




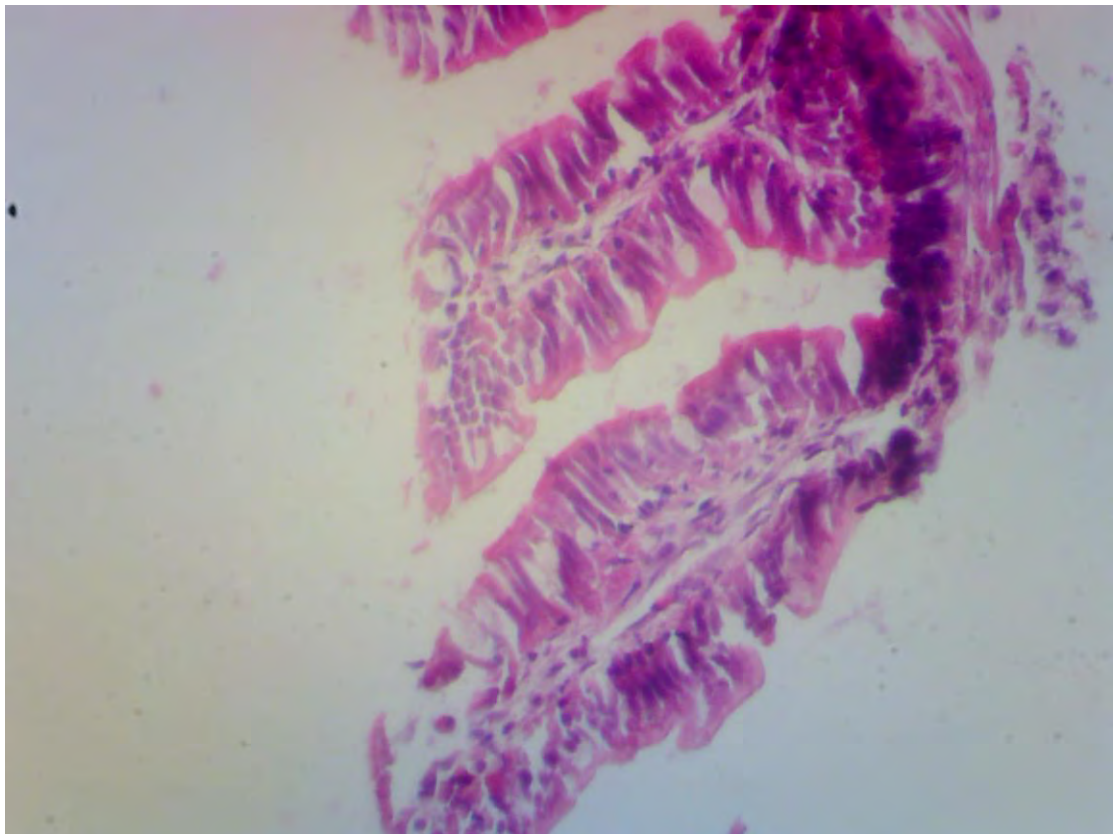
**Εικόνα 13:** Δείγμα 1D2OH(B) 2, χρώση αιματοξυλίνη-ηωσίνη, με 3 εντερικές λάχνες.



