

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΦΗΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΥΔΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΔΙΑΒΙΩΣΗΣ
ΩΣ ΜΕΣΟΥ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗΣ
ΕΚΤΡΟΦΗΣ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ *Sparus aurata*

ΜΠΑΤΖΙΝΑ ΑΛΚΗΣΤΗ

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Καρακατσούλη Ναυσικά, Επίκ. Καθηγήτρια ΓΠΑ

Χαδιώ Στέλλα, Αναπλ. Καθηγήτρια ΓΠΑ

Παπουτσόγλου Σωφρόνιος, Ομ. Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα, Οκτώβριος 2013

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΦΗΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΥΔΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΔΙΑΒΙΩΣΗΣ
ΩΣ ΜΕΣΟΥ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗΣ
ΕΚΤΡΟΦΗΣ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ *Sparus aurata***

ΜΠΑΤΖΙΝΑ ΑΛΚΗΣΤΗ

Εξεταστική Επιτροπή:

Καρακατσούλη Ναυσικά, Επίκ. Καθηγήτρια ΓΠΑ

Χαδιώ Στέλλα, Αναπλ. Καθηγήτρια ΓΠΑ

Παπουτσόγλου Σωφρόνιος, Ομ. Καθηγητής ΓΠΑ

Βερροιάπουλος Γεώργιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Μήλιου Ελένη, Αναπλ. Καθηγήτρια ΓΠΑ

Παναγιωτάκη Παναγιώτα, Αναπλ. Καθηγήτρια Παν/μιο Θεσσαλίας

Μεγαλοφώνου Περσεφόνη, Επίκ. Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Αθήνα, Οκτώβριος 2013

Η αποδοχή για την εκπόνηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνθεσης του Τμήματος Γεωπονικής Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών (ΓΣΕΣ 194η/29-04-2009). Ο ορισμός της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής και η ανάθεση του θέματος έγιναν με απόφαση της ΓΣΕΣ (198η/10-06-2009). Η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή εγκρίθηκε με απόφαση της ΓΣΕΣ (4η/03-06-2013). Το ελάχιστο κατώτερο χρονικό όριο για την απόκτηση του Διδακτορικού Διπλώματος ήταν τουλάχιστον τέσσερα (4) ημερολογικά έτη από τον ορισμό της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής (Ν. 3685/2008).

Η έγκριση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών δε δηλώνει την αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ.2).

Στη Σοφία, τον Αντώνη και τη Νίκη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΛΦΑΒΗΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	7
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	8
A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	10
B. ABSTRACT.....	13
Γ. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	16
1. Εισαγωγή.....	17
1.1 Διαφοροποίηση περιβάλλοντος.....	17
1.2 Από τη διαφοροποίηση στον εμπλουτισμό περιβάλλοντος	18
1.3 Επίδραση ενός σύνθετου περιβάλλοντος διαβίωσης στα ψάρια	19
1.4 Η σχέση του εμπλουτισμού περιβάλλοντος με την ευζωία.....	20
1.4 Σκοπός.....	23
2. Συνοπτική περιγραφή πειραμάτων	25
Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	26
1. Πείραμα 1.....	26
1.1 Εισαγωγή – Σκοπός	27
1.2 Υλικά και μέθοδοι	27
1.3 Αποτελέσματα	35
1.4 Συζήτηση.....	45
2. Πείραμα 2.....	52
2.1 Εισαγωγή - Σκοπός	53
2.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	54
2.3 Αποτελέσματα	57
2.4 Συζήτηση.....	70
3. Πείραμα 3.....	77
3.1 Εισαγωγή - Σκοπός	78

3.2 Υλικά και Μέθοδοι	79
3.3 Αποτελέσματα	83
3.4 Συζήτηση.....	88
4. Πείραμα 4.....	91
4.1 Εισαγωγή - Σκοπός	92
4.2 Υλικά και Μέθοδοι	93
4.3 Αποτελέσματα	96
4.4 Συζήτηση.....	100
5. Πείραμα 5.....	103
5.1 Εισαγωγή – Σκοπός	104
5.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	104
5.3 Αποτελέσματα	108
5.4 Συζήτηση.....	121
Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	125
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	129

ΑΛΦΑΒΗΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

5-HIAA	5-υδροξυ-ινδολοξικό οξύ, Μεταβολίτης της σεροτονίνης
5-HT	Σεροτονίνη
BS	Blue Substrate (Κυανό υπόστρωμα, KY)
CF	Condition factor (Συντελεστής ευρωστίας)
CV	Coefficient of variation (Συντελεστής παραλλακτικότητας)
DA	Ντοπαμίνη
DHA	Εικοσιδυο-εξανοϊκό οξύ
DOPAC	3,4 διυδροξυ-φαινυλακετικό οξύ
DPA	Εικοσιδυο-πεντανοϊκό οξύ
EPA	Εικοσι-πεντανοϊκό οξύ
FCR	Food conversion ratio, Συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής
GS	Green Substrate (Πράσινο υπόστρωμα, ΠΥ)
HVA	Ομοβανιλικό οξύ
NS	No-Substrate (δεξαμενές χωρίς υπόστρωμα, XY)
PBS	Photo of the Blue Substrate (Φωτογραφία Κυανού Υποστρώματος, ΦΚΥ)
R2	2 ώρες επαναφορά μετά το stress
R24	24 ώρες επαναφορά μετά το stress
R6	6 ώρες επαναφορά μετά το stress
RBS	Red-Brown Substrate (Ερυθροκαφέ Υπόστρωμα, EKY)
S30	30 λεπτά εφαρμογή stress
S60	60 λεπτά εφαρμογή stress
S90	90 λεπτά εφαρμογή stress
SGR	Specific Growth Rate (Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης)
U	Unstressed (ψάρια χωρίς stress)
WG	Weight Gain (Επί % αύξηση του ζώντος βάρους)
EKY	Ερυθροκαφέ Υπόστρωμα
ENEO	Ελεύθερες Αζώτου Εκχυλισματικές Ουσίες
ΕΣΔ	Εγκεφαλοσωματικός Δείκτης
ΗΣΔ	Ηπατοσωματικός Δείκτης
KY	Κυανό Υπόστρωμα
NA	Νοραδρεναλίνη
Π	Χαμηλότερη πυκνότητα εκτροφής
2Π	Υψηλότερη πυκνότητα εκτροφής
ΠΥ	Πράσινο Υπόστρωμα
ΣΣΔ	Σπληνοσωματικός Δείκτης
ΦΚΥ	Φωτογραφία του Κυανού Υποστρώματος
XY	Χωρίς Υπόστρωμα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την ολοκλήρωση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής πολλοί συντέλεσαν ψυχικά, τεχνικά αλλά και υλικά και θεωρώ υποχρέωσή μου να τους εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες.

Όσα ευχαριστώ και να πω θα είναι λίγα για την επιβλέπουσά μου, κ. Ναυσικά Καρακατσούλη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ. Όλα αυτά τα χρόνια με στήριξε, με δίδαξε και με εμπιστεύτηκε αφιερώνοντας ατελείωτες ώρες για την επιτυχή εκπόνηση και συγγραφή της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, δείχνοντας πάντα απεριόριστη κατανόηση και υπομονή.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, κ. Σωφρόνιο Ε. Παπουτσόγλου Ομότιμο Καθηγητή ΓΠΑ για τις υποδείξεις του, και ιδιαίτερα την κ. Στέλλα Χαδιώ Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ που με συμβούλευε πάντα ουσιαστικά και με βοήθησε σε κάθε μου απορία και προβληματισμό οποτεδήποτε τη χρειάστηκα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής κ. Παναγιώτα Παναγιωτάκη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τον ενθουσιασμό και την υποστήριξη που πάντα έδειχνε για αυτή τη μελέτη, κ. Ελένη Μήλιου Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ για τις εποικοδομητικές συμβουλές της, κ. Γεώργιο Βερροϊόπουλο Καθηγητή ΕΚΠΑ για το ενδιαφέρον που έδειξε και τις πολύτιμες διορθώσεις του και κ. Περσεφόνη Μεγαλοφώνου Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ για τις ουσιαστικές υποδείξεις και τις συμβουλές της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους τεχνικούς του Εργαστηρίου Εφηρμοσμένης Υδροβιολογίας, κ. Γιώργο Κωνσταντίνου, κ. Ξενοφώντα Βρεττό και κ. Παναγιώτη Φούγια που πρόσφεραν απλόχερα τις γνώσεις και τη βοήθειά τους για την πραγματοποίηση της μελέτης αυτής.

Για την πολύτιμη συμβολή τους στις αναλύσεις, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κκ Μυλωνά Κωνσταντίνο και Παπαδάκη Ιωάννη από το ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., τις κ. Παπαδοπούλου-Νταϊφώτη Ζέτα, Δάλλα Χριστίνα και Παπασάββα Δέσποινα από την Ιατρική Σχολή Αθηνών και τον κ. Καλλογιάννη Δημήτριο από το ΓΠΑ. Επίσης, ευχαριστώ την κ. Σωτηράκογλου Κυριακή Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ για τις συμβουλές της κατά τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φοιτητές που βοήθησαν κατά τις δειγματοληψίες και τις αναλύσεις.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στους φίλους μου Άκη Λιάκο, Λένα Ζυγογιάννη, Μαρία Γκερέκου, Ίριδα Παλαμίδα, Άννα Ψάρρου, Σοφία Αποστολίδου, Μαντώ Κοτσίρη, Γιάννη Κλειδά, Δήμητρα Ταγκούλη, Ανελίζα Τσουμπρή, Ιωάννα Ζυγογιάννη για την ανοχή και την υποστήριξη που έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια, τα χιλιόμετρα που ταξίδεψαν για να με βοηθήσουν σε πειράματα, το ενδιαφέρον τους και την υπομονή τους.

Τέλος ευχαριστώ πολύ την οικογένειά μου Σοφία Βουκάλη, Αντώνη Βουκάλη και Νίκη Καρναβά για την στήριξή τους και την εμπιστοσύνη τους σε όλες μου τις αποφάσεις.

**ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΔΙΑΒΙΩΣΗΣ ΩΣ
ΜΕΣΟΥ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗΣ ΕΚΤΡΟΦΗΣ ΤΗΣ
ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ *Sparus aurata***

ΜΠΑΤΖΙΝΑ ΑΛΚΗΣΤΗ

*Τμήμα Ζωικής Επιστήμης και Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο Εφηρμοσμένης
Υδροβιολογίας, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 118 55, email: nafsika@aua.gr*

Α. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος ορίζεται ως η τροποποίηση εκείνη του περιβάλλοντος διαβίωσης η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση των βιολογικών λειτουργιών των ζώων που βρίσκονται σε αιχμαλωσία και αποσκοπεί στην εξασφάλιση των «ψυχολογικών» αναγκών των ζώων αλλά και στην έκφραση της φυσικής τους συμπεριφοράς. Η πλειοψηφία των εργασιών που σχετίζονται με την επίδραση του εμπλουτισμού του περιβάλλοντος στα ψάρια επικεντρώνεται στην εφαρμογή ενός πιο σύνθετου περιβάλλοντος. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι η προσθήκη ζωντανών ή πλαστικών φυτών, διαφόρων ειδών υποστρωμάτων ή ακόμα και η εισαγωγή νέων αντικειμένων βελτιώνουν την ικανότητα ανεύρεσης τροφής των εκτρεφόμενων ψαριών που προορίζονται για απελευθέρωση στο φυσικό περιβάλλον, ενώ αυξάνονται οι πιθανότητες επιβίωσης των ψαριών μετά την απελευθέρωσή τους. Επιπλέον, η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος μπορεί να αυξήσει, να μειώσει ή να μην επηρεάσει την επιθετική συμπεριφορά διαφόρων ειδών εκτρεφόμενων ψαριών και να βελτιώσει ή να μην έχει επίδραση στην ανάπτυξη. Ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος μπορεί επίσης να βελτιώσει την ικανότητα αντίληψης Θηλαστικών αλλά και των ψαριών. Ειδικά στην περίπτωση των ψαριών, η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος επηρεάζει το μέγεθος και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό του εγκεφάλου, που μπορεί να συμβάλλουν σε μια πιο εύπλαστη συμπεριφορά και καλύτερη ικανότητα αντίληψης και μάθησης.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί το κατά πόσο η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος διαβίωσης της τσιπούρας *Sparus aurata* μπορεί να αποτελέσει ένα μέσο εμπλουτισμού του περιβάλλοντος και να βελτιώσει την εντατική εκτροφή της. Έτσι, σχεδιάστηκαν και πραγματοποιήθηκαν πέντε πειράματα.

Στο **πρώτο πείραμα**, διαπιστώθηκε ότι όταν άτομα τσιπούρας (ηλικίας 1+) εκτράφηκαν (84 ημέρες) σε δεξαμενές με Κυανό ή Ερυθροκαφέ υπόστρωμα (ΚΥ και ΕΚΥ αντίστοιχα) βελτιώθηκαν τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξής τους (ζων βάρος, ολικό και σταθερό μήκος, ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, % αύξηση του ζώντος βάρους) και η αξιοποίηση της τροφής (συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής). Επιπλέον, τα ψάρια του ΚΥ παρουσίασαν καλύτερο συντελεστή ευρωστίας και αυξημένη περιεκτικότητα σε ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σε δείγμα του ραχιαίου μυϊκού ιστού τους σε σχέση με τα ψάρια των άλλων επεμβάσεων. Ακόμη, παρατηρήθηκε μειωμένη επιθετικότητα στα ψάρια του ΚΥ και ΕΚΥ καθώς επίσης και διαφοροποίηση στα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου. Η απασχόληση των ψαριών με τον

πυθμένα της δεξαμενής παρατηρήθηκε σε όλες τις επεμβάσεις ανεξάρτητα από την παρουσία του υποστρώματος. Η γενική εικόνα (ανάπτυξη, συμπεριφορά) των ψαριών στις δεξαμενές με Πράσινο υπόστρωμα (ΠΥ) δεν παρουσίασε σημαντικές διαφοροποιήσεις από αυτή των δεξαμενών Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ). Η φυσιολογία των ψαριών όπως εκτιμήθηκε από τις παραμέτρους του πλάσματος του αίματος και του ήπατος που αναλύθηκαν, ήταν παρόμοια μεταξύ των επεμβάσεων.

Στο **δεύτερο πείραμα**, μελετήθηκε κατά πόσο τα ευεργετικά αποτελέσματα του Κυανού και Ερυθροκαφέ υποστρώματος μπορούν να είναι εμφανή ακόμα και όταν η τσιπούρα εκτρέφεται σε διαφορετικές πυκνότητες (98 ημέρες). Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν άτομα τσιπούρας διαφορετικής γενιάς και ηλικίας (0+). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε ότι τα ψάρια στις δεξαμενές με ΚΥ παρουσίασαν καλύτερη ανάπτυξη (ζων βάρος, ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, % αύξηση του ζώντος βάρους), μειωμένη επιθετικότητα, καλύτερη ποιότητα ραχιαίου μυϊκού ιστού ως προς την περιεκτικότητά του σε ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και μεταβολές στα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου. Αντίθετα, τα ψάρια των δεξαμενών με ΕΚΥ αν και παρουσίασαν όμοια αποτελέσματα με αυτά των ψαριών με ΚΥ, δεν παρουσίασαν βελτίωση στην ανάπτυξη. Η φυσιολογία των ψαριών δεν επηρεάστηκε (παραμέτροι πλάσματος αίματος και ήπατος, σύσταση σώματος).

Στα πρώτα δύο πειράματα, διαπιστώθηκε η θετική επίδραση του χρωματιστού υποστρώματος χαλκιού στην τσιπούρα. Σκοπός του **τρίτου πειράματος** είναι να διερευνηθούν οι πιθανές επιλογές της τσιπούρας ως προς τα υποστρώματα που είχαν χρησιμοποιηθεί στα προηγούμενα πειράματα. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές προτίμησης σε συνδυασμούς ανά δύο των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα προηγούμενα πειράματα και της επέμβασης ΧΥ. Οι δοκιμές προτίμησης πραγματοποιήθηκαν σε άτομα δύο διαφορετικών ηλικιών (0+ και 2+) ώστε τα αποτελέσματα να συνεκτιμηθούν με αυτά των μακροχρόνιων πειραμάτων. Επίσης, οι δοκιμές έγιναν στα ψάρια ατομικά και σε ομάδες των επτά ατόμων ώστε να εκτιμηθεί η πιθανή εμπλοκή των κοινωνικών σχέσεων στην προτίμησή τους. Στις δοκιμές των τριών υποστρωμάτων με την επέμβαση ΧΥ, παρατηρήθηκε σαφής προτίμηση του ΚΥ ή του ΕΚΥ και απόρριψη του ΠΥ για τα ψάρια και των δύο ηλικιών. Στις δοκιμές μεταξύ των υποστρωμάτων, τα μεγαλύτερα ψάρια προτίμησαν το ΚΥ έναντι του ΕΚΥ ή του ΠΥ, ενώ επέλεξαν το ΕΚΥ μόνο στην περίπτωση που το ΚΥ δε δινόταν ως επιλογή. Αντίθετα, τα ψάρια μικρότερης ηλικίας δεν επέλεξαν μεταξύ του ΚΥ και του ΕΚΥ ή του ΠΥ, ενώ προτίμησαν το ΕΚΥ έναντι του ΠΥ. Επίσης, οι επιλογές των ψαριών δε διέφεραν όταν δοκιμάζονταν ατομικά ή σε ομάδες.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των τριών προηγούμενων πειραμάτων, το επόμενο πείραμα επικεντρώθηκε στο ΚΥ. Σκοπός του **τέταρτου πειράματος** ήταν να αποσαφηνιστεί η φύση της θετικής επίδρασης του Κυανού υποστρώματος (φυσική παρουσία ή/και χρώμα) και η πιθανή εμπλοκή του φωτεινού περιβάλλοντος στα αποτελέσματα. Για το σκοπό αυτό άτομα τσιπούρας (ηλικίας 0+) εκτράφηκαν σε δεξαμενές με ΚΥ, με τη Φωτογραφία του Κυανού υποστρώματος (ΦΚΥ) ή δεξαμενές ΧΥ (75 ημέρες). Διαπιστώθηκε ότι τα ψάρια του ΚΥ είχαν καλύτερη ανάπτυξη (ζων

βάρος, ειδικός ρυθμός ανάπτυξης) και αξιοποίηση της τροφής (συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής), ενώ παρουσίασαν τη χαμηλότερη επιθετικότητα. Οι παράμετροι του αίματος και η δομή του αμφιβληστροειδούς χιτώνα δεν επηρεάστηκαν από τις επεμβάσεις. Επίσης, η φυσιολογία, τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης και η επιθετικότητα των ψαριών στις δεξαμενές με ΦΚΥ δε διέφεραν από των ψαριών του ΧΥ.

Τέλος, στο **πέμπτο πείραμα** μελετήθηκε η πιθανή επίδραση του ΚΥ στην αντίδραση στο stress της τσιπούρας. Το πείραμα σχεδιάστηκε με στόχο τη μελέτη της επίδρασης κατά τη διάρκεια εφαρμογής οξέος stress και κατά την επαναφορά των ψαριών μέσω δεικτών πρωτογενούς και δευτερογενούς αντίδρασης. Άτομα τσιπούρας (ηλικίας 0+) εκτράφηκαν (75 ημέρες) σε δεξαμενές με ή χωρίς ΚΥ και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε stress συνωστισμού για 30, 60 ή 90 λεπτά. Επίσης μελετήθηκε η επαναφορά των ψαριών στις αρχικές συνθήκες ύστερα από 2, 6 ή 24 ώρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα ψάρια που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με ΚΥ παρουσίασαν καλύτερα χαρακτηριστικά ανάπτυξης και μειωμένη επιθετικότητα κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου. Επιπλέον, το ΚΥ διαφοροποίησε την αντίδραση στο stress της τσιπούρας.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής υποδεικνύουν ότι το Κυανό υπόστρωμα, μέσω της φυσικής του παρουσίας και όχι μόνο του χρώματός του είναι ευεργετικό για την ελεγχόμενη εκτροφή της τσιπούρας *Sparus aurata*, αφού βελτιώνει τα παραγωγικά της χαρακτηριστικά αλλά και αυτά που σχετίζονται με τη συμπεριφορά της, τροποποιώντας τις κοινωνικές σχέσεις των ψαριών. Η χρήση του Κυανού υποστρώματος σαν ένας αποτελεσματικός τρόπος εμπλουτισμού του περιβάλλοντος που προάγει την ευζωία της τσιπούρας, ενισχύεται περαιτέρω από την προτίμηση του ψαριού για το υπόστρωμα αυτό. Θεωρείται ενθαρρυντικό ότι μια τόσο απλή διαφοροποίηση στο περιβάλλον εκτροφής των ψαριών (όπως το ΚΥ) μπορεί να έχει πολλαπλά οφέλη τόσο για το ψάρι όσο και για τον παραγωγό.

