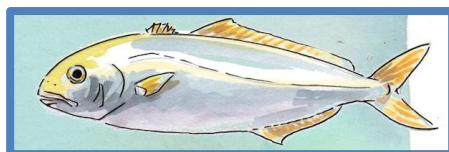


**Ειδικές Δράσεις «ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ»
ΜΑΓΙΑΤΙΚΟ Τ6ΥΒΠ-0068**



Παραδοτέο

Αριθμός Παραδοτέου:	Π2.2.2	Μήνας Παράδοσης ΤΠΕ:	32
Τίτλος Παραδοτέου	Αξιολόγησή του βελτιωμένου πρωτοκόλλου, και συγκριτικά με την χρήση ή μη προβιοτικών και κωπηπόδων στο διατροφικό πρωτόκολλο νυμφικής εκτροφής του μαγιάτικου.		
Ενότητα Εργασίας (ΕΕ):	2	Συντονιστής ΕΕ:	ΙΘΑΒΒΥΚ
Τίτλος ΕΕ:	Νυμφικές εκτροφές και παραγωγή γόνου		
Αριθμός Εργασίας:	2.2.	Υπεύθυνος Παραδοτέου:	ΙΘΑΒΒΥΚ
Τίτλος εργασίας:	Βελτίωση των υφιστάμενων πρωτοκόλλων νυμφικής εκτροφής με βάση την οντογένεση του πεπτικού συστήματος και της όρασης		
Εταίροι:	ΙΘΑΒΒΥΚ	ΓΑΛΑΞΙΔΙ	
Κατάσταση:	Ολοκληρωμένο	Μήνας παράδοσης:	32

Υπεύθυνος ερευνητής για το παραδοτέο: Παπαδάκης, Ι. (ΙΘΑΒΒΥΚ)

Συνεργαζόμενοι ερευνητές από Εταίρους: Μακρίδης, Π. (Πανεπιστήμιο Πατρών), Καραπαναγιώτης, Σ. (ΓΑΛΑΞΙΔΙ), Τσακωνίτη, Κ. (ΓΑΛΑΞΙΔΙ), Μέγκος, Α. (ΓΑΛΑΞΙΔΙ)

Σύντομη περιγραφή (ΤΠΕ):

Η έκθεση περιλαμβάνει την αξιολόγηση του βελτιωμένου πρωτοκόλλου εκτροφής συγκριτικά με την χρήση προβιοτικών και κωπηπόδων. Η αξιολόγηση αυτή βασίστηκε, α) στον προσδιορισμό της διατροφικής προτίμησης του μαγιάτικου σε σχέση με το πρωτόκολλο εκτροφής, β) τον εντοπισμό των περιόδων υποσιτισμού και προβληματικής αξιοποίησης των πρωτοκόλλων νυμφικής εκτροφής του μαγιάτικου σε σχέση με το αρχικό διατροφικό πρωτόκολλο. Οι εκτροφές και οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε ιχθυογεννητικό σταθμό της εταιρίας Γαλαξίδι Θαλάσσιες Καλλιέργειες Α.Ε.. Η ανάλυση των δειγμάτων βασίστηκε σε ιστολογικές μεθόδους που πραγματοποιήθηκαν στο ΙΘΑΒΒΥΚ-ΕΛΚΕΘΕ.





Εισαγωγή

Η βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων εκτροφής είναι μια συνεχής πρόκληση για την αύξηση των παραγωγικών δεικτών. Κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια και ιδιαίτερα κατά την φάση της παραγωγής γόνου η δημιουργία νέων πρωτοκόλλων εκτροφής για τα νέα είδη που εισάγονται στην ιχθυοκαλλιέργεια ή η βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων για τα ήδη υπάρχοντα είδη κρίνεται απαραίτητη. Ειδικότερα κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια η βελτιστοποίηση των διατροφικών πρωτοκόλλων βοηθά όχι μόνο στην αύξηση των παραγωγικών δεικτών αλλά και στην ευημερία αλλά και στην εύρωστη ανάπτυξη των εκτρεφόμενων οργανισμών. Για να επιτευχθεί αυτό εκτός από την αξιολόγηση των κοινών παραγωγικών δεικτών που χρησιμοποιεί η ιχθυοκαλλιέργεια, στοχευμένες μελέτες σε βασικά λειτουργικά συστήματα, που συσχετίζονται με την διατροφική κατάσταση του εκτρεφόμενου οργανισμού, βοηθούν στην ασφαλή διεξαγωγή σημαντικών και αξιόπιστων συμπερασμάτων.

Η γνώση της λειτουργίας του πεπτικού συστήματος είναι σημαντική, διότι με αυτό το σύστημα ο οργανισμός συλλαμβάνει την τροφή του από την οποία προσλαμβάνει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά με τα οποία θα μπορέσει να συντηρηθεί, να αυξηθεί, να αναπαραχθεί και να διατηρηθεί στην ζωή. Η παραπάνω γνώση σε υποψήφια είδη που πρόκειται να εισέλθουν σε βιομηχανική εκτροφή, όπως το μαγιάτικο (*Seriola dumerili*) που μελετά η πρόταση αυτή, βοηθά στην ορθή οργάνωση των πρωτοκόλλων εκτροφής. Κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των νυμφών των ψαριών και συγκεκριμένα από το στάδιο της εκκόλαψης έως και την μεταμόρφωσή τους σε νεαρά ιχθύδια, εμφανίζονται πολυάριθμες μεταβολές που συσχετίζονται με την παρουσία, την μορφολογία αλλά και την λειτουργία των δομών του πεπτικού συστήματος των ψαριών (Przybył et al., 2006). Για τον παραπάνω λόγο στο παραδοτέο **Π2.2.1** έγινε λεπτομερέστατη περιγραφή της οντογένεσης του πεπτικού συστήματος και του συστήματος της όρασης στο μαγιάτικο.