**Εικόνα 14:** Δείγμα 1D2OH (B), χρώση αιματοξυλίνη- ηωσίνη, μεγέθυνση x10, μία εντερική λάχνη.

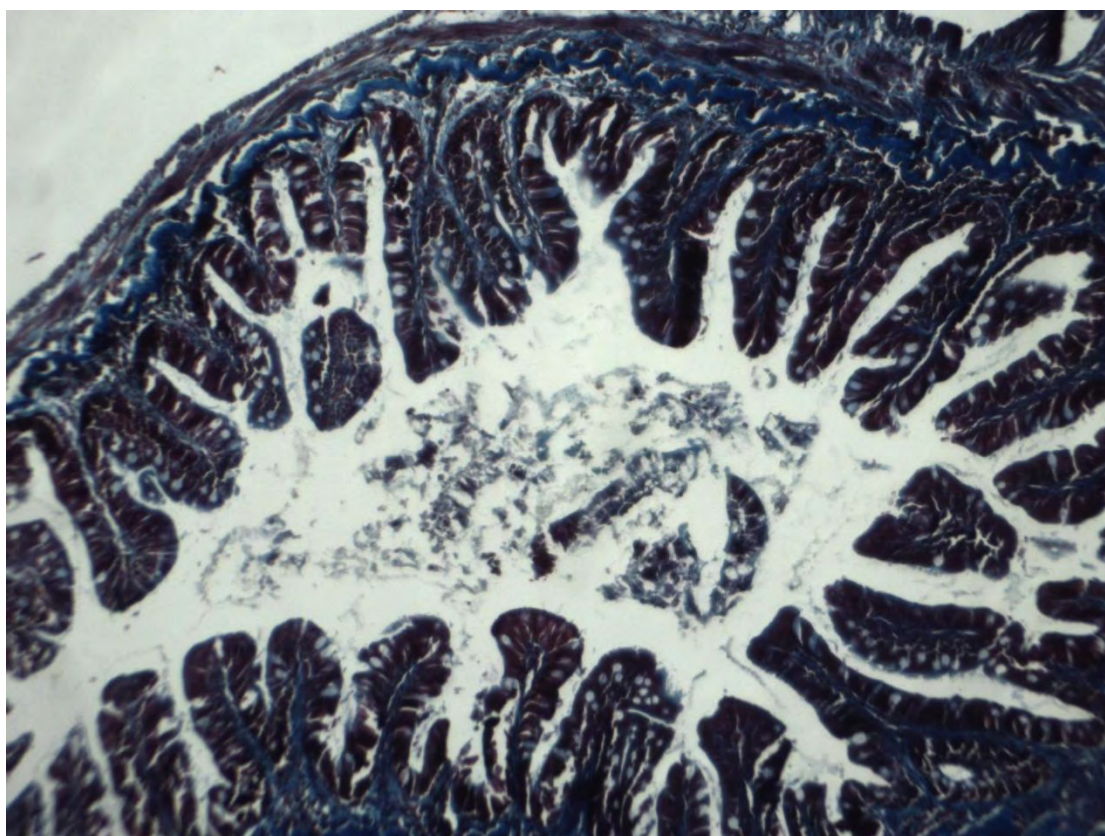


**Εικόνα 15:** Δείγμα 1D30H (B), χρώση αιματοξυλίνη- ηωσίνη, μεγέθυνση x10, μία εντερική λάχνη.



**Εικόνα 16:** Δείγμα 1D30H (A1), χρώση αιματοξυλίνη-ηωσίνη, μεγέθυνση x10, 2 εντερικές λάχνες.





**Εικόνα 17:** Δείγμα 1D10H (Γ), χρώση Alcian blue, μεγέθυνση x4.

Τα δεδομένα βιολογικής εκτροφής προήλθαν από προηγούμενη έρευνα και στη συγκεκριμένη χρησιμοποιήθηκαν οι διάμετροι. Τα δεδομένα αυτά καλούνται δευτερογενή. Οι διάμετροι από συμβατική εκτροφή είναι πολύ περισσότεροι σε αριθμό μια και εμφανίζονται περισσότερα καλυκοειδή κύτταρα λόγω των αντιδιατροφικών παραγόντων που περιέχονται στην εμπορική τροφή. Επιπλέον, με τη συγκεντρωτική θεώρηση των αποτελεσμάτων παρατηρούνται περισσότερες διακυμάνσεις στη συμβατική τροφή.

Για σαφέστερη εικόνα και για να διατυπωθούν συμπεράσματα ελέγχονται οι δύο πληθυσμοί με τη χρήση στατιστικών τεστ. Στον ένα πληθυσμό ο αριθμός των διαμέτρων ήταν 36 ενώ στον άλλο 112. Ελέγχεται αρχικά η κανονικότητα της κατανομής στον κάθε χειρισμό αλλά και μεταξύ αυτών και στη συνέχεια υπολογίζεται η στατιστική σημαντικότητα.