Λέξεις κλειδιά: *Sparus aurata*, εμπλουτισμός περιβάλλοντος, ευζωία, τσιπούρα, υπόστρωμα

MODIFICATIONS OF SURROUNDING ENVIRONMENT TO IMPROVE INTENSIVE REARING OF GILTHEAD SEABREAM

Sparus aurata

BATZINA ALKISTI

Faculty of Animal Science and Aquaculture, Department of Applied Hydrobiology,

75, Iera Odos, Athens, 118 55, email: nafsika@aua.gr

B. ABSTRACT

Environmental enrichment is defined as “an improvement in the biological functioning of captive animals resulting from modifications to their environment” and may provide for the psychological and behavioral needs of captive animals. The majority of the studies on the effect of environmental enrichment on fish focused on environmental complexity effects. For example, tanks containing live or plastic plants, several kinds of substrate or even novel objects improved the fitness and foraging behavior of hatchery-produced fish when released in the wild, thus increasing their chances of survival and success of re-introduction programs. On the other hand, structurally enriched tanks reduced, increased or had no effect on the aggressive behavior of several widely reared species. Moreover, environmental enrichment resulted in improved growth or survival for several fish species, but had no growth effect on other fish species. From another point of view, increased environmental complexity may enhance the cognitive abilities of other vertebrates and fish. Especially in the case of fish, environmental modifications affected brain size and brain cell proliferation which may contribute to a more flexible behavior and improved cognitive and learning abilities.

The aim of the present Thesis is to investigate whether the modification of surrounding environment of gilthead seabream *Sparus aurata* may act as a means of environmental enrichment and thus improve its intensive rearing. For this purpose, five experiments were designed and performed.

In the **first experiment** it was shown that gilthead seabream (age 1+) reared (84 days) with Blue or Red-Brown substrate (BS and RBS respectively) improved their growth performance (mass, total and standard length, Specific Growth Rate, Mass Gain) and feed utilization (Food Conversion Ratio). Besides, BS fish presented better Condition Factor (CF) and higher content of n-3 polyunsaturated fatty acids in the fillet than fish from other treatments. Moreover, lower level of aggression was observed for BS and RBS fish, which also showed certain alterations in brain monoamine neurotransmitters levels. Fish-bottom interactions were observed in all treatments regardless the presence of substrate. On the other hand, the overall performance of fish reared with Green substrate (GS) was hardly differentiated from fish reared in tanks without substrate (no-substrate, NS). Physiological status of fish as estimated by plasma and liver parameters examined was similar among treatments.

The **second experiment** investigated whether the beneficial effects of the presence of Blue or Red-Brown substrates could be still apparent when gilthead seabream is reared under different densities (98 days). In this experiment fish of different progeny and age (0+) were used. According to results BS fish had better growth performance (body mass, Specific Growth Rate, Mass Gain), reduced aggressive behavior, better fillet quality (n-3 polyunsaturated fatty acids content) and brain monoamine neurotransmitters alterations. On the other hand, RBS fish presented the same results as BS fish but failed to produce significant growth enhancement. Physiological status of fish was not affected by treatments (blood and liver parameters, carcass proximate composition).

In the first two experiments, the response of gilthead seabream to the chosen substrates was studied. The aim of the **third experiment** was to “ask” gilthead seabream if and what substrate it chooses. For this purpose, preference tests of paired choices were performed. Treatments included the three substrates used in previous experimentation and the plain environment (no-substrate). Preference tests were conducted for two age classes (2+ and 0+) to account for previous long term experiments and fish were tested either individually or in groups of seven specimens in order to evaluate the possible involvement of sociality on fish preferences. In contrasts of the three substrates with NS, a clear choice for BS and RBS and an insistent rejection of the GS was observed for fish of both age classes. In dual substrate contrasts older fish chose BS over RBS or GS while they preferred RBS only when BS was not present. On the other hand, younger fish made no choice between BS and RBS or GS while they preferred RBS over GS. According to results fish choices were quite similar no matter if fish were tested individually or in groups.

Given the results of the three previous experiments, the following experimentations were focused on the BS. The aim of the **forth experiment** was to elucidate whether the color of the BS used or its physical presence is responsible for the observed enrichment effects, as well as the possible involvement of the photic environment on results. For this purpose, 0+ fish were reared in tanks with BS, with the photo of the blue substrate on the bottom (PBS) or in NS. According to results, BS fish showed improved growth performance (mass, Specific Growth Rate) and food utilization (Food Conversion Ratio) and presented the lower level of aggression. Blood parameters and retina structure were not affected by treatments. Performance of fish reared with PBS was not differentiated from that of NS fish.

The aim of the **fifth experiment** was to investigate the possible effect of BS on gilthead seabream stress response. The experiment was designed to study the effect of confinement stress and fish recovery through primary and secondary stress response indicators. To this end, fish (age 0+) were reared (75 days) with or without BS and then subjected to confinement stress for 30, 60 or 90 minutes. Fish recovery to normal conditions was also examined after 2, 6 and 24 hours post-stress. According to results, fish reared with BS presented better growth performance and reduced aggressive

behavior than fish in NS tanks. Moreover, BS did modify the time course of gilthead seabream stress response to confinement.

In conclusion, the overall results of the present Thesis showed and confirmed that the presence of blue substrate, and not only its color, was beneficial for the intensive rearing of gilthead seabream, since it improved both productive-related and behavioral traits and modified fish social interactions. The use of the blue substrate as an effective means of environmental enrichment, improving fish welfare, is further supported by the fact that gilthead seabream preferred the blue substrate. It is considered encouraging that a rather simple improvement of fish rearing environment (as the substrate used) may have multiple beneficial aspects for fish and producers.

***Keywords:* Sparus aurata, environmental enrichment, welfare, seabream, substrate**

Γ. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

1.1 Διαφοροποίηση περιβάλλοντος

Η εκτροφή των ψαριών πραγματοποιείται κυρίως με στόχο τη διατροφή του ανθρώπου. Εξίσου σημαντική όμως, είναι η εκτροφή τους με σκοπό την απελευθέρωσή τους στη φύση για να εμπλουτιστούν τα φυσικά αποθέματα, η εκτροφή διακοσμητικών ψαριών και πειραματόζωων. Σημαντικά προβλήματα που έχουν προκύψει κατά την εκτροφή (π.χ. διατροφή, πυκνότητα εκτροφής, ποιότητα νερού) έχουν μελετηθεί και αντιμετωπιστεί με μεγάλη επιτυχία. Σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από την περίπτωση της εκτροφής των ψαριών που προορίζονται για τη διατροφή του ανθρώπου, η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος διαβίωσης απασχολεί ιδιαίτερα την έρευνα.

Όσον αφορά στα ψάρια που προορίζονται για τη βελτίωση των φυσικών αποθεμάτων, η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος διαβίωσής τους με διάφορα υλικά, αποτελεί κοινή τακτική προσομοίωσης του φυσικού περιβάλλοντος. Το τεχνητό περιβάλλον εκτροφής προκαλεί σημαντικές διαφοροποιήσεις στη συμπεριφορά των ψαριών, αφού εκτρέφονται σε μεγάλες πυκνότητες που δε συνηθίζεται στη φύση και δεν έχουν τη δυνατότητα να έρθουν σε επαφή με την πληθώρα των ερεθισμάτων που απαντώνται στο φυσικό περιβάλλον. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα εκτρεφόμενα άτομα να αδυνατούν να αναζητήσουν την τροφή τους, να μην είναι σε θέση να εντοπίσουν ή να αποφύγουν κάποιο θηρευτή και τελικά να διακυβεύεται η επιβίωσή τους όταν απελευθερώνονται στη φύση. Με σκοπό την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών, η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος διαβίωσης με την έννοια του εμπλουτισμού έχει παρουσιάσει θετικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, η προσθήκη ζωντανών ή πλαστικών φυτών, διαφόρων τύπων υποστρωμάτων ή ακόμα και η εισαγωγή νέων αντικειμένων στο περιβάλλον διαβίωσης των εκτρεφόμενων ψαριών βελτίωσε τη φυσιολογία και τη συμπεριφορά αναζήτησης τροφής ενώ αύξησε το ποσοστό επιβίωσής τους μετά την απελευθέρωση (Braithwaite and Salvanes, 2005; Lee and Berejikian, 2008; Roberts et al., 2011; Salvanes and Braithwaite, 2006).

Στην περίπτωση των ψαριών που εκτρέφονται ως διακοσμητικά, η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος διαβίωσης είναι επίσης ευρέως διαδεδομένη. Η εκτροφή τους βοηθά στη διατήρηση των φυσικών ιχθυοπληθυσμών που μειώνονται λόγω της υπεραλίευσης τους. Τόσο κατά τη διαβίωση των ψαριών στα ενυδρεία όσο και κατά την αναπαραγωγή τους, το περιβάλλον διαφοροποιείται με διάφορα υλικά όπως πέτρες, χαλίκι, ζωντανά ή πλαστικά φυτά ή ακόμα και πλαστικούς σωλήνες που λειτουργούν ως καταφύγια ή σημεία εναπόθεσης των αυγών, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της ευζωίας τους. Για παράδειγμα, η προσθήκη πλαστικών φυτών σε δεξαμενές με ιππόκαμπο *Hippocampus erectus* οδήγησε σε αυξημένα ποσοστά επιβίωσης των ατόμων αυτών σε σχέση με τα άτομα που ζούσαν σε συμβατικές δεξαμενές (Lin et al., 2009).

Επίσης, στην περίπτωση των ψαριών που προορίζονται ως πειραματόζωα για έρευνες σχετικές με τον άνθρωπο [κυρίως το είδος *Danio rerio* (zebrafish)], το περιβάλλον διαβίωσης απασχολεί τους ερευνητές. Οι εργαστηριακές δεξαμενές είναι

συνήθως απλές, χωρίς πρόσθετα υλικά. Όμως, ένα τέτοιο περιβάλλον ενδέχεται να περιορίσει την έκφραση της φυσικής συμπεριφοράς των ψαριών με αποτέλεσμα να υποβαθμίσει την ευζωία τους. Έτσι, η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος διαβίωσης θεωρείται ευεργετική επηρεάζοντας τόσο την ευζωία των πειραματόζωων όσο και την ακεραιότητα των πειραματικών αποτελεσμάτων (Brydges and Braithwaite, 2009; Williams et al., 2009).

Αντίθετα με τα παραπάνω, στην εκτροφή των ψαριών που προορίζονται για τη διατροφή του ανθρώπου, η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος διαβίωσης δεν αποτελεί συνήθη τακτική. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη τα ευεργετικά αποτελέσματα που έχουν παρατηρηθεί στις εκτροφές των άλλων ψαριών, η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος μπορεί να ωφελήσει τόσο το ψάρι βελτιώνοντας την ευζωία του, όσο και την παραγωγή. Οι μελέτες που αφορούν στην εφαρμογή τέτοιων πρακτικών είναι περιορισμένες και στοχεύουν κυρίως στη μείωση των τραυματισμών του δέρματος και των μορφολογικών αλλοιώσεων των πτερυγίων σε άτομα ιριδίζουσας πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* και υπόγλωσσου *Hippoglossus hippoglossus* (Arndt et al., 2001; Ottesen et al., 2007). Επίσης, έχει γίνει προσπάθεια να μειωθεί η καταστροφή των διχτυών των κλωβών από τα εκτρεφόμενα ψάρια και να περιοριστεί η διαφυγή τους. Συγκεκριμένα, σε πειραματικούς κλωβούς με μπακαλιάρους *Gadus morhua*, έγινε ανάρτηση αντικειμένων (πλαστικοί σωλήνες, πλαστικές μπάλες, σκοινί), τα οποία απέσπασαν την προσοχή των ψαριών και τελικά μειώθηκε η καταστροφή των διχτυών (Zimmermann et al., 2012).

1.2 Από τη διαφοροποίηση στον εμπλουτισμό περιβάλλοντος

Σύμφωνα με τη Newberry (1995) εκείνη η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος που έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση των βιολογικών λειτουργιών των ζώων που βρίσκονται σε αιχμαλωσία ορίζεται ως εμπλουτισμός του περιβάλλοντος. Ακόμη, σύμφωνα με τους Shepherdson et al. (1998) ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος δίνει τη δυνατότητα στα ζώα να εκφράσουν τη φυσική τους συμπεριφορά και να καλύψουν τις «ψυχολογικές» και φυσιολογικές τους ανάγκες. Η σημασία του εμπλουτισμού του περιβάλλοντος διατυπώθηκε αρχικά από τον Yerkes (1925), ενώ από τη δεκαετία του 1960 οι υπεύθυνοι των ζωολογικών κήπων άρχισαν να εμπλουτίζουν τα κλουβιά των ζώων (Mellen and MacPhee, 2001).

Η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους αυξάνοντας έτσι τα ερεθίσματα που δέχονται τα ζώα σε αιχμαλωσία. Ένας από αυτούς είναι η κοινωνική διαφοροποίηση, που πραγματοποιείται με την ταυτόχρονη παρουσία ατόμων του ίδιου ή διαφορετικού είδους μειώνοντας τις επιπτώσεις του κοινωνικού αποκλεισμού των ζώων αλλά και προάγοντας τη φυσική τους συμπεριφορά (Mellen and MacPhee, 2001).

Ακόμη, η διέγερση της ακοής, της όσφρησης ή της όρασης αποτελούν έναν τρόπο διαφοροποίησης του περιβάλλοντος. Για παράδειγμα η μετάδοση μουσικής, ή ήχων που

σχετίζονται με το φυσικό περιβάλλον των ζώων επηρεάζουν τη συμπεριφορά και τη φυσιολογία των ζώων (Newberry, 1995; Papoutsoglou et al., 2007, 2008, 2010, 2013; Wells, 2009). Επιπλέον, η διέγερση της όσφρησης με ουσίες που σχετίζονται ή δε σχετίζονται με το φυσικό περιβάλλον των ζώων μπορεί να επιφέρουν παρόμοια αποτελέσματα (Newberry, 1995; Wells, 2009). Ακόμη, η διέγερση της όρασης μπορεί να επιτευχθεί μέσω προβολής video, φωτογραφιών ή την τοποθέτηση καθρέφτη στο περιβάλλον διαβίωσης. Τα ερεθίσματα αυτά επηρεάζουν τη συμπεριφορά και την κοινωνικότητα των ζώων, ενώ σχετίζονται με την ικανότητα αντίληψης και μάθησης (Wells, 2009).

Η διαφοροποίηση μέσω της δημιουργίας ενός πιο σύνθετου περιβάλλοντος διαβίωσης, αποτελεί ίσως την πιο διαδεδομένη κατηγορία πιθανού εμπλουτισμού. Στους χώρους διαβίωσης ή εκτροφής μπορεί να γίνει προσθήκη διάφορων υλικών που προσομοιάζουν στο φυσικό περιβάλλον των ζώων προάγοντας φυσικές συμπεριφορές. Ωστόσο, η προσθήκη παιχνιδιών (π.χ. πλαστικές μπάλες, μεταλλικές ράβδοι, λάστιχα αυτοκινήτων) φαίνεται να βοηθά την κοινωνικότητα ορισμένων ζώων αλλά και να επηρεάζει την επιθετική τους συμπεριφορά (Newberry, 1995).

1.3 Επίδραση ενός σύνθετου περιβάλλοντος διαβίωσης στα ψάρια

Τα υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση του περιβάλλοντος στα ψάρια περιλαμβάνουν ζωντανά ή πλαστικά φυτά, βότσαλα, χαλίκια, βράχους, άμμο αλλά και άλλου τύπου υλικά όπως ξύλα, πλαστικούς σωλήνες ή κεραμικά αντικείμενα.

Για παράδειγμα, η προσθήκη υποστρώματος χαλικιού σε δεξαμενές με ιριδιζούσα πέστροφα *Oncorhynchus mykiss* βελτίωσε την ανάπτυξη της (Arndt et al., 2001), ενώ η τοποθέτηση πλαστικών φυτών σε δεξαμενές με ιππόκαμπο *Hippocampus erectus* αύξησε το ποσοστό επιβίωσής του (Lin et al., 2009). Στις περιπτώσεις αυτές, η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος θεωρείται εμπλουτισμός αφού δρα ευεργετικά για τα είδη. Αντίθετα, η προσθήκη υποστρώματος με περίφυτα σε κλωβούς με μυξινάρι *Liza aurata* δεν επηρέασε την ανάπτυξη (Richard et al., 2010). Στην περίπτωση αυτή, η διαφοροποίηση αυτή δεν μπορεί να θεωρηθεί εμπλουτισμός, λαμβάνοντας υπόψη τον ορισμό του που θέτει ως βασική προϋπόθεση τη βελτίωση των βιολογικών λειτουργιών των ζώων.

Ακόμη, η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος επηρεάζει τη συμπεριφορά των ψαριών όπως συμβαίνει και σε άλλα ζώα. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι όταν έγινε προσθήκη βότσαλων, δοχείων ή περιφύτων σε δεξαμενές με διάφορα είδη ψαριών που συνηθίζονται στα οικιακά ενυδρεία (π.χ. *Hypheosobrycon eques*, *Xiphophorus maculatus*, *Haplochromis burtoni*, *Oreochromis niloticus*) αυξήθηκε η επιθετικότητα μεταξύ των ατόμων (Barreto et al., 2011; Nijman and Heuts, 2000). Αντίθετα, η προσθήκη των ίδιων υλικών θεωρήθηκε εμπλουτισμός για ψάρια του είδους *Geophagus brasiliensis* αφού οδήγησαν σε μείωση της επιθετικότητας (Kadry and Barreto, 2010). Ομοίως, η παρουσία άμμου στον πυθμένα της δεξαμενής με άτομα του είδους

Paralichthys olivaceus λειτούργησε ως καταφύγιο για τα ψάρια και οδήγησε σε μειωμένο κανιβαλισμό (Dou et al., 2000). Επιπλέον, στην περίπτωση που μελετήθηκε η κοινωνική διαφοροποίηση μεταξύ διακοσμητικών ψαριών (διαφορετικός αριθμός ατόμων ανά ομάδα ή διαφορετικά είδη ψαριών ανά ομάδα), ο εμπλουτισμός αυτός προήγαγε τη φυσική συμπεριφορά των ψαριών να δημιουργήσουν κοπάδια (Saxby et al., 2010; Sloman et al., 2011).

Μελέτες σε Θηλαστικά έχουν δείξει ότι η ευεργετική επίδραση της διαφοροποίησης του περιβάλλοντος (στην περίπτωση αυτή εμπλουτισμός) επάγεται από λειτουργικές και δομικές αλλαγές του εγκεφάλου ως αντίδραση σε ένα εξωτερικό ερέθισμα (Mohammed et al., 2002; Stairs and Bardo, 2009). Οι έρευνες κυρίως στα τρωκτικά έχουν δείξει ότι η διαβίωση σε διαφοροποιημένο περιβάλλον σχετίζεται με αυξημένο μέγεθος εγκεφάλου, αυξημένη πυκνότητα νευρώνων και πάχος φλοιού, αλλαγές στο επίπεδο νευροτροφίνων του υπόκαμπου του εγκεφάλου, στη νευρογένεση, στην έκφραση των υποδοχέων της σεροτονίνης και στην περιεκτικότητα του εγκεφάλου σε νευροδιαβιβαστές (Bessinis et al., 2012; Brenes et al., 2008; Mohammed et al., 2002; Naka et al., 2002; Rasmuson et al., 1998). Επιπλέον ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος έχει συνδεθεί με βελτίωση της μάθησης/μνήμης, άλλες ικανότητες αντίληψης, μειωμένη ανησυχία και καταθλιπτική συμπεριφορά σε τρωκτικά (Brenes et al., 2008; McQuaid et al., 2012).

