

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

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Η επίδραση της υποκατάστασης του διαιτητικού ιχθυαλεύρου από
άλευρο του μικροφύκου *Chlorella vulgaris* στην ιστολογία του ήπατος
της τσιπούρας (*Sparus aurata* L.)»**

Γεωργία Λαχανίδου

ΒΟΛΟΣ 2019

«Η επίδραση της υποκατάστασης του διαιτητικού ιχθυαλεύρου από άλευρο του μικροφύκου *Chlorella vulgaris* στην ιστολογία του ήπατος της τσιπούρας (*Sparus aurata* L.)»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) **Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης**, Επίκουρος Καθηγητής – Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*.
- 2) **Παναγιώτης Βερίλλης**, Επίκουρος Καθηγητής – Μικροσκοπία και Ανάλυση Εικόνας στην Ιστολογία και στους Υδρόβιους Οργανισμούς, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.
- 3) **Ελένη Γκολομάζου**, Επίκουρη Καθηγήτρια – Προστασία – Ευζωία Ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη για την πολύτιμη βοήθεια του και τη διαρκή υποστήριξη του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κ. Παναγιώτη Βερίλλη και κα Ελένη Γκολομάζου, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την διδακτορική φοιτήτρια Μαρία Μετσοβίτη, καθώς και τον συμφοιτητή μου Αναστάσιο Μανωλιό που ήταν παρόν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Η βιολογία της τσιπούρας (<i>Sparus aurata</i>)	1
1.2 Ο ρόλος του ήπατος στη φυσιολογία θρέψης των ιχθύων.....	3
1.3 Η χρήση του ιχθυαλεύρου στις ιχθυοτροφές και η αντικατάσταση του από φυτικές πρωτεΐνες	5
1.4 Η χρήση των μικροφυκών στην αντικατάσταση των ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές.....	9
1.5 Ιστολογικές αλλοιώσεις/επιδράσεις από την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου με φυτικές πρωτεΐνες	13
1.6 Σκοπός της μελέτης	16
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	18
2.1 Δειγματοληψίες.....	18
2.2 Ιστολογική τεχνική	19
2.2.1 Μονιμοποίηση του ιστού	19
2.2.2 Αφυδάτωση, καθαρισμός (διαύγαση) και εμποτισμός ιστού με παραφίνη ..	20
2.2.3 Έγκλειση του ιστού σε παραφίνη	22
2.2.4 Ιστολογική τομή.....	22
2.2.5 Αποπαραφίνωση και χρώση.....	23
2.2.6 Στερεοποίηση των τομών.....	25
2.2.7 Μελέτη των ιστολογικών τομών στο οπτικό μικροσκόπιο.....	25

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	27
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	35
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	42
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	43
6.1 Ελληνική βιβλιογραφία.....	43
6.2 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία	45
ABSTRACT	54

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, 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 τη 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: *Chlorella vulgaris*, *Sparus aurata*, ήπαρ, ιστολογική ανάλυση

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

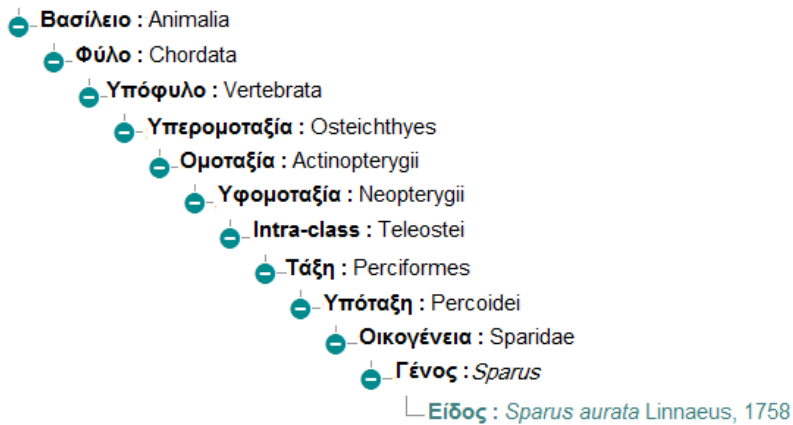
1.1 Η βιολογία της τσιπούρας (*Sparus aurata*)

Η τσιπούρα *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) είναι ένας από τους οστεϊχθύες των θαλάσσιων υδάτων και ανήκει στο γένος *Sparus* της οικογένειας Sparidae, όπως φαίνεται και από τη συστηματική της κατάταξη (Εικ. 1). Αποτελεί είδος της υποτροπικής ζώνης με έντονη γεωγραφική εξάπλωση στη Μεσόγειο θάλασσα, καθώς είναι κοινό σε όλες σχεδόν τις παράκτιες περιοχές της. Το συναντάμε και στις ακτές του Ατλαντικού ωκεανού, από την περιοχή της Μεγάλης Βρετανίας μέχρι τη Σενεγάλη, ενώ σπανιότερη είναι η παρουσία του στα νερά της Μαύρης θάλασσας (Νεοφύτου 2015, FAO 2019). Εκτρέφεται στη Μεσόγειο με μεγάλη επιτυχία μέσω του συστήματος εντατικής ελεγχόμενης μαζικής εκτροφής και μάλιστα βρίσκεται ανάμεσα στα δέκα κυριότερα παραγόμενα είδη ψαριών στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Παπουτσόγλου 2008). Σύμφωνα με στοιχεία του Συνδέσμου Ελληνικών Θαλασσοκαλιεργειών (ΣΕΘ 2018), η τσιπούρα (*S. aurata*) κατέχει επάξια την τρίτη θέση στην κατάταξη, με παραγωγή που το έτος 2017 άγγιξε τους 100.022 τόνους.

Η υψηλή ανθεκτικότητα που παρουσιάζει στις μεταβολές της αλατότητας (ευρύαλο) και της θερμοκρασίας (ευρύθερμο) είναι από τα βιολογικά της χαρακτηριστικά που την καθιστούν κατάλληλο είδος προς εκτροφή (FAO 1978, Κλαουδάτος & Κλαουδάτος 2012). Συγκεκριμένα αντέχει σε ένα εύρος θερμοκρασιών που κυμαίνεται μεταξύ των 4-30 °C, με μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης να παρατηρείται στους 22-24 °C και βέλτιστη θερμοκρασία για τις περιόδους αναπαραγωγής στους 13-17 °C. Όσον αφορά την αλατότητα, μπορεί να ζήσει σε νερά με επίπεδα από 0 ‰ μέχρι 40 ‰, ενώ η μέγιστη ανάπτυξη της ευνοείται σε ποσοστά μεταξύ του 28-32 ‰. Εξίσου

σημαντικοί παράγοντες για την επιβίωση και ανάπτυξη της είναι η διαβίωση σε περιβάλλον κορεσμένο ως προς το O₂ και τιμή pH εντός των επιτρεπόμενων ορίων (7,8-8,3) (Παπουτσόγλου 2008).

Συστηματική κατάταξη :



Εικόνα 1. Συστηματική κατάταξη του είδους *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) (INPN 2019).

Η τσιπούρα (*S. aurata*) αναπαράγεται εγγενώς, με ερμαφροδιτισμό, όπως και τα περισσότερα μέλη της τάξης των Perciformes. Παρουσιάζει διαδοχικό ερμαφροδιτισμό, με πρωτανδρία κατά την οποία τα άτομα γεννιούνται και ωριμάζουν γενετικά, αρχικά ως αρσενικά (κατά το πρώτο ή το δεύτερο έτος της ηλικίας τους) και στην πορεία της ζωής τους (κατά το δεύτερο ή τρίτο έτος της ηλικίας τους) επέρχεται αλλαγή του φύλου και μετατρέπονται σε θηλυκά (Βουλτσιάδου και συν. 2015, FAO 2019). Η μέγιστη ηλικία στην οποία μπορεί να φτάσει είναι μεταξύ 10-15 έτη και το μέγιστο μήκος 60-70 cm (βάρος 16-18 kg).

Ως βενθοπελαγικός οργανισμός, κινείται σε όλη την υδάτινη στήλη (λόγω του διατροφικού του τύπου) και ενδημεί σε περιοχές όπου η σύσταση του πυθμένα είναι ποικίλης φύσεως (αμμώδεις, βραχώδεις, καλυμμένους με λιβάδια του είδους *Posidonia oceanica*). 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 (βάθος μέχρι 30 m), ενώ τα ενήλικα άτομα συναντώνται και σε βάθη των 100-150 m.

Ανήκει στους σαρκοφάγους ιχθύς και για αυτό η στοματική της κοιλότητα είναι εξοπλισμένη με γνάθους που διαθέτουν 4-5 χοντρούς και δυνατούς σαν κυνόδοντες (στο πρόσθιο τμήμα) για την αρπαγή της λείας και αρκετές σειρές μυλόδοντων (περίπου 4-5 στην επάνω και 3-4 στην κάτω γνάθο) για τη σύνθλιψη των οστράκων που διαθέτουν τα δίθυρα μαλάκια (π.χ. μύδια). Στο φυσικό περιβάλλον το διαιτολόγιο της περιλαμβάνει κυρίως οργανισμούς όπως ζωοπλαγκτόν (π.χ. κοπήποδα), πολύχαιτους, αμφίβια, γαστερόποδα, μαλάκια (κυρίως δίθυρα), καρκινοειδή και κατάλληλου μεγέθους ιχθύς, με τους οποίους επιλέγει να τραφεί, ανάλογα την ηλικία στην οποία βρίσκεται (Παπουτσόγλου 2008, FAO 2019).

1.2 Ο ρόλος του ήπατος στη φυσιολογία θρέψης των ιχθύων

Το ήπαρ των ιχθύων βρίσκεται εντός της περιτοναϊκής κοιλότητας, είναι τοποθετημένο κοντά στην περιοχή του στομάχου και πάντοτε καλά ανεπτυγμένο (Buddington & Kuz' mina 2000, Vicentini *et al.* 2005, Μεντέ 2011). Συνήθως αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο και αδένα του σώματος, όπου λαμβάνει χώρα πλήθος λειτουργιών ύψιστης ζωτικής σημασίας (Buddington & Kuz' mina 2000, Βερίλλης & Μεντέ 2017). Βέβαια το μέγεθος, το σχήμα, ο όγκος και το χρώμα του, ποικίλει και

προσαρμόζεται ανάλογα με το διαθέσιμο χώρο που υπάρχει μεταξύ των υπόλοιπων σπλάχνων, την εποχή και τη διατροφή (Buddington & Kuz'mina 2000, Vicentini *et al.* 2005, Faccioli *et al.* 2014). Ιστολογικά στα περισσότερα είδη των Τελεόστεων εμφανίζεται διαιρεμένο σε δύο λοβούς (δίλοβο), αν και σε αρκετά είδη έχουμε την ύπαρξη τριών λοβών (τρίλοβο), ενώ σε άλλα την πλήρη απουσία τους (Vicentini *et al.* 2005, Μεντέ 2011, Faccioli *et al.* 2014). Το ηπατικό παρέγχυμα αποτελείται κατά κύριο λόγο από ηπατοκύτταρα, που είναι υπεύθυνα για τις βασικές λειτουργίες που επιτελούνται στο ήπαρ. Τα ηπατοκύτταρα είναι πολυγωνικού σχήματος, με σφαιρικό πυρήνα στο κέντρο, ύπαρξη πυρηνίσκου και ευδιάκριτη ετεροχρωματίνη και ευχρωματίνη (Munshi & Dutta 1996, Βερίλλης & Μεντέ 2017).

Το ήπαρ θεωρείται συμπληρωματικό όργανο του πεπτικού σωλήνα με τον οποίο συνδέεται μέσω αγωγών. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πεπτική διαδικασία και στη μεταβολική ισορροπία (αναβολισμός και καταβολισμός) του οργανισμού (Buddington & Kuz'mina 2000, Faccioli *et al.* 2014, Βερίλλης & Μεντέ 2017). Πιο συγκεκριμένα συμβάλει στην αφομοίωση των θρεπτικών ουσιών, οι οποίες αφού απορροφηθούν στο έντερο, περνάνε στο αίμα και μεταφέρονται στο ήπαρ μέσω της ηπατικής πυλαίας φλέβας. Εκεί το αίμα διηθείται και στη συνέχεια μέσω του κυκλοφορικού συστήματος οι θρεπτικές ουσίες διοχετεύονται στα διάφορα όργανα και ιστούς του σώματος. Η διήθηση του αίματος που επιτυγχάνεται στο χώρο του ήπατος αποσκοπεί και στην αποδόμηση τυχόν βλαβερών ουσιών (αποτοξίνωση) που μπορεί να έχουν εισέλθει στον οργανισμό. Τα προϊόντα της αποδόμησης αυτών των ουσιών είτε αποθηκεύονται προσωρινά στη χοληδόχο κύστη και μεταφέρονται στο έντερο μαζί με τα χολικά υγρά, απ' όπου και αποβάλλονται, είτε μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας

του αίματος, στα νεφρά απ' όπου και αποβάλλονται μέσω του ουροποιητικού συστήματος.

Η δράση του ήπατος ως πεπτικός αδένας σχετίζεται με την παραγωγή ενός εκκρίματος (εξωκρινής δράση), του χολικού υγρού, το οποίο συμπυκνώνεται και αποθηκεύεται στη χοληδόχο κύστη (Buddington & Kuz' mina 2000, Faccioli *et al.* 2014). 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 (Μεντέ 2011). Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι στο συκώτι 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 (Βουλτσιάδου και συν. 2015, Βερίλλης & Μεντέ 2017). Όπως γίνεται λοιπόν αντιληπτό οι πολλαπλές λειτουργίες του ήπατος το καθιστούν ένα όργανο ύψιστης σημασίας με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, για αυτό και επιλέγεται ως «όργανο στόχος» για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του διαιτητικού χειρισμού και της δομής, μορφολογίας και λειτουργίας του (Βερίλλης & Μεντέ 2017).

Σε ότι αφορά το πάγκρεας, 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. Η λειτουργία του παγκρεατικού ιστού ως αδένας χαρακτηρίζεται από διπλή δράση, εξωκρινή και ενδοκρινή. Το εξωκρινές πάγκρεας

αποτελείται από χαρακτηριστικά κυψελοειδή κύτταρα, που έχουν ένα μεγάλο σφαιρικό πυρήνα, εσωτερικά του οποίου διακρίνονται 1 έως 3 πυρηνίσκοι και σκούρο βασεοφιλικό κυτταρόπλασμα, επίσης εμφανίζουν μεγάλο αριθμό ηωσινόφιλων εκκριτικών προενζυμικών κοκκίων. 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. Αναφορικά με τον ενδοκρινή αδένα του παγκρέατος, αυτός διαθέτει τα νησίδια του Langerhans, τα οποία αποτελούνται από έναν αριθμό ελαφρά χρωματισμένων, έγκλειστων σφαιρικών μαζών ή συσσωματωμάτων αδενικών κυττάρων με ωχρή χρώση. Η ενδοκρινής δράση του έχει να κάνει με την έκκριση ορμονών, οι πιο γνωστές εκ των οποίων είναι η ινσουλίνη που παράγεται από τα κύτταρα Β, η γλυκαγόνη που παράγεται από τα κύτταρα Α, η σωματοστατίνη και το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο. Το ποσοστό έκκρισης των παγκρεατικών ορμονών εξαρτάται από την διατροφή που ακολουθείται, κάποιους μεταβολικούς παράγοντες καθώς και τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν (Buddington & Kuz' mina 2000, Βερίλλης & Μεντέ 2017) .