Στο εν λόγω πείραμα η κανονική κατανομή μεταξύ των διαμέτρων που προήλθαν από οργανικά εκτρεφόμενες πέστροφες και αυτών που προήλθαν από συμβατικά

εκτρεφόμενες επιβεβαιώθηκε με τη χρήση δύο διαφορετικών μη παραμετρικών τεστ. Αυτό διενεργήθηκε για να κατοχυρωθεί με τα βεβαιότητας η κανονικότητα κατανομής. Η αρχική υπόθεση και στα δύο τεστ (Shapiro- Wilk και Kolmogorov-Smirnov) δηλώνει πως υπάρχει κανονική κατανομή και για να απορριφθεί θα πρέπει ο αριθμός που υπολογίζεται στατιστικά να είναι μικρότερος από ένα συγκεκριμένο όριο. Στην έρευνα που εκπονήθηκε, για το τεστ Shapiro – Wilk ο αριθμός αυτός είναι μεγαλύτερος από το όριο, πράγμα που επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση περί κανονικής κατανομής. Τα αποτελέσματα γίνονται σαφή στους πίνακες που παρατίθενται ακολούθως.

Τεστ κανονικότητας			
Shapiro- Wilk	DF	Statistic	Prob<W
Βιολογική	36	0,97457	0,56263
Συμβατική	112	0,98846	0,45832

Τεστ κανονικότητας			
Kolmogorov- Smirnov	DF	Statistic	Prob<W
Βιολογική	36	0,09916	0,92482
Συμβατική	112	0,05538	0,99388

Εφόσον παρατηρείται κανονική κατανομή στο εσωτερικό του κάθε πληθυσμού, ακολουθεί το επόμενο βήμα και ελέγχεται η στατιστική σημαντικότητα. Προηγείται η συγκεντρωτική απεικόνιση των μέσων των πληθυσμών (Mean), της τυπικής απόκλισης (SD) και του τυπικού σφάλματος των μέσων (SEM). Επισημαίνεται ότι το SEM προσδιορίζει τη διακύμανση ανάμεσα σε διαφορετικές ομάδες δειγμάτων, ενώ η τυπική απόκλιση υποδηλώνει τη διακύμανση στην τιμές των δειγμάτων της ίδιας ομάδας. Για αποσαφήνιση των προαναφερθέντων παρατίθεται και ο ανάλογος πίνακας.

Two sample t-test				
Descriptive statistics				
	N	Mean	SD	SEM
Βιολογική	36	15,38	4,26	0,71
Συμβατική	112	21,92	6,69	0,63

Με τη διενέργεια t-test ανάμεσα στους δύο διαφορετικούς χειρισμούς, βιολογική και συμβατική εκτροφή με N= πλήθος διαμέτρων που υπολογίστηκαν ανά διαφορετικό χειρισμό, παρατηρείται διαφοροποίηση ως προς το μέσο (mean). Η διαφορά αυτή προσδιορίζεται με την τιμή 6,54. Οι διάμετροι μεταξύ των πληθυσμών παρουσιάζουν διαφορετική τυπική απόκλιση (SD: Standard Deviation) καθώς και διαφορετικό τυπικό σφάλμα των μέσων (SEM: Standard Error Mean). Οι τιμές τους διαφαίνονται στον παραπάνω πίνακα.



t-Test Statistics			
	t Statistic	DF	Prob> t
Equal Variance Assumed	-5,50608	146	1,61E-07
Equal Variance NOT Assumed	-6,8737	93,85732	6,82E-10

Στους δύο διαφορετικούς τύπους εκτροφής, οι πληθυσμοί που εξετάζονται δεν έχουν το ίδιο μέγεθος ως προς το πλήθος των ατόμων που τους απαρτίζουν. Παρουσιάζουν διαφορά ως προς τα μέσα με επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0,05$ . Αυτό στο οποίο γίνεται εστίαση είναι οι διάμετροι των καλυκοειδών κυττάρων. Ειδικότερα, η μέγιστη διάμετρος των βλεννοπαραγωγών κυττάρων για τις πέστροφες που ακολούθησαν την οργανική δίαιτα υπολογίστηκε  $18,3 \pm 4,3 \mu\text{m}$ . Αντίθετα, σαφώς μεγαλύτερη αριθμητικά, υπολογίστηκε η διάμετρος στα ψάρια συμβατικής εκτροφής σημειώνοντας τα  $21,9 \pm 6,7 \mu\text{m}$ . Συνεπώς, φτάνουμε στο συμπέρασμα πως η συμβατική τροφή εμφανίζεται να δημιουργεί στατιστικά μεγαλύτερα ( $p=1,19 \times 10^{-6}$ ) βλεννογόνα κύτταρα από ότι η βιολογική τροφή.