Παρατηρήθηκε στο μαγιάτικο (όπως είναι κοινό και στα υπόλοιπα εκτρεφόμενα είδη) ότι η εμφάνιση των βασικών δομών του πεπτικού συστήματός του δεν πραγματοποιείται ταυτόχρονα. Εκτός από διαφοροποιήσεις στον χρόνο εμφάνισης της κάθε δομής, παρουσιάζονται και μορφολογικές αλλαγές σε βασικές δομές του πεπτικού συστήματος όπως το έντερο ή το συκώτι. Αυτές οι μορφολογικές διαφορές σχετίζονται με εξωτερικούς παράγοντες όπως το διατροφικό πρωτόκολλο. Αλλαγές στην κατάσταση του συκωτιού των ψαριών και ειδικότερα στην εναπόθεση λίπους σε αυτό μπορεί να συνδέονται τόσο με την ποιοτική όσο και με την ποσοτική σύσταση των τροφών που εμπεριέχονται στο διατροφικό πρωτόκολλο των νυμφικών εκτροφών (Papadakis et al., 2013; Papadakis et al., 2009). Ο εντοπισμός αυτών των μεταβολών μας υποδεικνύουν κατά την διάρκεια της νυμφικής εκτροφής με μεγάλη ακρίβεια τις περιόδους όπου οι νύμφες αντιμετώπισαν διατροφική καταπόνηση (Margulies 1993; Papadakis et al., 2013). Το παραπάνω, σε συνδυασμό με την μελέτη της διατροφικής συμπεριφοράς του μαγιάτικου, που εστιάζεται στην ανάλυση των στομαχικών περιεχομένων σε σχέση με τα συστατικά των τροφών που συμπεριλαμβάνονται στο διατροφικό πρωτόκολλο, μπορεί να αναδείξει τις αδυναμίες του διατροφικού πρωτοκόλλου σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές. Βάσει αυτών των δεδομένων στην συνέχεια πραγματοποιούνται με ακρίβεια οι βελτιώσεις στο διατροφικό πρωτόκολλο που εφαρμόζεται κατά την φάση των νυμφικών εκτροφών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιώντας αυτήν την αρχή και μεθοδολογία αφού εφαρμόστηκε ένα βελτιωμένο πρωτόκολλο εκτροφής όπως περιγράφεται στο παραδοτέο **Π2.2.1** έγινε δοκιμή δυο ακόμη πρωτοκόλλων στα οποία έγινε συμπληρωματική χρήση προβιοτικών στο νερό εκτροφής αλλά και κωπηπόδων στο διατροφικό πρωτόκολλο.

Η χρήση προβιοτικών στις τροφές, σε αρκετές περιπτώσεις έχει προταθεί ως στρατηγική για βιώσιμη υδατοκαλλιέργεια (Dawood et al., 2019; Van Doan et al., 2020). Οι νύμφες των ψαριών λόγω του ανώριμου ανοσοποιητικού τους συστήματος κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια είναι πολύ ευαίσθητες σε ασθένειες, γεγονός που οδηγεί σε υψηλή θνησιμότητα κατά την εκτροφή των προνυμφών (Zapata et al., 2006). Ένα κοινό πρόβλημα κατά το στάδιο των νυμφικών εκτροφών στην υδατοκαλλιέργεια, είναι η προσβολή από φυσικά ευκαιριακά βακτήρια που μπορεί να γίνουν παθογόνα. Ο πρώτος αποικισμός από μικρόβια του εντέρου στα ψάρια ξεκινά όταν ανοίγει το στόμα των νυμφών και αρχίζει η εξωτερική διατροφή (Egerton et al., 2018). Ο πρώτος αποικισμός μικροβίων στο έντερο των νυμφών διευκολύνει την ταχύτερη ωρίμανση της πεπτικής οδού γεγονός που βοηθάει περεταίρω και την πέψη των θρεπτικών συστατικών καθώς βελτιώνουν τη χρήση της τροφής και την περαιτέρω ανάπτυξη της ανοσίας (Rawls et al., 2004), σε πιθανή μελλοντική εισβολή παθογόνων, η οποία πιθανώς να επηρεάζει την ανάπτυξη και υγεία των νυμφών (Nayak 2010; Vadstein et al., 2013). Έχει αποδειχθεί ότι τα προβιοτικά αυξάνουν την επιβίωση των προνυμφών θαλάσσιων ψαριών (Gomez-Gil et al., 2000). Σύμφωνα με αποτελέσματα που έχουν εξαχθεί έως τώρα από σχετικές μελέτες φαίνεται ότι τα προβιοτικά στις νυμφικές εκτροφές έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, ιδιαίτερα έναντι των



παθογόνων βακτηριών *Vibrio* spp., όπως το *V. anguillarum* και το *V. vulnificus*, τα οποία αποτελούν σημαντικό πρόβλημα στις μονάδες υδατοκαλλιέργειας (Makridis et al., 2021). Τα προβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη ήταν του γένους *Phaeobacter* (Π2.3.1). Τα εν λόγω βακτήρια ως προβιοτικά έχουν μελετηθεί εκτενέστερα τα τελευταία χρόνια, με σκοπό την εφαρμογή τους σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένων και των μονάδων υδατοκαλλιέργειας (Beyersmann et al., 2017).

Τα κωπήποδα ως γνωστό είναι το προτιμώμενο φυσικό θήραμα για τις περισσότερες νύμφες θαλάσσιων ψαριών και συχνά αποτελούν το κυρίαρχο συστατικό της αρχικής τους διατροφής στην φύση (Holt et al., 2003). Τα κωπήποδα δεν διαθέτουν μόνο διατροφικά προφίλ που πληρούν τις απαιτήσεις των προνυμφών των ψαριών (Aragão et al., 2004; Rønnestad et al., 1999), αλλά περιέχουν επίσης υψηλά επίπεδα πεπτικών ενζύμων (Conceição et al., 2010) και είναι ικανά να προκαλούν διεγερτικά αποτελέσματα της όρεξης στις προνύμφες (Olivotto et al., 2011). Ως εκ τούτου, θεωρούνται ευρέως ανώτερα από rotifers και *Artemia* για την καλλιέργεια προνυμφών ψαριών. Ωστόσο, η χρήση κωπήποδων σε εμπορικά εκκολαπτήρια εξακολουθεί να είναι περιορισμένη, σε μεγάλο βαθμό λόγω των δυσκολιών στην εντατική καλλιέργειά τους (Alajmi and Zeng, 2014). Στην παρούσα μελέτη με το μαγιάτικο, χρησιμοποιήθηκαν ναύπλιοι κωπήποδων του είδους *Acartia tonsa*. Τα κωπήποδα δε χρειάζονται εμπλουτισμό με λιπαρά οξέα, αλλά καλό είναι να ταΐζονται μαζί με ζωντανά μικροφύκη σύμφωνα με την τεχνική του πράσινου νερού. Το μικρό μέγεθος των ναυπλίων είναι ιδανικό για τη σίτιση μικρών ιχθυονυμφών, όπως είναι οι ιχθυονύμφες του μαγιάτικου. Επιπλέον, αφού δε εμπλουτίζονται, δεν επιβαρύνεται το περιβάλλον της δεξαμενής της νυμφικής εκτροφής με λιπαρά στην επιφάνειά της (Conceição et al., 2010). Τέλος, η κατάποση κύστεων των κωπήποδων δεν δημιουργεί πρόβλημα στις ιχθυονύμφες όπως στην περίπτωση κύστεων της *Artemia* sp όπου μπορεί με την κατάποση τους να μπλοκάρουν το πεπτικό κανάλι.