Παρά τις ανατομικές διαφορές στον εγκεφαλο των ψαριών σε σχέση με τα Θηλαστικά (Bone and Moore, 2008; Papoutsoglou, 2012), σύμφωνα με μελέτες σχετικά με την επίδραση του εμπλουτισμού του περιβάλλοντος, έχουν αναφερθεί νευροανατομικές αλλαγές του εγκεφάλου αλλά και αλλαγές που σχετίζονται με την αντίληψη σε διάφορα είδη ψαριών (Galhardo and Oliveira, 2009). Για παράδειγμα, η δημιουργία ενός πιο σύνθετου περιβάλλοντος διαβίωσης (π.χ. παρουσία μικρών πετρών, πλαστικών φυτών, χαλικοιού) ή ο κοινωνικός εμπλουτισμός (ατομική ή ομαδική εκτροφή) οδήγησαν σε τροποποιήσεις του μεγέθους του εγκεφάλου και κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Gonda et al., 2009; Kihlslinger and Nevitt, 2006; von Krogh et al., 2010). Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος ενδέχεται να μην επηρεάσει το ολικό μέγεθος του εγκεφάλου ή το μέγεθος συγκεκριμένων περιοχών του (οσφρητικό βολβό, τελεγκέφαλο) (Burns et al., 2009; Kihlslinger et al., 2006). Επιπλέον, ο εμπλουτισμός βελτιώνει τις ικανότητες αντίληψης και μάθησης των ψαριών (Kotrschal and Taborsky, 2010; Strand et al., 2010). Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε ότι νεαρά άτομα μπακαλιάρου του Ατλαντικού *Gadus morhua* που ζούσαν σε διαφοροποιημένο περιβάλλον με πέτρες και περίφυτα, βελτίωσαν την ικανότητά τους να βρίσκουν ζωντανή τροφή παρουσία ψαριών-«εκπαιδευτών» (Strand et al., 2010).

1.4 Η σχέση του εμπλουτισμού περιβάλλοντος με την ευζωία

Ανακεφαλαιώνοντας, διαπιστώνεται ότι η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος, και ιδιαίτερα στην περίπτωση που θεωρείται εμπλουτισμός του περιβάλλοντος, είναι

άρρηκτα συνδεδεμένη με την ευζωία των ψαριών. Η έννοια της ευζωίας και η εκτίμηση του επιπέδου της αποτελεί ένα πολυδιάστατο θέμα για τα ζώα (Ashley, 2007; Conte, 2004, Huntingford et al., 2006).

Ο όρος ευζωία προϋποθέτει την εξασφάλιση 5 ελευθεριών για τα ζώα, δηλαδή απουσία πείνας και δίψας, ενόχλησης, πόνου, τραυματισμού και ασθένειας, την δυνατότητα εκδήλωσης φυσικής συμπεριφοράς και τέλος την απουσία φόβου και δυσφορίας/ανησυχίας (distress) (FAWK, 1996). Οι ελευθερίες αυτές καθορίστηκαν ύστερα από έρευνες που επιβεβαιώνουν επιστημονικά την ισχύ τους για τα Θηλαστικά και οδήγησαν στη θέσπιση ευρωπαϊκών και παγκόσμιων κανονισμών (π.χ. Council Decision, 1978). Όμως, όσον αφορά στα ψάρια, η αποσαφήνιση του όρου της ευζωίας δεν είναι εύκολη. Αφενός, ο όρος ερμηνεύεται διαφορετικά ανάλογα με την ιδιότητα του καθενός. Για παράδειγμα, η ευζωία των ψαριών για έναν παραγωγό συνδέεται με υγιή και εύρωστα ψάρια, ενώ άλλοι υποστηρίζουν ότι η ευζωία επιτυγχάνεται όταν εξασφαλίζεται η δυνατότητα έκφρασης φυσικής συμπεριφοράς (Dawkins, 2004). Αφετέρου, η ευζωία αποτελεί ιδιαίτερα αμφιλεγόμενο θέμα όσον αφορά στα ψάρια. Η έλλειψη νεοφλοιού (neocortex) στον εγκέφαλο των ψαριών που στα Θηλαστικά σχετίζεται με την συνείδηση και τα συναισθήματα, οδηγεί σε αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με το κατά πόσο τα ψάρια έχουν τη δυνατότητα συναίσθησης (sentience) ή συνειδητής αίσθησης πόνου ή φόβου (Braithwaite, 2010; Rose, 2002). Ωστόσο, τα ψάρια διαθέτουν αισθητήρια όργανα που δεν υπάρχουν στα Θηλαστικά (πλευρική γραμμή, ηλεκτροϋποδοχείς) αλλά και περιοχές με ομόλογη λειτουργία του νεοφλοιού στον εγκέφαλό τους που τους επιτρέπει να αναπτύσσουν τέτοιου είδους συμπεριφορές (Braithwaite, 2010; EFSA, 2009). Ακόμη, έχουν αναφερθεί αρκετές ομοιότητες μεταξύ ψαριών και Θηλαστικών σχετικές με τη συμπεριφορά και τη φυσιολογία τους που ενθαρρύνουν την διερεύνηση τρόπων εξασφάλισης της ευζωίας τους (Bergqvist and Gunnarsson, 2011; Huntingford et al., 2006; Lund et al., 2007).

Η εκτίμηση της ευζωίας περιλαμβάνει τη γενική κατάσταση των ζώων, σωματικά και «ψυχολογικά» και προϋποθέτει ότι το ζώο είναι υγιές, μπορεί να ανταπεξέλθει στο περιβάλλον που ζει, έχει τη δυνατότητα να εκφράσει οποιαδήποτε φυσική συμπεριφορά, δε βιώνει αρνητικές εμπειρίες ενώ του δίνεται η δυνατότητα να βιώσει θετικές εμπειρίες (Dawkins, 2004; Boissy et al., 2007). Για την εκτίμησή της έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετοί δείκτες, π.χ. τραυματισμοί, το προσδόκιμο ζωής, ύπαρξη ασθενειών κ.α. (Broom, 1991). Ακόμη, έχει αναπτυχθεί η χρήση συγκεκριμένων δεικτών (Animal Needs Index) που συνδυάζουν αρκετούς παράγοντες του περιβάλλοντος διαβίωσης των ζώων (Bartussek, 1999). Ωστόσο, η μελέτη της ευζωίας απαιτεί μια σφαιρική προσέγγιση, εκτιμώντας τη φυσική κατάσταση (π.χ. τραυματισμοί, ασθένειες, διατροφική κατάσταση, ανάπτυξη), τη φυσιολογία (π.χ. επίπεδα ορμονών που σχετίζονται με το stress, επίπεδα μονοαμινών του εγκέφαλου) αλλά και τη συμπεριφορά (π.χ. έκφραση φυσικής συμπεριφοράς, δοκιμές προτίμησης) των ζώων (Huntingford et al., 2012).

Όσον αφορά στην εκτίμηση της φυσικής κατάστασης, η εκτίμηση της υγείας, της διατροφικής κατάστασης, της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής αλλά και η εξωτερική

εμφάνιση των ζώων (ύπαρξη πληγών ή τραυματισμών) αποτελούν βασικούς δείκτες (Huntingford et al., 2012). Για παράδειγμα, η εκτροφή γουρουνιών σε εμπλουτισμένο περιβάλλον μείωσε τους τραυματισμούς των ζώων (Sneddon and Beattie, 1995), ενώ οι τραυματισμοί που παρουσιάζονται στα ψάρια των εντατικών εκτροφών κατά τη διάρκεια διάφορων χειρισμών υποβαθμίζουν την ευζωία τους (EFSA, 2008).

Για την εκτίμηση της φυσιολογίας, η αξιολόγηση ορμονών που σχετίζονται με το stress (π.χ. κορτιζόλη) αλλά και παράμετροι σχετικές με τον εγκέφαλο (π.χ. μονοαμίνες) αποτελούν σημαντικούς δείκτες. Στην περίπτωση των ορμονών του stress, αυξημένα επίπεδα υποδηλώνουν ενδεχομένως την αντίδραση σε κάποια κατάσταση (π.χ. οξύ stress). Όταν όμως τα επίπεδα αυτά παραμένουν αυξημένα για μεγάλο χρονικό διάστημα, η παρουσία χρόνιου stress σε συνδυασμό με την ανικανότητα των ατόμων να αντιμετωπίσουν μια δυσάρεστη κατάσταση μπορεί να υποδηλώνει μειωμένη ευζωία (Huntingford et al., 2012). Για παράδειγμα, ποντίκια που εκτράφηκαν σε συμβατικές συνθήκες παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα κορτικοστερόνης σε σχέση με αυτά που εκτράφηκαν σε διαφοροποιημένο περιβάλλον, υποδηλώνοντας την παρουσία χρόνιου stress (Van Loo et al., 2004). Το ίδιο παρατηρείται και στην περίπτωση των ψαριών. Για παράδειγμα, όταν ο σολομός του Ατλαντικού *Salmo salar* εκτράφηκε σε εμπλουτισμένες δεξαμενές παρουσίασε χαμηλότερα επίπεδα κορτιζόλης από τα άτομα των συμβατικών δεξαμενών (Näslund et al., 2013).

Η εκτίμηση της συμπεριφοράς ως δείκτης της ευζωίας μπορεί να συγκεντρώσει όλες τις παραμέτρους που σχετίζονται με το ζώο και να δώσει μια πλήρη εικόνα της κατάστασής του (Dawkins, 2004). Για την αξιολόγηση της συμπεριφοράς, σημαντική είναι η παρατήρηση στερεοτυπικών κινήσεων που υποδηλώνουν μια δυσάρεστη κατάσταση για το ζώο (Mason and Rushen, 2006). Ακόμη, οι νευροδιαβιβαστές του εγκέφαλου που σχετίζονται με τη συμπεριφορά, κυρίως την επιθετικότητα και την ανταγωνιστική συμπεριφορά μεταξύ των ατόμων, αποτελούν έναν τρόπο μελέτης των κοινωνικών ιεραρχιών σε ομάδες ψαριών (Winberg and Nilsson, 1993a). Επιπλέον, οι δοκιμές προτίμησης αποτελούν ένα μέσο εκτίμησης των αναγκών που σχετίζονται με τη συμπεριφορά και την ψυχολογία των ζώων (Broom, 1991; Dawkins, 2004) και συνεπώς την εξασφάλιση της ευζωίας τους (Dawkins, 2004; Shepherdson et al., 1998). Οι δοκιμές προτίμησης εφαρμόζονται σε διάφορα είδη ζώων για την επιλογή σε συνθήκες διαβίωσης. Για παράδειγμα, προτίμηση υποστρώματος σε ωοπαραγωγές όρνιθες (Scholz et al., 2010), φωτισμού σε κρεοπαραγωγές όρνιθες (Mendes et al., 2013) και στρωμνής σε αμνούς (Wolf et al., 2010). Όσον αφορά στα ψάρια, οι δοκιμές προτίμησης έχουν χρησιμοποιηθεί ώστε να προσδιοριστούν συγκεκριμένες συμπεριφορές αλλά και για πληροφορίες σχετικά με τις κατάλληλες συνθήκες διαβίωσης (Galhardo et al., 2009; Kistler et al., 2011).

1.4 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί το κατά πόσο η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος διαβίωσης της τσιπούρας *Sparus aurata* μπορεί να αποτελέσει ένα μέσο εμπλουτισμού του περιβάλλοντος και να βελτιώσει την εντατική εκτροφή του είδους τόσο με την έννοια των παραγωγικών χαρακτηριστικών όσο και με την έννοια της ευζωίας.

Το αρχικό ερώτημα που έπρεπε να απαντηθεί ήταν ποιο υλικό θα χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση του περιβάλλοντος. Οι προϋποθέσεις που τέθηκαν ήταν να μην προκαλεί αλλαγές στην ποιότητα του νερού, δηλαδή να μην αντιδρά χημικά με αυτό και να είναι συμβατό με το φυσικό περιβάλλον διαβίωσης της τσιπούρας. Έτσι, επιλέχθηκε υάλινη ψηφίδα σε τρία χρώματα (Κυανό, Ερυθροκαφέ και Πράσινο). Αυτά τα χρώματα του υποστρώματος μπορούν να βρεθούν στο φυσικό περιβάλλον που ζει η τσιπούρα, είτε εξαιτίας του κυανού μήκους κύματος που επικρατεί στα βαθύτερα νερά, είτε του φυσικού χρωματισμού του πυθμένα (Basurco et al., 2011).

Η πρώτη προσέγγιση ήταν να διαπιστωθεί εάν η διαφοροποίηση αυτή είναι ωφέλιμη για την τσιπούρα και μπορεί να θεωρηθεί εμπλουτισμός του περιβάλλοντος διαβίωσής της (Κεφάλαιο Δ1). Στη συνέχεια, έχοντας εκτιμήσει την ευεργετική (Κυανό και Ερυθροκαφέ υπόστρωμα) ή μη (Πράσινο υπόστρωμα) επίδραση των συγκεκριμένων υποστρωμάτων, διερευνήθηκε το κατά πόσο τα θετικά αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν συνεχίζουν να ισχύουν όταν τα ψάρια εκτρέφονται σε διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής (Κεφάλαιο Δ2), γνωρίζοντας ότι η πυκνότητα ενδιαφέρει άμεσα την παραγωγή και σχετίζεται με την ευζωία, επηρεάζοντας τις κοινωνικές σχέσεις των ψαριών αλλά και την ποιότητα του νερού (Ashley, 2007; EFSA, 2008; Ellis et al., 2002).

Στο επόμενο στάδιο της διερεύνησης (Κεφάλαιο Δ3) εφαρμόστηκε δοκιμή προτίμησης στην τσιπούρα μεταξύ των τριών υποστρωμάτων. Σκοπός του παρόντος πειράματος ήταν να διερευνηθούν οι πιθανές επιλογές της τσιπούρας ως προς τα υποστρώματα που είχαν χρησιμοποιηθεί στα προηγούμενα πειράματα, ώστε να συνεκτιμηθεί η προτίμηση του είδους με τη μακροχρόνια επίδραση της παρουσίας των υποστρωμάτων.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων, στη συνέχεια η διερεύνηση επικεντρώθηκε στο Κυανό υπόστρωμα (Κεφάλαιο Δ4). Κύριο μέλημα ήταν να αποσαφηνιστεί η φύση της θετικής επίδρασης του Κυανού υποστρώματος προσδιορίζοντας αν η δράση του οφείλεται στη φυσική του παρουσία μέσα στο χώρο της εκτροφής ή/και στο χρώμα του. Επιπλέον, διαπιστώνοντας ότι η προσθήκη υποστρώματος διαφοροποιεί το φωτεινό περιβάλλον της δεξαμενής, μελετήθηκε η πιθανή εμπλοκή του στην επίδραση του Κυανού υποστρώματος.

Η διερεύνηση ολοκληρώθηκε με τη μελέτη της αντίδρασης σε οξύ stress της τσιπούρας όταν εκτρέφεται με Κυανό υπόστρωμα (Κεφάλαιο Δ5). Η διέγερση του οργανισμού με οξύ stress και ο τρόπος αντίδρασής του δίνουν πληροφορίες σχετικά με

τη συνολική κατάσταση των ψαριών (Conte, 2004; EFSA, 2008; Galhardo and Oliveira, 2009).

Εκτιμώντας σφαιρικά την ευζωία των ψαριών και συνυπολογίζοντας τα χαρακτηριστικά που αφορούν στην παραγωγή, εξετάστηκαν παράμετροι

της **ανάπτυξης** (ζων βάρος, βιομετρικά χαρακτηριστικά, συντελεστής ευρωστίας, συντελεστής παραλλακτικότητας βάρους, κατανομή συχνοτήτων, ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, επί % αύξηση βάρους, συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής),

της **φυσιολογίας** [αιματοκρίτης, πλάσμα (γλυκόζη, τριακυλγλυκερίδια, χοληστερόλη, ολικές πρωτεΐνες, αλβουμίνη, ωσμωμοριακότητα, κορτιζόλη), ήπαρ (ολικά λίπη, υγρασία), οργανοσωματικοί δείκτες (ήπαρ, σπλήνας εγκεφάλου), εγκεφάλου (μονοαμίνες, λιπαρά οξέα εγκεφάλου), οφθαλμοί (δομή αμφιβληστροειδούς χιτώνα)],

της **ποιότητας** [χημική σύσταση σώματος (ολικές πρωτεΐνες, ολικά λίπη, τέφρα, υγρασία), δείγμα ραχιαίου μυϊκού ιστού (ολικά λίπη, υγρασία, λιπαρά οξέα) και

της **συμπεριφοράς** (επιθετικές ενέργειες, αλληλεπίδραση με τον πυθμένα, προσέγγιση στον πυθμένα, αξιολόγηση κοινωνικής κατάστασης μέσω συσχετίσεων μονοαμινών εγκεφάλου με ζων βάρος ψαριών, επίπεδα νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου, αξιολόγηση προτίμησης) της τσιπούρας.

2. Συνοπτική περιγραφή πειραμάτων

Στο πλαίσιο της Διδακτορικής μελέτης πραγματοποιήθηκαν τα εξής πειράματα:

Πείραμα 1: Επίδραση του υποστρώματος ως μέσο διαφοροποίησης του περιβάλλοντος εκτροφής της τσιπούρας σε παραμέτρους της ανάπτυξης, της συμπεριφοράς και της φυσιολογίας

Διάρκεια πειράματος: 84 ημέρες (από 14/12/2009 ως 8/3/2010)

Πείραμα 2: Επίδραση του εμπλουτισμού του περιβάλλοντος σε παραμέτρους της ανάπτυξης, της συμπεριφοράς και της φυσιολογίας της τσιπούρας όταν εκτρέφεται σε διαφορετικές πυκνότητες

Διάρκεια πειράματος: 98 ημέρες (από 11/10/2010 ως 17/1/2011)

Πείραμα 3: Ατομική ή ομαδική δοκιμή προτίμησης υποστρώματος σε άτομα τσιπούρας

Διάρκεια πειράματος: 15 ημέρες (από 1/11/2011 ως 15/11/2011)

Πείραμα 4: Διερεύνηση της φύσης της θετικής επίδρασης του Κυανού υποστρώματος στην ελεγχόμενη εκτροφή της τσιπούρας

Διάρκεια πειράματος: 75 ημέρες (από 02/12/2011 ως 14/2/2012)

Πείραμα 5: Επίδραση του Κυανού υποστρώματος στην αντίδραση σε οξύ stress ατόμων τσιπούρας

Διάρκεια πειράματος: 75 ημέρες (από 02/12/2011 ως 14/2/2012)

Δ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Πείραμα 1

Επίδραση του υποστρώματος ως μέσο διαφοροποίησης του περιβάλλοντος εκτροφής της τσιπούρας σε παραμέτρους της ανάπτυξης, της συμπεριφοράς και της φυσιολογίας



Batzina, A. and Karakatsouli, N. Effects of the presence of substrate as a means of environmental enrichment in intensively reared gilthead seabream *Sparus aurata*: Growth and behavioral effects. *Aquaculture*, 370-371, 54-60.

1.1 Εισαγωγή – Σκοπός

Ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος εκτροφής, ιδιαίτερα η δημιουργία ενός πιο σύνθετου περιβάλλοντος διαβίωσης για τα ψάρια θεωρείται ότι προάγει την ανάπτυξη, μειώνει την επιθετικότητα, αυξάνει τα ποσοστά επιβίωσης ή βελτιώνει την ικανότητα αντίληψης σε διάφορα είδη ψαριών (π.χ. Arndt et al., 2001; Dou et al., 2000; Strand et al., 2010; Torrezani et al., 2013).

Το περιβάλλον διαβίωσης στις εντατικές εκτροφές είναι συνήθως απλό, χωρίς τροποποιήσεις που να σχετίζονται με εμπλουτισμό. Σκοπός του παρόντος πειράματος ήταν να διερευνηθεί εάν η προσθήκη υποστρώματος στις δεξαμενές ημίκλειστου συστήματος θαλασσινού νερού μπορεί να λειτουργήσει ως εμπλουτισμός περιβάλλοντος για την τσιπούρα *Sparus aurata*. Η τσιπούρα αποτελεί ένα από τα κυριότερα εκτρεφόμενα είδη στη Μεσόγειο και συνεπώς έχει μεγάλη εμπορική σημασία. Η εκτίμηση της πιθανής βελτίωσης των βιολογικών λειτουργιών των ψαριών εξετάστηκε με βάση παραγωγικά και φυσιολογικά κριτήρια, ενώ εκτιμήθηκε και η συμπεριφορά της τσιπούρας.