Ο λόγος στον οποίο μπορεί να αποδοθεί η εμφανής διαφοροποίηση μεταξύ των δύο χειρισμών είναι η ύπαρξη αντιδιατροφικών παραγόντων στη συμβατική τροφή. Με τον όρο αντιδιατροφικοί παράγοντες, εννοούνται όλα εκείνα τα συστατικά ή τυχόν μεταβολίτες αυτών που περιέχονται στις τροφές δρουν ανασταλτικά στις μεταβολικές διεργασίες του οργανισμού (Μεντέ και Νέγκας, 2011). Αντιδιατροφικοί παράγοντες για την πέστροφα που είναι ένα σαρκοφάγο ψάρι μπορούν να θεωρηθούν ακόμα και οι υδατάνθρακες όταν βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στην τροφή. Οι υδατάνθρακες χαρακτηρίζονται ως τα συστατικά αυτά της τροφής με τη χαμηλότερη ενεργειακή αξία και εμπεριέχονται στις πελέτες με τη μορφή αμύλου και ινών (Κεντούρη Μ., 2015). Με τη μορφή αυτή είναι άπεπτη για το έντερο της πέστροφας ή

εμφανίζουν πολύ μικρή πεπτικότητα και ο οργανισμός αντιδρά με την υπέρμετρη έκκριση βλέννας.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα κατέδειξαν πως η οργανική τροφή απαιτεί μικρότερη διάμετρο βλεννοπαραγωγών κυττάρων και κατά συνέπεια μικρότερη ποσότητα εκκρινόμενης βλέννας. Από την άλλη η εμπορική τροφή απαιτεί μεγαλύτερη ποσότητα βλέννας για να επέλθει η πέψη. Αν αναλογιστεί κανείς τη σύσταση της συμβατικής τροφής θα στηρίξει το συμπέρασμα αυτό στην ύπαρξη αντιδιατροφικών παραγόντων. Σύμφωνα με τους Φώτη και Αγγελίδη(2003) στο βιβλίο «Εκτροφή και παθολογία ιχθύων», η πέστροφα χαρακτηρίζεται ως σαρκοφάγο και αδηφάγο ψάρι. Συνεπώς για ένα σαρκοφάγο ψάρι υπάρχει δυστοκία ως προς την πέψη και απορρόφηση των φυτικής προέλευσης πρωτεϊνών και έτι περισσότερο των υδατανθράκων. Η παρουσία ινωδών ουσιών στη σύσταση της τροφής απαιτεί περισσότερη έκκριση βλέννας ώστε να επέλθει η πέψη, γεγονός που επιβεβαιώνεται μέσω της σύγκρισης control τροφής με άλλη που περιείχε Ergosan, σε έρευνα των Heidarieh et al. 2012 σε πέστροφες.

Τα βλεννοπαραγωγά κύτταρα υπερτερούν σε αριθμό σε σχέση με τους άλλους τύπους κυττάρων στο έντερο. Η ύπαρξη αυτών γίνεται έκδηλη όταν το ψάρι ξεκινά της εξωγενή διατροφή, καθώς αναφέρεται από τον Παπουτσόγλου 2008. Σημαντικό πλεονέκτημα στη βελτιστοποίηση πέψης και απορρόφησης δίνουν οι ψυκτροειδείς παρυφές, οι οποίες σύμφωνα με τον Wilson, 2011 αυξάνουν την εντερική επιφάνεια πάνω από 90%. Οι σταγόνες λιπιδίων στα εντεροκύτταρα καθώς και ο αριθμός λιποπρωτεϊνικών μορίων σε ενδοκυτταρικούς χώρους επηρεάζονται απ' τις πηγές τροφής και είτε δυσχεραίνουν είτε διευκολύνουν την απορρόφηση. Στην ιριδοειδή πέστροφα το 25% του συνολικού χαλκού που απορροφάται βρίσκεται στο στομάχι (in vitro) και σε ζωντανό ιστό, το ποσοστό αυτού στο στομάχι είναι ίσο με το σύνολο των ποσοστών πρόσθιου και μέσου τμήματος εντέρου. Ιδανικό

μικροθρεπτικό για τα ψάρια είναι και το νικέλιο μιας και απορροφάται το 50% από το συνολικό που υπάρχει στις βιομηχανικές τροφές.