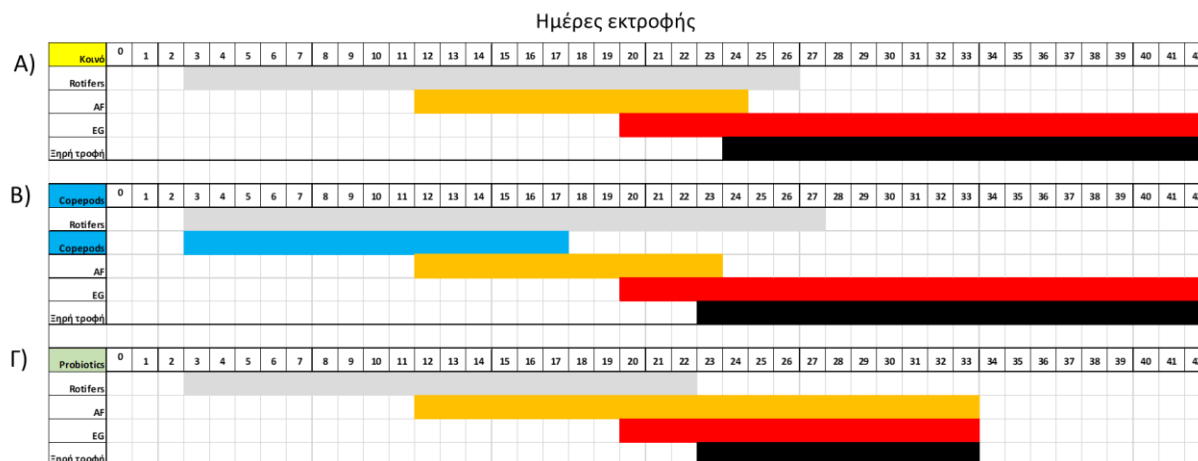
Στόχος της μελέτης είναι η αξιολόγηση τριών διαφορετικών διατροφικών (κοινό, εμπλουτισμένο με κωπήποδα και εμπλουτισμένο με προβιοτικά) πρωτοκόλλων για το μαγιάτικο, βασιζόμενοι όχι μόνο σε παραγωγικούς δείκτες αλλά χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα μορφολογικούς δείκτες βασικών οργάνων του πεπτικού συστήματος, καθώς και δείκτες που σχετίζονται με την διατροφική συμπεριφορά και ευρωστία των νυμφών του μαγιάτικου.

Υλικά και Μέθοδοι

A) Πρωτόκολλο εκτροφής – δειγματοληψίες

Η εκτροφή και στην συνέχεια η δειγματοληψία των νυμφών του μαγιάτικου πραγματοποιήθηκαν στον ιχθυογεννητικό σταθμό της εταιρίας Γαλαξίδι Θαλάσσιες Καλλιέργειες Α.Ε.. Τα πρωτόκολλα εκτροφής που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις δεξαμενές παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1Α**. Το κοινό πρωτόκολλο είναι αποτέλεσμα ενός βελτιωμένου πρωτοκόλλου το οποίο αναπτύχθηκε στο έργο αυτό και περιγράφεται στο παραδοτέο Π2.2.1.

Όσον αφορά το πρωτόκολλο με τα κωπήποδα (**Εικ. 1Β**) έγινε χρήση κωπήποδων του είδους *Acartia tonsa*. Στις εκτροφές χρησιμοποιήθηκε συντηρημένο φυτοπλαγκτόν (όχι ζωντανό). Τέλος στην εκτροφή με τα προβιοτικά (**Εικ. 1Γ**) χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Phaeobacter inhibens*. Σε απλά βιολογικά φίλτρα που κατασκευάστηκαν με αυτό τον τρόπο προστέθηκε αερισμός με μια πέτρα αέρα, ώστε να υπάρχει οξυγόνωση των κυλίνδρων και των μικροβιακών κοινοτήτων του στελέχους *P. inhibens* που είχαν αποικίσει τους κεραμικούς κυλίνδρους και επιπλέον να δημιουργείται ένα συνεχές ρεύμα προς τη στήλη του νερού μέσα στη δεξαμενή. Με αυτόν τον τρόπο μεταφέρονταν κύτταρα του *P. inhibens* σε όλη τη δεξαμενή. Από τη στήλη του νερού μεταφέρονται τα κύτταρα των προβιοτικών βακτηριών στους οργανισμούς της ζωντανής τροφής και κατόπιν στις ιχθυονύμφες μέσω της ζωντανής τροφής. Επίσης μεταφέρονται απευθείας στις ιχθυονύμφες που ενεργητικά λαμβάνουν θαλασσινό νερό για λόγους ωσμωρύθμισης.



Εικόνα 1. Διατροφικά πρωτόκολλα εκτροφής μαγιάτικου. Α) κοινό διατροφικό πρωτόκολλο, Β) πρωτόκολλο με κωπήποδα, Γ) πρωτόκολλο με προβιοτικά. Με διαφορετικούς χρωματισμούς εμφανίζεται η διάρκεια χορήγησης αντίστοιχα των διαφόρων τύπων τροφής που εμπειρεύχαν τα πρωτόκολλα. Rotifers = τροχόζωα, AF = ναύπλιοι αρτέμιας μικρού μεγέθους στους οποίους δεν εφαρμόζεται διαδικασία εμπλουτισμού, EG = ναύπλιοι αρτέμιας μεγάλου μεγέθους στους οποίους εφαρμόζεται διαδικασία εμπλουτισμού.

Δείγματα 5 ατόμων, αφού μετρήθηκαν ως προς το συνολικό μήκος τους, συλλέχθηκαν και συντηρήθηκαν σε διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης και 1% γλουταραλδεΰδης (McDowell and Trump, 1976) και στην συνέχεια στάλθηκαν στο Ινστιτούτο θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. για την περαιτέρω ιστολογική επεξεργασία τους.

Β) Ιστολογική ανάλυση

Τα δείγματα πριν την μονιμοποίηση τους σε πολυμεριζόμενη ρητίνη (methacrylate resin, Technovit 7100®, Heraeus Kulzer, Germany), αφυδατώνονταν σε μια σειρά διαλυμάτων αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης. Οι τομές είχαν πάχος 3-4 μm και έγιναν με μικροτόμο (Reichert Jung, Biocut 2035, Germany). Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η διεργασία της χρώσης με Methylene Blue (Sigma, Germany)/Azure II (Sigma, Germany)/Basic Fuchsin (Polysciences, USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Bennett et al., 1976). Όλες οι τομές εξετάστηκαν με την βοήθεια μικροσκοπίου σε διαφορετικές μεγεθύνσεις (Nikon Eclipse 50i, Melville, NY) και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η φωτογράφησή τους. Η ανάλυση των στομαχικών περιεχομένων πραγματοποιήθηκε σε φωτογραφίες που άρθησαν σε ιστολογικές τομές νυμφών μαγιάτικου.

Γ) Μελέτη του ποσοστού κάλυψης του συκωτιού με λίπος και της ανάλυσης των στομαχικών περιεχομένων.