Επιπλέον προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών και των λιπαρών οξέων του εγκεφάλου θεωρώντας ότι αποτελούν το συνδεδετικό κρίκο ώστε το εμπλουτισμένο περιβάλλον να επιδράσει στη τσιπούρα. Οι αναλύσεις αυτές συμπεριλήφθηκαν κυρίως για δύο λόγους. Αρχικά, στα Θηλαστικά η σεροτονινεργική και ντοπαμινεργική δραστηριότητα του εγκεφάλου έχουν διαπιστωθεί ότι εμπλέκονται σε αρκετούς μηχανισμούς της αντίληψης και της συμπεριφοράς όπως της επιθετικότητας, του stress και της κοινωνικής συμπεριφοράς (Couppis and Kennedy, 2008; Dalla et al., 2005; Dalla et al., 2008; Popova, 2006). Αν και υπάρχουν δεδομένα που σχετίζονται με αλλαγές στους νευροδιαβιβαστές του εγκεφάλου λόγω εμπλουτισμού περιβάλλοντος εκτροφής σε τρωκτικά (Brenes et al., 2008; Naka et al., 2002), όσον αφορά στα ψάρια δεν υπάρχει αντίστοιχη βιβλιογραφία. Παρ' όλα αυτά, έχουν αναφερθεί ομοιότητες μεταξύ ψαριών και Θηλαστικών ως προς τη λειτουργία του σεροτονινεργικού και ντοπαμινεργικού συστήματος (Lillesaar, 2011; Winberg and Nilsson, 1993a). Επιπλέον, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, μεταβολές στην περιεκτικότητα των ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων του εγκεφάλου του ανθρώπου και των τρωκτικών σχετίζονται με αρκετές ψυχικές ασθένειες (π.χ. Kidd, 2007; Vancassel et al., 2007), ενώ συνδέονται και με τους νευροδιαβιβαστές του εγκεφάλου (π.χ. Vines et al., 2012). Αντίστοιχη βιβλιογραφία για τα ψάρια δεν υπάρχει και για αυτό τα λιπαρά οξέα του εγκεφάλου συμπεριλήφθηκαν ως πιθανοί δείκτες «ψυχολογικού» stress.

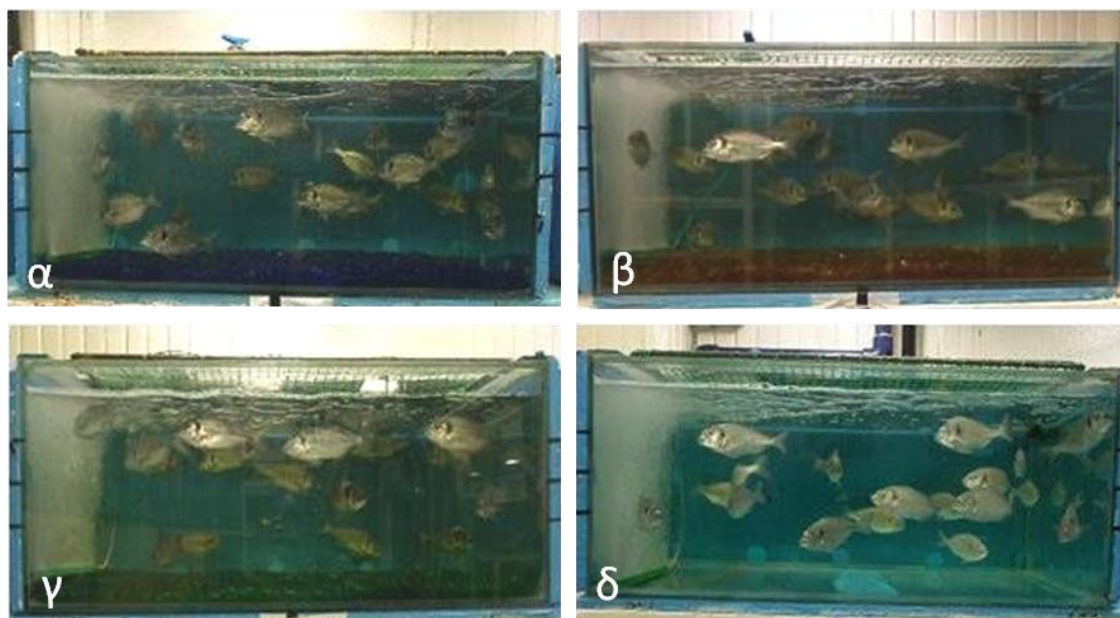
1.2 Υλικά και μέθοδοι

1.2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την πραγματοποίηση του πειράματος, έγινε προμήθεια νεαρών ατόμων τσιπούρας, *Sparus aurata* τα οποία παρέμειναν σε εργαστηριακές συνθήκες για

τουλάχιστον έξι μήνες. Στη συνέχεια 144 ψάρια με μέσο βάρος $68,3 \pm 0,50$ g (ηλικίας 1+) διανεμήθηκαν τυχαία σε 8 πανομοιότυπες δεξαμενές σε απόλυτα ομοιογενείς ομάδες των 18 ατόμων. Η αρχική πυκνότητα των ομάδων ήταν $5,7 \pm 0,01$ kg m⁻³ και η αρχική παραλλακτικότητα του βάρους $9,1 \pm 0,12\%$ για τέσσερις επεμβάσεις με δύο επαναλήψεις κάθε μία. Τα ψάρια παρέμειναν σε πειραματικές συνθήκες για 84 ημέρες.

Χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικού χρώματος υποστρώματα χαλικιού, Κυανό (ΚΥ), Ερυθροκαφέ (ΕΚΥ), Πράσινο (ΠΥ) και δεξαμενές Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ). Στις δεξαμενές με διαφοροποιημένο περιβάλλον, το υπόστρωμα αποτελούταν από ομοιόμορφο στρώμα μονοχρωματικής υάλινης ψηφίδας (Ερμής Α.Ε., Κυανή, Ερυθροκαφέ ή Πράσινη ψηφίδα), σε ύψος 2,5 cm (20 kg/δεξαμενή, μέγεθος ψηφίδας 6-12 mm), ενώ οι δεξαμενές ΧΥ παρέμειναν άδειες (υάλινος πυθμένας). Το υπόστρωμα κάλυπτε όλη την επιφάνεια του πυθμένα και το ύψος του σε κάθε δεξαμενή ήταν 2,5 cm (Εικόνα 1). Οι λόγοι επιλογής του συγκεκριμένου υποστρώματος περιγράφονται στο Υποκεφάλαιο Γ1.4.



Εικόνα 1: Πειραματικές δεξαμενές, με Κυανό (α), Ερυθροκαφέ (β), Πράσινο (γ) υπόστρωμα και Χωρίς υπόστρωμα (δ).

Η χορήγηση της τροφής στα ψάρια γινόταν με το χέρι. Χρησιμοποιήθηκε εμπορικό σιτηρέσιο (βυθιζόμενα σύμπηκτα) κατάλληλο για νεαρά άτομα τσιπούρας [υγρασία 6,45%; πρωτεΐνη 45,65%; λίπη 20,14%; τέφρα 6,03%; ελεύθερες αζώτου εκχυλισματικές ουσίες (ΕΝΕΟ) 21,73%]. Η ποσότητα της τροφής που χορηγήθηκε ήταν 2% του ζώντος βάρους τους σύμφωνα με το στάδιο ανάπτυξης των ψαριών και τη θερμοκρασία του νερού (Lupatsch and Kissil, 1998) σε 3 γεύματα (8:30, 11:30 και 14:30) από Δευτέρα ως Παρασκευή. Το Σάββατο δινόταν ένα γεύμα (11:00), ενώ την Κυριακή δε γινόταν χορήγηση τροφής. Στις δεξαμενές με υπόστρωμα τα ψάρια δε δυσκολεύονταν να βρουν την τροφή τους. Τα σύμπηκτα έμεναν στη επιφάνεια του

υποστρώματος και σε όλες τις επεμβάσεις ο μέσος χρόνος κατανάλωσης της τροφής ήταν πέντε λεπτά. Τα ψάρια ζυγίζονταν ατομικά κάθε 15 ημέρες και η ποσότητα της τροφής προσαρμοζόταν κατάλληλα. Κατά τη διάρκεια του πειράματος δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα.

Οι δεξαμενές ήταν υάλινες, ορθογώνιες [διαστάσεις 36x68x88 cm (ύψος × πλάτος × μήκος), όγκος 215,5 L] και αποτελούσαν μέρος ενός ημίκλειστου συστήματος θαλασσινού νερού συνολικού όγκου 34,3 m³ (ημερήσια ανανέωση νερού κυκλώματος 3%). Το κύκλωμα διέθετε μηχανικά φίλτρα με πορώδες υλικό (σπόγγοι) και βυθιζόμενα βιολογικά φίλτρα με χαλίκια, καθώς επίσης και λάμπες εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας UV για τον έλεγχο των παθογόνων μικροοργανισμών. Κάθε δεξαμενή διέθετε σύστημα παροχής νερού, σύστημα παροχής ατμοσφαιρικού αέρα καθώς και σύστημα αποχέτευσης και διατήρησης σταθερής στάθμης νερού. Τα πλευρικά τοιχώματα της κάθε δεξαμενής εκτός από το πρόσθιο ήταν καλυμμένο με γαλάζιο φελιζόλ. Η παροχή του νερού γινόταν από την επιφάνεια με σταθερή ροή για όλες τις δεξαμενές 2,1 L/min (14 πλήρεις ανανεώσεις νερού/ημέρα).

Όλες οι δεξαμενές καθαρίζονταν επιμελώς μία φορά την εβδομάδα. Το καθάρισμα περιλάμβανε το τρίψιμο των τοιχωμάτων και του πυθμένα και απομάκρυνση των 2/3 του νερού της δεξαμενής. Στις εμπλουτισμένες δεξαμενές το υπόστρωμα δεν αφαιρούταν. Αντίθετα, γινόταν τρίψιμο και ανακάτεμα του χαλικιού και στη συνέχεια, με τη βοήθεια ενός ειδικά διαμορφωμένου σιφονιού (διάφανο, άχρωμο, διαμέτρου 2 cm) στο οποίο είχε προσαρμοστεί ένα διάφανο χωνί, γινόταν η απομάκρυνση των οργανικού φορτίου αποφεύγοντας το πέρασμα του χαλικιού από το σιφόνι. Το ίδιο σιφόνι χρησιμοποιούταν και στις δεξαμενές χωρίς υπόστρωμα ώστε να πραγματοποιείται ο ίδιος χρόνος καθαρισμού για όλες τις δεξαμενές (περίπου 15' ανά δεξαμενή). Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού ελέγχονταν καθημερινά (πριν το 1^ο γεύμα και 30 λεπτά μετά το τελευταίο γεύμα). Για τη μέτρηση της θερμοκρασίας και του δεσμευμένου οξυγόνου χρησιμοποιήθηκε φορητός μετρητής οξυγόνου τύπου Oxyguard (Handy Mk III) με ενσωματωμένο ψηφιακό θερμόμετρο. Η τιμή του pH μετρήθηκε με φορητό μετρητή τύπου Oxyguard (Handy pH). Η αλατότητα του νερού μετρήθηκε με φορητό διαθλασίμετρο. Παράλληλα με τη λήψη των μετρήσεων λαμβάνονταν δείγματα νερού από κάθε δεξαμενή. Τα καθημερινά δείγματα (100ml/δεξαμενή) συλλέγονταν μετά από διήθηση με την χρήση ηθμού και στη συνέχεια αποθηκεύονταν σε μεγαλύτερα φιαλίδια χωρητικότητας 2lt και καταψύχονταν. Οι αναλύσεις που ακολουθούσαν αφορούσαν στον εβδομαδιαίο προσδιορισμό της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων και της ολικής αμμωνίας.

Η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε σε 12 ώρες φως προς 12 ώρες σκοτάδι με προσομοίωση ανατολής και δύσης για 30 λεπτά, ενώ η ένταση του φωτισμού προσαρμόστηκε στα 200 lx στην επιφάνεια κάθε δεξαμενής. Ως πηγή φωτισμού χρησιμοποιήθηκαν λάμπες λευκού φωτός (cool white fluorescence lamps, OSRAM DULUX D/E 26W/840 G24Q-3) στο κέντρο της επάνω πλευρά της κάθε δεξαμενής. Η ρύθμιση της έντασης φωτισμού γινόταν με ειδικό λογισμικό (winDim 4.0e PC), ενώ η

μέτρηση της έντασης σε κάθε δεξαμενή γινόταν με τη βοήθεια ψηφιακού φωτόμετρου (RS 180-7133, RS Components Ltd., Corby, Northants, UK).

Η προσθήκη του υποστρώματος στον πυθμένα των δεξαμενών τροποποίησε το φωτεινό περιβάλλον κυρίως λόγω αλλαγών στην αντανάκλαση του φωτός από τον πυθμένα. Παρά το γεγονός ότι δεν πραγματοποιήθηκε μέτρηση της αντανάκλασης, το περιβάλλον των δεξαμενών γινόταν πιο σκούρο για έναν εξωτερικό παρατηρητή. Επιπλέον, με την παρουσία του υποστρώματος οι σκιές των ψαριών στον πυθμένα της δεξαμενής δεν ήταν πλέον ορατές.

1.2.2 Παρατηρήσεις συμπεριφοράς

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου γινόταν καταγραφή της συμπεριφοράς των ψαριών. Συγκεκριμένα γινόταν λήψη video διάρκειας 10 λεπτών την 1^η, 5^η, 9^η και 12^η εβδομάδα από την μπροστινή πλευρά της δεξαμενής, τέσσερις φορές την εβδομάδα (Τρίτη, Τετάρτη, Πέμπτη και Παρασκευή) ανάμεσα στο πρώτο και δεύτερο γεύμα (9:15 έως 11:00, με διάστημα 5 λεπτών μεταξύ των λήψεων). Τη Δευτέρα δε γινόταν λήψη video για να αποφευχθεί η καταγραφή οποιασδήποτε αλλαγής στην συμπεριφορά των ψαριών λόγω της ασυτίας που υπόκεινταν την Κυριακή. Ένεκα της διαθεσιμότητας μόνο μιας κάμερας, δεν ήταν δυνατή η καταγραφή κάθε δεξαμενής σε κάθε χρόνο παρατήρησης για κάθε μέρα και εβδομάδα. Έτσι σχεδιάστηκε ένα εβδομαδιαίο πρόγραμμα λήψεων για να ικανοποιήσει αυτή τη συνθήκη ως προς τις επεμβάσεις (Πίνακας 1). Πραγματοποιήθηκαν τελικά τέσσερις λήψεις/δεξαμενή/εβδομάδα ή οχτώ λήψεις/επέμβαση/εβδομάδα. Από το κάθε video γινόταν επεξεργασία των εννέα λεπτών. Αν και τα ψάρια ήταν εξοικειωμένα με την παρουσία του πειραματιστή, το πρώτο λεπτό από κάθε λήψη αφαιρούταν για να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα συνυπολογισμού της αναστάτωσης των ψαριών κατά την τοποθέτηση της κάμερας.

Πίνακας 1: Εβδομαδιαίο πρόγραμμα λήψης video για την παρατήρηση της συμπεριφοράς των ψαριών που εκτρέφονται σε δεξαμενές με Κυανό (KY), Ερυθροκαφέ (EKY) και Πράσινο (PY) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (XY).

	Τρίτη	Τετάρτη	Πέμπτη	Παρασκευή
9:15	PY1 [#]	XY1	KY1	EKY1
9:30	PY2	XY2	KY2	EKY2
9:45	XY1	KY1	EKY1	PY1
10:00	XY2	KY2	EKY2	PY2
10:15	KY1	EKY1	PY1	XY1
10:30	KY2	EKY2	PY2	XY2
10:45	EKY1	PY1	XY1	KY1
11:00	EKY2	PY2	XY2	KY2

[#] Οι αριθμοί 1 και 2 αντιπροσωπεύουν τις δεξαμενές επαναλήψεις.

Μελετήθηκε η επιθετική συμπεριφορά και η συμπεριφορά που σχετίζεται με τον πυθμένα. Η επιθετικότητα εκτιμήθηκε με την καταμέτρηση των επιθετικών ενεργειών, δηλαδή του κυνηγητού, των τσιμπημάτων ή των δαγκωμάτων μεταξύ των ψαριών. Οι παρατηρήσεις της συμπεριφοράς που σχετίζεται με τον πυθμένα διακρίθηκαν σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη αφορούσε στην πιθανή προτίμηση των ψαριών να κολυμπούν κοντά στην επιφάνεια του πυθμένα (προσέγγιση στον πυθμένα). Για να εκτιμηθεί αυτή η προτίμηση, η μπροστινή πλευρά κάθε δεξαμενής σημάνθηκε με ταινία σε απόσταση 12 cm (για τις δεξαμενές χωρίς υπόστρωμα) και 13,7 cm (για τις δεξαμενές που υπήρχε υπόστρωμα) από τον πυθμένα. Η σήμανση αυτή υποδήλωνε το κατώτερο ένα τρίτο του ολικού διαθέσιμου χώρου των ψαριών. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης του video, ο αριθμός των ψαριών που βρισκόταν κάτω από το όριο αυτό καταγραφόταν κάθε 30 δευτερόλεπτα και τελικά εκφραζόταν ως ποσοστό του ολικού αριθμού των ψαριών.

Η δεύτερη κατηγορία παρατηρήσεων αφορούσε στη φυσική επαφή των ψαριών με τον πυθμένα. Λόγω έλλειψης στοιχείων σχετικά με αυτή τη συμπεριφορά δεν ήταν δυνατό να γνωρίζουμε εξ' αρχής την πιθανή απασχόληση της τσιπούρας με τον πυθμένα, ιδιαίτερα στην περίπτωση της ύπαρξης υποστρώματος. Έτσι, γινόταν καταγραφή οποιασδήποτε φυσικής επαφής μεταξύ ψαριού και πυθμένα στο διάστημα των εννέα λεπτών του video. Τα δεδομένα αναφέρονται στο σύνολο της ομάδας των ψαριών κάθε δεξαμενής, διότι τα ψάρια δεν ήταν σημασμένα με αποτέλεσμα να μη γνωρίζουμε ποιο ή πόσα άτομα εμφάνιζαν κάποια από τις παραπάνω συμπεριφορές που αναφέρθηκαν.

Ακόμα, μελετήθηκε η απασχόληση των ψαριών με την αντανάκλασή τους στις υάλινες πλευρές των δεξαμενών. Κατά την εκτροφή των ψαριών στις δεξαμενές αυτές τόσο κατά τη διατήρηση των ψαριών στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας όσο και κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων έχει παρατηρηθεί ότι τα ψάρια συνηθίζουν να πλησιάζουν την αντανάκλασή τους και να ακουμπούν τα τοιχώματα των δεξαμενών με το ρύγχος τους. Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες η τοποθέτηση ενός καθρέφτη στις δεξαμενές των ψαριών χρησιμοποιείται ως ερέθισμα επηρεάζοντας την επιθετική συμπεριφορά τους (Desjardins and Fernald, 2010). Η παρουσία του υποστρώματος είναι πιθανό να έχει επηρεάσει την ένταση του παραπάνω φαινομένου. Για την εκτίμηση αυτής της συμπεριφοράς καταγράφηκε ο αριθμός των ψαριών που έρχονταν σε επαφή με την αντανάκλασή τους κάθε 30 δευτερόλεπτα (για κάθε video εννέα λεπτών) και εκφράστηκε ως ποσοστό επί της ομάδας των ψαριών κάθε δεξαμενής.