Χρησιμοποιούνται, εν γένει, μορφομετρικοί δείκτες προκειμένου να διαπιστωθεί διαφοροποίηση μεταξύ πληθυσμών που τους χορηγήθηκε τροφή διαφορετικής σύστασης (Currens, 1989). Ψάρι στο οποίο είχε χορηγηθεί εμπορική τροφή συντιθέμενη από φύκη εμφάνισε μεγαλύτερο ποσοστό βλεννοπαραγωγών κυττάρων σε σχέση με εμπορική τροφή καθορισμένης πρωτεϊνικής σύστασης. Το πάχος των ψυκτροειδών παρυφών, το μήκος εντέρου και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των πυλωρικών τυφλών δεν παρουσίασαν διαφοροποίηση μεταξύ των δύο χειρισμών ( Heidarieh, 2012) .Συνεπώς, τα βλεννοπαραγωγά κύτταρα είναι μια αντιπροσωπευτική παράμετρος για την αλλαγή της ιστοφυσιολογίας του εντέρου και της υγιεινής του ψαριού. Διπλάσιος βρέθηκε ο αριθμός των καλυκοειδών κυττάρων στο εντερικό επιθήλιο πέστροφας που διατράφηκε με σιτηρέσιο σόγιας, γεγονός που ελλοχεύει τροποποιήσεις στη βλέννα και στη διαδικασία της πέψης. Επίσης, παρατηρήθηκε καταστολή της απορρόφησης λόγω της παρουσίας άπεπτων πολυσακχαριτών (Ostaszewska, 2004). Αυτά τα βιβλιογραφικά δεδομένα, ενισχύουν την προτίμηση της οργανικής τροφής στο εν λόγω πείραμα.

Γενικά, τα αποτελέσματα ιστοφυσιολογικών μελετών που εστιάζουν στο έντερο μπορούν να αναδείξουν την επιρροή οποιουδήποτε τύπου τροφής, της ασιτίας αλλά και της κακής διατροφής στην ανάπτυξη του ψαριού (Raskovic, 2011). Ειδικότερα, σε πείραμα που διεξήχθη με προσθήκη βιογενών αμινών σε πειραματική δίαιτα υπήρξε άμεση απόκριση από το έντερο, έχοντας σαν απότοκο την πρόκληση οιδήματος στα βλεννοπαραγωγά κύτταρα και τον εκφυλισμό της εκκριτικής τους διεργασίας (Opstvedt, 1996). Το έντερο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη συγκέντρωση οξυγόνου και αμμωνίας μετά από γεύμα. Οι συγκεντρώσεις αυτές συνδέονται άμεσα με την ενζυμική διάσπαση των ,παρεχόμενων από την τροφή, αμινοξέων. Η ενεργότητα των ενζύμων που διενεργεί τη διάσπαση αντανακλά και τη φυσιολογική ή μη εικόνα του εντέρου (Mommensen, 2003).

Στην εκτροφή ιχθύων ο στόχος είναι να επιτυγχάνεται η βέλτιστη σχέση μεταξύ της παρεχόμενης τροφής και της απορρόφησης αυτής από τον οργανισμό. Για αυτό το λόγο στοχεύουμε στην κατάρτιση σιτηρεσιών κατάλληλων για τις διατροφικές ανάγκες του εκάστοτε ψαριού.