Το λίπος από διαφορετικές περιοχές συκωτιού νυμφών μαγιάτικου από κάθε μέρα δειγματοληψίας εκτιμήθηκε σύμφωνα με την μεθοδολογία που έχει αναπτυχθεί από τους Papadakis et. al. (2009, 2013). Πριν την 5^η ημέρα εκτροφής δεν ήταν δυνατό να μετρηθεί το λίπος στο συκώτι λόγω του υπερβολικά μικρού μεγέθους του. Για κάθε ημέρα δειγματοληψίας από 3 νύμφες πάρθηκαν 6 μικροφωτογραφίες σε μεγέθυνση X100 από διαφορετικές περιοχές του συκωτιού. Η συνολική κάλυψη του συκωτιού με λιπώδη ιστό υπολογίστηκε με πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας (Image J, NIH, USA). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό κάλυψης με λίπος σε σχέση με την συνολική επιφάνεια της υπό μελέτης φωτογραφίας του συκωτιού.

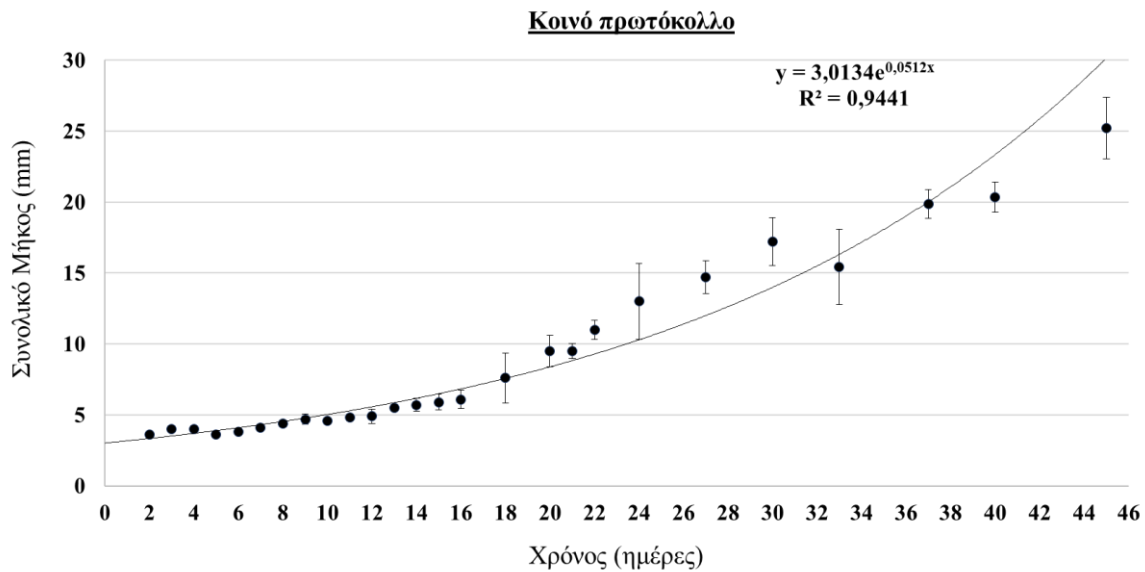
Επιπρόσθετα με την χρήση μικροσκοπίου σε διαφορετικές μεγεθύνσεις έγινε εντοπισμός και καταγραφή των συστατικών του αντίστοιχου τύπου τροφής που υπήρχε στο πεπτικό κανάλι των νυμφών.



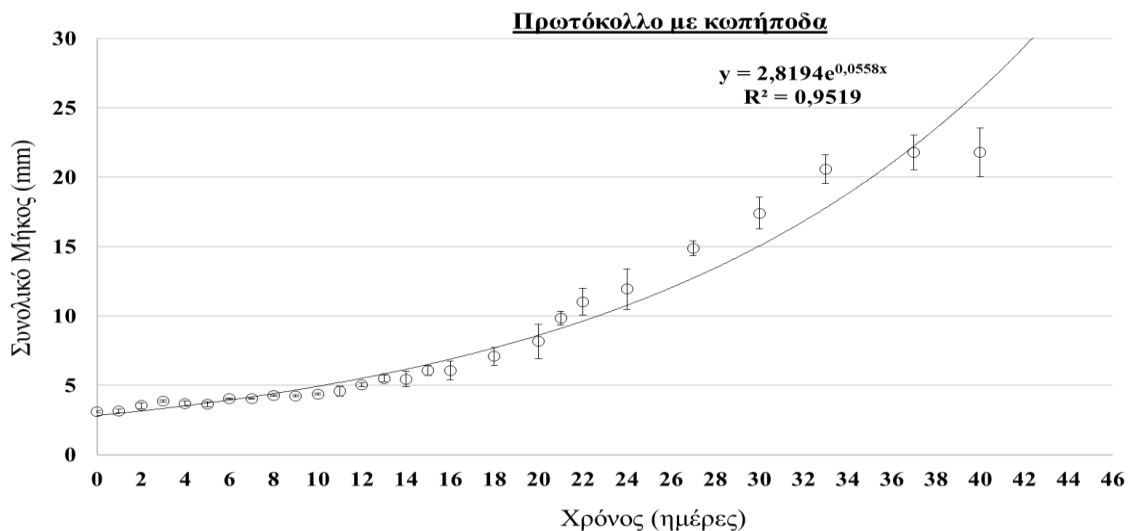
Αποτελέσματα

Α) Ρυθμός αύξησης

Παρακάτω παρουσιάζονται οι ρυθμοί αύξησης καθώς και οι εξισώσεις που περιγράφουν την αύξηση των νυμφών του μαγιάτικου που εκτράφηκαν με το κοινό πρωτόκολλο (Εικ. 2), με το πρωτόκολλο που εμπεριείχε κωπήποδα (Εικ. 3) και με αυτό που εμπεριείχε προβιοτικά (Εικ. 4), αντίστοιχα. Ο συγκεντρωτικός πίνακας και των τριών πρωτοκόλλων παρουσιάζεται στην Εικόνα 5. Οι τιμές του μήκους των νυμφών στην εκτροφή με τα κωπήποδα ήταν μεγαλύτερες σε σχέση με τα άλλα δυο πρωτόκολλα από την 34^η και έπειτα. Επίσης οι τιμές των προβιοτικών παρουσιάζονται να είναι μικρότερες μετά την 20^η ημέρα εκτροφής σε σχέση με τις υπόλοιπες δυο εκτροφές (Εικ. 5). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι την 20^η ημέρα εκτροφής άρχισε η χορήγηση της εμπλουτισμένης αρτέμιας (EG).