1.2.3 Αναλύσεις

Η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων (NO_2^- -N) προσδιορίστηκε φωτομετρικά με τη μέθοδο του σχηματισμού ρόδιου ερυθροϊώδους χρώματος σε τιμή pH 2,0-2,5, προερχόμενο από την αντίδραση των νιτρικών με διάλυμα σουλφανιλαμίδης και με NED (N-Cl-naphthyl-Ethylenediamine Dihydrochloride, Greenberg et al., 1992). Η συγκέντρωση της ολικής αμμωνίας ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$ -N) προσδιορίστηκε φωτομετρικά

μέσω της αντίδρασης της αμμωνίας με τη φαινόλη και το υποχλωριώδες διάλυμα, σε αλκαλικό περιβάλλον, δίνοντας μπλε της ινδοφαινόλης. Η ένταση του γαλάζιου χρώματος της ένωσης αυτής προσδιορίζεται με τη χρήση νιτροπρωσσικού νατρίου (Greenberg et al., 1992). Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο (Helias α, Thermo Electron Cooperodion). Η συγκέντρωση της τοξικής (μη ιονισμένης) μορφής της αμμωνίας (NH₃-N) υπολογίστηκε μέσω του παρακάτω τύπου (Emerson et al., 1975; Bower and Bidwell, 1978):

$$\text{Τοξική NH}_3 \text{ θαλασσινού νερού} = [\text{ολική αμμωνία}] \times \frac{1}{1 + \text{antilog}[\text{pK}_a\text{S}(\text{T}) - \text{pH}]} \text{ ppm}$$

όπου,

[ολική αμμωνία] = η συγκέντρωση της ολικής αμμωνίας σε ppm

$$\text{pK}_a\text{S}(\text{T}) = \text{pK}_a\text{S}(\text{T}=298 \text{ }^\circ\text{K}) + 0,0324(298 - \text{T } ^\circ\text{K})$$

$\text{pK}_a\text{S}(\text{T}=298 \text{ }^\circ\text{K})$ = σταθερά που εξαρτάται από την αλατότητα, τη θερμοκρασία και το pH (η τιμή της δίνεται σε πίνακες)

T = θερμοκρασία σε °K

Μετά το τέλος της κύριας πειραματικής διαδικασίας όλα τα ψάρια θανατώθηκαν με ευθανασία. Χρησιμοποιήθηκε μεγάλη δόση αναισθητικού (2-φαινόξυ-αιθανόλη, 1,5 ml/L) και πραγματοποιήθηκαν ατομικό ζύγισμα (ακρίβειας 0,01 g), σωματομετρήσεις (με χρήση παχύμετρου, ακρίβειας 0,1 mm) αιμοληψία και λήψη εγκέφαλου. Το σύνολο της διαδικασίας (ατομικό ζύγισμα, λήψη αίματος και εγκέφαλου) διήρκησε περίπου 3 λεπτά για κάθε ψάρι και διατηρήθηκε ο ίδιος χρόνος δειγματοληψίας για κάθε πειραματική ομάδα. Η λήψη του αίματος έγινε με σύριγγες όγκου 1 ml οι οποίες περιείχαν αντιπηκτική ουσία (ηπαρίνη, 60U/ml αίματος), από τη ραχιαία φλέβα. Άμεσα έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για να διαχωριστεί το πλάσμα από τα έμμορφα συστατικά του αίματος και στη συνέχεια καταψύχθηκε στους -30 °C μέχρι να γίνει ανάλυση γλυκόζης, χοληστερόλης και τριακυλγλυκεριδίων (ενζυματική φωτομετρική μέθοδος εμπορίου, Elitech Diagnostics, Sees, France). Απομονώθηκε το ήπαρ και ζυγίστηκε (ακρίβεια 0,1 mg) για τον υπολογισμό του ηπατοσωματικού δείκτη (ΗΣΔ) και τον προσδιορισμό της περιεκτικότητάς του σε υγρασία και ολικά λίπη (Folch et al., 1957). Επίσης απομονώθηκε ο σπλήνας, ζυγίστηκε (ακρίβεια 0,1 mg) και εκφράστηκε ως ποσοστό του ζώντος βάρους (ΣΣΔ, Σπληνοσωματικός Δείκτης). Εκτός από τα παραπάνω, έγινε λήψη δείγματος μυϊκού ιστού από το ραχιαίο τμήμα του σώματος και προσδιορίστηκε η περιεκτικότητά του σε υγρασία (105 °C για 24 ώρες), ολικά λίπη (Folch et al., 1957) και λιπαρά οξέα. Όλα τα ψάρια κάθε δεξαμενής ομογενοποιήθηκαν και λυοφιλιώθηκαν για να προσδιοριστεί η χημική σύσταση του σώματος (χωρίς τα εντόσθια) με τις μεθόδους Kjeldahl και Soxhlet (AOAC, 1984) και προσδιορίστηκε η

περιεκτικότητα της σώματος σε υγρασία (105 °C για 24 ώρες) και τέφρα (600 °C για 12 ώρες).

Σε δέκα άτομα από κάθε δεξαμενή έγινε λήψη του εγκέφαλου με τη βοήθεια χειρουργικού νυστεριού με τομή στο κεφάλι των ψαριών. Ο εγκέφαλος λήφθηκε ολόκληρος, καθαρίστηκε από το αίμα που τον περιέβαλε, ζυγίστηκε (ακρίβεια 0,1 mg) και καταψύχθηκε άμεσα σε ξηρό πάγο και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -80°C μέχρι την πραγματοποίηση των αναλύσεων. Το βάρος του εγκέφαλου εκφράστηκε ως ποσοστό του ζώντος βάρους (ΕΣΔ, Εγκεφαλοσωματικός Δείκτης). Τα μισά δείγματα εγκέφαλου χρησιμοποιήθηκαν για των προσδιορισμό των νευροδιαβιβαστών, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα για των προσδιορισμό των λιπαρών οξέων.

Ο προσδιορισμός των νευροδιαβιβαστών του εγκέφαλου έγινε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή όπως περιγράφεται από τους (Sharp et al., 1987) και (Papadopoulou-Daifoti et al., 1995). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Thermo Hypersil-Keystone (Aquasil C18), 150 mm × 2.1 mm 5 μm Hypersil, Elite C18. Προσδιορίστηκε η νοραδρεναλίνη (NA), ντοπαμίνη (DA) και οι μεταβολίτες τους 3,4 διυδρόξυ-φαινυλνυλακετικό οξύ (DOPAC) και ομοβανιλλικό οξύ (HVA), η σεροτονίνη (5-HT) και ο μεταβολίτης της 5-υδροξυ-ινδολοξικό οξύ (5-HIAA). Επιπλέον, οι λόγοι των DOPAC/DA, HVA/DA, (DOPAC+HVA)/DA και 5-HIAA/5-HT υπολογίστηκαν ως δείκτες της σεροτονινεργικής και της ντοπαμινεργικής δραστηριότητας.

Με τη μέθοδο των Folch et al. (1957), απομονώθηκε λίπος από τα δείγματα του ραχιαίου μυϊκού ιστού και του εγκέφαλου. Ακολούθησε εστεροποίηση των λιπαρών οξέων των δειγμάτων (ήπαρ, ραχιαίος μυϊκός ιστός) (Christie, 1990) και εν συνεχεία ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός τους με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος (Agilent Technologies 6890N) εξοπλισμένος με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (FID, Flame Ionization Detector). Όλα τα δείγματα λίπους, εστεροποιημένα ή μη, μέχρι ολοκλήρωσης των ανωτέρω διαδικασιών, διατηρήθηκαν σε ατμόσφαιρα αζώτου στους -25° C.

Η ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων έγινε χρησιμοποιώντας πρότυπα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων των εταιρειών Sigma και Larodan. Τα λιπαρά οξέα τα οποία ταυτοποιήθηκαν είναι τα εξής: C14:0. C16:0. C16:1n7. C17:0. C18:0. C18:1n7. C18:1n9. C18:2n6. C18:3n3. C18:4n3. C20:0. C20:1n9. C20:2n6. C20:4n6. C20:5n3. C22:1n9. C22:5n3 και C22:6n3. Η ποσοτικοποίηση των μεθυλεστέρων έγινε με τον προσδιορισμό των συντελεστών ανταπόκρισης (response factors) του ανιχνευτή σύμφωνα με τους Cuadros-Rodríguez et al. (2007) (§4.5. Calibration by internal normalization). Συγκεκριμένα για κάθε πρότυπο λιπαρό οξύ, προσδιορίστηκε ο συντελεστής ανταπόκρισης μετά από ανάλυση διαδοχικών συγκεντρώσεων με την ίδια ποσότητα εσωτερικού προτύπου (19:0) που χρησιμοποιήθηκε και για τα δείγματα και υπολογισμού του λόγου της περιοχής κάθε κορυφής με την αντίστοιχη του εσωτερικού προτύπου. Τέλος, υπολογίστηκαν τα ποσοστά ανάκτησης (recovery) κάθε μεθυλεστέρα κατά τις διαδικασίες της εκχύλισης και εστεροποίησης. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν

ως εκατοστιαία αναλογία του συνόλου των ταυτοποιηθέντων μεθυλεστέρων (% ολικών μεθυλεστέρων) και ως mg μεθυλεστέρα/g νωπού βάρους ιστού.

Βάσει της διατροφικής αξίας του ραχιαίου μυϊκού ιστού που σχετίζεται με μακράς αλυσίδας ω -3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, στο παρόν πείραμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του εικοσι-πεντανοϊκού οξέος (20:5 ω -3, EPA), εικοσιδυο-πεντανοϊκού οξέος (22:5 ω -3, DPA), εικοσιδυο-εξαενοϊκού οξέος (22:6 ω -3, DHA), καθώς επίσης και του λόγου ω -3: ω -6. Επίσης, το άθροισμα των EPA και DHA υπολογίστηκε για 100 g εδώδιμου προϊόντος.

1.2.4 Υπολογισμοί και ανάλυση δεδομένων

Υπολογίστηκαν ο μέσος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (Specific Growth Rate, SGR), [$SGR = (\ln W_f - \ln W_{in}) \times 100 / t$, όπου W_f : το τελικό μέσο βάρος σε g, W_{in} : το αρχικό μέσο βάρος σε g, t : η χρονική διάρκεια της εκτροφής σε ημέρες], ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής (Food Conversion Ratio, FCR), [$FCR = (\text{Τροφή που καταναλώθηκε, g}) / (\text{αύξηση βάρους, g})$], η εκατοστιαία αύξηση του βάρους (Weight Gain %, WG) [$WG = 100 \times (W_f - W_{in}) / W_{in}$] και ο συντελεστής παραλλακτικότητας του βάρους (Coefficient of weight Variation, CV), [$CV = (100 \times \text{τυπική απόκλιση}) / (\text{μέσο ζων βάρος})$] για την ομάδα κάθε δεξαμενής ενώ ο συντελεστής ευρωστίας (Condition factor, CF) [$CF = 100 \times (\text{ζων βάρος, g}) / (\text{σταθερό μήκος, cm})^3$] υπολογίστηκε για το κάθε ψάρι.

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με μονοπαραγοντική εγκιβωτισμένη ανάλυση διασποράς (one way nested analysis of variance-ANOVA) με τη χρήση γενικού γραμμικού μοντέλου (General Linear Model). Η δεξαμενή χρησιμοποιήθηκε ως τυχαίος εγκιβωτισμένος παράγοντας (random nested factor) στην επέμβαση του υποστρώματος για να συνυπολογιστεί η επίδρασή της στην ανάλυση. Στην περίπτωση των δεδομένων του εγκέφαλου το ζων βάρος χρησιμοποιήθηκε ως συμεταβλητή (covariate). Η επίδραση της επέμβασης θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική όταν $P < 0,05$. Για την σύγκριση των μέσων όρων χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Duncan. Όλες οι παράμετροι ελέγχθηκαν για την ισχύ της κανονικότητας και της ομοιογένειας της διασποράς, ενώ όπου δεν ίσχυαν έγιναν οι απαραίτητες μετατροπές (π.χ. λογάριθμος, τετραγωνική ρίζα, κτλ). Για να διαπιστωθούν οι διαφορές στα δεδομένα της συμπεριφοράς μεταξύ των τεσσάρων εβδομάδων παρατήρησης πραγματοποιήθηκε ανάλυση διασποράς με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (two way repeated measures ANOVA) με τη χρήση γενικού γραμμικού μοντέλου (General Linear Model) ώστε να αναλυθούν η επίδραση του υποστρώματος (Y), της εβδομάδας παρατήρησης (E) και της αλληλεπίδρασής τους (YxE). Επίσης πραγματοποιήθηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ του ζώντος βάρους και των νευροδιαβιβαστών του εγκέφαλου με τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης Pearson. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο κείμενο και στους πίνακες αφορούν σε μέσους όρους \pm τυπικό σφάλμα χωρίς μετατροπές.

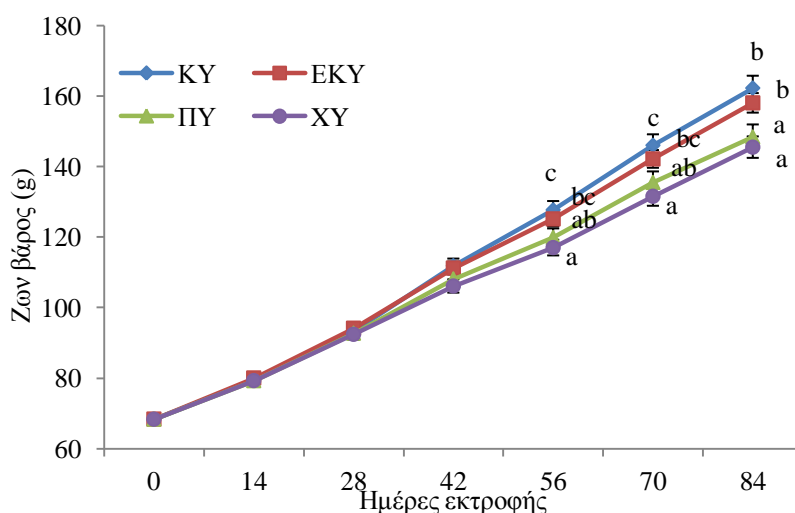
1.3 Αποτελέσματα

1.3.1 Ποιότητα νερού

Τα αποτελέσματα της ποιότητας του νερού δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των επεμβάσεων εκτός από την περίπτωση της περιεκτικότητας του νερού σε νιτρώδη ιόντα. Οι τιμές διατηρήθηκαν ως εξής: θερμοκρασία $20,6 \pm 0,04$ °C, δεσμευμένο οξυγόνο $6,4 \pm 0,01$ mg/L (κορεσμός $91,4 \pm 0,13\%$), pH $7,33 \pm 0,003$, αλατότητα $37,1 \pm 0,03$ g/L, ολική αμμωνία $0,40 \pm 0,008$ mg/L, τοξική αμμωνία $0,002 \pm 0,0001$ mg/L. Όσον αφορά στην περιεκτικότητα του νερού σε νιτρώδη ιόντα (mg/L), παρατηρήθηκαν αυξημένες τιμές στις δεξαμενές με υπόστρωμα σε σχέση με τις δεξαμενές Χωρίς υπόστρωμα [(P=0,0) KY: $0,086 \pm 0,0043$, EKY: $0,086 \pm 0,0038$, ΠΥ: $0,086 \pm 0,0039$, XY: $0,044 \pm 0,0034$]. Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση της θερμοκρασίας (κατά $2,5$ °C) ύστερα από 28 ημέρες εκτροφής.

1.3.2 Παραγωγικά χαρακτηριστικά – Παράμετροι της φυσιολογίας

Τα ψάρια που εκτράφηκαν στις δεξαμενές με KY και EKY είχαν στατιστικά μεγαλύτερο τελικό ζων βάρος και σταθερό μήκος σε σχέση με τα ψάρια στις δεξαμενές με ΠΥ και XY (Διάγραμμα 1, Πίνακας 2). Η επίδραση του KY στο σωματικό βάρος ήταν εμφανής ύστερα από 56 ημέρες εκτροφής και ως το τέλος της πειραματικής περιόδου. Τα ψάρια στις δεξαμενές με EKY διαφοροποιήθηκαν επίσης από αυτά των δεξαμενών XY ύστερα από 56 ημέρες εκτροφής, όμως η διαφοροποίηση από τα ψάρια στις δεξαμενές με ΠΥ εμφανίστηκε μόνο κατά την ολοκλήρωση της πειραματικής περιόδου (ημέρα 84). Η ανάπτυξη των ψαριών του ΠΥ δε διαφοροποιήθηκε ποτέ από αυτή των ψαριών του XY.



Διάγραμμα 1: Ζων βάρος ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (KY), Ερυθροκαφέ (EKY) ή Πράσινο (ΠΥ) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (XY) για 84 ημέρες. Διαφορετικά γράμματα για τις ίδιες ημέρες εκτροφής υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. (ημέρα 56: $P < 0,01$, ημέρα 70: $P < 0,01$, ημέρα 84: $P < 0,01$).

Ακόμη, τα ψάρια του ΚΥ παρουσίασαν στατιστικά υψηλότερες τιμές του συντελεστή ευρωστίας συγκριτικά με όλες τις άλλες επεμβάσεις (Πίνακας 2), ενώ ο συντελεστής παραλλακτικότητας του τελικού βάρους δεν επηρεάστηκε από τις επεμβάσεις και κυμάνθηκε μεταξύ 10,7 και 13,4% ($P>0,05$). Οι τιμές του ολικού και σταθερού μήκους ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερες για τα ψάρια στις δεξαμενές με ΚΥ και ΕΚΥ.

Πίνακας 2: Ολικό και σταθερό μήκος και συντελεστής ευρωστίας ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (ΚΥ), Ερυθροκαφέ (ΕΚΥ) ή Πράσινο (ΠΥ) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ) για 84 ημέρες (n=2).

	Επέμβαση				P
	ΚΥ	ΕΚΥ	ΠΥ	ΧΥ	
Ολικό μήκος (cm)	20,6±0,14 b	20,7±0,11 b	20,1±0,15 a	20,1±0,13 a	***
Σταθερό μήκος (cm)	17,8±0,10 b	17,8±0,11 b	17,4±0,13 a	17,4±0,10 a	**
Συντελεστής ευρωστίας	2,91±0,029 b	2,78±0,029 a	2,79±0,033 a	2,76±0,029 a	**

P: Επίπεδο Σημαντικότητας, ΜΣ: Μη Σημαντικό, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$. Μέσοι όροι για τον ίδιο παράγοντα με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

Τα ψάρια στις δεξαμενές με ΚΥ παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές Ειδικού Ρυθμού Ανάπτυξης (ημέρες 0-84) από τα ψάρια στις δεξαμενές με ΠΥ και ΧΥ (Πίνακας 3). Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των ψαριών στις δεξαμενές με ΕΚΥ διαφοροποιήθηκε μόνο από τα ψάρια των δεξαμενών ΧΥ. Σημαντικές διαφοροποιήσεις παρουσιάστηκαν επίσης τις ημέρες εκτροφής 29 έως 42 όπου οι τιμές του Ειδικού Ρυθμού Ανάπτυξης ήταν υψηλότερες στις δεξαμενές με υπόστρωμα σε σχέση με ΧΥ (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (ΚΥ), Ερυθροκαφέ (ΕΚΥ) ή Πράσινο (ΠΥ) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ) για 84 ημέρες (n=2).