1.3 Η χρήση του ιχθυαλεύρου στις ιχθυοτροφές και η αντικατάσταση του από φυτικές πρωτεΐνες

Σύμφωνα με τον Κανονισμό της (ΕΕ) 2017/786 της 8^{ης} Μαΐου 2017, το ιχθυάλευρο ορίζεται ως η μεταποιημένη ζωική πρωτεΐνη που προέρχεται από υδρόβια ζώα, εξαιρουμένων των θαλάσσιων θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των υδρόβιων ασπόνδυλων, ιδίως εκείνων που καλύπτονται από το άρθρο 3 παράγραφος 1 στοιχείο ε)

της οδηγίας 2006/88/EK του Συμβουλίου και του αστερία του είδους *Asterias rubens* τα οποία αλιεύονται σε περιοχή παραγωγής μαλακίων. Τα υδρόβια ζώα ορίζονται με παραπομπή ως ψάρια που ανήκουν στην υπερομοταξία Άγναθα και στις ομοταξίες Χονδριχθύες και Οστεϊχθύες, μαλάκια που ανήκουν στο φύλλο Mollusca και καρκινοειδή που ανήκουν στο υποφύλο Crustacea (ΕΕ 2017).

Είναι προϊόν που χρησιμοποιείται κυρίως ως πρώτη ύλη στις ιχθυοτροφές, καθώς αποτελεί τη σημαντικότερη πηγή πρωτεΐνης για τους εκτρεφόμενους ιχθύες (Hardy & Barrows 2002). Αποτελεί άλευρο το οποίο προκύπτει από την επεξεργασία διαφόρων ειδών ιχθύων, κυρίως πελαγικών, όπως ο γαύρος, η ρέγγα, ο καπελάνος, η φρίσσα, το σκουμπρί, η σαρδέλα κτλ. Τα περισσότερα ιχθυάλευρα παρασκευάζονται από ολόκληρα ψάρια, αλλά κάποια άλλα προέρχονται και από υποπροϊόντα φιλετοποίησης (συνήθως η περιεκτικότητά τους είναι ελαφρώς χαμηλότερη σε πρωτεΐνη και υψηλότερη σε ιχνοστοιχεία, συγκριτικά με τα ολόκληρα ψάρια) και μεταποίησης ψαριών (κονσερβοποίηση), είτε ακόμα και από παρεμπύπτοντα αλιεύματα. Τα ιχθυάλευρα από υποπροϊόντα φιλετοποίησης και από παρεμπύπτοντα αλιεύματα πλέον αποτελούν περίπου το 25% της παγκόσμιας παραγωγής ιχθυαλεύρων (Hardy & Barrows 2002, Hardy & Tacon 2002, Αδαμίδου & Νέγκας 2011, Καραπαναγιωτίδης 2015).

Θεωρούνται πλούσιες πρωτεϊνικές πηγές υψηλής βιολογικής αξίας, καθώς η περιεκτικότητά τους σε ολικές πρωτεΐνες είναι της τάξης του 56-76% επί της ουσίας τους, και ακριβώς για αυτό τα ποσοστά συμμετοχής τους στις ιχθυοτροφές είναι αρκετά υψηλά (Αδαμίδου & Νέγκας 2011). Ο κλάδος των ιχθυοκαλλιεργειών είναι άρρηκτα συνδεδεμένος εδώ και πολλά χρόνια με τα ιχθυάλευρα, διότι είναι ιδιαίτερα πολύτιμα,

τόσο για την ποσότητα όσο και για την ποιότητα της πρωτεΐνης που προσφέρουν στο σιτηρέσιο (Windson 2001). Αυτό σημαίνει ότι διαθέτουν ιδανικό προφίλ απαραίτητων αμινοξέων, ταιριαστό με τις απαιτήσεις των εκτρεφόμενων ιχθύων. Επίσης είναι πλούσια σε ενέργεια, ω-3 και ω-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, είναι καλές πηγές ανόργανων στοιχείων όπως το ασβέστιο, ο φώσφορος, το μαγνήσιο και το κάλιο, καθώς και βιταμινών όπως οι B₁, B₂, B₆ και B₁₂. Περιέχουν ιχνοστοιχεία όπως ψευδάργυρο, ιώδιο, σίδηρο, χαλκό, μαγγάνιο, κοβάλτιο, σελήνιο, φθόριο και επιπλέον είναι ιδιαίτερα εύγευστα και εύπεπτα για τα ψάρια (Windson 2001, Jackson 2009, Αδαμίδου & Νέγκας 2011). Δικαιολογημένα λοιπόν εδώ και τόσα χρόνια, κατέχουν την κορυφή ανάμεσα στις πηγές πρωτεΐνης που προορίζονται για τις τροφές των ψαριών σε συνθήκες εκτροφής.

Στην Ευρώπη η εκτροφή ψαριών στηρίζεται κυρίως σε σαρκοφάγα είδη, ένα εκ των οποίων και η τσιπούρα (*S. aurata*). Για την επιτυχή εκτροφή αυτών των ειδών απαιτούνται σιτηρέσια πλούσια σε εύπεπτες πρωτεΐνες, που στοχεύουν στη βέλτιστη ανάπτυξη, υγεία και ευζωία των οργανισμών. Αυτό εξηγεί και την ανάγκη, για τη χρήση της ιδανικότερης πρωτεϊνικής πηγής, που μέχρι στιγμής κρίνεται ότι είναι το ιχθυάλευρο. Βέβαια για τους σκοπούς της παραγωγής των ιχθυαλεύρων, εδώ και χρόνια ασκείται μεγάλη αλιευτική πίεση, με αποτέλεσμα να γίνεται εκμετάλλευση των φυσικών ιχθυοπληθυσμών σε μη βιώσιμα επίπεδα (αυξήθηκε από 10% που ήταν το 1974 σε 33,1% το 2015) (FAO 2018, Eurogroup for Animals 2018). Αυτός είναι και ένας από τους λόγους που συνέβαλαν στην τεράστια μείωση που υπέστησαν τα φυσικά ιχθυαποθέματα, και παρά τις όσες προσπάθειες γίνονται μέχρι και σήμερα, ακόμα δεν έχουν επανακάμψει. Αποτέλεσμα αυτού είναι η αύξηση της τιμής του ιχθυαλεύρου στην αγορά (FAO 2018).

Σύμφωνα με δεδομένα του παγκόσμιου οργανισμού τροφίμων FAO, η παγκόσμια παραγωγή εκτρεφόμενων ψαριών το έτος 2016 έφτασε τους 80 εκατομμύρια τόνους για ανθρώπινη κατανάλωση (FAO 2018). Οι ιχθυοκαλλιέργειες αποτελούν ίσως τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο κλάδο ζωικής παραγωγής για πολλές χώρες σε ολόκληρο τον κόσμο, πράγμα που υποδηλώνει πως και η ζήτηση για ιχθυοτροφές αυξάνεται με ανάλογο ρυθμό (Καραπαναγιωτίδης 2015). Οι οικολογικοί και οι οικονομικοί παράγοντες που προαναφέρθηκαν, καθώς και η σύγχρονη τάση για βιώσιμη ιχθυοκαλλιέργεια (χρήση πιστοποιημένων τροφών με βιώσιμα συστατικά κτλ.) είναι αυτοί που ώθησαν τους ειδικούς στην προσπάθεια για ελαχιστοποίηση της χρήσης του ιχθυαλεύρου (Καραβέλλας και συν. 2013). Η ανάγκη για εύρεση εναλλακτικών πηγών, εξίσου αποτελεσματικών και αξιόπιστων με το ιχθυάλευρο αποτελεί μια από τις σημαντικότερες προκλήσεις για την παγκόσμια βιομηχανία παραγωγής ιχθυοτροφών. Οι δυνατές επιλογές είναι πολλές, λίγες όμως είναι οι κατάλληλες και οικονομικά συμφέρουσες, διότι το κάθε υποψήφιο συστατικό θα πρέπει να διαθέτει ένα σύνολο χαρακτηριστικών. Σε αυτά ανήκουν, η κατάλληλη θρεπτική σύσταση, η άμεση διαθεσιμότητα του, η ευκολία στο χειρισμό, τη μεταφορά και την αποθήκευση του, η αποδοχή του από τους παραγωγούς και τους καταναλωτές, να έχει μικρό οικολογικό αποτύπωμα, ενώ θα πρέπει να είναι και οικονομικό (Hardy & Tacon 2002, Naylor *et al.* 2009).

Μια από τις κατηγορίες που έχει δοκιμαστεί επανειλημμένα σε πολλά διατροφικά πειράματα που έχουν γίνει, είναι οι πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης. Το κραμβάλευρο, το φοινικάλευρο, το φυστικάλευρο, το ηλιάλευρο, το σουσαμάλευρο, το καρυδάλευρο, η γλουτένη αραβοσίτου, η γλουτένη σιταριού και το σογιάλευρο είναι μερικές από αυτές (Naylor *et al.* 2009, Καραπαναγιωτίδης 2011). Βέβαια η χρήση τους

στις ιχθυοτροφές των σαρκοφάγων ειδών παρουσιάζει μειονεκτήματα, που αφορούν κυρίως την υγεία και την ανάπτυξη αυτών, ενώ μπορεί να δημιουργήσει και προβλήματα τοξικότητας (Καραπαναγιωτίδης 2011, Baeza-Arino *et al.* 2016). Αυτό συμβαίνει επειδή συγκριτικά με το ιχθυάλευρο, στα άλευρα αυτά έχουμε χαμηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης, υποδεέστερο προφίλ απαραίτητων αμινοξέων, παρουσία αντιδιατροφικών παραγόντων όπως αναστολείς πρωτεασών, λεκτίνες, τανίνες, φαινόλες και σαπωνίνες στους οποίους τα ψάρια παρουσιάζουν ευαισθησία, ενώ ταυτόχρονα είναι περισσότερο δύσπεπτα συστατικά λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε δύσπεπτους υδατάνθρακες (Francis *et al.* 2001, Αδαμίδου & Νέγκας 2011). Βέβαια με την κατάλληλη επεξεργασία και αδρανοποίηση των αντιδιατροφικών παραγόντων μπορούν να βελτιωθούν και να χρησιμοποιηθούν με μεγαλύτερη άνεση, πράγμα που συνήθως επηρεάζει και τη διατροφική τους αξία. Όμως η χρήση τους δεν μπορεί να φτάσει τα επίπεδα του ιχθυαλεύρου, ούτε την πλήρη αντικατάσταση αυτού (Αδαμίδου & Νέγκας 2011, Καραπαναγιωτίδης 2011). Αναφορικά με τις φυτικές πρωτεΐνες, ανησυχία προκαλεί και η παρουσία γενετικά τροποποιημένων προϊόντων, που χρησιμοποιούνται σήμερα στη γεωργία, ιδιαίτερα εκείνων που προέρχονται από σόγια και καλαμπόκι (Pusztai & Bardocz 2006).

1.4 Η χρήση των μικροφυκών στην αντικατάσταση των ιχθυαλεύρων στις ιχθυοτροφές

Τα μικροφύκη αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι των υδάτινων οικοσυστημάτων στα οποία διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο, μέσω της συμμετοχής τους στις τροφικές αλυσίδες (Brown 2002). Με αφορμή αυτό άρχισαν να χρησιμοποιούνται στην υδατοκαλλιέργεια, αρχικά ως τροφή για οστρακοειδή και

γαρίδες, με σκοπό την κάλυψη των διατροφικών τους αναγκών κατά τη μετάβαση από την ενδογενή στην εξωγενή φάση διατροφής (στάδιο της Ζωής). Ταυτόχρονα η χρήση τους επεκτάθηκε στην ανάπτυξη και τη διατροφική ενίσχυση του ζωοπλαγκτού στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς, που με τη σειρά του αποτελεί τροφή για τις εκτρεφόμενες νύμφες των ευρύαλων ειδών ιχθύων. Επιπλέον στους ιχθυογεννητικούς για την τεχνική του <<πράσινου νερού>> που ακολουθείται, γίνεται εισαγωγή ζωντανών μικροφυκών μέσα στο νερό, που στοχεύει στη βελτίωση της ποιότητας του (Κλαουδάτος & Κλαουδάτος 2012). Τέλος αξιοσημείωτη είναι η συμμετοχή τους στη διατροφή των εκτρεφόμενων ψαριών, ως πηγή χρωστικών ουσιών που αποσκοπεί στη βελτίωση του χρώματος της σάρκας (π.χ. στα σολομοειδή) ή για άλλους βιολογικούς σκοπούς.

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει στραφεί στους φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς, ως πιθανή εναλλακτική επιλογή αντί του ιχθυαλεύρου. Ο λόγος αφορά κυρίως τη θρεπτική τους αξία, αλλά και τη δυνατότητα ελέγχου-ρυθμίσεως της περιεκτικότητας τους σε πρωτεΐνες ανάλογα κυρίως με το χρησιμοποιούμενο μέσο καλλιέργειας (Παπουτσόγλου 2008). Γενικότερα η θρεπτική αξία των μικροφυκών εξαρτάται από τις συνθήκες εκτροφής, το μέγεθος, το σχήμα, το πόσο εύπεπτα είναι, τη βιοχημική σύσταση (θρεπτικά συστατικά, ένζυμα, τοξίνες εάν υπάρχουν κτλ.) καθώς και τις απαιτήσεις του είδους, στη διατροφή του οποίου θα περιλαμβάνονται (Brown 2002).

Η περιεκτικότητα τους σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια είναι υψηλή με ποσοστά που ποικίλουν και κυμαίνονται περίπου στο 6-52%, 5-23% και 7-23% αντίστοιχα (Brown *et al.* 1997). Όσον αφορά το προφίλ των αμινοξέων, αυτό είναι παρόμοιο για την πλειοψηφία των μικροφυκών και ικανοποιεί επαρκώς τις ανάγκες των

εκτρεφόμενων ιχθύων, με εξαίρεση μερικά που παρουσιάζουν μικρή έλλειψη στη μεθειονίνη και την κυστεΐνη. Το πιο κατάλληλο προφίλ φαίνεται να το έχουν τα *Spirulina maxima*, *Spirulina platensis*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella ellipsoidea*, *C. vulgaris*, *Dunaliella bardawil*, *Dunaliella salina* και *Aphanizomenon flos-aquae* (Sen Roy & Pal 2014).



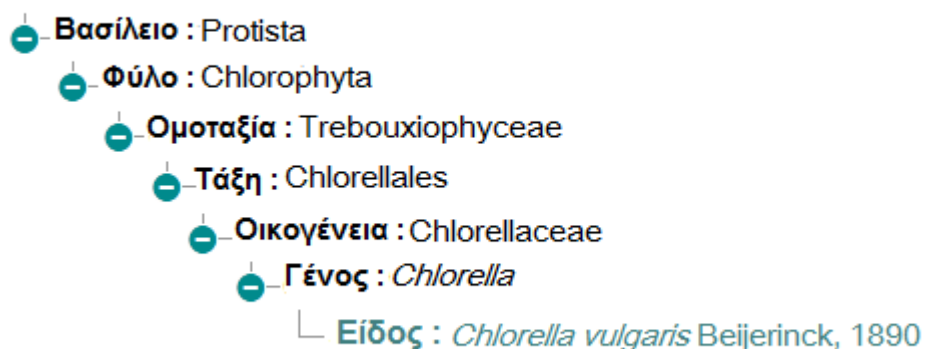
Εικόνα 2. *Chlorella vulgaris* (Algotherm 2017).