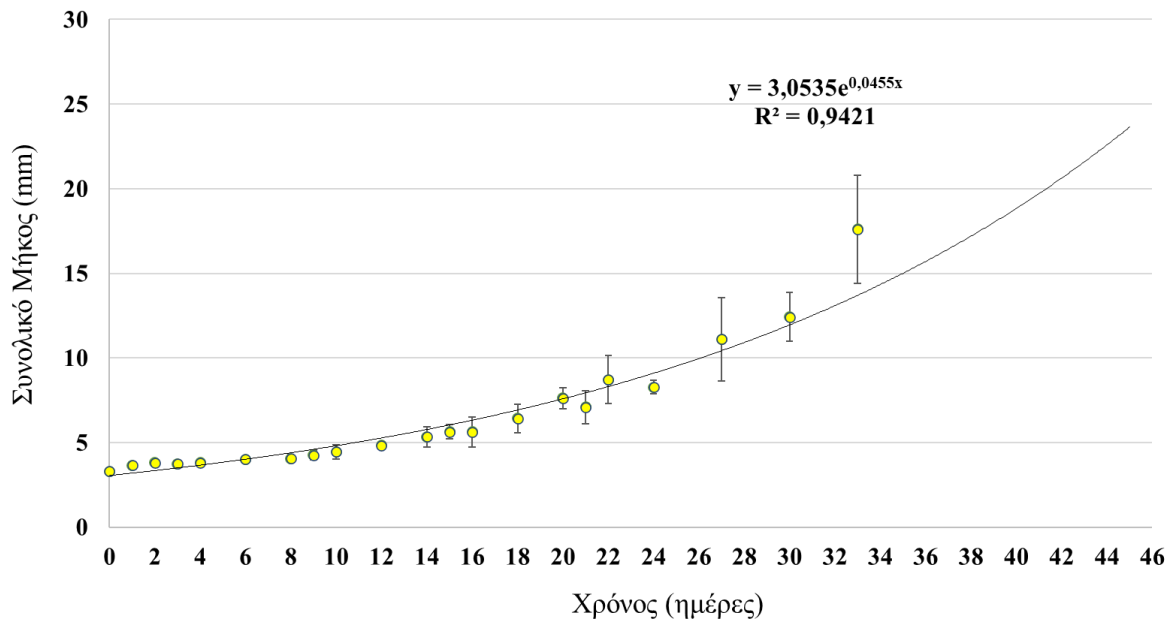
Εικόνα 2. Εξέλιξη της αύξησης του μήκους του μαγιάτικου στο οποίο έγινε χρήση του κοινού πρωτοκόλλου.



Εικόνα 3. Εξέλιξη της αύξησης του μήκους του μαγιάτικου στο οποίο έγινε χρήση του πρωτοκόλλου που εμπεριείχε κωπήποδα.

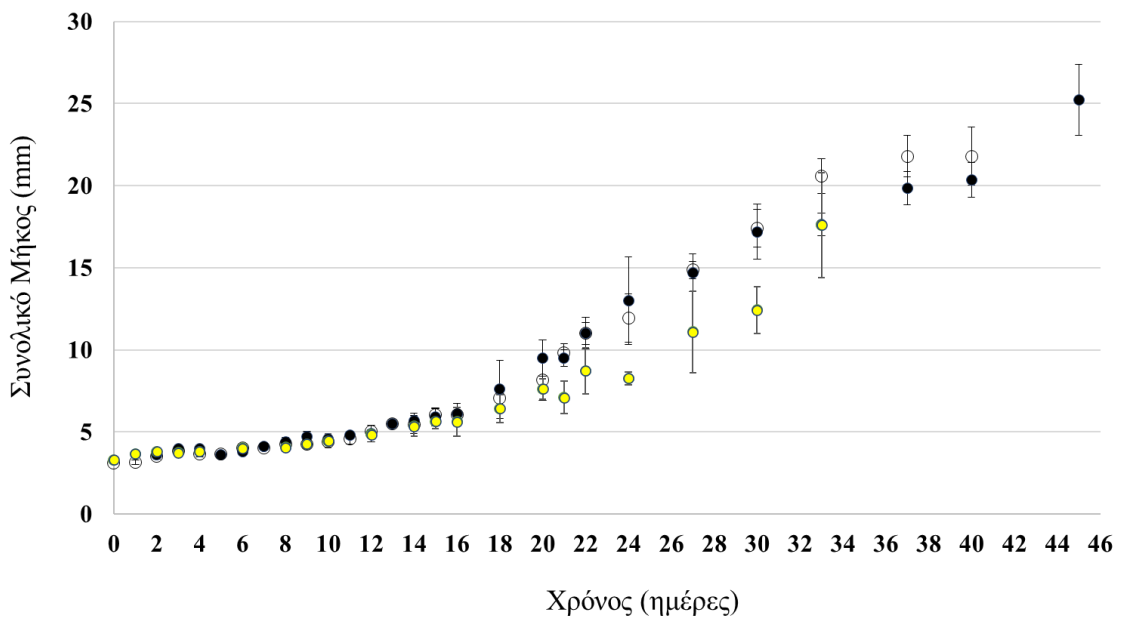


Πρωτόκολλο με προβιοτικά



Εικόνα 4. Εξέλιξη της αύξησης του μήκους του μαγιάτικου στο οποίο έγινε χρήση του πρωτοκόλλου που εμπεριείχε προβιοτικά.

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα αύξησης



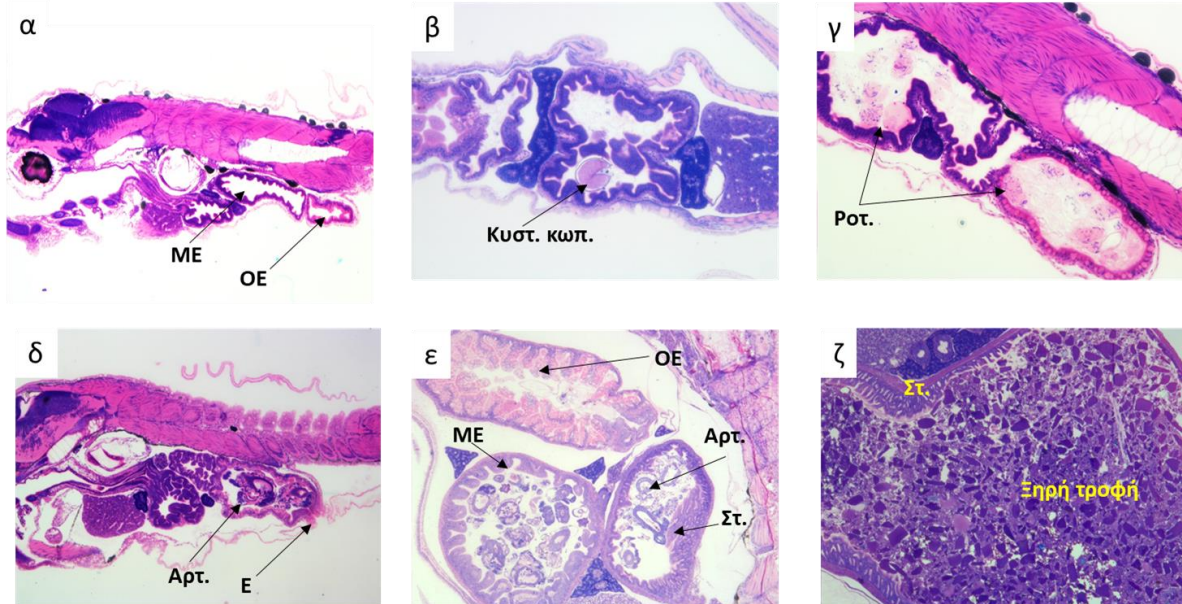
Εικόνα 5. Εξέλιξη της αύξησης του μήκους του μαγιάτικου και στα τρία πρωτόκολλα εκτροφής που χρησιμοποιήθηκαν.