Σε πειράματα που διεξήχθησαν σε Νορβηγία και Ολλανδία, σχετικά με την αντικατάσταση ιχθυαλεύρου με σογιάλευρα ως επί το πλείστον σημειώθηκε πως τα αποτελέσματα ήταν ολέθρια για την πέψη όταν το ποσοστό αντικατάστασης προσέγγιζε το 30%. Σε πείραμα όπου ιριδοειδής πέστροφα ακολούθησε δίαιτα χαμηλής λιπιδικής σύστασης, παρατηρήθηκε αύξηση του ύψους των εντεροκυττάρων καθώς και του πλήθους των βλεννοπαραγωγών (Raskovic, 2011). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με την εν λόγω έρευνα μια και η συμβατική τροφή περιέχει περισσότερα φυτικά άλευρα (άλευρο γλουτένης και αραβόσιτου) και παρουσιάζει μειωμένη περιεκτικότητα σε ιχθυάλευρο και ιχθυέλαιο σε σχέση με την οργανική.

Δίαιτες που περιείχαν πρωτεΐνες προερχόμενες από ρύζι σε ποσοστό 20% δεν παρουσίασαν ουσιαστικές διαφορές στη μορφολογία του εντέρου και στη φυσιολογία πέψης. Αντίθετα, εκείνες με μεγαλύτερα ποσοστά αυτής της πρωτεΐνης φυτικής προέλευσης κατέδειξαν μειωμένη ενεργότητα των ενζύμων που συμβάλλουν στην πέψη (Gai, 2012). Σιτηρέσια που συνίστανται από ιχθυάλευρα τείνουν να παρουσιάζουν αυξημένη πεπτικότητα ακατέργαστων πρωτεϊνών σε σχέση με αυτά που έχουν στη σύστασή τους πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης. Η πρωτεϊνική πηγή είναι καθοριστικός παράγοντας ως προς την πεπτικότητα των αμινοξέων. Ψάρια που διατράφηκαν με δίαιτες που περιείχαν αυξημένο ποσοστό ζωικών πρωτεϊνών παρουσίασαν πτυχώσεις του βλεννογόνου χιτώνα με μεγαλύτερο ύψος και τα εντεροκύτταρα εμφάνισαν πολλά κενोटόπια (Gao, 2011).

Όταν παρέχεται σε πέστροφες γεύμα με συστατικά υψηλού πρωτεϊνικού φορτίου οι συντελεστές ενέργειας και πεπτικότητας εμφανίζουν ταύτιση. Αυτή η σχέση δεν εμφανίζεται όταν σε ιριδοειδή πέστροφα παρέχονται τροφές φυτικής προέλευσης ή γενικά φυτικά συστατικά (λόγου χάρη σπόροι δημητριακών και έλαια αυτών) χαμηλής πρωτεϊνικής σύστασης (Gaylord, 2008).

Τα υψηλής ποιότητας ιχθυάλευρα είναι εύληπτα και εύπεπτα (παρουσιάζουν πεπτικότητα που προσεγγίζει το 90%) και χαρακτηρίζονται σε γενικές γραμμές από απουσία αντιδιατροφικών παραγόντων. Οι αντιδιατροφικοί παράγοντες ενδέχεται να ανιχνευθούν σε προϊόντα σόγιας και να προκαλέσουν εντερικές φλεγμονές στα σαλμοειδή (Lund, 2011).

Ο χαρακτηρισμός των εκτρεφόμενων ιχθύων ως οργανικά εκτρεφόμενων αποτελεί μια πρόκληση για τη βιομηχανία και συγχρόνως ένα σημαντικό δέλεαρ. Αυτό συμβαίνει γιατί με την οργανική εκτροφή έναντι της συμβατικής παρατηρούνται ελάχιστες περιβαλλοντικές επιβαρύνσεις. Καθώς σημειώνεται στη βιβλιογραφία η συμβατική εκτροφή σαλμοειδών παρουσίαζε υψηλότερο αντίκτυπο στην υπερθέρμανση του πλανήτη και ενέτεινε την τοξικότητα του περιβάλλοντος σε σχέση με την εκτροφή πουλερικών (Pelletier, 2007).

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 5.1 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βερίλλης Π. (2015) Οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία, Κεφ.3 «Προετοιμασία δειγμάτων για οπτική μικροσκοπία», σελ. 55-59

Βερίλλης Π., Μεντέ Ε. (2017) Ιστοφυσιολογία ιχθύων και καρκινοειδών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.