Επίσης διαθέτουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), που είναι πολύ σημαντικά για τα ψάρια και συγκεκριμένα τα εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA), εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA) και αραχιδονικό οξύ (AA) (Brown 2002). Είναι καλές πηγές ιχνοστοιχείων όπως το μαγγάνιο, ο ψευδάργυρος και ο χαλκός, καθώς και μακροστοιχείων όπως το μαγνήσιο, το νάτριο, το ασβέστιο, το κάλιο και ο φώσφορος. Επιπλέον να σημειωθεί ότι

αποτελούν φυσική πηγή βιταμινών με κυριότερες τις A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, E, το παντοθενικό οξύ, τη βιοτίνη, το φολικό οξύ και τη νιασίνη, ενώ πολύ σημαντικές, ειδικά για την υδατοκαλλιέργεια είναι και οι χρωστικές που περιέχουν, όπως αναφέρθηκε και πριν, στις οποίες συγκαταλέγονται οι χλωροφύλλες, τα καροτενοειδή οι ξανθοφύλλες κτλ. (Sharif *et al.* 2017).

Τα πιο κοινά-καλλιεργούμενα είδη φυτοπλαγκτονικών οργανισμών ανήκουν στα γένη *Isochrysis*, *Tetraselmis*, *Nannochloropsis* και *Chlorella* (Εικ. 2), μεταξύ άλλων με το τελευταίο να είναι και αυτό που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης (Παπουτσόγλου 2008). Το μικροφύκος *C. vulgaris* (Beijerinck, 1890) είναι ένας ευκαρυωτικός μονοκύτταρος οργανισμός που φέρει πολλά δομικά στοιχεία όμοια με αυτά των φυτών, όπως κυτταρικό τοίχωμα, μιτοχόνδρια και ένα χλωροπλάστη στον οποίο λαμβάνει χώρα η διαδικασία της φωτοσύνθεσης.

Συστηματική κατάταξη :



Εικόνα 3. Συστηματική κατάταξη του *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890) (INPN 2019).

Το σχήμα του είναι σφαιρικό, με διάμετρο 2-10 μm και έχει χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα. Ανακαλύφθηκε από τον Martinus Willem Beijerinck το 1890, ως το πρώτο μικροφύκος με ευδιάκριτο πυρήνα. Όπως προαναφέρθηκε ανήκει στο γένος *Chlorella* της οικογένειας Chlorellaceae, σύμφωνα με την συστηματική του κατάταξη (Εικ. 3). Αναπτύσσεται στα γλυκά νερά και τα κύτταρα του αναπαράγονται με απλή διχοτόμηση. Η ετήσια παραγωγή του το 2009 έφτασε τους 2.000 τόνους (ξηρό βάρος), με τις κύριες χώρες παραγωγής να είναι η Ιαπωνία, η Γερμανία και η Ταϊβάν (Safi *et al.* 2014).

1.5 Ιστολογικές αλλοιώσεις/επιδράσεις από την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου με φυτικές πρωτεΐνες

Πλήθος ερευνών που πραγματοποιήθηκαν, επικεντρώθηκε στον έλεγχο της καταλληλότητας των φυτικών πρωτεϊνών, από ιστολογικής απόψεως, όσον αφορά την επίδραση τους στο ήπαρ των ψαριών (Robaina *et al.* 1995, Martinez – Llorens *et al.* 2012, Baeza – Ariño *et al.* 2016). Σε γενικές γραμμές το σύνολο των αποτελεσμάτων ήταν θετικό, ως προς την αντικατάσταση ποσότητας ιχθυαλεύρου με πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης, καθώς ενώ μπορεί να έχει επιπτώσεις στην ιστολογία του ήπατος, αυτές δεν είναι σοβαρές. Μια από τις πιο κοινές ιστολογικές αλλοιώσεις που μπορεί να παρατηρηθεί στο ήπαρ είναι η συσσώρευση ποσότητας λίπους εντός των ηπατοκυττάρων, μια κατάσταση που ονομάζεται στεάτωση και είναι ένδειξη ενός μη υγιούς ήπατος. Συνήθως οφείλεται σε μειωμένη ικανότητα σύνθεσης πρωτεϊνών, από ανεπάρκεια των απαραίτητων λιπαρών οξέων και χρήση μεγάλης ποσότητας ελαίων φυτικής προέλευσης στην τροφή.

Οι περισσότερες αλλοιώσεις που δεν έχουν οδηγήσει στην καταστροφή – εκφύλιση του ήπατος και την πλήρη δυσλειτουργία του, είναι αναστρέψιμες εάν τα

ψάρια επιστρέψουν σε μια ισορροπημένη διατροφή (Caballero *et al.* 2004). Γενικότερα όμως υπάρχει η ανησυχία πως η μακροχρόνια χρήση πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις σε κάποια ψάρια, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ιστοπαθολογικών προβλημάτων, δυσλειτουργία του ήπατος και ανικανότητα αυτού να μεταβολίσει (Martinez – Llorens *et al.* 2012).

Ερευνητές που εξέτασαν το ήπαρ από τσιπούρες (*S. aurata*), κατέληξαν πως όταν η διατροφή τους περιλάμβανε άλευρο από χαρούπι κυρίως σε ποσοστά 34% και 52%, υπήρχαν ορατές διαφορές στο ήπαρ, οι οποίες όμως δεν ήταν ανησυχητικές (Martinez – Llorens *et al.* 2012). Στα συγκεκριμένα ποσοστά παρατηρήθηκε ελαφριά μετατόπιση των πυρήνων και μικρός αριθμός από κενοτόπια στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων, όχι όμως σε βαθμό που να προκληθεί στεάτωση του ήπατος. Για το λόγο αυτό το άλευρο από χαρούπι σύμφωνα με τα αναφερόμενα αποτελέσματα μπορεί να χρησιμοποιηθεί αλλά σε ποσοστό μέχρι 34% του σιτηρεσίου. Για το ίδιο είδος σε πείραμα όπου δοκιμάστηκε σιτηρέσιο που υπέστη υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου με σογιάλευρο κατά 10%, 20% και 30%, η ιστολογική μελέτη που ακολούθησε έδειξε ότι το ήπαρ των ψαριών δεν υπέστη κάποια σοβαρή αλλοίωση (Robaina *et al.* 1995). Οι διαφορές που σημειώθηκαν, συγκριτικά πάντα με το σιτηρέσιο-μάρτυρα, αφορούσαν την περίπτωση του ποσοστού υποκατάστασης (30%), όπου παρατηρήθηκε αυξημένη αποθήκευση λίπους στα ηπατοκύτταρα, μείωση του αποθηκευμένου γλυκογόνου καθώς και αποδομημένα κύτταρα σε μερικά δείγματα. Σε μετέπειτα έρευνα που στηρίχτηκε στο παραπάνω πείραμα αλλά με υψηλότερα ποσοστά υποκατάστασης (20%, 40% και 60%), τα αποτελέσματα ήταν εξίσου αισιόδοξα αφού το ήπαρ των ψαριών δεν υπέστη κάποια σημαντική ζημιά (Kokou *et al.* 2015). Μόνο όταν το ποσοστό υποκατάστασης

άγγιξε το 60% παρατηρήθηκε συσσώρευση λίπους στα ηπατοκύτταρα και αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας.

Υποκατάσταση ιχθυάλευρου με σογιάλευρο δοκιμάστηκε και στο είδος *Carassius auratus gibelio* σε ποσοστά 20%, 40%, 60%, 80% και 100% όμως στο ποσοστό 20% καθώς και στην πλήρη αντικατάσταση (100%) παρατηρήθηκαν ηπατοκύτταρα τα οποία είχαν υποστεί απόπτωση (Liu *et al.* 2015). Με αντίστοιχο τρόπο έγινε δοκιμή και για άλευρο από λούπινο στη διατροφή της τσιπούρας (*S. aurata*) σε ποσοστά 10%, 20% και 30%. Τα περισσότερα ιστολογικά δείγματα έδιναν μια εικόνα υγιούς ήπατος, διότι έμοιαζαν με αυτά του σιτηρεσίου-μάρτυρα. Ασήμαντος αριθμός λιποσταγονιδίων και μείωση της συγκέντρωσης γλυκογόνου παρατηρήθηκε στα ποσοστά 20% και 30%, ενώ από το σύνολο των αποτελεσμάτων της έρευνας προέκυψε ότι το συγκεκριμένο συστατικό μετά από κατάλληλη επεξεργασία θα μπορούσε να αποτελέσει μια καλή πηγή πρωτεΐνης (Robaina *et al.* 1995). Από την άλλη, έρευνα επάνω στο ίδιο είδος ψαριού δοκίμασε τη χρήση ενός μείγματος από πρωτεΐνη ρυζιού και πρωτεΐνη μπιζελιού σε ποσοστά 30, 60 και 90%. Τα δείγματα που εξετάστηκαν και κυρίως αυτά που είχαν ταϊστεί με τροφές που το ποσοστό υποκατάστασης έφτανε το 60-90%, εμφάνισαν μετατοπισμένους πυρήνες και έντονα κενोटόπια, με μικρότερη συχνότητα εμφάνισης στα χαμηλότερα ποσοστά. Ενώ έντονη ήταν και η συσσώρευση λίπους για το ανώτερο ποσοστό (Baeza – Agi~no *et al.* 2016).

Επιπλέον μελέτες που αφορούσαν κύρια εκτρεφόμενα είδη όπως τον μπακαλιάρo του Ατλαντικού (*Gadus morhua*) και το σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*) είχαν εξίσου θετικά αποτελέσματα, ως προς τη χρήση πρώτων υλών φυτικής προέλευσης στη διατροφή τους. Συγκεκριμένα αποδείχτηκε ότι ο μπακαλιάρo του

Ατλαντικού (*G. morhua*) μπορεί να τραφεί με σιτηρέσια που περιέχουν μέχρι και 440 g/kg μείγματος από το συνδυασμό είτε γλουτένης καλαμποκιού με σογιάλευρο, είτε γλουτένης σίτου με συμπλήρωμα από πρωτεΐνη σόγιας, χωρίς αυτό να έχει επιπτώσεις στο ήπαρ του (Hansen *et al.* 2006). Για το σολομό του Ατλαντικού (*S. salar*) η υποκατάσταση ιχθυαλεύρου με μείγμα από πρωτεΐνη μπιζελιού, πρωτεΐνη σόγιας και εκχύλισμα ηλίανθου δεν οδήγησε στην εμφάνιση υψηλού αριθμού κενοτοπίων στο κυτταρόπλασμα, ούτε σε στεάτωση του ήπατος των ψαριών που συμμετείχαν στο πείραμα. Η μοναδική διαφορά, συγκριτικά με το ήπαρ των ψαριών που ταΐστηκαν με το σιτηρέσιο-μάρτυρα, ήταν η αύξηση του συσσωρευμένου λίπους στο ήπαρ, αλλά σε μικρό βαθμό (Hartviksen *et al.* 2014).

1.6 Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα έρευνα επικεντρώθηκε στην ιστολογική εξέταση του ήπατος από τσιπούρες (*S. aurata*), οι οποίες στα πλαίσια πειραματικής εκτροφής διατράφηκαν με σιτηρέσια όπου πραγματοποιήθηκε υποκατάσταση ιχθυαλεύρου, με άλευρο προερχόμενο από το μικροφύκος *C. vulgaris*. Το ήπαρ εξετάστηκε για τυχόν ιστολογικές αλλοιώσεις, καθώς και για τη σημαντικότητα αυτών, λόγω διατροφικού παράγοντα. Σκοπός της μελέτης ήταν να εξακριβωθεί εάν και κατά πόσο η συγκεκριμένη εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης είναι κατάλληλη να συμπεριληφθεί ως συστατικό στις ιχθυοτροφές. Διότι οποιαδήποτε σοβαρή ιστολογική βλάβη στο ήπαρ και κατ' επέκταση, δυσλειτουργία αυτού, μπορεί να είναι η αρχή για περεταίρω επιπτώσεις στην υγεία και ανάπτυξη των εκτρεφόμενων ατόμων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψίες

Για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 48 ιχθύες του είδους *S. aurata* μέσου βάρους 15-20 g τα οποία προήλθαν από διατροφικό πείραμα, διάρκειας 12 εβδομάδων. Στο διάστημα της εκτροφής τα ψάρια ήταν χωρισμένα σε 4 διαφορετικές διατροφικές ομάδες και σε κάθε μια από αυτές χορηγήθηκε σιτηρέσιο που η σύσταση διέφερε ως προς το ποσοστό υποκατάστασης του ιχθυαλεύρου (FM) με άλευρο από μικροφύκος του είδους *C. vulgaris* (CM). Συγκεκριμένα, το σιτηρέσιο που αντιστοιχούσε στην ομάδα FM αποτέλεσε το σιτηρέσιο-μάρτυρα, στο οποίο η αποκλειστική πηγή ζωικής πρωτεΐνης ήταν το ιχθυάλευρο (FM). Οι ομάδες CM10, CM20 και CM30 διατράφηκαν με σιτηρέσια στα οποία έγινε υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου του σιτηρεσίου-μάρτυρα κατά 10%, 20% και 30%, αντίστοιχα. Όλα τα σιτηρέσια ήταν καταρτισμένα με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι ισοενεργειακά (21 MJ/Kg) και ισοπρωτεϊνικά (52 % της τροφής) (Πιν. 1). Μετά τη λήξη της περιόδου εκτροφής ακολούθησε τυχαία επιλογή 48 δειγμάτων, 12 ανά διατροφική ομάδα για τις ανάγκες της ιστολογικής μελέτης. Τα δείγματα αφού απομακρύνθηκαν από τις δεξαμενές εκτροφής με απόχη, θανατώθηκαν παρατείνοντας την παραμονή τους στο αναισθητικό αυξανόμενης δοσολογίας (φαινοξυαιθανόλη συγκέντρωσης 0,10 ml/L) και τοποθετήθηκαν άμεσα σε πάγο. Τη διαδικασία ευθανασίας των δειγμάτων ακολούθησαν, αρχικά η μέτρηση του βάρους τους σε ζυγό ακριβείας 2 δεκαδικών ψηφίων (0,01 g) και έπειτα η μέτρηση του μήκους τους σε ιχθυόμετρο (ακρίβεια 0,1 cm). Τέλος πραγματοποιήθηκε τομή στην κοιλιακή χώρα με σκοπό την απομόνωση και ζύγιση του ήπατος.

Πίνακας 1. Σύσταση σε πρώτες ύλες και θρεπτική σύσταση των σιτηρεσιών.