Ποσοστό κάλυψης του συκωτιού με λίπος και στομαχικά περιεχόμενα

Για την καλύτερη παρουσίαση των αποτελεσμάτων η συνολική περίοδος έχει διαιρεθεί σε 4 μικρότερες υποπεριόδους σε σχέση με τα κοινά χαρακτηριστικά που εμφάνιζαν τα διατροφικά πρωτόκολλα (1^η περίοδος:



πάνω από 10%, υποδηλώνοντας μεγαλύτερη σε αριθμό κατανάλωση ρότιφερ (Εικ.7Γ) σε σχέση με τα υπόλοιπα πρωτόκολλα. Όσον αφορά την διατροφική συμπεριφορά των νυμφών, στην περίπτωση του πρωτοκόλλου που εμπεριείχε κωπήποδα, είναι γεγονός ότι δεν εντοπίστηκαν στο πεπτικό κανάλι. Οι μοναδικές μορφές που εντοπίστηκαν ήταν κύστες κωπήποδων την 8^η ημέρα της εκτροφής (Εικ.7Β).

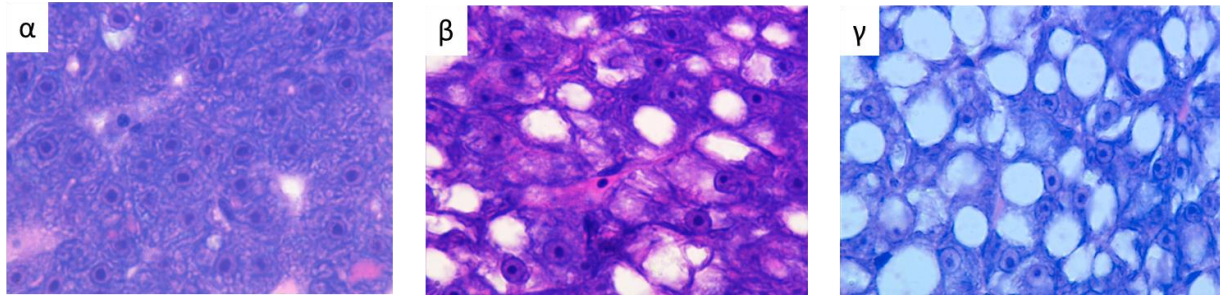


Εικόνα 7. Ιστολογικές τομές όπου εμφανίζονται τα διάφορα συστατικά τροφής στο πεπτικό κανάλι των νυμφών του μαγιάτικου. ME = μεσαίο έντερο. OE = οπίσθιο τμήμα του εντέρου, Κυστ. Κωπ. = κύστη κωπήποδου, Ροτ. = ρότιφερς – τροχόζωα, Αρτ. = Αρτέμια, Ε = έδρα, Στ. = στομάχι.

Κατά την δεύτερη περίοδο της εκτροφής όπου και στα τρία πρωτόκολλα έγινε εισαγωγή της Αρτέμιας AF η οποία καταναλώθηκε αμέσως από τις νύμφες του μαγιάτικου. Ταυτόχρονα όμως παρατηρήθηκε από την ανάλυση του περιεχόμενου στο πεπτικό κανάλι ότι και στις τρεις περιπτώσεις υπήρξε ένα χρονικό διάστημα 3 μερών για το κοινό πρωτόκολλο και 2 ημερών για το πρωτόκολλο με τα κωπήποδα και τα προβιοτικά όπου παρατηρήθηκε η Αρτέμια AF να περνά άπεπτη από το πεπτικό κανάλι (Εικ. 7Δ). Το γεγονός αυτό προκάλεσε διατήρηση των χαμηλών επιπέδων λίπους στο συκώτι στο κοινό και στο πρωτόκολλο με τα κωπήποδα για διάστημα ακόμα δυο ημερών ενώ δεν επηρέασε το πρωτόκολλο με τα προβιοτικά.

Κατά την 3^η περίοδο πραγματοποιήθηκε εισαγωγή στο διατροφικό πρωτόκολλο και της μεγαλύτερης αρτέμιας EG, η οποία πριν γίνει η χορήγησή της είχε πραγματοποιηθεί εμπλουτισμός της με εμπορικά εμπλουτιστικά. Ταυτόχρονα γινόταν χορήγηση και της μικρότερης AF αρτέμιας, στην οποία δεν απαιτείται εμπλουτισμός. Και τα δυο είδη αρτέμιας εντοπίστηκαν στο στομαχικό περιεχόμενο των νυμφών. Το λίπος στο συκώτι δεν παρουσίασε μείωση, υποδηλώνοντας έτσι ότι δεν υπήρξε περίοδος διατροφικής καταπόνησης την συγκεκριμένη χρονική περίοδο και στα τρία πρωτόκολλα που γινόταν χρήση της αρτέμιας.

Κατά την 4^η περίοδο οι νύμφες συνέχιζαν να καταναλώνουν την αρτέμια που τους χορηγούνταν από το διατροφικό πρωτόκολλο. Χαρακτηριστική είναι η 24^η μέρα εκτροφής κατά την οποία το λίπος στο συκώτι είναι σε επίπεδα κάτω του 10%, υποδηλώνοντας για την εκτροφή με τα προβιοτικά μια περίοδο διατροφικής καταπόνησης. Η δεξαμενή στην οποία έγιναν τα πειράματα με τα προβιοτικά είχε ψάρια έως την 32^η ημέρα μετά την εκκόλαψη. Αντίθετα οι δεξαμενές με το κοινό πρωτόκολλο, το πείραμα των νυμφικών εκτροφών τελείωσε την 40^η και 45^η ημέρα εκτροφής, όπου στην συνέχεια τα ψάρια οδηγήθηκαν στην προπάχυνση. Στο κοινό πρωτόκολλο εκτροφής η κατανάλωση ξηρής τροφής άρχισε την 37^η ημέρα εκτροφής, ενώ στο πρωτόκολλο με τα κωπήποδα το αντίστοιχο παρατηρήθηκε την 41^η ημέρα της εκτροφής.



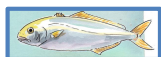
Εικόνα 8. Ιστολογικές τομές από συκώτι σε μαγιάτικο όπου εμφανίζονται τρία διαφορετικά επίπεδα εναπόθεσης λίπους στο συκώτι.