Ημέρες εκτροφής	Επέμβαση				P
	ΚΥ	ΕΚΥ	ΠΥ	ΧΥ	
0-14	1,08±0,012	1,13±0,007	1,06±0,032	1,06±0,053	ΜΣ
15-28	1,15±0,016	1,16±0,001	1,12±0,044	1,10±0,033	ΜΣ
29-42	1,29±0,022 c	1,19±0,011 bc	1,10±0,009 b	0,99±0,046 a	**
43-56	0,95±0,046	0,84±0,047	0,74±0,053	0,70±0,069	ΜΣ
57-70	0,96±0,022	0,91±0,001	0,88±0,026	0,84±0,062	ΜΣ
71-84	0,75±0,045	0,76±0,020	0,64±0,054	0,71±0,021	ΜΣ
0-84	1,03±0,023 c	1,00±0,008 bc	0,92±0,015 ab	0,90±0,036 a	*

P: Επίπεδο Σημαντικότητας, ΜΣ: Μη Σημαντικό, * $P<0,05$, ** $P<0,01$. Μέσοι όροι για τον ίδιο παράγοντα με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

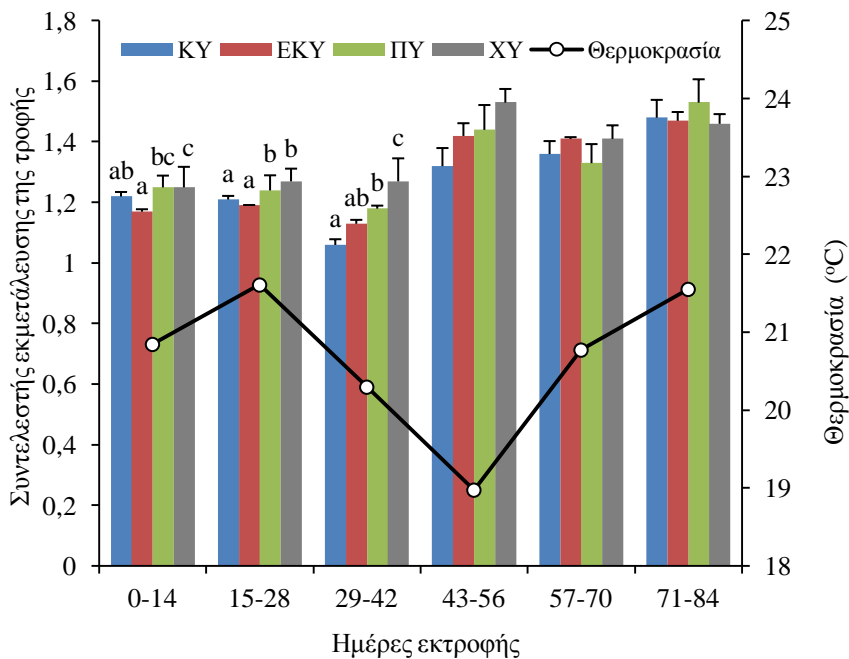
Τα ίδια παρατηρήθηκαν και για την επί % αύξηση του ζώντος βάρους για το σύνολο της πειραματικής περιόδου (ημέρες 0-84) αλλά και τις ημέρες 29-42 (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Επί % αύξηση του ζώντος βάρους ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (ΚΥ), Ερυθροκαφέ (ΕΚΥ) ή Πράσινο (ΠΥ) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ) για 84 ημέρες (n=2).

Ημέρες εκτροφής	Επέμβαση				
	ΚΥ	ΕΚΥ	ΠΥ	ΧΥ	P
0-14	16,4±0,20	17,1±0,10	16,0±0,51	16,0±0,86	ΜΣ
15-28	17,5±0,25	17,7±0,01	17,0±0,71	16,6±0,54	ΜΣ
29-42	19,9±0,37 c	18,2±0,18 bc	16,6±0,55 ab	14,8±1,03 a	*
43-56	14,2±0,72	12,5±0,74	10,9±0,82	10,2±1,06	ΜΣ
57-70	14,4±0,35	13,6±0,02	13,1±0,41	12,4±0,97	ΜΣ
71-84	11,1±0,70	11,2±0,31	9,4±0,83	10,4±0,32	ΜΣ
0-84	137,8±4,58 c	131,3±1,40 bc	117,2±2,35 ab	112,8±5,81 a	*

P: Επίπεδο Σημαντικότητας, ΜΣ: Μη Σημαντικό, *P<0,05. Μέσοι όροι για τον ίδιο παράγοντα με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

Από την αρχή της πειραματικής περιόδου και ως την 28^η ημέρα ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής παρουσίασε χαμηλότερες τιμές για τα ψάρια των δεξαμενών με ΚΥ και ΕΚΥ σε σχέση με τα ψάρια των δεξαμενών ΧΥ (Διάγραμμα 2). Μεταξύ των ημερών 29 και 42 ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής των ψαριών των δεξαμενών ΧΥ ήταν υψηλότερος όλων των επεμβάσεων, ενώ από την 43^η ημέρα και ως το τέλος της πειραματικής περιόδου δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων (Διάγραμμα 2). Όσον αφορά στο σύνολο της πειραματική περιόδου, οι τιμές του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής δεν επηρεάστηκαν από τις επεμβάσεις (ΚΥ: 1,27±0,030, ΕΚΥ: 1,30±0,006, ΠΥ: 1,32±0,049, ΧΥ: 1,36±0,050, P>0,05).



Διάγραμμα 2: Συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (KY), Ερυθροκαφέ (EKY) ή Πράσινο (PY) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (XY) για 84 ημέρες (n=2). Στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$ για τις περιόδους εκτροφής 0-14, 15-28 και 29-42).

Καμία από τις παραμέτρους του πλάσματος του αίματος που εξετάστηκαν δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις. Οι μέσες τιμές διαμορφώθηκαν ως εξής: χοληστερόλη 174,8-198,0 mg/dL, τριακυλγλυκερίδια 175,7-194,9 mg/dL και γλυκόζη 74,32-89,28 mg/dL. Ο ΣΣΔ των ψαριών του KY ($0,13 \pm 0,008$) και του PY ($0,11 \pm 0,007$) δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά από των ψαριών στις δεξαμενές XY ($0,11 \pm 0,007$), ενώ των ψαριών του EKY ($0,14 \pm 0,008$) είχε στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές.

Οι παράμετροι του ήπατος που μελετήθηκαν (υγρασία: 62,2-63,0%, ολικά λίπη: 15,6-16,4% νωπού βάρους, Ηπατοσωματικός Δείκτης: 0,96-1,15%), καθώς επίσης η χημική σύσταση της σώματος (υγρασία: 65,96-67,56%, ολικές πρωτεΐνες: 18,13-18,77%, ολικά λίπη: 9,81-11,19%, τέφρα: 3,08-3,36%) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων.

Η περιεκτικότητα του ραχιαίου μυϊκού ιστού σε υγρασία και ολικά λίπη, καθώς επίσης το ποσοστό των EPA, DPA και DHA (% ολικών λιπαρών οξέων) δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων (Πίνακας 6). Ωστόσο, τα ολικά λιπαρά οξέα και η ποσότητα (mg/g) των EPA και DPA είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές στα ψάρια των δεξαμενών με KY. Το ίδιο παρατηρήθηκε και όταν υπολογίστηκε το άθροισμα των EPA και DHA σε 100 g ραχιαίου μυϊκού ιστού. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ποσότητα του DHA και στο λόγο ω -3: ω -6 (Πίνακας 5).

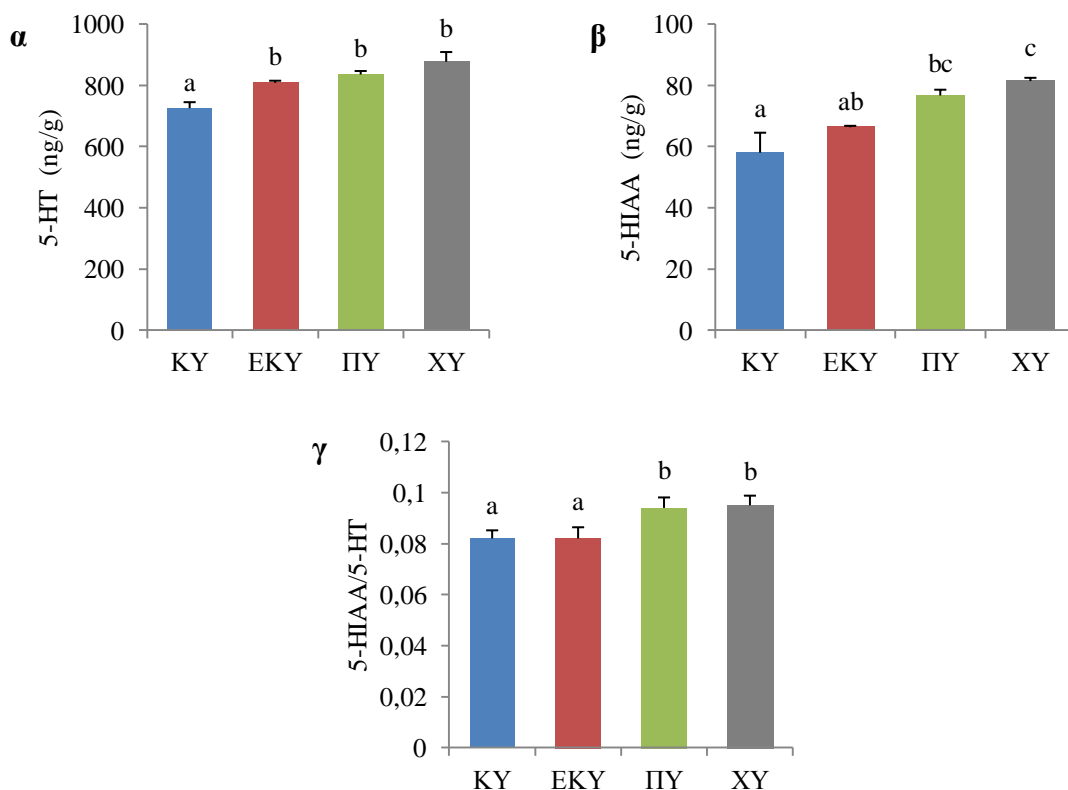
Πίνακας 5: Χημική σύσταση και Λιπαρά οξέα ραχιαίου μυϊκού ιστού (ΛΟ) ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (ΚΥ), Ερυθροκαφέ (ΕΚΥ) ή Πράσινο (ΠΥ) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ) για 84 ημέρες (n=2).

	Επέμβαση				P
	ΚΥ	ΕΚΥ	ΠΥ	ΧΥ	
Ραχιαίος μυϊκός ιστός					
Υγρασία (%)	73,4±0,71	74,2±0,06	74,7±0,39	73,3±1,05	ΜΣ
Ολικά λίπη (% NB)	3,23±0,422	2,72±0,340	2,57±0,230	3,09±0,282	ΜΣ
ΛΟ (mg/g NB)	12,88±0,972b	5,93±0,021a	6,84±1,051a	7,27±1,219 a	*
ΛΟ (% ολικών ΛΟ)					
20:5ω-3 (EPA)	6,48±0,598	6,83±0,062	6,83±0,169	7,47±0,185	ΜΣ
22:5ω-3 (DPA)	3,80±0,289	3,81±0,284	3,88±0,045	3,87±0,090	ΜΣ
22:6ω-3 (DHA)	10,33±2,021	11,74±0,960	11,96±0,291	12,75±0,598	ΜΣ
ΛΟ (mg/g NB)					
20:5ω-3 (EPA)	0,83±0,014b	0,41±0,005a	0,47±0,083a	0,54±0,073a	*
22:5ω-3 (DPA)	0,49±0,054b	0,23±0,018a	0,27±0,044a	0,28±0,045a	*
22:6ω-3 (DHA)	1,31±0,160	0,70±0,059	0,82±0,146	0,93±0,111	ΜΣ
ω-3:ω-6	1,21±0,286	1,14±0,049	1,14±0,030	1,22±0,065	ΜΣ
EPA+DHA (mg/100g)	231,8±17,39 b	110,2±6,45 a	129,1±22,91 a	146,9±18,21 a	*

P: Επίπεδο Σημαντικότητας, NB: Νωπό Βάρος, EPA: εικοσι-πεντανοϊκό οξύ, DPA: εικοσιδυο-πεντανοϊκό οξύ, DHA: εικοσιδυο-εξανοϊκό οξύ, ω-3: ολικά ω-3 ΛΟ, ω-6: ολικά ω-6 ΛΟ, ΜΣ: Μη Σημαντικό, *P<0,05. Μέσοι όροι για τον ίδιο παράγοντα με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

1.3.3 Νευροδιαβιβαστές και λιπαρά οξέα εγκέφαλου

Η σεροτονίνη (5-HT) είχε χαμηλότερες τιμές στα ψάρια των δεξαμενών με ΚΥ σε σχέση με όλες τις άλλες επεμβάσεις (Διάγραμμα 3α). Ο μεταβολίτης της σεροτονίνης (5-HIAA) είχε τις υψηλότερες τιμές στα ψάρια των δεξαμενών ΧΥ και τις χαμηλότερες στα ψάρια των δεξαμενών με ΚΥ. Τα ψάρια στις δεξαμενές με ΕΚΥ και ΠΥ είχαν ενδιάμεσες τιμές. Ωστόσο, τα ψάρια των δεξαμενών με ΕΚΥ διέφεραν στατιστικά σημαντικά ως προς τις τιμές του μεταβολίτη της σεροτονίνης σε σχέση με τα ψάρια στις δεξαμενές ΧΥ, ενώ αυτά στις ΠΥ δεξαμενές δε διέφεραν από τα ψάρια των δεξαμενών ΧΥ (Διάγραμμα 3β). Η σεροτονινεργική δραστηριότητα του εγκέφαλου, όπως εκτιμάται από το λόγο 5-HIAA/5-HT, ήταν υψηλότερη στα ψάρια των δεξαμενών με ΠΥ και ΧΥ σε σχέση με αυτά των δεξαμενών με ΚΥ και ΕΚΥ (Διάγραμμα 3γ).



Διάγραμμα 3: Νευροδιαβιβαστές εγκέφαλου. Σεροτονίνη (α, 5-HT), 5-υδροξυ-ινδολοξικό οξύ (β, 5-HIAA) και σεροτονινεργική δραστηριότητα (γ, 5-HIAA/5-HT) σε άτομα τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (KY), Ερυθροκαφέ (EKY) ή Πράσινο (ΠΥ) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (M) για 84 ημέρες (n=2). Στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (5-HT: $P < 0,05$, 5-HIAA: $P < 0,05$, 5-HIAA/5-HT: $< 0,05$).

Η νοραδρεναλίνη (NA) δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ψαριών στις δεξαμενές με υπόστρωμα και XY (Πίνακας 6). Ωστόσο, τα επίπεδα της νοραδρεναλίνης ήταν υψηλότερα στα ψάρια των δεξαμενών με ΠΥ σε σχέση με αυτά των δεξαμενών με KY και EKY (Πίνακας 6). Τα ψάρια των δεξαμενών XY είχαν τις υψηλότερες τιμές σε ντοπαμίνη (DA), ενώ τα επίπεδα της ντοπαμίνης ήταν χαμηλά για τα ψάρια στο ΠΥ και ακόμη χαμηλότερα γι' αυτά στο KY και EKY (Πίνακας 6). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων για τους μεταβολίτες της ντοπαμίνης DOPAC και HVA ή για τη ντοπαμινεργική δραστηριότητα, δηλαδή για τους λόγους DOPAC/DA, HVA/DA και (DOPAC+HVA)/DA (Πίνακας 6).

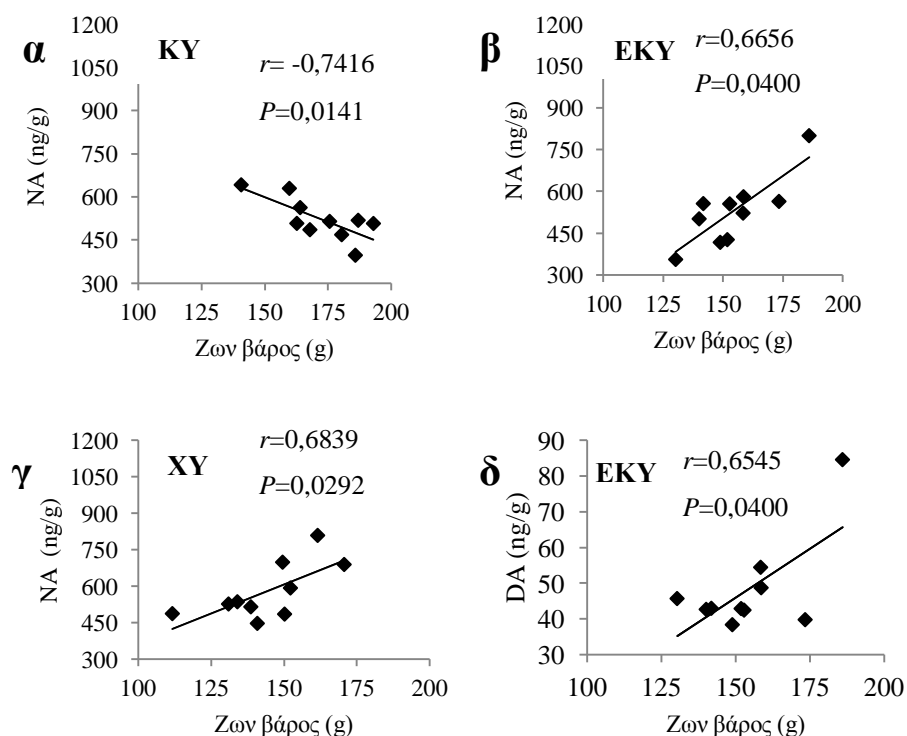
Η περιεκτικότητα του εγκέφαλου σε ολικά λίπη, η σύσταση του εγκέφαλου σε λιπαρά οξέα ποιοτικά (% των ολικών λιπαρών οξέων) ή ποσοτικά (mg/g νωπού βάρους ιστού), αλλά και το μέγεθος του εγκέφαλου (Εγκεφαλοσωματικός Δείκτης) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Νευροδιαβιβαστές εγκέφαλου, ολικά λίπη, λιπαρά οξέα (ΛΟ) και μέγεθος εγκέφαλου (ΕΣΔ) ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (KY), Ερυθροκαφέ (EKY) ή Πράσινο (ΠΥ) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (XY) για 84 ημέρες (n=2).

	Επέμβαση				P
	KY	EKY	ΠΥ	XY	
NA (ng/g)	516,6±23,25 a	498,4±26,45 a	609,3±23,03 b	577,1±43,72 ab	*
DA (ng/g)	40,0±1,13 a	43,0±1,14 a	49,9±1,75 b	59,4±2,28 c	***
DOPAC (ng/g)	1,88±0,192	2,80±0,589	3,44±0,128	3,80±0,762	ΜΣ
HVA (ng/g)	1,69±0,258	2,98±0,463	2,60±0,064	2,28±0,215	ΜΣ
DOPAC/DA	0,043±0,0014	0,066±0,0002	0,073±0,0326	0,065±0,0037	ΜΣ
HVA/DA	0,043±0,0071	0,066±0,0091	0,045±0,0087	0,039±0,0030	ΜΣ
DOPAC+HVA/DA	0,085±0,0108	0,132±0,0287	0,121±0,0603	0,104±0,0217	ΜΣ
Ολικά λίπη (% NB)	9,03±0,154	8,83±0,245	9,02±0,227	9,09±0,347	ΜΣ
ΛΟ (% ολικών ΛΟ)					
18:3 ω-3 (α-λινολενικό οξύ)	0,71±0,129	0,68±0,168	0,94±0,163	1,00±0,271	ΜΣ
20:4 ω-6 (ARA)	1,51±0,060	1,55±0,019	1,53±0,039	1,52±0,057	ΜΣ
20:5 ω-3 (EPA)	4,30±0,157	4,05±0,209	4,68±0,279	4,72±0,285	ΜΣ
22:5 ω-3 (DPA)	1,61±0,012	1,51±0,135	1,72±0,220	1,88±0,278	ΜΣ
22:6 ω-3 (DHA)	23,8±0,690	23,3±0,768	25,5±0,670	25,4±0,318	ΜΣ
ω-3 PUFA	30,6±0,35	29,7±1,32	33,1±1,41	33,3±0,60	ΜΣ
ΛΟ (mg/g NB)					
18:3 ω-3 (α-λινολενικό οξύ)	0,15±0,036	0,19±0,081	0,32±0,119	0,36±0,168	ΜΣ
20:4 ω-6 (ARA)	0,32±0,005	0,42±0,088	0,50±0,094	0,52±0,095	ΜΣ
20:5 ω-3 (EPA)	0,91±0,085	1,09±0,272	1,54±0,417	1,64±0,453	ΜΣ
22:5 ω-3 (DPA)	0,34±0,022	0,41±0,117	0,58±0,192	0,67±0,237	ΜΣ
22:6 ω-3 (DHA)	5,02±0,139	6,26±1,448	8,35±1,994	8,72±1,804	ΜΣ
ω-3 PUFA	6,5±0,29	8,0±1,94	10,9±2,76	11,5±2,71	ΜΣ
ΕΣΔ (% ΖΒ)	0,21±0,010	0,21±0,009	0,20±0,008	0,20±0,007	ΜΣ

NA: νοραδρεναλίνη, DA: ντοπαμίνη, DOPAC: 3,4 διυδροξύ-φαινυλακετικό οξύ, HVA: ομοβανιλικό οξύ, NB: Νωπό Βάρος, ΕΣΔ: εγκεφαλοσωματικός δείκτης, ΖΒ: Ζων Βάρος, P: Επίπεδο Σημαντικότητας, ΜΣ: Μη Σημαντικό, * $P<0,05$, *** $P<0,001$. Μέσοι όροι για τον ίδιο παράγοντα με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

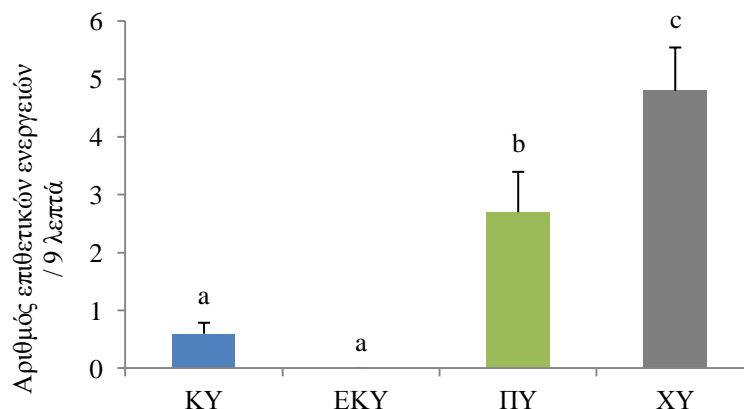
Η νοραδρεναλίνη του εγκεφάλου παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με το βάρος των ψαριών του KY, ενώ θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε για τα ψάρια του EKY και του XY (Διάγραμμα 4α-γ). Επιπλέον, η ντοπαμίνη των ψαριών του EKY παρουσίασε θετική συσχέτιση με το βάρος τους (Διάγραμμα 4δ). Καμία άλλη συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε για τις μονοαμίνες του εγκεφάλου και τους μεταβολίτες τους σε σχέση με το βάρος των ψαριών.