Συστατικά/τροφές	FM	CM10	CM20	CM30
Σύσταση σε πρώτες ύλες (%)				
<i>Chlorella</i> , άλευρο	0,00	6,35	12,70	19,00
Ιχθυάλευρο	53,70	48,35	42,95	37,60
Σιτάρι	10,40	10,44	10,54	10,67
Γλουτένη καλαμποκιού	24,50	24,30	24,10	23,90
Ιχθυέλαιο	10,60	9,60	8,60	7,55
Βιταμίνες & ανόργανα στοιχεία	0,30	0,30	0,30	0,30
Φωσφορικό μονοασβέστιο	0,30	0,30	0,30	0,30
Βιταμίνη C	0,10	0,10	0,10	0,10
Βιταμίνη E	0,10	0,10	0,10	0,10
Λυσίνη	0,00	0,12	0,23	0,35
Μεθειονίνη	0,00	0,04	0,08	0,13
Θρεπτική σύσταση				
Υγρασία (%)	6,63	6,63	6,64	6,65
Ξηρά Ουσία (%)	93,37	93,37	93,36	93,35
Ολικές Πρωτεΐνες (%)	52,01	52,02	52,01	52,02
Ολικά Λίπη (%)	16,02	15,32	14,61	13,86
Υδατάνθρακες (%)	13,62	14,98	16,39	17,81
Ινώδεις Ουσίες (%)	0,38	1,15	1,92	2,68
Τέφρα (%)	11,48	10,76	10,04	9,32
Ενέργεια (KJ/g)	21,05	21,07	21,09	21,10
EPA (%)	0,74			
DHA (%)	1,31			

2.2 Ιστολογική τεχνική

2.2.1 Μονιμοποίηση του ιστού

Οι ιστοί μετά την εξαγωγή τους τοποθετήθηκαν άμεσα σε ειδικά πλαστικά δοχεία (χωρητικότητας 25 ml) που περιείχαν ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 10%, η ποσότητα του οποίου ήταν περίπου τριπλάσια του όγκου των δειγμάτων ιστού. Έπειτα τα πλαστικά δοχεία σημάνθηκαν με τον κωδικό του κάθε δείγματος και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (-20 °C) μέχρι τη στιγμή της ιστολογικής τους εξέτασης.

2.2.2 Αφυδάτωση, καθαρισμός (διαύγαση) και εμποτισμός ιστού με παραφίνη

Μετά την επιτυχή μονιμοποίηση των ιστών ακολούθησε η επεξεργασία τους σε ειδικό σύστημα επεξεργασίας ιστών που καλείται ιστοκινέτα (Εικ. 4). Στη συγκεκριμένη συσκευή οι ιστοί πέρασαν αυτόματα από τα στάδια της αφυδάτωσης, της διαύγασης και του εμποτισμού με παραφίνη έπειτα από ρύθμιση της συσκευής στο πρόγραμμα που επιλέχθηκε, συνολικής διάρκειας 19 ωρών. Συγκεκριμένα οι κασετίνες που περιείχαν τους μονιμοποιημένους ιστούς τοποθετήθηκαν εντός του ειδικού εξαρτήματος (καλάθι) της συσκευής, με το οποίο έγινε δυνατή η ταυτόχρονη εμβάπτιση όλων των ιστών σε μια σειρά από χημικές ουσίες (Πιν. 2).



Εικόνα 4. Εργαστηριακή ιστοκινέτα (Leica TP 1020).

Πιο αναλυτικά κατά το πρώτο στάδιο της διαδικασίας τα δείγματα βυθίστηκαν διαδοχικά σε βαθμιαία σειρά υδατικών διαλυμάτων αιθανόλης, συγκεντρώσεων 70%, 80%, 95% και 100% (κατά αύξοντα αριθμό) προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή αφυδάτωση τους. Αρχικά τοποθετήθηκαν στο διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 70% όπου παρέμειναν για μια ώρα. Έπειτα πέρασαν στο δεύτερο δοχείο της συσκευής που περιείχε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 80% όπου παρέμειναν βυθισμένα για άλλη μια ώρα. Μετά το πέρας αυτού του διαστήματος μπήκαν σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 95% για μία ώρα και κατόπιν για δύο ώρες σε νέο διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 95%. Στη συνέχεια βαπτίστηκαν σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 100% πρώτα για μία ώρα και μετά απευθείας για άλλη μια ώρα σε νέο διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 100%. Τέλος για την ολοκλήρωση της διαδικασίας αφυδάτωσης βυθίστηκαν για διάστημα δύο ωρών σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 100%.

Κατά το δεύτερο στάδιο, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ξυλόλη, όπου πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές πλύσεις έτσι ώστε να καθαριστούν οι ιστοί από την αλκοόλη. Το πρώτο λουτρό των προς εξέταση ιστών σε ξυλόλη διήρκησε δύο ώρες και η διαδικασία συνεχίστηκε με την επανάληψη του λουτρού για άλλες δύο ώρες σε νέα ξυλόλη. Τέλος πραγματοποιήθηκε ο εμποτισμός των ιστών με παραφίνη, όπου τα δείγματα αρχικά επί δύο ώρες βρισκόντουσαν μέσα σε δοχείο με υγρή παραφίνη και έπειτα βυθίστηκαν εκ νέου σε δοχείο με παραφίνη για τέσσερις επιπλέον ώρες μέχρι την ολοκλήρωση και του τελευταίου σταδίου.

Κατά τη διάρκεια της όλης διαδικασίας στην ιστοκινέτα πραγματοποιούνταν ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε τα διαλύματα αιθανόλης να

διδυσούν ευκολότερα στον ιστό του δείγματος. Με ήπια περιοδική ανακίνηση η διαδικασία επιταχύνονταν, ενώ επίσης εξασφαλιζόνταν η ομοιογενής επεξεργασία των δειγμάτων. Για αυτό το λόγο, η ιστοκινέτα ρυθμίστηκε ώστε η ανάδευση των δειγμάτων να γίνεται αυτόματα και σε όλα τα στάδια.

Πίνακας 2. Πρωτόκολλο ιστοκινέτας.

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

2.2.3 Έγκλειση του ιστού σε παραφίνη

Μετά τη λήξη του προγράμματος λειτουργίας της ιστοκινέτας οι πλαστικές κασετίνες αφαιρέθηκαν από τη συσκευή και μεταφέρθηκαν μέσα σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως που περιείχε παραφίνη σε θερμοκρασία 60 °C, προς αποφυγή πήξης της ήδη υπάρχουσας παραφίνης που είχε παραμείνει από την προηγούμενη διαδικασία του εμποτισμού. Στη συνέχεια ακολούθησε σκλήνωση των δειγμάτων χειροκίνητα, προκειμένου να διατηρηθούν οι ιστοί στην ολότητα τους. Αναλυτικότερα κάθε κασετίνα ανοίχτηκε και με τη βοήθεια λαβίδας έγινε εξαγωγή και τοποθέτηση του ιστού

σε ειδικό μεταλλικό καλούπι, σε κάθε ένα από τα οποία προστέθηκε υγρή παραφίνη (Εικ. 5).



Εικόνα 5. Σκλήνωση του ιστού μέσα σε μεταλλικά καλούπια.

Ακολούθησε μεταφορά των δειγμάτων σε ψυχρή πλάκα για στερεοποίηση της παραφίνης και σταθεροποίηση του ιστού, έπειτα αφαιρέθηκε το καλούπι και έμειναν οι σχηματισμένοι κύβοι παραφίνης με τον εγκλεισμένο ιστό οι οποίοι τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη για να παγώσει καλύτερα η παραφίνη.

2.2.4 Ιστολογική τομή

Αφού έγινε ο εγκλεισμός του ιστού και στερεοποιήθηκε καλά η παραφίνη, στη συνέχεια οι κύβοι παραφίνης τοποθετήθηκαν κάθετα στην ειδική υποδοχή της μικροτόμου ρυθμισμένη στα 5μm για την εξαγωγή εγκάρσιων τομών ήπατος. Πριν ξεκινήσει το κόψιμο καθαρίστηκε πολύ προσεκτικά η λεπίδα της μικροτόμου με ξυλόλη για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων παραφίνης από προηγούμενη χρήση και έπειτα ξεκίνησε η διεξαγωγή διαδοχικών τομών σε συνεχή επανάληψη έως ότου αυτές να πάρουν τη μορφή λεπτής και ομοιόμορφης σειράς ιστολογικών τομών (Εικ. 6). Ακολούθησε εισαγωγή τους σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 40 °C και επικόλληση αυτών που



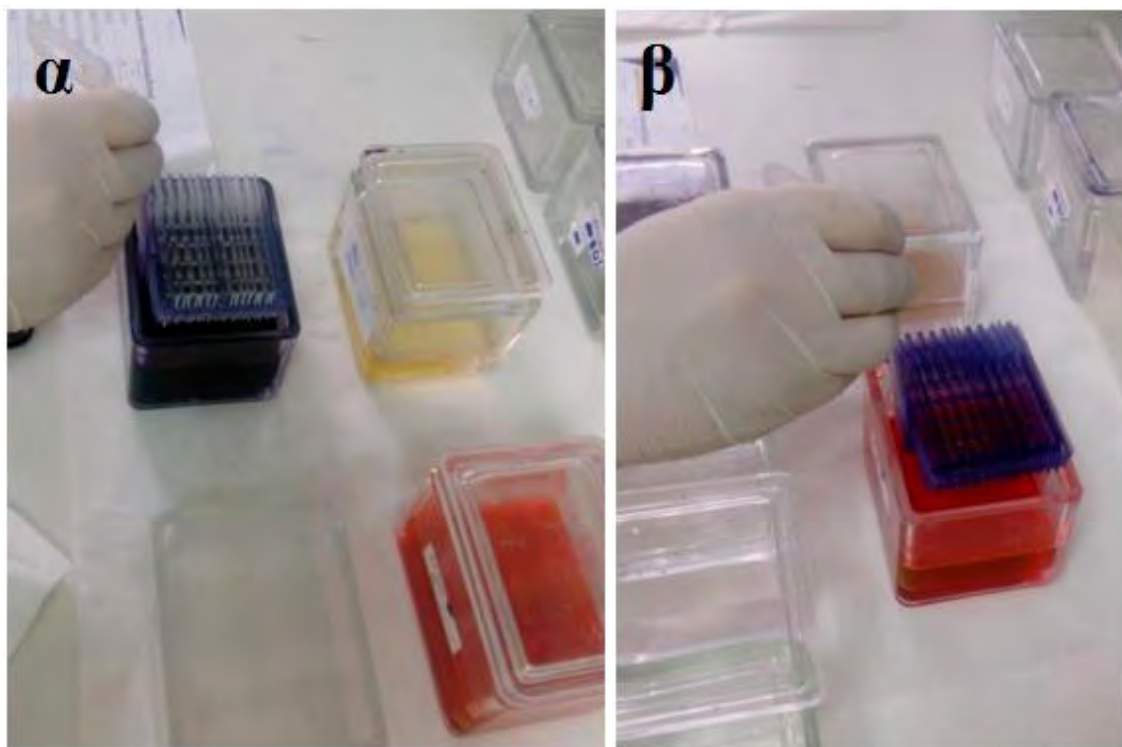
Εικόνα 6. α) μικροτόμος (SLEE MAINZ CUT 5062) β) υδατόλουτρο.

θεωρήθηκαν κατάλληλες σε αντικειμενοφόρες πλάκες, όπου επάνω αναγράφονταν ο κωδικός του κάθε δείγματος. Τέλος για την επιπεδοποίηση των τομών και την εξάτμιση του νερού οι αντικειμενοφόρες τοποθετήθηκαν επάνω σε θερμαινόμενη πλάκα για όσο χρόνο αυτό θεωρήθηκε απαραίτητο.

2.2.5 Αποπαραφίνωση και χρώση

Η συγκεκριμένη διαδικασία χρειάστηκε να επαναληφθεί αρκετές φορές προκειμένου να πραγματοποιηθεί αποπαραφίνωση και χρώση όλων των δειγμάτων. 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 (Πιν. 3).

Κατά το στάδιο της αποπαραφίνωσης τα δείγματα βυθίστηκαν διαδοχικά στα δύο πρώτα δοχεία που περιείχαν ξυλόλη για διάστημα δεκαπέντε λεπτών στο καθένα. Έπειτα εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 100% για δύο λεπτά και ακολούθησε επανάληψη αυτού του βήματος σε νέο διάλυμα αιθανόλης ίδιας συγκέντρωσης. Στη συνέχεια ακολούθησε το στάδιο της ενυδάτωσης κατά το οποίο η θήκη με τα δείγματα τοποθετήθηκε αρχικά σε 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.



Εικόνα 7. α) δοχείο χρώσης με αιματοξυλίνη β) δοχείο χρώσης με ηωσίνη.

Μετά την ενυδάτωση, ακολούθησε 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 την ολοκλήρωση της διαδικασίας χρώσης τοποθετήθηκαν στην ηωσίνη για τρία λεπτά και μετά το πέρας αυτού του χρόνου ξανά ξεπλύθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης για τριάντα δευτερόλεπτα (Εικ. 7).

Εν συνεχεία, προκειμένου τα δείγματα να υποστούν αφυδάτωση έγινε εισαγωγή τους σε μια σειρά από διαλύματα αιθανόλης διαφορετικών συγκεντρώσεων (70%, 80%, 90% και 100%).

Πίνακας 3. Πρωτόκολλο χρώσης αιματοξυλίνης – ηωσίνης.

α/α		ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΣΤΑΔΙΟΥ	ΣΤΑΔΙΟ
1	Ξυλόλη	15 min	ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗ
2	Ξυλόλη	15 min	
3	Αιθανόλη 100%	2 min	ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ
4	Αιθανόλη 100%	2 min	ΞΥΛΟΛΗΣ
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	

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. Τέλος 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.

2.2.6 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.

2.2.7 Μελέτη των ιστολογικών τομών στο οπτικό μικροσκόπιο

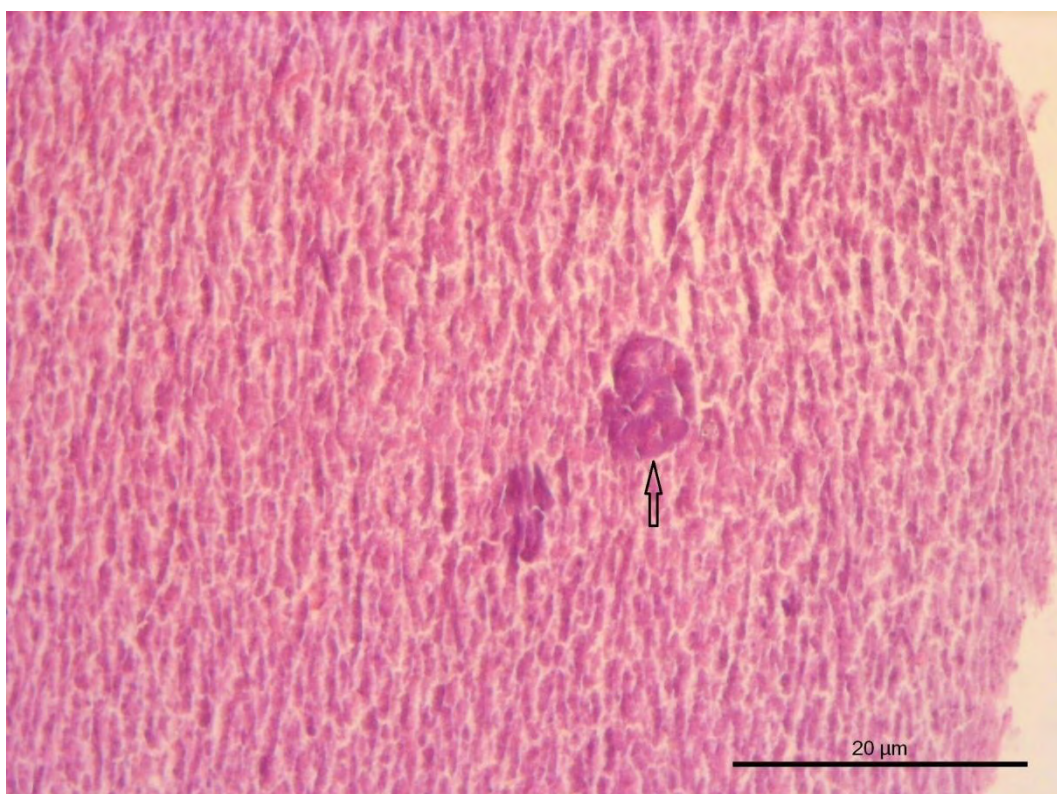
Μετά την ολοκλήρωση της εξαγωγής και επεξεργασίας των ιστολογικών τομών ήπατος, ακολούθησε η μελέτη τους σε οπτικό μικροσκόπιο (Bresser Science TRM 301) σε μεγέθυνση X10, X40. Οι απεικονίσεις κάθε παρασκευάσματος φωτογραφήθηκαν μέσω ειδικής προσαρμοσμένης στο μικροσκόπιο ψηφιακής κάμερας (Bresser Mikro Cam 5.0 MP).