Συζήτηση

Είναι γεγονός ότι βασικό ρόλο στην ανάπτυξη μιας βιώσιμης ιχθυοκαλλιέργειας παίζει η διατροφή των ιχθυονυμφών αφού η ανάπτυξη γενικότερα των ψαριών, η υγεία και η ευζωία είναι πρωταρχικής σημασίας (Olivotto et al., 2017; Piccinetti et al., 2017). Δεδομένου ότι ο υποσιτισμός είναι ένας βασικός παράγοντας καταπόνησης των νυμφών, οι διατροφικές απαιτήσεις ακόμα και στο επίπεδο της διαμόρφωσης των διατροφικών πρωτοκόλλων που απαιτούνται για τη βέλτιστη ανάπτυξη προνυμφών, έχουν μεγάλη σημασία (Cahu et al., 2003). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης αναδεικνύουν την διαφοροποίηση της επίδρασης στην νυμφική εκτροφή του μαγιάτικου των διαφορετικών πρωτοκόλλων. Επίσης η προσέγγιση που έγινε πέρα των παραγωγικών δεικτών σε σχέση με τους ρυθμούς αύξησης, μας έδειξε με ακρίβεια τις περιόδους της διατροφικής καταπόνησης για κάθε διαφορετικό διατροφικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν την μελέτη.

Ειδικότερα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διατροφή των νυμφών του μαγιάτικου με κωπήποδα βοήθησε σημαντικά στο να επιτευχθούν μεγαλύτεροι ρυθμοί αύξησης σε σχέση με τα αλλά δυο πρωτόκολλα εκτροφής. Είναι γεγονός ότι ορισμένα είδη όπως η τσιπούρα (*Sparus aurata*), το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), ο κρانيός (*Argyrosomus regius*) κ.α, επιτυγχάνουν ικανοποιητικά ποσοστά ανάπτυξης και επιβίωσης παρέχοντάς τους αποκλειστικά εμπλουτισμένα ρότιφερ και αρτέμια. Ωστόσο, η σίτιση με κωπήποδα κατά τη διάρκεια της προνυμφικής περιόδου αναφέρουν ότι βελτιώνει την ανάπτυξη τόσο κατά την νυμφική εκτροφή όσο και σε νεαρά ψάρια (Blanco et al., 2016; Olivotto et al., 2010; Olivotto et al., 2008b). Ως εκ τούτου, τα κωπήποδα μπορούν να θεωρηθούν ένα σημαντικό συμπλήρωμα κατά την φάση των αρχικών σταδίων διατροφής όταν δηλαδή ταυτόχρονα χορηγούνται τα ρότιφερ και η αρτέμια ως πρώτη ζωντανή τροφή σε προνύμφες θαλάσσιων ψαριών (Olivotto et al., 2008a; Olivotto et al., 2008b). Στην φύση, τα κωπήποδα είναι το κύριο φυσικό θήραμα το οποίο προτιμούν σε μεγαλύτερο βαθμό για την διατροφή τους τα περισσότερα θαλάσσια ψάρια κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά τους στάδια (Drillet et al., 2011). Επιπρόσθετα έχει αποδειχθεί ότι κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των νυμφών, τα ευεργετικά αποτελέσματα που προσφέρουν στις νύμφες συνδέονται με τη βιοχημική σύνθεση των κωπήπόδων. Ειδικότερα, έχει δοθεί έμφαση στη σύνθεση των λιπιδίων τους, στην περιεκτικότητα και την αναλογία των υψηλά ακόρεστων λιπαρών οξέων (Bell et al., 2003).

Στην παρούσα μελέτη ωστόσο, η κατανάλωση κωπήπόδων από τις νύμφες, αν και έδωσε πλεονέκτημα αύξησης σε σχέση με τα υπόλοιπα δύο πρωτόκολλα εκτροφής, δεν επηρέασε το ποσοστό λίπους στο συκώτι. Αντιθέτως στο πρωτόκολλο εκτροφής με τα προβιοτικά υπήρξε σημαντική βελτίωση του λίπους κατά τις πρώτες ημέρες εκτροφής σε σχέση με τα υπόλοιπα δυο πρωτόκολλα. Το παραπάνω υποδηλώνει την σημαντική επίδραση των προβιοτικών στις διαδικασίες πέψης των ρότιφερ λόγω του ότι επιδρούν θετικά στην μείωση του αρνητικού βακτηριακού φορτίου όπως τα διάφορα είδη *Vibrio* κατά την διάρκεια των νυμφικών εκτροφών. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης που πραγματοποιήθηκε από το Πανεπιστήμιο Πατρών στο **Παραδοτέο Π2.3.1**. Ένα σημαντικό πρόβλημα που προκύπτει κατά την χρήση των κωπήπόδων είναι η δυσκολία παραγωγής τους σε ευρεία βιομηχανική κλίμακα και το υψηλό κόστος που έχουν στην παρούσα χρονική στιγμή γεγονός που οδηγεί στην περιορισμένη και με μέτρο χρήση τους. Το παραπάνω αποτελεί ένα σημαντικό βρόγχο για την ευρεία χρησιμοποίησή τους και κατά το στάδιο



εκτροφής του μαγιάτικου γεγονός που δεν τα κάνει ανταγωνιστικά σε σχέση με το κοινό πρωτόκολλο και το πρωτόκολλο με τα προβιοτικά.

Τα έως τώρα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι το μέγεθος στο οποίο αρχίζουν να δημιουργούνται οι γαστρικοί αδένες είναι μεταξύ των 5,7 και 6,0 mm. Ωστόσο, αν και η έναρξη χορήγησης της αρτέμιας AF έγινε όταν ο μέσος όρος των δειγμάτων ήταν στα 5 mm, αυτή φάνηκε να καταναλώνεται από τις νύμφες. Το παραπάνω αποδεικνύεται από το γεγονός ότι, από την στιγμή που δόθηκε η αρτέμια AF, καταναλώθηκε αμέσως και από την επόμενη κιόλας μέρα άρχισε να αξιοποιείται από τον οργανισμό, αφού στις νύμφες οι οποίες κατανάλωσαν αρτέμια AF παρατηρήθηκε ξεκάθαρη αύξηση του ποσοστού λίπους στο συκώτι τους. Επίσης δεν παρατηρήθηκε σε κανένα δείγμα που μελετήθηκε και σε καμιά μέρα εκτροφής, άπεπτη αρτέμια ή τμήματα αρτέμιας στο τελευταίο τμήμα του πεπτικού καναλιού. Συνεπώς, ο συγχρονισμός της χορήγησης της αρτέμιας AF και της εμφάνισης των γαστρικών αδένων φαίνεται να βοηθά στην μέγιστη αξιοποίηση της χορηγούμενης τροφής.

Συμπεράσματα

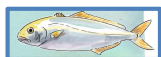
Η χρήση κωπηπόδων συνέβαλε θετικά στους ρυθμούς αύξησης του μαγιάτικο σε σχέση με τα άλλα πρωτόκολλα εκτροφής αλλά η χρήση τους και από οικονομικής και διαχειριστικής πλευράς κρίνεται προς το παρόν ακόμα προβληματική.