Κλαουδάτος Σ., Κλαουδάτος Δ. (2012) Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφές υδρόβιων ζωικών οργανισμών, Κεφ.2 «Εκτροφή ιχθύων γλυκέων και αλμυρών υδάτων», σελ. 56-60

Κουσουλάκος Σ.Α. (2007) Εισαγωγή στην αναπτυξιακή βιολογία και ιστολογία, Ενότητα 2 «Ιστολογία», Κεφ. 2 «Κλασσική ιστολογική τεχνική» σελ. 217-222

Κρούπης Κ. (2010) Η επίδραση της ασιτίας και της διατροφής με φυσική και τεχνητή τροφή στην ιστολογία του πεπτικού αδένα της караβίδας (*perhogns Norvegicus*, Linnaeus 1758), πτυχιακή διατριβή, Γ.Ι.Υ.Π

Μεντέ Ε., Νέγκας Ι. (2011) Στοιχεία φυσιολογίας θρέψεως και εφαρμοσμένη διατροφή ιχθύων και καρκινοειδών, Κεφ. 2 «Πεπτικό σύστημα και πέψη», σελ. 80-85

Νεοφύτου Χ. Ν. (2004) Ιχθυολογία, Κεφ. 8 «Ψάρια του γλυκού νερού», σελ. 212- 213

Παπουτσόγλου Σ. (2008) Διατροφή ιχθύων, Κεφ. 3 «Πεπτικό σύστημα ιχθύων μορφολογία και ιδιότητες», σελ. 167-177

Φώτης Γ.Δ. , Αγγελίδης Π.Γ (2003) Εκτροφή και παθολογία ιχθύων , Τόμος Α' (Υδάτινο περιβάλλον, στοιχεία ιχθυολογίας, ιχθυοτροφία και ιχθυοπαθολογία), Κεφάλαιο Δ' «Αναπαραγωγή και εκτροφή πέστροφας» σελ. 154-162

Χάλκος Γ.Ε. (2011) Στατιστική, Κεφ. 6 «Έλεγχος υποθέσεων» σελ. 209-212, Κεφ. 11 «Μη παραμετρικές διαδικασίες» σελ. 276-277

## 5.2 ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Al- Hussaini A.H. (1949) On the functional morphology of the alimentary tract of some fish in relation to differences in their feeding habits: anatomy and histology, Quarterly Journal Microscopical Science, Vol. 90, part 2

Banan Khojasteh S.M (2009) Histological, histochemical and ultrastructural study of the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), World Applied Sciences Journal 6 (11): 1525-1531

Banan Khojasteh S.M. (2012) The morphology of the post-gastric alimentary canal in teleost fishes: a brief review, International Journal of Aquatic Science, vol.3: 71-85

Bozic F. et al. (2001) Starvation induced pathobiology in the gut of carp (*Cyprinus carpio*, L.) Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 114; 134-138

Currens P.K. et al. (1989) Effects of different feeding regimes on the morphometrics of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*O.mykiss*), Copeia, vol.1989, pp. 689-695

El-Shemy H. (2011) Soybean and nutrition, Ch. 12 “Dietary effect of soybean (*Glycine max*) products on gut histology and microbiota of fish” p.231-244

Gaballero 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: 253-271

Gai F. et al. (2012) Enzymatic and Histological Evaluations of Gut and Liver in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Fed with Rice Protein Concentrate-based Diets, *J of World Aquaculture Society*, vol. 32, no. 2

Gao Y. et al. (2011) Supplementation of fishmeal and plant protein-based diets for rainbow trout with a mixture of sodium formate and butyrate, *Aquaculture*, *Science Direct*

Gaylord T.G et al. (2008) Apparent digestibility of gross nutrients from feedstuffs in extruded feeds for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *J of World Aquaculture Society*, vol. 39

Grossel M. et al. (2011) The multifunctional gut of fish, Ch. 1 "Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes" Wilson J.M. , Castro L.F.C, p.2-44, Ch.2 "Feeding, digestion and absorption of nutrients" Bakke A.M. et al., p. 57-75

Guillame J. et al. (2001) Nutrition and feeding of fish and crustaceans, Ch. 4 "Digestive physiology and nutrient digestibility in fishes", p. 27-45