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. Με σκοπό λοιπόν την εκτίμηση της ακεραιότητας του ορίστηκε μια βαθμονομημένη κλίμακα από το μηδέν έως το τρία (0-3) σύμφωνα με την οποία ο αριθμός μηδέν (0) αντιστοιχούσε σε φυσιολογική μορφολογία του ήπατος, ο αριθμός ένα (1) αντιστοιχούσε σε ήπαρ με παρουσία ελάχιστων αλλοιώσεων συγκριτικά με το σιτηρέσιο-μάρτυρα, ο αριθμός δύο (2) αντιστοιχούσε σε ήπαρ με αισθητές αλλοιώσεις μεσαίας έντασης, ενώ ο αριθμός τρία (3) αντιστοιχούσε σε ήπαρ με σημαντικές και έντονες παθολογικές αλλοιώσεις ή ήπαρ που είχε εκφυλιστεί (Baeza – Ari~no *et al.* 2016).

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 κενοτοπίων 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. Να σημειωθεί ότι στις περιπτώσεις παρουσίας παγκρεατικών νησιδίων πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της μορφής αυτών (φυσιολογική ή μη).

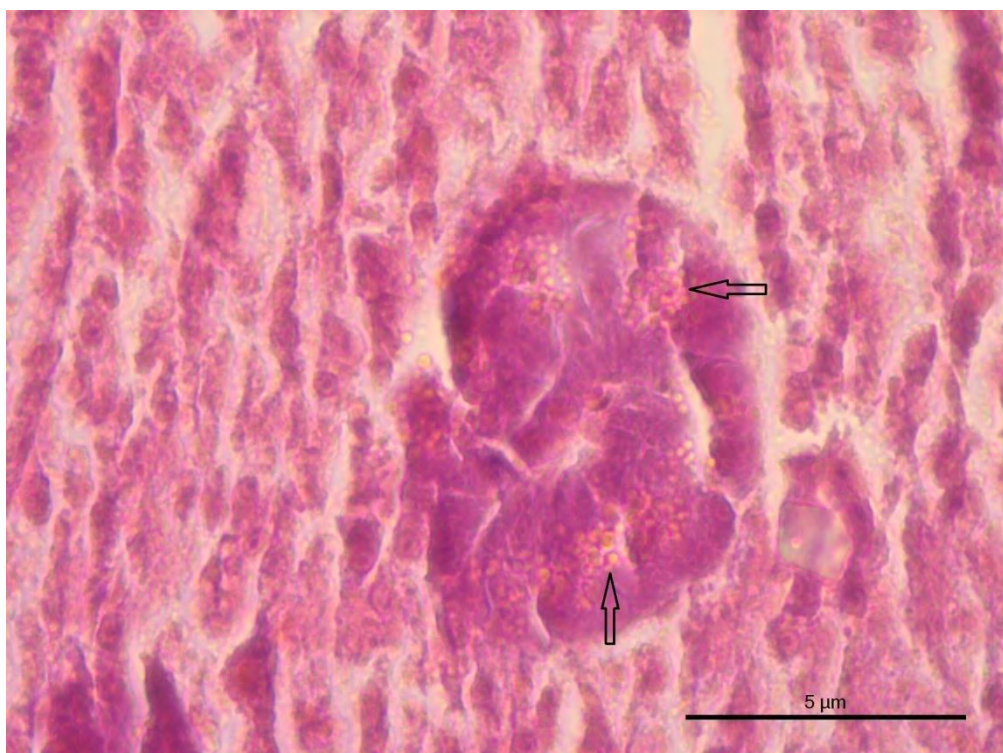
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα ψάρια που ανήκαν στην πρώτη διατροφική ομάδα όπου χρησιμοποιήθηκε το σιτηρέσιο-μάρτυρας (FM), δεν εμφάνισαν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις ήπατος (Εικ. 8). Το ηπατικό παρέγχυμα που μελετήθηκε στο οπτικό μικροσκόπιο, για τα δείγματα αυτής της ομάδας (FM-1, FM-2, FM-3, FM-4, FM-5, FM-6, FM-7, FM-8, FM-9, FM-10, FM-11, FM-12) παρουσίασε ηπατοκύτταρα με σφαιρικούς πυρήνες τοποθετημένους κεντρικά, χωρίς καμία αλλοίωση του σχήματος τους, και ευδιάκριτο πυρηνίσκο.



Εικόνα 8. Φυσιολογικός ιστός ήπατος χωρίς καμία παθολογική ένδειξη, από ψάρι της πρώτης διατροφικής ομάδας (σιτηρέσιο – μάρτυρα), με διακριτό παγκρεατικό νησίδιο.

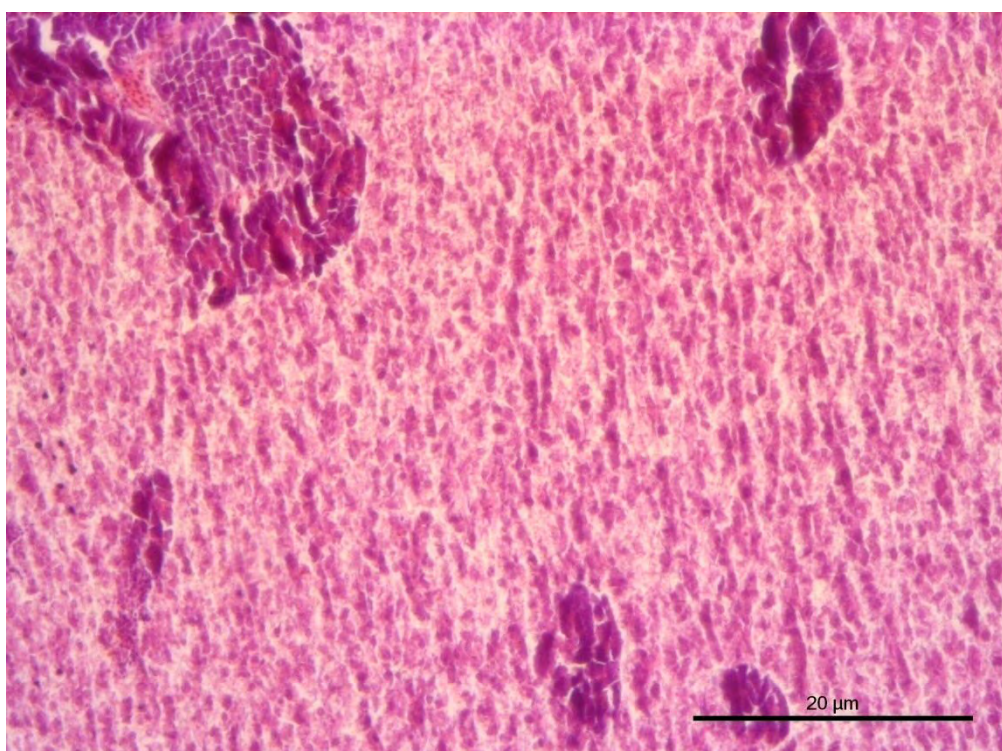
Επιπλέον εντοπίστηκαν παγκρεατικά νησίδια στο ηπατικό παρέγχυμα με διακριτά εκκριτικά προενζυμικά κοκκία (Εικ. 9), μια αναμενόμενη παρατήρηση αφού τα ψάρια ήταν σε ασιτία για μια ημέρα, πριν την ευθανασία τους. Σύμφωνα με την κλίμακα που ορίστηκε για να περιγράψει την ιστολογική κατάσταση των δειγμάτων, στην προκειμένη περίπτωση αυτή χαρακτηρίζεται φυσιολογική (τιμή στην κλίμακα $\rightarrow 0$).



Εικόνα 9. Παγκρεατικό νησίδιο με εκκριτικά προενζυμικά κοκκία.

Στη δεύτερη διατροφική ομάδα όπου χρησιμοποιήθηκε σιτηρέσιο με το χαμηλότερο ποσοστό υποκατάστασης 10% (CM10), οι ιστολογικές τομές που λήφθηκαν και μελετήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο εμφάνισαν αποτελέσματα, όμοια

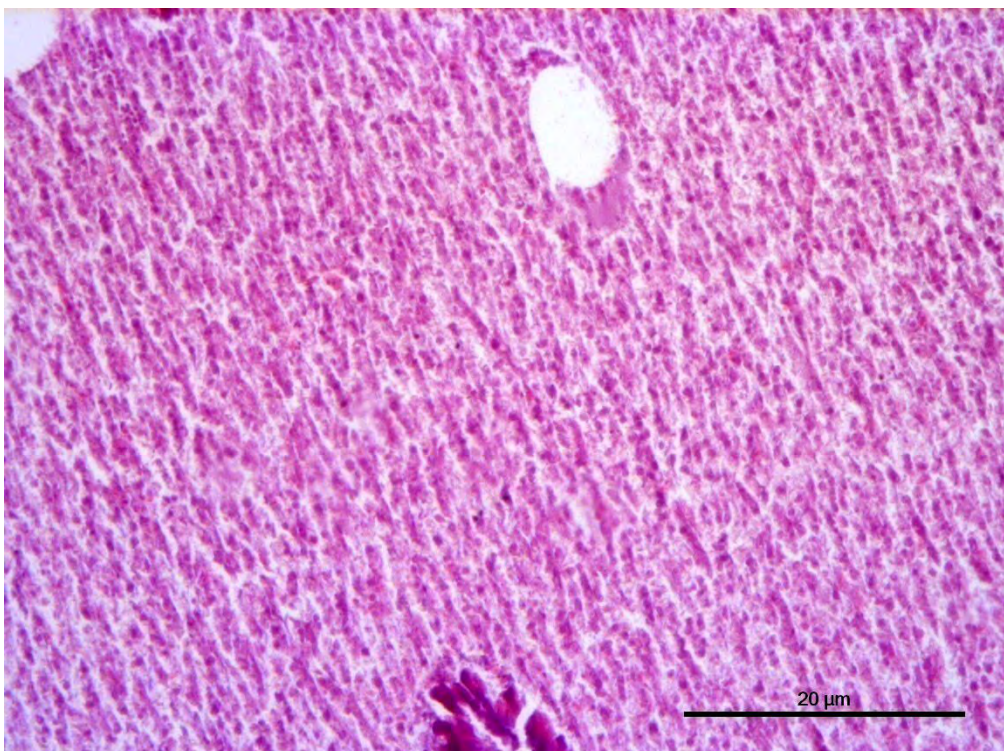
με αυτά που αντιστοιχούσαν στην πρώτη διατροφική ομάδα. Πιο συγκεκριμένα στο σύνολο των δειγμάτων (CM10-1, CM10-2, CM10-3, CM10-4, CM10-5, CM10-6, CM10-7, CM10-8, CM10-9, CM10-11, CM10-12) η πλειοψηφία των ηπατοκυττάρων που εξετάστηκαν δεν εμφάνισε μετατοπισμένους πυρήνες και η γενικότερη εικόνα του ιστού ήταν καλή, χωρίς την παρουσία κοκκιωμάτων και αιμορραγιών.



Εικόνα 10. Δείγμα τομής ήπατος με τον αριθμό 7 από τη διατροφική ομάδα CM10 (CM10-7). Απεικόνιση φυσιολογικού ιστού.

Οι πυρήνες ήταν ευδιάκριτοι, κεντρικοί, μη πεπλατυσμένοι, με ύπαρξη πυρηνίσκου, ενώ ο αριθμός των λιποσταγονιδίων που παρατηρήθηκαν ήταν ελάχιστος και η παρουσία τους θεωρήθηκε φυσιολογική. Η αξιολόγηση της κατάστασης του

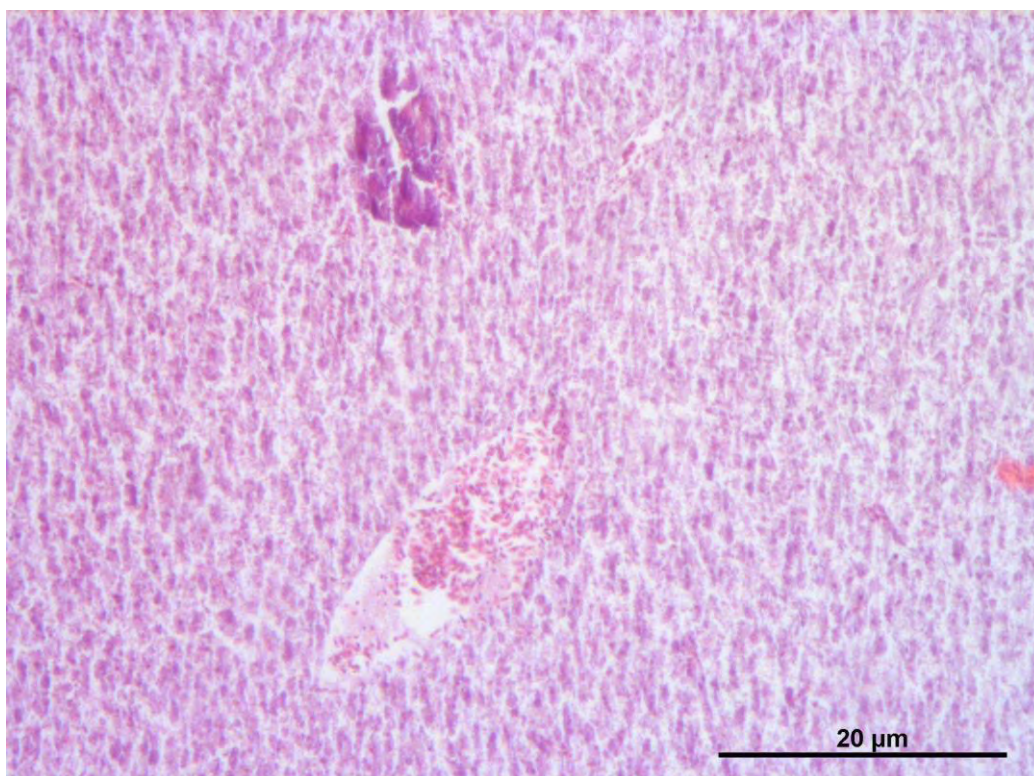
ηπατικού παρεγχύματος ήταν καλή, χωρίς την παρουσία ιστοπαθολογικών ευρημάτων (Εικ. 10, Εικ. 11). Σύμφωνα με την κλίμακα που ορίστηκε για να περιγράψει την ιστολογική κατάσταση των δειγμάτων, αυτή ήταν ανάλογη της φυσιολογικής (τιμή στην κλίμακα $\rightarrow 0$).