Τα προβιοτικά συντελούν στην μείωση του παθογόνου βακτηριακού φορτίου (**Π2.3.1**) κατά τις πρώτες ημέρες της εκτροφής γεγονός που επιδρά θετικά όπως φάνηκε από την παρούσα εργασία στους δείκτες της διατροφικής καταπόνησης των νυμφών του μαγιάτικου.

Διαφοροποιήσεις από ΤΠΕ: Καμία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alajmi, F., Zeng, C., 2014. The effects of stocking density on key biological parameters influencing culture productivity of the calanoid copepod, *Parvocalanus crassirostris*. *Aquaculture*. 434, 201-207.
- Aragão, C., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Fyhn, H.-J., 2004. Amino acid pools of rotifers and Artemia under different conditions: nutritional implications for fish larvae. *Aquaculture*. 234, 429-445.
- Bell, E.M., Lockyear, J.F., McPherson, J.M., Dale Marsden, A., Vincent, A.C.J., 2003. First Field Studies of an Endangered South African seahorse, *Hippocampus capensis*. *Environmental Biology of Fishes*. 67, 35-46.
- Bennett, H.S., Wyrick, A.D., Lee, S.W., McNeil, J.H., 1976. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives, and simple stains. *Stain Technology*. 51, 71-94.
- Beyersmann, P.G., Tomasch, J., Son, K., Stocker, R., Göker, M., Wagner-Döbler, I., Simon, M., Brinkhoff, T., 2017. Dual function of tropodithetic acid as antibiotic and signaling molecule in global gene regulation of the probiotic bacterium *Phaeobacter inhibens*. *Scientific Reports*. 7, 730.
- Blanco, A., Planas, M., Moyano, F.J., 2016. Ontogeny of digestive enzymatic capacities in juvenile seahorses *Hippocampus guttulatus* fed on different live diets. *Aquaculture Research*. 47, 3558-3569.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J., Takeuchi, T., 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*. 227, 245-258.
- Conceição, L.E.C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., Dinis, M.T., 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*. 41, 613-640.
- Dawood, M.A.O., Koshio, S., Abdel-Daim, M.M., Van Doan, H., 2019. Probiotic application for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. 11, 907-924.
- Drillet, G., Frouël, S., Sichlau, M.H., Jepsen, P.M., Højgaard, J.K., Joarder, A.K., Hansen, B.W., 2011. Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. *Aquaculture*. 315, 155-166.
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., Ross, R.P., 2018. The Gut Microbiota of Marine Fish. *Frontiers in Microbiology*. 9.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. 191, 259-270.
- Holt, V.L., Cushing-Haugen, K.L., Daling, J.R., 2003. Oral contraceptives, tubal sterilization, and functional ovarian cyst risk. *Obstetrics and Gynecology*. 102, 252-258.



- Makridis, P., Kokou, F., Bournakas, C., Papandroulakis, N., Sarropoulou, E., 2021. Isolation of *Phaeobacter* sp. from Larvae of Atlantic Bonito (*Sarda sarda*) in a Mesocosmos Unit, and Its Use for the Rearing of European Seabass Larvae (*Dicentrarchus labrax* L.). *Microorganisms*. 9.
- Margulies, D., 1993. Assessment of the nutritional condition of larval and early juvenile tuna and Spanish mackerel (Pisces: Scombridae) in the Panamá Bight. *Marine Biology*. 115, 317-330.
- McDowell, E.M., Trump, B.F., 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 100, 405-414.
- Nayak, S.K., 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*. 41, 1553-1573.
- Olivotto, I., Piccinetti, C.C., Avella, M.A., Rubio, C.M., Carnevali, O., 2010. Feeding strategies for striped blenny *Meiacanthus grammistes* larvae. *Aquaculture Research*. 41, e307-e315.
- Olivotto, I., Avella, M.A., Sampaolesi, G., Piccinetti, C.C., Navarro Ruiz, P., Carnevali, O., 2008a. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: Rearing and feeding studies. *Aquaculture*. 283, 92-96.
- Olivotto, I., Planas, M., Simões, N., Holt, G.J., Avella, M.A., Calado, R., 2011. Advances in Breeding and Rearing Marine Ornamentals. *Journal of the World Aquaculture Society*. 42, 135-166.
- Olivotto, I., Chemello, G., Vargas, A., Randazzo, B., Piccinetti, C.C., Carnevali, O., 2017. Marine ornamental species culture: From the past to “Finding Dory”. *General and Comparative Endocrinology*. 245, 116-121.
- Olivotto, I., Capriotti, F., Buttino, I., Avella, A.M., Vitiello, V., Maradonna, F., Carnevali, O., 2008b. The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphiprion clarkii* larviculture: Effects on larval survival and growth. *Aquaculture*. 274, 347-352.
- Papadakis, I.E., Kentouri, M., Divanach, P., Mylonas, C.C., 2013. Ontogeny of the digestive system of meagre *Argyrosomus regius* reared in a mesocosm, and quantitative changes of lipids in the liver from hatching to juvenile. *Aquaculture*. 388, 76-88.
- Papadakis, I.E., Zaiss, M.M., Kyriakou, Y., Georgiou, G., Divanach, P., Mylonas, C.C., 2009. Histological evaluation of the elimination of *Artemia* nauplii from larval rearing protocols on the digestive system ontogeny of shi drum (*Umbrina cirrosa* L.). *Aquaculture*. 286, 45-52.
- Piccinetti, C.C., Grasso, L., Maradonna, F., Radaelli, G., Ballarin, C., Chemello, G., Evjemo, J.O., Carnevali, O., Olivotto, I., 2017. Growth and stress factors in ballan wrasse (*Labrus bergylta*) larval development. *Aquaculture Research*. 48, 2567-2580.
- Przybył, A., Ostaszewska, T., Mazurkiewicz, J., Wegner, A., 2006. The effect of experimental starters on morphological changes in the intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae reared under controlled conditions. *Arch. Pol. Fish.* 14, 67-83.
- Rønnestad, I., Thorsen, A., Finn, R.N., 1999. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture*. 177, 201-216.
- Vadstein, O., Bergh, Ø., Gatesoupe, F.-J., Galindo-Villegas, J., Mulero, V., Picchiatti, S., Scapigliati, G., Makridis, P., Olsen, Y., Dierckens, K., Defoirdt, T., Boon, N., De Schryver, P., Bossier, P., 2013. Microbiology and immunology of fish larvae. *Reviews in Aquaculture*. 5, S1-S25.
- Van Doan, H., Hoseinifar, S.H., Ringø, E., Ángeles Esteban, M., Dadar, M., Dawood, M.A.O., Faggio, C., 2020. Host-Associated Probiotics: A Key Factor in Sustainable Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*. 28, 16-42.
- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-de Frías, C., Cortés, A., 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 20, 126-136.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRASΕυρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Ταμείο
Περιφερειακής ΑνάπτυξηςΕΠΑνεΚ 2014-2020
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