Halver J.E. , Hardy R.W. (2002) Fish nutrition, Ch. 7 "Nutritional physiology", p.393-406, Ch.13 "Diet and fish husbandry", p. 720-730

Heidarieh M. et al. (2012) Effect of dietary Ergosan on growth performance, digestive enzymes, intestinal histology, hematological parameters and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Fish Physiol Biochem*, 38: 1169-1174

Lund I. et al. (2011) Replacement of fish meal with a matrix of organic plant proteins in organic trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed, and the effects on nutrient utilization and fish performance, *Aquaculture* 321: 259-266

Mommsen T.P et al. (2003) Metabolic zonation in teleost gastrointestinal tract, Effects of fasting and cortisol in Tilapia, *J Comp Physiol. B*, 173:409-418



Morrow D.M (2003) The effects of diet composition and ration on biotransformation enzymes and stress parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Thesis, p.1-10

Moyano F.J et al. (1992) Nutritive value of diets containing a high percentage of vegetable proteins for trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Aquat. Living Resour.* 5: 23-29

Mumford S. et al. (2007) Fish histology and histopathology, Chapter 1 “Tissue processing “, Chapter 2 “Gastrointestinal tract and pancreas” USFWS- NCTC

Opstvedt J. et al. (1996) Freshness of fish used in making fish meal for salmonids and the effects of biogenic amines, IFOMA

Ostaszewska T. et al. (2005) Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins, *Aquaculture* 245: 273-286

Pelletier N., Tyedmers P. (2007) Feeding farmed salmon: Is organic better?, *Aquaculture* 272: 399-416

Raskovic B. et al. (2011) Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish, *Journal of Agricultural Sciences*, vol.56 pp.86-100

Ringøa E. et al. (2003) Electron microscopy of the intestinal microflora of fish, *Aquaculture* 227: 395-415

### **5.3 ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΕΣ ΠΗΓΕΣ**

[http://www.histology.leeds.ac.uk/digestive/GI\\_layers.php](http://www.histology.leeds.ac.uk/digestive/GI_layers.php)

[http://www.histology.leeds.ac.uk/digestive/small\\_intestine.php](http://www.histology.leeds.ac.uk/digestive/small_intestine.php)

[http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/images/2/2c/%CE%94%CE%B9%CE%B1%CF%84%CF%81%CE%BF%CF%86%CE%AE\\_%CF%84%CF%89%CE%BD\\_%CE%B5%CE%BA%CF%84%CF%81%CE%B5%CF%86%CF%8C%CE%BC%CE%B5%CE%BD%CF%89%CE%BD\\_%CE%B9%CF%87%CE%B8%CF%8D%CF%89%CE%BD.pdf](http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/images/2/2c/%CE%94%CE%B9%CE%B1%CF%84%CF%81%CE%BF%CF%86%CE%AE_%CF%84%CF%89%CE%BD_%CE%B5%CE%BA%CF%84%CF%81%CE%B5%CF%86%CF%8C%CE%BC%CE%B5%CE%BD%CF%89%CE%BD_%CE%B9%CF%87%CE%B8%CF%8D%CF%89%CE%BD.pdf)

[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus\\_mykiss/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en)

<http://afs-fhs.org/continuing-ed/Histology-Module-1.2.pdf>

[https://training.fws.gov/resources/course-resources/fish-histology/Fish\\_Histology\\_Manual\\_v4.pdf](https://training.fws.gov/resources/course-resources/fish-histology/Fish_Histology_Manual_v4.pdf)

<http://www.originlab.com/doc/Origin-Help/NormalityTest-EX>

[http://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mph-modules/bs/bs704\\_nonparametric/bs704\\_nonparametric2.html](http://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mph-modules/bs/bs704_nonparametric/bs704_nonparametric2.html)

<http://www.physics.csbsju.edu/stats/KS-test.html>

<http://support.minitab.com/en-us/minitab/17/topic-library/basic-statistics-and-graphs/hypothesis-tests/tests-of-means/what-is-the-standard-error-of-the-mean/>

<http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/MANUALS/ALCIAN.PDF>