Εικόνα 11. Δείγμα τομής ήπατος με τον αριθμό 11 από την διατροφική ομάδα CM10 (CM10-11). Απεικόνιση φυσιολογικού ιστού.

Στην τρίτη διατροφική ομάδα, όπου στην τροφή που χρησιμοποιήθηκε έλαβε χώρα υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου της τάξης του 20%, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ιστολογική ανάλυση δεν απείχαν πολύ από αυτά των δύο πρώτων ομάδων. Στα δείγματα αυτής της ομάδας (CM20-1, CM20-2, CM20-3, CM20-4, CM20-

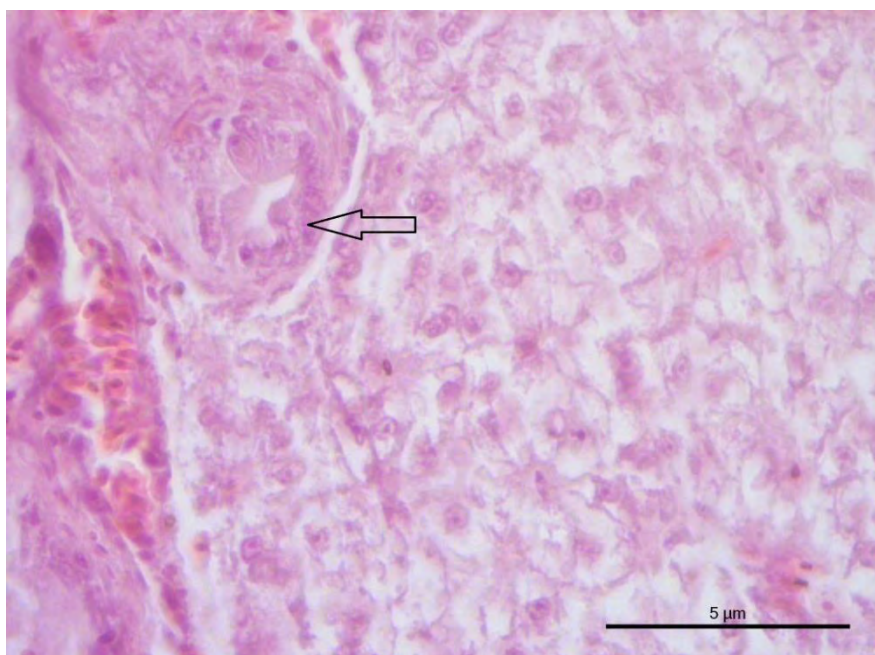
5, CM20-6, CM20-7, CM20-8, CM20-9, CM20-10, CM20-11, CM20-12) οι πυρήνες των ηπατοκυττάρων στην πλειοψηφία τους εμφανιζόντουσαν στο κέντρο, με ορατούς πυρηνίσκους και το σχήμα τους να έχει παραμείνει σφαιρικό (Εικ. 12). Στα παγκρεατικά νησίδια ήταν εμφανή τα εκκριτικά προενζυμικά κοκκία στα κυψελοειδή κύτταρα.



Εικόνα 12. Φυσιολογικός ιστός ήπατος χωρίς καμία παθολογική ένδειξη, από ψάρι της τρίτης διατροφικής ομάδας (CM20).

Σε όλα τα δείγματα της συγκεκριμένης διατροφικής ομάδας παρατηρήθηκαν λιποσταγονίδια σε ποικίλα μεγέθη (κυρίως μικρά) με ανομοιόμορφη κατανομή αυτών στην έκταση της ιστολογικής τομής (Εικ. 13). Βέβαια ο αριθμός τους, αν και μεγαλύτερος συγκριτικά με αυτόν που παρατηρήθηκε στα δείγματα από τη δεύτερη

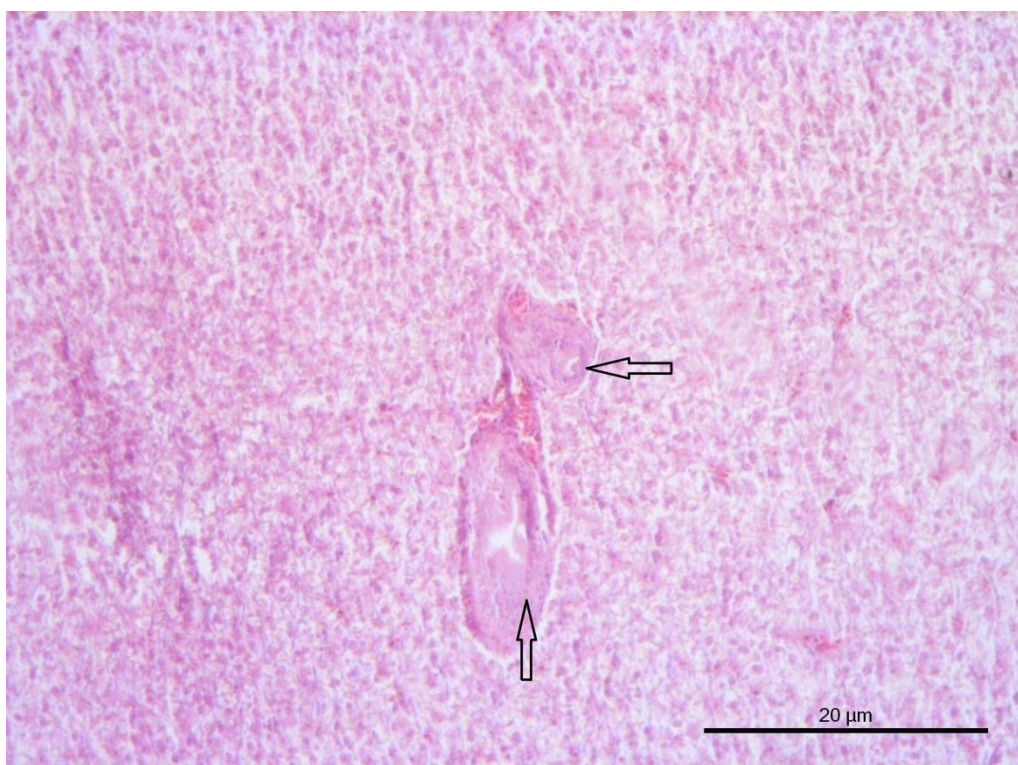
διατροφική ομάδα, δεν ήταν ανησυχητικά μεγάλος και η παρουσία τους θεωρήθηκε φυσιολογική, αφού δεν οδήγησε σε κάποια παθολογική κατάσταση. Επιπλέον σε δύο χοληφόρους πόρους που εντοπίστηκαν στο δείγμα με τον αριθμό 4 (CM20-4) παρατηρήθηκε υπερπλασία των τοιχωμάτων τους (bile duct proliferation), μια κατάσταση που θεωρήθηκε μη αξιολογήσιμη (Εικ. 13, Εικ. 14).



Εικόνα 13. Υπερπλασία χοληφόρου πόρου και παρουσία λιποσταγονιδίων.

Σε γενικές γραμμές η εικόνα των δειγμάτων ήταν καλή, εξαιρουμένου του προαναφερθέντος δείγματος. Σύμφωνα με την κλίμακα που ορίστηκε η αξιολόγηση των δειγμάτων αυτής της διατροφικής ομάδας κρίνεται φυσιολογική (τιμή στην κλίμακα →0).

Στην τελευταία διατροφική ομάδα με το υψηλότερο ποσοστό υποκατάστασης 30%, τα δείγματα που εξετάστηκαν (CM30-1, CM30-2, CM30-3, CM30-4, CM30-5, CM30-6, CM30-6, CM30-7, CM30-8, CM30-9, CM30-10, CM30-11, CM3012) στο σύνολο τους εμφάνισαν ορατούς σφαιρικούς πυρήνες, οι οποίοι βρισκόντουσαν τοποθετημένοι στο κέντρο των κυττάρων και διέθεταν εμφανή πυρηνίσκο (Εικ. 15). Σημειώθηκε παρουσία λιποσταγονιδίων σε λίγο μεγαλύτερη ένταση συγκριτικά με τα δείγματα των προηγούμενων διατροφικών ομάδων, όχι όμως σε βαθμό που να ξεπερνάει το φυσιολογικό.



Εικόνα 14. Δύο χοληφόροι πόροι με υπερπλασία των τοιχωμάτων τους.

Σύμφωνα με την κλίμακα που ορίστηκε η κατάσταση των δειγμάτων αυτής της διατροφικής ομάδας, σε γενικές γραμμές ήταν φυσιολογική (τιμή στην κλίμακα $\rightarrow 0$). Μόνο δύο από τα δείγματα ιστού, σε αυτό με τον αριθμό 11 (CM30-11) παρατηρήθηκε αυτόλυση ιστού και στο δείγμα με τον αριθμό 12 (CM30-12) έγινε η ίδια παρατήρηση απλά μικρότερης έντασης.



Εικόνα 15. Φυσιολογικός ιστός ήπατος χωρίς καμία παθολογική ένδειξη, από ψάρι της τέταρτης διατροφικής ομάδας (CM30).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προκειμένου τα μικροφύκη να μπορέσουν να ενταχθούν άφοβα στη βιομηχανία παρασκευής ιχθυοτροφών, ως εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης, προέχει να εξασφαλιστεί η καταλληλότητα τους όσον αφορά τη σωστή ανάπτυξη και την καλή υγεία των οργανισμών, για τους οποίους προορίζονται. Η επιλογή τους ως υποκατάστατο του ιχθυαλεύρου, αποτελεί ένα σχετικά νέο αντικείμενο μελέτης για την επιστημονική κοινότητα. Από τα πειράματα που έχουν γίνει μέχρι στιγμής, φαίνεται πως τα θέματα που απασχόλησαν περισσότερο έχουν να κάνουν με τη χρήση διαφόρων ειδών μακροφυκών και μικροφυκών, στη διατροφή ποικίλων ειδών υδρόβιων εκτρεφόμενων οργανισμών, για την εξακρίβωση των όποιων επιπτώσεων αυτά μπορεί να έχουν και με τι αυτές μπορεί να σχετίζονται.

Σε διατροφικό πείραμα που έγινε στον κέφαλο (*Mugil cephalus*), εντός του σιτηρεσίου του χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστά τα είδη *Ulva lactuca* και *Caulerpa prolifera*, σε ποσοστά 10%, 20% και 30%. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα είδη αυτά μπορούν να συμπεριληφθούν στη διατροφή του *M. cephalus* σε ποσοστό μέχρι 20%, χωρίς να επηρεαστεί η συνολική κατανάλωση τροφής και η ανάπτυξη των ψαριών. Ειδικά όσον αφορά το *C. prolifera* για τα ποσοστά 10% και 20%, τα αποτελέσματα ήταν πολύ κοντά σε αυτά από το σιτηρέσιο-μάρτυρα και έδειξαν υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης, συγκριτικά με τα αποτελέσματα των υπόλοιπων διατροφικών ομάδων. Συμπερασματικά το *C. prolifera* θα μπορούσε να αποτελέσει συστατικό στη διατροφή του συγκεκριμένου ψαριού, επειδή βελτιώνει τη θρεπτική σύσταση της τροφής, προσφέρει καλή ανάπτυξη, ενισχύει τη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA και αναστέλλει την εκδήλωση ασθενειών (Abu Zinadah *et al.* 2013).

Στα πλαίσια άλλης έρευνας, στη διατροφή ιχθυδίων τσιπούρας (*S. aurata*), έγινε υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου με το μικροφύκος *Scenedesmus almeriensis* σε ποσοστά 12%, 20%, 25% και 39%. Σκοπός ήταν ο έλεγχος της ανάπτυξης, της σύστασης του σώματος και της λειτουργίας του εντέρου των εκτρεφόμενων ιχθυδίων. Από την εξέταση των αποτελεσμάτων, γενικά δεν παρατηρήθηκε αρνητική επίδραση για κάποιο από τα παραπάνω σημεία, στα οποία επικεντρώθηκε η συγκεκριμένη μελέτη. Μάλιστα εντοπίστηκε αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα και απορροφητική επιφάνεια του εντέρου για όλες τις διατροφικές ομάδες. Βέβαια η υποκατάστασης της τάξης του 20% αποδείχτηκε αποτελεσματικότερη συγκριτικά με τις υπόλοιπες και με μικρές διαφορές από το σιτηρέσιο-μάρτυρα. Αυτό δικαιολογείται με τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης και τον συντελεστή αποδοτικότητας πρωτεϊνών που έτειναν να είναι υψηλότεροι, καθώς και από την υψηλότερη απορροφητική ικανότητα τόσο στο πρόσθιο όσο και στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου. Επομένως προέκυψε ότι η παραπάνω υποκατάσταση είναι εφικτή στη διατροφή της τσιπούρας (*S. aurata*) στο συγκεκριμένο στάδιο ανάπτυξης της, και ειδικά σε ποσοστό της τάξης του 20% έχει πολύ θετική επίδραση κυρίως στη λειτουργία του εντέρου. (Vizcaínoa *et al.* 2014).

Όσον αφορά τη γλωρέλλα (*C. vulgaris*), σύμφωνα με αποτελέσματα μελέτης που πραγματοποιήθηκε με στόχο να εξετάσει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, το συντελεστή μετατρεψιμότητας τροφής, το συντελεστή αποδοτικότητας πρωτεϊνών και τους σωματομετρικούς δείκτες, αποδείχθηκε καλή πηγή πρωτεΐνης για το είδος *Clarias gariepinus*. Τα ποσοστά υποκατάστασης που έλαβαν χώρα στην αναφερόμενη έρευνα ήταν 5%, 15% και 25%. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν φάνηκε πως ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής και οι σωματομετρικοί δείκτες, έφεραν υψηλότερη τιμή για τη διατροφική ομάδα του σιτηρεσίου-μάρτυρα, ενώ για τον ειδικό

ρυθμό ανάπτυξης και το συντελεστή αποδοτικότητας πρωτεϊνών η τιμή αυξάνονταν με την αύξηση του ποσοστού υποκατάστασης και ήταν σαφώς υψηλότερη συγκριτικά με το σιτηρέσιο-μάρτυρα. Φυσικά οι διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων δεν ήταν μεγάλες και η χρήση του συγκεκριμένου μικροφύκου κρίθηκε κατάλληλη. (Enyidi 2017).

Επιπλέον στη διατροφή του είδους *Oreochromis niloticus* έγινε προσθήκη μικροφυκών (*Chlorella spp* και *Scenedesmus spp*) σε ποσοστά 10%, 25%, 50% και 75%, που αποσκοπούσε στη διερεύνηση της ανάπτυξης, του συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής και της σύστασης του σώματος των ψαριών. Από τα αποτελέσματα ήταν ξεκάθαρο ότι η υποκατάσταση που προαναφέρθηκε είναι δυνατή σε ποσοστό μέχρι 50%, αφού για το υψηλότερο ποσοστό υποκατάστασης της τάξης του 75% ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, ο συντελεστής μετατρεψιμότητας τροφής και ο συντελεστής αποδοτικότητας πρωτεϊνών, εμφάνισαν τη χαμηλότερη τιμή συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες διατροφικές ομάδες και για τα δύο μικροφύκη. Αντιθέτως για το ποσοστό υποκατάστασης 50% η τιμή των παραπάνω συντελεστών ήταν η υψηλότερη, ακόμα και από αυτή που αντιστοιχούσε στο σιτηρέσιο-μάρτυρα. (Badwy *et al.* 2008).