Διάγραμμα 4: Συσχετίσεις με συντελεστή συσχέτισης Pearson μεταξύ του ζώντος βάρους και της νοραδρεναλίνης, NA (α - γ) και ντοπαμίνης, DA (δ) του εγκεφάλου ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (KY) ή Ερυθροκαφέ (EKY) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (XY) για 84 ημέρες (n=10).

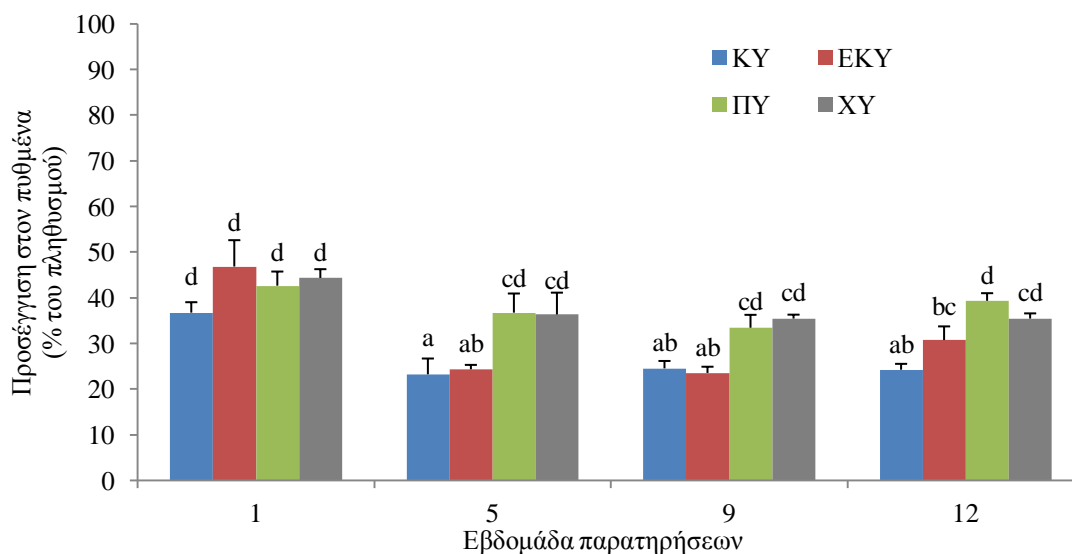
1.3.4 Συμπεριφορά

Ο αριθμός των επιθετικών ενεργειών ήταν μικρότερος στις δεξαμενές με KY και EKY, ενώ δε διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο αυτών επεμβάσεων. Η επιθετικότητα ήταν μεγαλύτερη στα ψάρια των δεξαμενών με ΠΥ και ακόμη μεγαλύτερη στις δεξαμενές XY (Διάγραμμα 5). Η επιθετική συμπεριφορά δε διαφοροποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (αλληλεπίδραση χρόνος παρατήρησης x υπόστρωμα, $P > 0,05$). Τα ψάρια που έκαναν επίθεση είχαν ανυψωμένο το ραχιαίο πτερύγιο και σκουρότερο χρωματισμό στο σώμα τους. Αυτό παρατηρήθηκε ακριβώς πριν την επίθεση, ενώ στη συνέχεια τα χαρακτηριστικά αυτά εξασθενούσαν με αποτέλεσμα τα ψάρια να μη διακρίνονται ανάμεσα στα άτομα της ομάδας κάθε δεξαμενής. Αντίθετα, τα ψάρια που δέχονταν μια επίθεση δεν παρουσίασαν αλλαγές στην εμφάνισή τους, ενώ απομακρύνονταν από αυτά που επιτίθονταν. Δεν παρατηρήθηκαν ψάρια με πληγές, αμυχές ή τραυματισμούς στο ουραίο πτερύγιο.



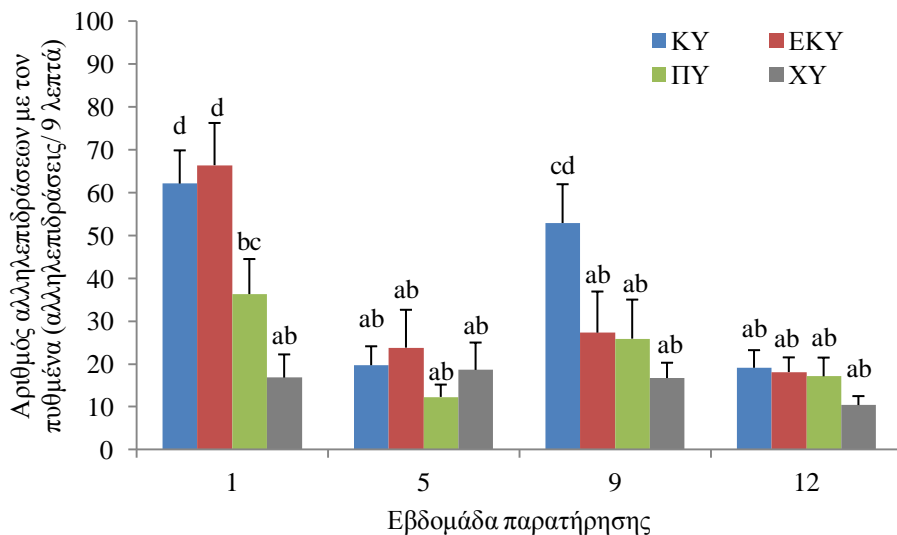
Διάγραμμα 5: Αριθμός επιθετικών ενεργειών ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (KY), Ερυθροκαφέ (EKY) ή Πράσινο (PY) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (XY) για 84 ημέρες (n=2). Στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P<0,001$).

Η προσέγγιση των ψαριών στον πυθμένα παρουσίασε αλληλεπίδραση μεταξύ του χρόνου παρατήρησης και του υποστρώματος. Στην περίπτωση των δεξαμενών με KY και EKY, περισσότερα ψάρια συνήθιζαν να κολυμπούν κοντά στον πυθμένα την πρώτη εβδομάδα παρατήρησης σε σχέση με τις εβδομάδες 5, 9 και 12 (Διάγραμμα 6). Επιπλέον, στις δεξαμενές με PY και XY η προσέγγιση των ψαριών στον πυθμένα δε διαφοροποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου. Σε όλες τις περιπτώσεις το ποσοστό των ψαριών που κολυμπούσαν κοντά στον πυθμένα δεν ξεπερνούσε το 50% του συνόλου των ατόμων της κάθε δεξαμενής. Μονοπώληση της τροφής ή συμπεριφορά διεκδίκησης κάποιας περιοχής της δεξαμενής από τα ψάρια ή εκτεταμένη συμπεριφορά ανεύρεσης τροφής δεν παρατηρήθηκαν σε καμία περίπτωση.



Διάγραμμα 6: Προσέγγιση στον πυθμένα ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (KY), Ερυθροκαφέ (EKY) ή Πράσινο (PY) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (XY) για 84 ημέρες (n=2). Στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P<0,05$).

Όσον αφορά στην απασχόληση των ψαριών με τον πυθμένα παρατηρήθηκε ότι στις δεξαμενές με υπόστρωμα αλλά και σε αυτές ΧΥ, τα ψάρια πλησίαζαν τον πυθμένα με το στόμα τους ανοιχτό και το έκλειναν μόλις ακουμπούσαν τον πυθμένα. Στην περίπτωση των δεξαμενών με υπόστρωμα, η κίνηση αυτή κατέληγε με τα ψάρια να αλληλεπιδρούν με το χαλίκι. Συγκεκριμένα, τα ψάρια έπιαναν ένα χαλίκι στο στόμα τους και στη συνέχεια το πετούσαν ή το «μασούσαν» και στη συνέχεια το πετούσαν ή σπάνια το κατάπιαν. Ο αριθμός αυτών των επαφών με τον πυθμένα ήταν σημαντικά μεγαλύτερος στις δεξαμενές με ΚΥ και ΕΚΥ κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας παρατήρησης σε σχέση με τις δεξαμενές με ΠΥ και ΧΥ (Διάγραμμα 7). Παρόλο που αυτή η συμπεριφορά ήταν εντονότερη στις δεξαμενές του ΠΥ σε σχέση με τις δεξαμενές ΧΥ, η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Στις επόμενες εβδομάδες παρατήρησης η απασχόληση με τον πυθμένα ήταν όμοια μεταξύ των επεμβάσεων, εκτός από την 9^η εβδομάδα όπου οι δεξαμενές με ΚΥ παρουσίασαν στατιστικά υψηλότερες τιμές (Διάγραμμα 7).



Διάγραμμα 7: Απασχόληση ψαριών με τον πυθμένα ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (ΚΥ), Ερυθροκαφέ (ΕΚΥ) ή Πράσινο (ΠΥ) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ) για 84 ημέρες (n=2). Στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$).

Ο αριθμός των ψαριών που ερχόταν σε επαφή με την αντανάκλασή τους δεν ήταν στατιστικά σημαντικός μεταξύ των επεμβάσεων κατά τη διάρκεια των τεσσάρων εβδομάδων παρατήρησης και οι τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 4,0 και 7,8% ($P > 0,05$). Τα ψάρια κολυπούσαν κοντά στην αντανάκλασή τους με το κεφάλι τους προς τα πλευρικά τοιχώματα της δεξαμενής. Δεν παρατηρήθηκαν σημάδια επιθετικής συμπεριφοράς των ψαριών προς την αντανάκλασή τους.

1.4 Συζήτηση

Τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος δείχνουν ότι η παρουσία Κυανού ή Ερυθροκαφέ υποστρώματος βελτιώνουν την ανάπτυξη (ζων βάρος, ολικό και σταθερό μήκος, ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, επί % αύξηση ζώντος βάρους) και την αξιοποίηση της τροφής, ενώ η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος με την προσθήκη υποστρώματος προκάλεσε αλλαγές στους νευροδιαβιβαστές του εγκεφάλου (Κυανό και Ερυθροκαφέ υπόστρωμα), αλλά και στη συμπεριφορά των ψαριών.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η τσιπούρα, όπως και άλλα είδη της οικογένειας Sparidae ζουν σε βραχώδεις αλλά και ήπιους πυθμένες που καλύπτονται από διάφορα υλικά (π.χ. άμμος, χαλίκι, μικρούς βράχους ή λιβάδια Ποσειδωνίας), συνήθως σε βάθος 30 m αλλά έως και 150 m (Basurco et al., 2011). Η παρουσία των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ενδεχομένως να έγιναν αντιληπτά από την τσιπούρα ως πιο όμοια στο φυσικό της περιβάλλον σε σχέση με το περιβάλλον των δεξαμενών. Χωρίς υπόστρωμα, με αποτέλεσμα να βελτιωθεί η ανάπτυξη και η φυσιολογία των ψαριών. Το ίδιο έχει παρατηρηθεί και για τον υπόγλωσσο *Hippoglossus hippoglossus* αλλά και την ιριδίζουσα πέστροφα *Oncorhynchus mykiss*, όπου η παρουσία υποστρώματος στον πυθμένα των δεξαμενών τους (π.χ. χαλίκι ή άμμος) βελτίωσε την ανάπτυξη και την αξιοποίηση της τροφής (Arndt et al., 2001a; Ottesen et al., 2007). Ωστόσο, οποιαδήποτε σύγκριση μεταξύ των εργασιών που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση του περιβάλλοντος θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη την παραλλακτικότητα των υλικών που χρησιμοποιούνται αλλά και τις διαφοροποιήσεις στην ηθολογία διαβίωσης μεταξύ των ειδών.

Η απουσία διαφοροποιήσεων μεταξύ των επεμβάσεων σε παραμέτρους της ανάπτυξης (ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, επί % αύξηση ζώντος βάρους) και στην αξιοποίηση της τροφής ύστερα από 42 ημέρες εκτροφής ενδεχομένως οφείλεται στην πτώση της θερμοκρασίας που παρατηρήθηκε εκείνο το χρονικό διάστημα και εντάθηκε το επόμενο δεκαπενθήμερο (Διάγραμμα 2). Ωστόσο, η καλύτερη ανάπτυξη που παρατηρήθηκε στα ψάρια των δεξαμενών με Κυανό και Ερυθροκαφέ υπόστρωμα, τόσο στο σύνολο της πειραματικής περιόδου (ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, επί % αύξηση ζώντος βάρους) αλλά και στο ζων βάρος από την 56η ημέρα εκτροφής, μπορεί να σχετίζεται με τα χαμηλά επίπεδα επιθετικότητας που διαπιστώθηκαν στις επεμβάσεις αυτές. Η εμπλοκή σε μια διαμάχη είναι μια διαδικασία που απαιτεί τη δαπάνη ενέργειας (Damsgård and Huntingford, 2012), έτσι είναι πιθανό τα αποθέματα ενέργειας των ψαριών στο Κυανό και Ερυθροκαφέ υπόστρωμα αντί να δαπανήθηκαν σε διαμάχες, να διατέθηκαν προς όφελος της ανάπτυξης. Γενικά, η επιθετικότητα που παρατηρήθηκε δεν ήταν έντονη αφού πραγματοποιήθηκε σχετικά μικρός αριθμός επιθετικών ενεργειών ενώ δεν υπήρχαν τραυματισμοί ή πληγές στα πτερύγια ή το σώμα των ψαριών. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στο μέγεθος/ηλικία των ψαριών, αφού η επιθετικότητα μπορεί να είναι πιο συχνή και έντονη μεταξύ νεαρών ατόμων και να μειώνεται καθώς τα ψάρια μεγαλώνουν (Greaves and Tuene, 2001).

Και σε άλλα είδη ψαριών, η διαφοροποίηση του περιβάλλοντος (π.χ. με άμμο, βότσαλα και φύκια) οδήγησε σε μείωση της επιθετικότητας (Basquill and Grant, 1998;

Dou et al., 2000; Höjesjö et al., 2004; Kadry and Barreto, 2010). Στις περιπτώσεις αυτές, ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος λειτούργησε είτε ως καταφύγιο είτε ως ένα φυσικό εμπόδιο που μείωσε την οπτική επαφή μεταξύ των ψαριών με αποτέλεσμα να μειώσει τις αλληλεπιδράσεις τους. Αντίθετα, σε άλλες εργασίες έχει παρατηρηθεί αύξηση της επιθετικότητας σε εμπλουτισμένο περιβάλλον. Στην περίπτωση αυτή, ο εμπλουτισμός θεωρήθηκε ιδιαίτερης αξίας από τα ψάρια με αποτέλεσμα να προάγει συμπεριφορές διεκδίκησης της περιοχής και να εντείνει τις μεταξύ τους διαμάχες (Barreto et al., 2011; Mikheev et al., 2005; Nijman and Heuts, 2000; 2011).

Στο παρόν πείραμα, καμία από τις παραπάνω περιπτώσεις δεν εξηγεί τη μείωση της επιθετικότητας, αφού τα ψάρια ούτε κρύβονταν ούτε παρουσίασαν συμπεριφορά διεκδίκησης κάποιας περιοχής στη δεξαμενή. Ωστόσο, η απασχόληση με τον πυθμένα που εμφάνισαν τα ψάρια των δεξαμενών με υπόστρωμα ενδέχεται να τα αποσπά από τις μεταξύ τους διαμάχες. Το ίδιο παρατηρήθηκε στον μπακαλιάρο του Ατλαντικού *Gadus morhua* όταν τοποθετήθηκαν διάφορα αντικείμενα στον πειραματικό κλωβό, τα οποία απέσπασαν την προσοχή του και έτσι μειώθηκε η καταστροφή των διχτυών των κλωβών και η πιθανή απόδραση των ψαριών (Zimmermann et al., 2012).

Το γεγονός ότι η τσιπούρα είναι ένα είδος που δημιουργεί ιεραρχικές κοινωνίες (Cammarata et al., 2012; Goldan et al., 2003; Karplus et al., 2000; Montero et al., 2009), σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της επιθετικότητας, υποδηλώνει μια τροποποίηση στην κοινωνική κατάσταση. Συγκεκριμένα, σε μικρές κοινωνικές ομάδες 4-10 ατόμων τσιπούρας παρατηρείται η θεμελίωση μιας γραμμικής ιεραρχίας όπου τα ψάρια μιας κοινωνικής τάξης είναι κυρίαρχα σε αυτά της χαμηλότερης κοινωνικής τάξης και υποτελή σε εκείνα της υψηλότερης τάξης (Goldan et al., 2003; Montero et al., 2009). Επίσης, όσον αφορά στην τσιπούρα αλλά και άλλα είδη ψαριών, έχει παρατηρηθεί ότι η εγκατάσταση μιας κοινωνικής ιεραρχίας σε μια ομάδα ψαριών παραμένει σταθερή στο χρόνο εφόσον δεν αλλάξουν τα άτομα που αποτελούν την ομάδα αυτή (Cammarata et al., 2012; Goldan et al., 2003; Winberg and Nilsson, 1993a). Ωστόσο, στην πραγματικότητα, είναι δύσκολο να προσδιοριστούν οι κοινωνικές ιεραρχίες σε μεγάλες ομάδες ψαριών όπως αυτές στις εντατικές μονάδες εκτροφής. Στο παρόν πείραμα, τα ψάρια δεν ήταν σημασμένα με αποτέλεσμα να είναι αδύνατος ο προσδιορισμός του ακριβή αριθμού ψαριών ή ακόμα των συγκεκριμένων ψαριών που πραγματοποιούσαν ή δέχονταν μια επίθεση. Ωστόσο, οι διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων στην επιθετική συμπεριφορά των ψαριών υποδηλώνουν πιο ήπιες κοινωνικές σχέσεις για τα ψάρια στις δεξαμενές με Κυανό και Ερυθροκαφέ υπόστρωμα.