Φυσικά η χρήση του *C. vulgaris* δεν περιορίστηκε μόνο σε ψάρια, αφού αξιοσημείωτα είναι τα πειράματα που επικεντρώθηκαν στη μελέτη της ανάπτυξης, της ανοσολογικής απόκρισης, της κατανάλωση ενέργειας και της δραστηριότητα των πεπτικών ενζύμων, που αφορούν τη γαρίδα των γλυκών νερών (*Macrobrachium rosenbergii*), κατά το αναπτυξιακό στάδιο του μεταναυπλίου (postlarvae). Μάλιστα τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ενθαρρυντικά (Radhakrishnan *et al.* 2015, Maliwat *et al.* 2016). Συγκεκριμένα σε διατροφικό πείραμα όπου πραγματοποιήθηκε υποκατάσταση

του ιχθυαλεύρου με το είδος *C. vulgaris* σε ποσοστά 25%, 50%, 75% και 100%, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η καλύτερη ανάπτυξη και η υψηλότερη κατανάλωση ενέργειας σημειώθηκε για το ποσοστό 50%, εν αντιθέσει με τα ποσοστά 75% και 100% όπου η ανάπτυξη και η κατανάλωση ενέργειας παρουσίασαν ελαφριά μείωση. Σχετικά με τη δραστηριότητα των πεπτικών ενζύμων (πρωτεάσες, αμυλάσες και λιπάσες) αυτή εμφανίστηκε επίσης υψηλότερη για το ποσοστό της τάξης του 50%. Φυσικά για καμία από τις διατροφικές ομάδες δεν υπήρξε αρνητική επίδραση της συμμετοχής του παραπάνω μικροφύκου στη διατροφή της συγκεκριμένης γαρίδας. Ακόμα στα πλαίσια έρευνας, για το ίδιο είδος γαρίδας, που χρησιμοποιήθηκαν σιτηρέσια στα οποία συμμετείχε το *C. vulgaris* σε ποσοστά 2%, 4%, 6% και 8%, παρατηρήθηκε ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης και αύξηση της ανθεκτικότητας ενάντια σε μόλυνση από το βακτήριο του είδους *Aeromonas hydrophila*. Όσον αφορά την τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης, αυτή ήταν ιδιαίτερα υψηλή για τα ποσοστά 4% και 6% συγκριτικά με αυτήν που αντιστοιχούσε στο σιτηρέσιο-μάρτυρα και στα υπόλοιπα ποσοστά συμμετοχής (Maliwat *et al.* 2016)

Γενικότερα η γλωρέλλα (*C. vulgaris*) είναι ένα από τα μικροφύκη που έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον ως υποκατάστατο του ιχθυαλεύρου, αν και η μελέτη της καταλληλότητας του για αυτόν το σκοπό βρίσκεται ακόμα σε αρχικό στάδιο. Κάποιες από τις έρευνες που έγιναν στάθηκαν στη χρήση αυτού αλλά και άλλων ειδών, ως συστατικό στις δίαιτες διαφόρων ιχθύων, για τον εντοπισμό πιθανών ιστολογικών αλλοιώσεων. Για παράδειγμα στην τιλάπια του είδους *O. niloticus* πραγματοποιήθηκε υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου της τάξης του 50% καθώς και πλήρης αντικατάσταση αυτού (100%). Από την ιστολογική ανάλυση προέκυψαν θετικές ενδείξεις, χωρίς την

εμφάνιση ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων στο ήπαρ και με φυσιολογικά ηπατοκύτταρα (Gbadamosi *et al.* 2015).

Επίσης στο χρυσόψαρο (*Carassius auratus*) έγινε υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου με άλευρο από χλωρέλλα (*C. vulgaris*) σε ποσοστά 0,75 % και 100%. Συνολικά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το άλευρο χλωρέλλας μπορεί να αντικαταστήσει πλήρως το ιχθυάλευρο στη διατροφή του συγκεκριμένου είδους, καθώς δεν εντοπίστηκαν ιστολογικές βλάβες στο ήπαρ και μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε αύξηση του μεγέθους των ηπατοκυττάρων και καρυοπύκνωση (Shi *et al.* 2017).

Εκτός από το ήπαρ, σε ιστολογική μελέτη που έγινε στο έντερο από σολομό του Ατλαντικού (*S. salar*), διαπιστώθηκε ότι η χρήση των ειδών *C.vulgaris* και *Candida utilis* στη διατροφή του έχει δράση ενάντια σε εντεροπάθειες όπως ισχύει και με την περίπτωση του ιχθυαλεύρου (Grammes *et al.* 2013).

Η συμμετοχή άλλων ειδών πέραν της χλωρέλλας (*C. vulgaris*), επίσης έχει δοκιμαστεί σε διατροφικά πειράματα για τους σκοπούς της ιστολογικής ανάλυσης. Παραδείγματος χάρη για το είδος *Labeo rohita* η υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου με μείγμα προερχόμενο από τα γένη *Azolla* και *Spirogyra* σε ποσοστά 25%, 50%, 75% και 100%, φάνηκε να καθίσταται δυνατή μόνο μέχρι το ποσοστό του 10%. Τα αποτελέσματα της ιστολογικής ανάλυσης του ήπατος δεν εμφάνισαν ιστολογικές αλλοιώσεις, με εξαίρεση τα δείγματα που αφορούσαν τα υψηλότερα ποσοστά υποκατάστασης, όπου παρατηρήθηκαν κάποια κενोटόπια στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων (Sheeno & Sahu 2006).

Επιπρόσθετα στην τιλάπια του Νείλου (*O. niloticus*) πραγματοποιήθηκε υποκατάσταση ιχθυάλευρου με άλευρο από το μακροφύκος του είδους *Taonia atomaria* σε ποσοστά 5%, 10% και 15%. Ιστολογικά δεν παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις στο ήπαρ των ιχθύων και η μοναδική διαφορά συγκριτικά με τα δείγματα που διατράφηκαν με το σιτηρέσιο-μάρτυρα, ήταν η εμφάνιση μικρού αριθμού λιποσταγονιδίων εντός των ηπατοκυττάρων. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι το παραπάνω μακροφύκος μπορεί να συμπεριληφθεί στη διατροφή της τιλάπιας του Νείλου (*O. niloticus*) σε ποσοστό μεγαλύτερο του 5% χωρίς να προκαλέσει κάποια βλάβη στον ιστό του ήπατος (Hussein 2017).

Τέλος στην τσιπούρα (*S. aurata*) πραγματοποιήθηκε έλεγχος της μικροχλωρίδας και της ιστολογίας του εντέρου της μετά από χορήγηση τροφής που περιλάμβανε προβιοτικά (*Bacillus subtilis*) και μικροφύκη (*Tetraselmis chuii*, *Phaeodactylum tricorutum*). Ο παραπάνω συνδυασμός καθώς και η χρήση του καθενός από τα μικροφύκη ξεχωριστά για κάποιες από τις διατροφικές ομάδες, αποδείχθηκε ακατάλληλος αφού τα αποτελέσματα τόσο για τη μικροχλωρίδα όσο και για τη δομή του εντέρου δεν ήταν ιδιαίτερα θετικά. Αναλυτικότερα ο αριθμός των καλυκοειδών βλεννογόνων κυττάρων (Goblet cells) και ο αριθμός των ενδοεπιθηλιακών λεμφοκυττάρων ήταν αισθητά χαμηλότερος συγκριτικά με το σιτηρέσιο-μάρτυρα. Γενικά δεν σημειώθηκε αρνητική επίδραση όσον αφορά την απορροφητική επιφάνεια του εντέρου, μόνο κατά τη συμμετοχή του *B. subtilis* παρατηρήθηκε μείωση του μήκους των μικρολαχνών. Επίσης εντοπίστηκε μικρής έντασης, αύξηση του διακυτταρικού χώρου, μεγάλα κενοτόπια στα εντεροκύτταρα, καθώς και μείωση της βακτηριακής ποικιλότητας που επηρέασε τη μικροχλωρίδα του εντέρου, για όλες τις διατροφικές ομάδες. (Cerezuela *et al.* 2012)

Όπως γίνεται αντιληπτό οι έρευνες που συνδυάζουν το κομμάτι των ιστολογικών αναλύσεων, και τη χρήση των μικροφυκών είναι λίγες. Μάλιστα η παρούσα ιστολογική μελέτη στο ήπαρ τσιπούρας (*S. aurata*) είναι η πρώτη προσπάθεια που γίνεται, με σκοπό να πιστοποιήσει εάν όντως το είδος *C. vulgaris* είναι ικανό να αποτελέσει συστατικό στην τροφή της.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας ιστολογικής ανάλυσης προέκυψε ένα δείγμα με εμφανή υπερπλασία τοιχώματος χοληφόρου πόρου, το οποίο κρίθηκε μη ειδικό και δεν αξιολογήθηκε. Η υπερπλασία ενός οργάνου ή ιστού είναι ουσιαστικά η αύξηση του μεγέθους του λόγω πολλαπλασιασμού των επιμέρους κυττάρων. Αυτό οφείλεται στην αναστολή της διαδικασίας προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) στο συγκεκριμένο όργανο ή ιστό. Οι παράγοντες που προκαλούν αυτήν την αναστολή μπορεί να είναι διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, κάποιοι παράγοντες της μεσοκυττάριας ουσίας, διάφορες στεροειδείς ορμόνες του φύλου και μερικές ιικές πρωτεΐνες. Γενικότερα η εμφάνιση υπερπλασίας συνήθως είναι αποτέλεσμα μιας αυξημένης λειτουργικής ζήτησης, ενός φυσικού ή χημικού ερεθισμού, ή υπερβολικής ορμονικής διέγερσης (Βερίλλης 2015).

Όσον αφορά τα λιποσταγονίδια που παρατηρήθηκαν σχεδόν στα δείγματα όλων των διατροφικών ομάδων, είναι γνωστό πως η συσσώρευση λίπους στο ήπαρ αποτελεί συνηθισμένο φαινόμενο για την πλειοψηφία των Τελεόστεων. Οι Τελεόστεοι έχουν την ικανότητα να αποθηκεύουν λίπος στον ηπατικό ιστό χωρίς απαραίτητα αυτό να έχει επίπτωση στην υγεία του οργανισμού ή να προκαλεί κάποια αλλοίωση στον ιστό. Μάλιστα στους ιχθύες, και ειδικά στις περιπτώσεις εντατικά εκτρεφόμενων ιχθύων, η συσσώρευση λίπους είναι εντονότερη από ότι στην περίπτωση των υπολοίπων

σπονδυλωτών, οδηγώντας πολλές φορές σε εσφαλμένη διάγνωση. Το σημείο στο οποίο η συσσώρευση λίπους στο ήπαρ παύει να θεωρείται φυσιολογική και αρχίζει να θεωρείται παθολογική κατάσταση δεν είναι πλήρως κατανοητό και πιθανότατα ποικίλει ανάμεσα στα διάφορα είδη. Συνδέεται με τη διατροφή και τις πρακτικές που ακολουθούνται πάνω σε αυτό το κομμάτι (Frasca *et al.* 2018). Παρόλα αυτά μια σχετικά μικρή συσσώρευση λίπους στο ήπαρ θεωρείται φυσιολογική ένδειξη για ένα ψάρι όπως ισχύει και στη συγκεκριμένη περίπτωση (Bianco *et al.* 2013).

Οι θετικές ενδείξεις της παραπάνω έρευνας, είναι μια καλή αρχή έτσι ώστε ερευνητές, παραγωγοί αλλά και καταναλωτικό κοινό να εξοικειωθούν με την ιδέα, ότι το μικροφύκος χλωρέλλα (*C. vulgaris*) έχει προοπτικές ως πηγή πρωτεΐνης και μάλιστα για την τσιπούρα (*S. aurata*), ενός από τα κυριότερα εκτρεφόμενα είδη της Μεσογείου. Φυσικά περαιτέρω έρευνα κρίνεται αναγκαία, όσον αφορά τη δυνατότητα συμμετοχής του συγκεκριμένου μικροφύκου σε υψηλότερα ποσοστά στη διατροφή της τσιπούρας (*S. aurata*), με στόχο την όσο το δυνατόν υψηλότερη υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου. Σειρά πρέπει να έχει η εκπόνηση μελετών, που να επικεντρώνονται στο αντίκτυπο της εκάστοτε υποκατάστασης στην ιστολογία του οργανισμού, οι οποίες πέραν του ήπατος καλό θα ήταν να επεκταθούν και σε άλλους ιστούς που μπορούν να επηρεαστούν από τη διατροφή (π.χ. έντερο). Επίσης απαραίτητος είναι ο προσδιορισμός της επίδρασης που έχει αυτή η χρήση της χλωρέλλας (*C. vulgaris*) αλλά και άλλων μικροφυκών, στη σύσταση του σώματος και στο προφίλ των λιπαρών οξέων για τη τσιπούρα (*S. aurata*).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, 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. 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.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 Ελληνική βιβλιογραφία

Αδαμίδου Σ., Νέγκας Ι. (2011) Συστατικά ιχθυοτροφών. Στο: Στοιχεία φυσιολογίας θρέψεως και εφαρμοσμένη διατροφή ιχθύων και καρκινοειδών. Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα, σελ. 381, 384, 385.

Αντωνοπούλου Ε. (2015) Καλλιέργεια Ιχθύων: Αναπαραγωγική Φυσιολογία. Στο: Βουλτσιάδου Ε., Αμπατζόπουλος Θ. Ι., Αντωνοπούλου Ε., Γκάνιας Κ., Γκέλης Σ., Στάικου Α., Τριανταφυλλίδης Α. (συγ.) Υδατοκαλλιέργειες. Εκδόσεις Κάλλιπος, σελ. 83.

Βερίλλης Π. (2015) Κύτταρα και ιστοί στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διελεύσεως. Στο: Βερίλλης Π. (συγ.) Οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, σελ. 170.

Βερίλλης Π., Μεντέ Ε. (2017) Ήπαρ, πάγκρεας και χολή. Στο: Βερίλλης Π., Μεντέ Ε. (επιμ.) Ιστοφυσιολογία ιχθύων και καρκινοειδών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος, σελ. 201-209.

ΕΕ (2017) Κανονισμός (ΕΕ) 2017/786 της επιτροπής της 8^{ης} Μαΐου 2017 για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 142/2011 όσον αφορά τους ορισμούς του ιχθυάλευρου και του ιχθυέλαιου. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης. L119/3.

Καραβέλλας Δ., Νάντσου Θ., Λιαρικός Κ., Μαλεγκάνος Γ., Χριστοπούλου Ι., Μαραγκού Π., Σβορώνου Ε., Γεωργιάδης Ν., Κορακάκη Ε., Προδρόμου Μ.,

Χασιώτης Γ., Πληθάρας Α., Κανδαράκης Α., Μινώτου Χ., Παξιμάδης Γ. (2013) Πρόταση – Ζωντανή ελληνική οικονομία για το περιβάλλον και τον άνθρωπο. WWF, σελ.51.

Καραπαναγιωτίδης Ι. Θ. (2011) Λιπίδια. Στο: Μεντέ Ε., Νέγκας Ι. (επιμ.) Στοιχεία φυσιολογίας θρέψεως και εφαρμοσμένη διατροφή ιχθύων και καρκινοειδών. Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα, σελ. 226.

Καραπαναγιωτίδης Ι. Θ. (2015) Τεχνολογία ιχθυοτροφών: Παραδόσεις του μαθήματος. σελ. 39-40.

Κλαουδάτος Σ. Δ., Κλαουδάτος Σ. Δ. (2012) Αναπαραγωγή – Εκτροφή ιχθύων θαλασσιών υδάτων. Στο: Κλαουδάτος Σ. Δ., Κλαουδάτος Σ. Δ. (συγ.) Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφές υδρόβιων ζωικών οργανισμών. Εκδόσεις Προπομπός, Αθήνα, σελ. 184.

Κλαουδάτος Σ. Δ., Κλαουδάτος Δ. Σ. (2012) Αναπαραγωγή-εκτροφή ιχθύων θαλάσσιων υδάτων, εκτροφή ευρύαλων ειδών ιχθύων, εκτροφή τσιπούρας. Στο: Κλαουδάτος Σ. Δ., Κλαουδάτος Δ. Σ. (συγ.) Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφές υδρόβιων ζωικών οργανισμών. Εκδόσεις Προπομπός, Αθήνα, σελ. 229.

Μεντέ Ε. (2011) Πεπτικό σύστημα και πέψη. Στο: Μεντέ Ε., Νέγκας Ι. (επιμ.) Στοιχεία φυσιολογίας θρέψεως και εφαρμοσμένη διατροφή ιχθύων και καρκινοειδών. Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα, σελ. 83,87.

- Νεοφύτου X. N.** (2015) Οστεϊχθύες θαλάσσιων υδάτων. Στο: Νεοφύτου X. N. (συγ.) Βιολογία ιχθύων & θαλάσσιων θηλαστικών. University Studio Press, Θεσσαλονίκη, σελ. 186.
- Παπουτσόγλου Σ. E.** (2008) Κατηγορίες, παραγωγή – κατάρτιση, παρασκευή, συντήρηση και χορήγηση σιτηρεσίων-τροφών ιχθύων. Στο: Παπουτσόγλου Σ. E. Διατροφή ιχθύων. Αθ. Σταμούλη, Αθήνα, σελ. 614.
- Παπουτσόγλου Σ. E.** (2008) Προτεινόμενες προδιαγραφές σιτηρεσίων-τροφών εκτρεφόμενων ειδών ιχθύων: Τσιπούρα – *Sparus aurata*. Στο: Παπουτσόγλου Σ. E. (συγ.) Διατροφή ιχθύων. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλη, Αθήνα, σελ. 846-848.
- ΣΕΘ** (2018) Ελληνική υδατοκαλλιέργεια: Ετήσια έκθεση, η υδατοκαλλιέργεια στην Ευρωπαϊκή Ένωση. ΣΕΘ, Ηλιούπολη Αττικής, Ελλάδα, σελ. 45, 50.

6.2 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Abu Zinadah O. A. H., Khalil W. K. B., El Ashmaoui H. M., Abdu F., Abou Alsoud M. E.** (2013) Evaluation of the anti – genotoxicity and growth performance impact of green algae on *Mugil cephalus*. Life Science Journal, 10(3):1543-1554.
- Algotherm** (2017) Cosmétique Marine, *Chlorella vulgaris* photo. Link: <https://www.algotherm.com/en/seaweed/chlorella-vulgaris-en/> (Πρόσβαση: 02-04-2019).
- Badwy. T. M., Ibrahim E. M., Zeinhom M. M.** (2008) Partial replacement of fish meal with dried microalga (*Chlorella spp* and *Scenedesmus spp*) in Nile Tilapia

(*Oreochromis niloticus*) diets. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, p 801-811.

Baeza – Ariño R., Martínez – Llorens S., Nogales – Merída S., Jover – Cerdá M., Tomás Vidal A. (2016) Study of liver and gut alterations in sea bream, *Sparus aurata* L., fed a mixture of vegetable protein concentrates. *Aquaculture Research*, 47:460-471.

Bianco C., Sirri R., Sarli G., Ostanello F., Bonaldo A., De Vico G., Mandrioli L. (2013) How severe is the lipid accumulation in fish liver? A fractal answer. *The Fractal Laboratory Journal*, 2:3.

Brown, M. R., 2002. Nutritional value of microalgae for aquaculture. In: Cruz-Suárez L. E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés M. G., Simoes N. (eds.) *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún, Quintana Roo, México p 281-292.

Bruslé J., Anadon G.G. (1996) The structure and function of fish liver. In: Munshi J. S. D., Dutta H. M. (eds) *Fish morphology: Horizon of new research*. Science Publishers, Lebanon, p 80-81.

Buddington R. K., Kuz' mina V. (2000) Digestive system. In: Ostrander G. K. (eds) *The laboratory fish*. Academic Press, USA, p 177-178.

Caballero M. J., Izquierdo M. S., Kjørsvik E., Fernandez A. J., Rosenlund G. (2004) Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata*, caused by short- or longterm feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology

after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases* 27:531–541.

Cerezuela R., Fumanal M., Tapia – Paniagua S. T., Meseguer J., Moríñigo M. Á., Esteban M. Á. (2012) Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. *Cell and Tissue Research*, 350(3):477-489.

Enyidi U. D. (2017) *Chlorella vulgaris* as protein source in the diets of African catfish *Clarias gariepinus*. *Fishes*, 2(4):17.

Eurogroup for animals (2018) Looking beneath the surface: Fish welfare in European aquaculture. pp 10.

Faccioli C. K., Chedid R. A., Bombonato M. T. S., Vicentini C. A., Vicentini I. B. F. (2014) Morphology and histochemistry of the liver of carnivorous fish *Hemisorubim platyrhynchos*. *International Journal of Morphology*, 32(2):715-720.

FAO (1978) Selection of species for aquaculture. In: Curriculum for the training of aquaculturists in the African Regional Center for Aquaculture, Aquaculture development and coordination programme ADCP/REP/78/6 (En). FAO, Pirassununga, State of São Paulo, Brazil.

Link: <http://www.fao.org/docrep/18156e/18156e04.htm>. (Πρόσβαση 10-9-2018)

FAO (2018) The state of world fisheries and aquaculture meeting the sustainable development goals. FAO, Rome, Italy, p 5, 43, 45,46.

- FAO** (2019) Fisheries and Aquaculture Department, Cultured aquatic species information programme, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758). Link: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en. (Πρόσβαση 10-9-2018)
- Francis G.**, Makker H. P. S., Becker K. (2001) Antinutritional factors present in plant – derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199:197-227.
- Frasca S.**, Jr., Wolf J. C., Kinsel M. J., Camus A. C., Lombardini E. D. (2018) Osteichthyes. In: Terio K. A., Mc Aloose D., Leger J. St. (eds) *Pathology of wildlife and zoo animals*. Academic Press, United States, pp 948.
- Gbadamosi O. K.**, Lupatsch I., Rowley A., Shield R. (2015) Effects of soybean meal replacement with dietary *Chlorella vulgaris* on nutritional performance and liver histology of Red Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, D. Histology & Histochemistry*, 7(2):17-31.
- Grammes F.**, Reveco F. E., Romarheim O. H., Landsverk T., Mydland L. T., Øverland M. (2013) *Candida utilis* and *Chlorella vulgaris* counteract intestinal inflammation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS One*, 8(12):e83213.
- Hansen A.-C.**, Rosenlund G., Karlsen Ø., Olsvik P., Hemre G.-I. (2006) The inclusion of plant protein in cod diets, its effects on macronutrient digestibility, gut and liver histology and heat shock protein transcription. *Aquaculture Research*, 37:773-784.

Hardy R. W., Barrows F. T. (2002) Diet formulation and manufacture. In: Halver J. E., Hardy R.W. (eds) Fish nutrition. Academic Press, USA, pp 519.

Hardy R. W., Tacon A. G. J. (2002) Fish meal: Historical uses, production trends and future outlook for sustainable supplies. In: Stickney R. R., McVey J. P. (eds) Responsible marine aquaculture. CABI Publishing, UK, p 312, 319, 320.

Hartviksen M., Vecino J. L. G., Ringø E., Bakke A.-M., Wadsworth S., Krogdahl Å., Ruohonen K., Kettunen A. (2014) Alternative dietary protein sources for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) effect on intestinal microbiota, intestinal and liver histology and growth. *Aquaculture Nutrition*, 20:381-398.

Hussein E. E. M. (2017) Effect of seaweed supplemented diets on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* performance. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5(2):205-210.

INPN (Inventaire National du Patrimoine Naturel), *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck], 1890, Taxonomic repository.

Link: <https://inpn.mnhn.fr/telechargement/referentielEspece/referentielTaxo>(Πρόσβαση: 05-04-2019)

INPN (Inventaire National du Patrimoine Naturel), *Sparus aurata* Linnaeus, 1758, Taxonomic repository.

Link:https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/69668/tab/taxo?lg=en (Πρόσβαση 05-04-2019).

- Jackson A.** (2009) The continuing demand for sustainable fishmeal and fish oil in aquaculture diets. *International Aqua Feed*, 12:32-33.
- Kokou F.,** Sarropoulou E., Cotou E., Rigos G., Henry M., Alexis M., Kentouri M. (2015) Effects of fish meal replacement by a soybean protein on growth, histology, selected immune and oxidative status markers of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Journal of the world aquaculture society*, 46:115-128.
- Liu H.,** Jin J., Zhu X., Han D., Yang Y., Xie S. (2015) Effect of substitution of dietary fish meal by soybean meal on different sizes of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*): digestive enzyme gene expressions and activities, and intestinal and hepatic histology. *Aquaculture Nutrition*, 23(1):129-147.
- Maliwat G. C.,** Velasquez S., Robil J. L., Chan M., Traifalgar R. F., Tayamen M., Ragaza J. A. (2016) Growth and immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) postlarvae fed diets containing *Chlorella vulgaris* (Beijerinck). *Aquaculture Research*, 48(4):1666-1676.
- Martínez – Llorens S.,** Baeza – Ariño R., Nogales – Merída S., Jover – Cerdá M., Tomás Vidal A. (2012) Carob seed germ meal as a partial substitute in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Amino acid retention, digestibility, gut and liver histology. *Aquaculture*, 338-341:124-133.
- Naylor R. L.,** Hardy R. W., Bureau D. P., Chiu A., Elliott M., Farrell A. P., Forster I., Gatlin D. M., Goldberg R. J., Hua K., Nichols P. D. (2009) Feeding aquaculture in an era of finite resources. *PNAS*, 106(36):15103-15110.

- Pusztai A.** & Bardocz S. (2006) GMO in animal nutrition: potential benefits and risks. In: Mosenthin R., Zentek J., Zebrowska T. (eds.), *Biology of nutrition in growing animals*. Elsevier, Edinburgh, UK, pp. 513–540.
- Radhakrishnan S.**, Saravana Bhavan P., Seenivasan C., Muralisankar T. (2015) Effect of dietary replacement of fishmeal with *Chlorella vulgaris* on growth performance, energy utilization and digestive enzymes in *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, 7(5):62-70.
- Robaina L.**, Izquierdo M. S., Moyano F. J., Socorro J., Vergara J. M., Montero D., Fernández – Palacios H. (1995) Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture*, 130:219-233.
- Safi C.**, Zebib B., Merah O., Pontalier P. Y., Vaca-Garcia C. (2014) Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35:265-278.
- Sen Roy S.**, Pal R. (2015) Microalgae in aquaculture: A review with special references to nutritional value and fish dietetics. *Proceedings of the Zoological Society*, 68(1):1-8.
- Sharif N.**, Munir N., Naz S., Iqbal R., Rauf W. (2017) Origin of algae and their plastids. In: Zia K. M., Zuber M., Ali M. (eds) *Algae based polymers, blends and composites: chemistry, biotechnology and materials science*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, p 101-102.

Sheeno T. P., Sahu N. P. (2006) Use of freshwater aquatic plants as a substitute of fishmeal in the diet of *Labeorohita* fry. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 1(2):126-135.

Shi X., Luo Z., Chen F., Wei C. C., Wu K., Zhu X. M., Liu X. (2017) Effect of fish meal replacement by *Chlorella* meal with dietary cellulose addition on growth performance, digestive enzymatic activities, histology and myogenic genes expression for crucian carp *Carassius auratus*. *Aquaculture Research*, 48(6):3244-3256.

Vicentini C. A., Vicentini I. B. F., Bombonato M. T. S., Bertolucci B., Lima S. G., Santos A. S. (2005) Morphological study of the liver in the Teleost *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Morphology*, 23(3):211-216.

Vizcaínoa A. J., López G., Sáeza M. I., Jiménez J. A., Barrosa A., Hidalgo L., Camacho – Rodríguez J., Martínez T. F., Cerón-García M. C., Alarcón F. J. (2014) Effects of the microalgae *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture*, 431:34-43.

Windson M. L. (2001) Composition and nutritional value. In: FAO corporate document repository: Fish meal. Torry Research Station, Advisory note No. 49.

Link: <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5926e/x5926e01.htm> (Πρόσβαση: 15-11-2018)

ABSTRACT

The present study was conducted in order to evaluate the liver alterations of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., fed with diets in which fishmeal protein was substituted by *Chlorella vulgaris* meal.

S. aurata juveniles of 15-20 g initial mean weight were fed for 12 weeks with 4 experimental isoenergetic (21 MJ/Kg) and isonitrogenous (52% CP) diets. The first diet was the control one, in which fishmeal (100%) was used as the main protein source. For the other three diets, the partial replacement of this ingredient with *C. vulgaris* meal was at 10% (CM10), 20% (CM20) and 30% (CM30). For the purposes of histological analysis, liver samples were removed from 12 fish per treatment and were followed the necessary preparation of them. Liver tissues were first fixed in 10% buffered formalin and then routinely dehydrated in ethanol, immersed in xylol and embedded in paraffin according to the standard histological techniques. Sections of 5µm were mounted and after deparaffinization were rehydrated, stained with haematoxylin – eosin and mounted with Cristal/Mount. A total number of 48 sections were studied by light microscopy.

The results obtained in the present histological study, showed no significant alterations in the liver of fish from all three dietary groups, comparatively with those of the control group. The majority of the nuclei appeared in the center of hepatocytes and lipid droplets were not many and small in size. No severe damage of the tissue as steatosis, hemorrhagic symptoms, necrotic areas, inflammation or edema were observed. The pancreatic islets contained acinar cells with many secretory zymogen granules. Only three samples showed minor histological lesions from dietary groups

CM20 and CM30. In the CM20 group, one fish showed bile duct proliferation. In the CM30 group two fish showed autolysis of the tissue.

In conclusion partial replacement of fish meal protein by *C. vulgaris* meal can take place up to 30%, without affecting the liver histology of gilthead sea bream. Further research is needed in order to determine the effect of the dietary microalgae on other nutritional parameters such as body proximate composition and fatty acid profiles of *S. aurata*.

Key-words: *Chlorella vulgaris*, *Sparus aurata*, liver, histology