Η άποψη αυτή ενισχύεται και από τα αποτελέσματα των νευροδιαβιβαστών του εγκέφαλου. Αν και δεν υπάρχουν άλλες εργασίες που να μελετούν τις μονοαμίνες στον εγκέφαλο των ψαριών που εκτρέφονται σε εμπλουτισμένο περιβάλλον, χαμηλότερη δραστηριότητα του σεροτονινεργικού συστήματος, δηλαδή μειωμένα επίπεδα σεροτονίνης (5-HT), του μεταβολίτη της σεροτονίνης (5-HIAA) ή/και της σεροτονινεργικής δραστηριότητας (5-HIAA/5-HT), καθώς επίσης χαμηλότερα επίπεδα ντοπαμίνης (DA) και των μεταβολιτών της έχουν αναφερθεί σε συγκεκριμένες περιοχές

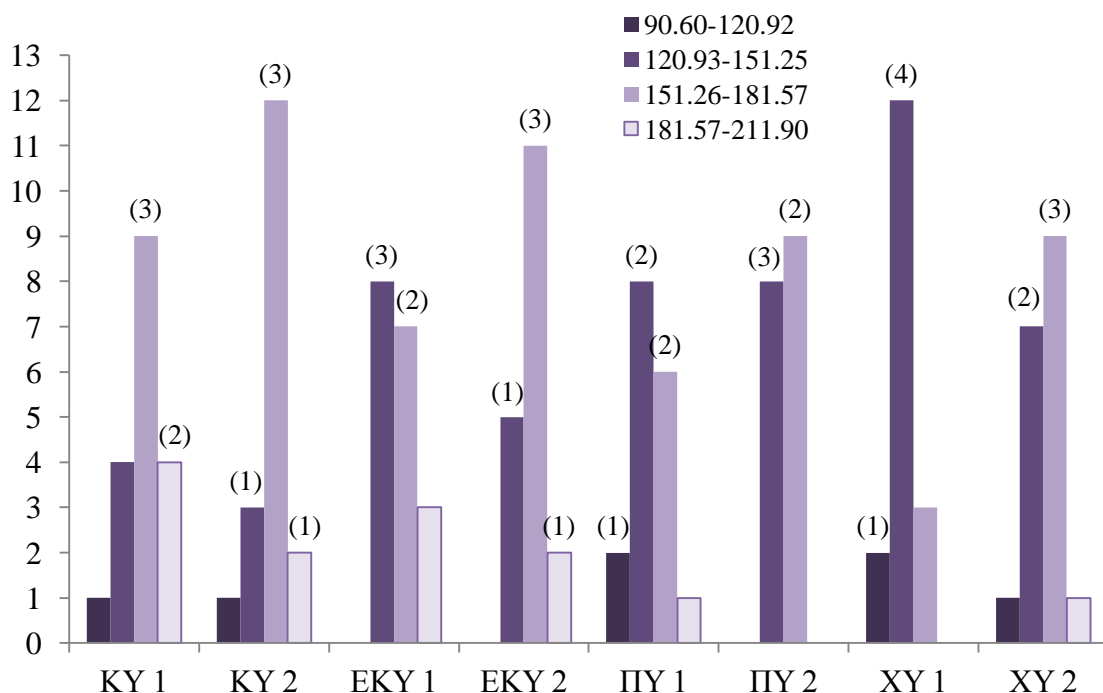
του εγκέφαλου των τρωκτικών (ποντίκια και επίμυες) που εκτράφηκαν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον μειώνοντας την καταθλιπτική συμπεριφορά και την ανησυχία των ατόμων (Brenes et al., 2008; McQuaid et al., 2012). Τα αποτελέσματα αυτά είναι όμοια με του παρόντος πειράματος για τα ψάρια των δεξαμενών με Κυανό και Ερυθροκαφέ υπόστρωμα που παρουσίασαν επίσης χαμηλή επιθετικότητα.

Αντίθετα, οι μεγαλύτερες τιμές του συστήματος της σεροτονίνης (5-HT, 5-HIAA, 5-HIAA/5-HT), της νοραδρεναλίνης (NA) και της ντοπαμίνης για τα ψάρια των δεξαμενών με Πράσινο υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα ενδεχομένως υποδηλώνουν αυξημένες πιθανότητες παρουσίας χρόνιου stress. Σύμφωνα με μελέτες σε διάφορα είδη ψαριών, έχει παρατηρηθεί ενεργοποίηση των συστημάτων της σεροτονίνης και των κατεχολαμινών σε καταστάσεις χρόνιου stress (Karakatsouli et al., 2007b; Papoutsoglou et al., 2006; Winberg and Nilsson, 1993b; Winberg et al., 1992). Η μειωμένη ανάπτυξη σε συνδυασμό με την αυξημένη επιθετικότητα των ψαριών στις δεξαμενές με Πράσινο υπόστρωμα και Χωρίς υπόστρωμα ενισχύουν την ύπαρξη χρόνιου stress στις επεμβάσεις αυτές.

Επιπλέον, είναι γενικότερα γνωστό ότι το σύστημα των μονοαμινών του εγκέφαλου έχει ιδιαίτερη εμπλοκή σε διάφορες συμπεριφορές και συγκεκριμένα την επιθετικότητα. Έτσι, έχει αναφερθεί ότι τα υποτελή ψάρια είναι λιγότερο επιθετικά, έχουν αυξημένη σεροτονινεργική δραστηριότητα και χαμηλότερη ανάπτυξη ενώ το αντίθετο παρατηρείται για τα κυρίαρχα ψάρια (Johnsson et al., 2006; Winberg and Nilsson, 1993a). Η αρνητική αυτή συσχέτιση μεταξύ της κοινωνικής θέσης και της σεροτονινεργικής δραστηριότητας έχει διαπιστωθεί για είδη της οικογένειας Salmonidae (Winberg et al., 1992; Winberg et al., 1991). Ωστόσο, στο παρόν πείραμα δεν μπορούν να διερευνηθούν παρόμοιες συσχετίσεις αφού δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί με ακρίβεια η κοινωνική θέση των ψαριών. Παρ' όλα αυτά, αν και σε μικρές κοινωνικές ομάδες ο προσδιορισμός της κοινωνικής θέσης των ατόμων που την απαρτίζουν είναι εφικτός, γνωρίζοντας τα άτομα που πραγματοποιούν ή δέχονται τις περισσότερες επιθέσεις, σε μεγάλες ομάδες (π.χ. σε συνθήκες εκτροφής) ο καθορισμός των κοινωνικών θέσεων δεν είναι τόσο εύκολος. Ένας έμμεσος τρόπος είναι η χρήση συσχετίσεων του βάρους των ψαριών με το επίπεδο μονοαμινών του εγκέφαλου και συγκεκριμένα της σεροτονινεργικής δραστηριότητας (Cubitt et al., 2008; Winberg et al., 1993). Τα κυρίαρχα ψάρια μιας ομάδας είναι συνήθως αυτά με το μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης αφού διεκδικούν την τροφή τους με μεγαλύτερη επιτυχία σε σχέση με τα υποτελή άτομα. Οι συσχετίσεις αυτές έχουν μελετηθεί σε ψάρια της οικογένειας Salmonidae που παρουσιάζουν ισχυρές κοινωνικές ιεραρχίες. Έτσι έχουν παρατηρηθεί αρνητικές συσχετίσεις της σεροτονινεργικής δραστηριότητας με το ρυθμό ανάπτυξης των ψαριών ή το σωματικό τους βάρος (Cubitt et al., 2008; Winberg et al., 1993), αποτελέσματα που φαίνονται να ισχύουν και σε τυχαία δειγματοληψία μικρού αριθμού ατόμων από κλωβό (Cubitt et al., 2008).

Ωστόσο, στο παρόν πείραμα δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις στις συσχετίσεις του βάρους με τη σεροτονινεργική δραστηριότητα. Από τη συχνότητα κατανομής του βάρους φαίνεται ότι τα ψάρια που αναλύθηκαν μέσω

τυχαίας δειγματοληψίας, ανήκαν κυρίως στις δύο μεσαίες κλάσεις βάρους (Διάγραμμα 8) και αυτό μπορεί να σχετίζεται με τα αποτελέσματα, αφού είναι πιθανό τα ψάρια της υψηλότερης ή χαμηλότερης κοινωνικής τάξης να μην περιλαμβάνονται στο δείγμα που αναλύθηκε. Εν τούτοις, ακόμα και σε μελέτες με ψάρια της οικογένειας Salmonidae που διαμορφώνουν έντονες ιεραρχίες, έχει παρατηρηθεί ότι το μεγαλύτερο ψάρι μιας ομάδας δεν είναι πάντα το κυρίαρχο, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να εμπλέκονται παράγοντες εκτός του μεγέθους στην κατάκτηση υψηλής κοινωνικής θέσης [π.χ. τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των ατόμων, η προηγούμενη εμπειρία τους ως προς την ήττα ή τη νίκη σε μια διαμάχη, (Huntingford et al., 1990; Winberg et al., 1992)].



Διάγραμμα 8: Κατανομή συχνοτήτων (αριθμός ψαριών) σε τέσσερις κλάσεις βάρους (g) που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (KY), Ερυθροκαφέ (EKY) ή Πράσινο (ΠΥ) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (XY) για 84 ημέρες. Ο αριθμός των ψαριών στα οποία έγινε τυχαία δειγματοληψία αναφέρεται μέσα σε παρένθεση.

Το σύστημα κατεχολαμινών του εγκέφαλου (NA, DA), αν και είναι λιγότερο μελετημένο στα ψάρια, θεωρείται ότι επίσης εμπλέκεται στη ρύθμιση της συμπεριφοράς. Έτσι, οι κοινωνικές αλληλεπιδράσεις και η επιθετικότητα φαίνεται να συνδέονται με αυξημένα επίπεδα νοραδρεναλίνης και ντοπαμίνης στον εγκέφαλο (Johnsson et al., 2006; Winberg and Nilsson, 1993a). Στο παρόν πείραμα, η νοραδρεναλίνη παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με το βάρος των ψαριών στις δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα ενισχύοντας την χαμηλή επιθετικότητα και τις ήπιες κοινωνικές αλληλεπιδράσεις που παρουσίασαν οι ομάδες αυτές. Αντίθετα, τα πιο επιθετικά ψάρια στις δεξαμενές Χωρίς υπόστρωμα παρουσίασαν θετική συσχέτιση, με τα πιο μεγάλα ψάρια να έχουν αυξημένα επίπεδα νοραδρεναλίνης. Ωστόσο, η θετική

συσχέτιση του βάρους με τα επίπεδα νοραδρεναλίνης και ντοπαμίνης που παρουσιάστηκε και στα ψάρια των δεξαμενών με Ερυθροκαφέ υπόστρωμα έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της επιθετικότητας και της ανάπτυξης και είναι δύσκολο να εξηγηθεί. Τέτοιες συσχετίσεις των μονοαμινών του εγκέφαλου με την επιθετικότητα και την κοινωνική θέση των ψαριών δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία και οι συγκρίσεις είναι επισφαλείς.

Παρά το γεγονός ότι τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος ενισχύουν την διαφοροποίηση των κοινωνικών σχέσεων μεταξύ των ψαριών, η ενδεχόμενη συμβολή των συνθηκών φωτισμού της δεξαμενής στην επιθετική συμπεριφορά δεν μπορεί να αποκλειστεί. Για παράδειγμα, χαμηλή ή υψηλή ένταση φωτισμού έχει παρατηρηθεί ότι μειώνει την επιθετικότητα των ψαριών είτε εξαιτίας μειωμένης ορατότητας ή λόγω αυξημένου κινδύνου θήρευσης (Almazán-Rueda et al., 2004; Timmer and Magellan, 2011). Στο παρόν πείραμα, αν και η ένταση φωτισμού διατηρήθηκε σταθερή στην επιφάνεια του νερού για όλες τις επεμβάσεις, η προσθήκη διαφορετικών υποστρωμάτων στον πυθμένα των δεξαμενών τροποποίησε την αντανάκλαση του φωτός και πιθανόν τις ιδιότητές του μέσα στο νερό. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία των πολλών ψηφίδων του υποστρώματος προκαλεί διάχυτη αντανάκλαση του φωτός σε αντίθεση με την κατοπτρική αντανάκλαση του φωτός που προκαλείται στους λείους πυθμένες των δεξαμενών Χωρίς υπόστρωμα. Η υπόθεση ότι οι συνθήκες φωτισμού εντός της δεξαμενής τροποποιήθηκαν σε βαθμό που να έγιναν αντιληπτές από την τσιπούρα επηρεάζοντας την επιθετική της συμπεριφορά παραμένει αντικείμενο περαιτέρω έρευνας.

Τα λιπαρά οξέα (ποιοτικά και ποσοτικά) του εγκέφαλου δε φάνηκαν να διαφοροποιούνται μεταξύ των επεμβάσεων. Στα Θηλαστικά έχει αναφερθεί ότι ορισμένα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (π.χ. EPA, DHA) εμπλέκονται σε διαταραχές της συμπεριφοράς (π.χ. κατάθλιψη, επιθετικότητα, υπερκινητικότητα). Η θεραπεία των διαταραχών αυτών περιλαμβάνει τη χορήγηση συμπληρωμάτων διατροφής με ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (DeMar Jr et al., 2006; Kidd, 2007; Vancassel et al., 2007). Οι μηχανισμοί της δράσης αυτής φαίνεται να σχετίζονται με τη σεροτονίνη του εγκέφαλου (Chen and Su, 2012; Hamazaki and Hamazaki, 2008; Vancassel et al., 2008; Vines et al., 2012). Ωστόσο, η ύπαρξη παρόμοιων μηχανισμών στα ψάρια δεν έχει μελετηθεί. Στο παρόν πείραμα η χρήση ολόκληρου του εγκέφαλου και των ολικών λιπών του εγκέφαλου μπορεί να καλύπτουν πιθανές διαφοροποιήσεις. Ωστόσο, δεδομένης της συνεχούς αντιπαράθεσης σχετικά με τη συνείδηση και συναίσθηση των ψαριών περαιτέρω έρευνα θεωρείται απαραίτητη.

Ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος δεν επηρέασε το μέγεθος του εγκέφαλου των ψαριών όπως έχει αναφερθεί και για άλλα ήδη ψαριών που εκτράφηκαν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον (Burns et al., 2009; Kihlslinger et al., 2006). Αντίθετα, αυξημένο μέγεθος εγκέφαλου ή τμημάτων του έχουν αναφερθεί σε κάποια είδη ψαριών (Kihlslinger and Nevitt, 2006; Näslund et al., 2012; von Krogh et al., 2010), όμοια με αυτή που έχει παρατηρηθεί σε Θηλαστικά (Mohammed et al., 2002). Η απουσία διαφοροποιήσεων στο παρόν πείραμα υποδηλώνει είτε ότι η παρουσία του

υποστρώματος δεν αποτελεί ένα ερέθισμα ικανό να προκαλέσει αλλαγές στο μέγεθος του εγκεφάλου, είτε πως οι πιθανές διαφοροποιήσεις εντοπίστηκαν σε κάποιο επιμέρους τμήμα του που δεν μελετήθηκε.

Η συμπεριφορά που σχετίζεται με τον πυθμένα παρατηρήθηκε σε όλες τις δεξαμενές ανεξάρτητα από την παρουσία του υποστρώματος σε αυτές. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στο γεγονός ότι τα ψάρια που εκτρέφονται σε δεξαμενές συνηθίζουν να βρίσκουν στον πυθμένα την τροφή που δεν πρόλαβαν να καταναλώσουν κατά τη βύθισή της. Η παρουσία του υποστρώματος δεν επηρέασε το ρυθμό κατανάλωσης της τροφής. Σε όλες τις επεμβάσεις η κατανάλωση της τροφής του κάθε γεύματος γινόταν σε σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ δεν παρατηρήθηκε «παγίδευση» των συμπλήκτων ανάμεσα στα χαλίκια του υποστρώματος. Ωστόσο, η παρουσία του υποστρώματος μπορεί να θεωρήθηκε από την τσιπούρα πιο κοντά στο φυσικό της περιβάλλον και ενδεχομένως ικανοποίησε την ανάγκη της να ψάχνει για να βρει την τροφή της. Η τσιπούρα συναντάται κοντά σε βραχώδεις και αμμώδεις περιοχές με διάφορα εδάφη (άμμο, χαλίκι, μικρούς βράχους ή λιβάδια Ποσειδωνίας), ενώ η διατροφή της περιλαμβάνει μύδια και καρκινοειδή που βρίσκονται επάνω ή κοντά σε βραχώδεις πυθμένες (Basurco et al., 2011). Αυτό σημαίνει ότι το συγκεκριμένο είδος συνηθίζει να εξερευνά, να σκαλίζει τον πυθμένα της θάλασσας και να αποσπά μύδια από τους βράχους. Τέτοιου τύπου συμπεριφορά μπορεί να είναι και αυτή που εμφανίζεται στο παρόν πείραμα στην περίπτωση των δεξαμενών με υπόστρωμα αφού ο άδειος πυθμένας στις δεξαμενές Χωρίς υπόστρωμα δεν θα επέτρεπε τέτοια συμπεριφορά.

Στην περίπτωση των ψαριών στις δεξαμενές με Κυανό και Ερυθροκαφέ υπόστρωμα και κυρίως κατά την πρώτη τους επαφή με αυτό (1^η εβδομάδα παρατηρήσεων), τα αποτελέσματα της προσέγγισης του πυθμένα και της φυσικής επαφής με αυτόν μπορεί να σχετίζονται με αυξημένη εξερευνητική συμπεριφορά (Jones and Godin, 2010). Η επικείμενη ελάττωση της συμπεριφοράς αυτής (εβδομάδες παρατήρησης 5, 9, 12), υποδηλώνει μια πιθανή έλλειψη ενδιαφέροντος ή/και εξοικείωσης με το εμπλουτισμένο περιβάλλον (Réale et al., 2007). Ωστόσο, η αύξηση της φυσικής επαφής με τον πυθμένα των ψαριών στις δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα κατά την 9^η εβδομάδα παρατήρησης δεν είναι εύκολο να εξηγηθεί.

Οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των ψαριών του Κυανού και Ερυθροκαφέ υποστρώματος που παρατηρήθηκαν (συντελεστής ευρωστίας, περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα) υποδηλώνουν ότι το Κυανό υπόστρωμα ίσως είναι πιο ευνοϊκό για τα ψάρια. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ψάρια του Κυανού υποστρώματος έχουν καλύτερη ποιότητα ραχιαίου μυϊκού ιστού ως προς την περιεκτικότητά τους σε EPA και DHA λιπαρά οξέα, που μπορεί να καλύψει τις ενδεικνυόμενες ημερήσιες ποσότητες πρόσληψης από τον άνθρωπο (250 mg/ημέρα, EFSA, 2010). Αν και η σχέση της ποιότητας του ραχιαίου μυϊκού ιστού με την ευζωία παραμένει αδιευκρίνιστη, μελέτες σε ορνίθια κρεοπαραγωγής έχουν δείξει ότι η εκτροφή τους σε εμπλουτισμένο περιβάλλον βελτίωσε την ευζωία τους και την ποιότητα του κρέατος ως προς την περιεκτικότητά του σε ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Castellini et al., 2002; Simsek

et al., 2009). Παρ' όλα αυτά, θα πρέπει να επισημανθεί, ότι παρά την κοινή παραδοχή ότι η επίτευξη καλού επιπέδου ευζωίας συνεπάγεται καλή ποιότητα προϊόντων (π.χ. καλή ποιότητα αυγών, κρέατος ή ραχιαίου μυϊκού ιστού ψαριού), τα επιστημονικά δεδομένα δεν επιτρέπουν ακόμα τη διεξαγωγή τέτοιων συμπερασμάτων.

Στο σύνολο των παραμέτρων που μελετήθηκαν, ελάχιστες διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν μεταξύ των δεξαμενών με Πράσινο υπόστρωμα και Χωρίς υπόστρωμα (συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής ημέρες 29-42, επιθετικότητα, ντοπαμίνη εγκέφαλου). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την εμπλοκή του χρώματος του υποστρώματος εκτός της φυσικής του παρουσίας στα αποτελέσματα, αφού παρά την ύπαρξη υποστρώματος δεν διαπιστώθηκαν οι θετικές επιδράσεις που παρατηρήθηκαν στις δεξαμενές με Κυανό και Ερυθροκαφέ υπόστρωμα. Βασική ωστόσο προϋπόθεση είναι το οπτικό σύστημα της τσιπούρας να μπορεί να διακρίνει διαφορετικά χρώματα. Αν και για κάποια είδη ιχθύων έχει διαπιστωθεί η ικανότητα διάκρισης χρωμάτων (π.χ. Colwill et al., 2005; Pignatelli et al., 2012; Siebeck et al., 2008), η αντίστοιχη οπτική ευαισθησία της τσιπούρας δεν έχει ακόμα μελετηθεί. Εντούτοις, είναι γνωστό, ότι το οπτικό σύστημα κάθε είδους ψαριού (μορφολογικά και λειτουργικά) είναι προσαρμοσμένο στις ιδιαίτερες συνθήκες του φυσικού περιβάλλοντος διαβίωσής του. Έτσι είναι πιθανό η τσιπούρα, βάσει της οπτικής της ικανότητας, να μην ήταν ικανή να διακρίνει διαφορά μεταξύ του περιβάλλοντος που δημιουργήθηκε στις δεξαμενές με Πράσινο υπόστρωμα και Χωρίς υπόστρωμα και συνεπώς να μην προκλήθηκε ένα ισχυρό ερέθισμα ικανό να επηρεάσει την ανάπτυξη και τη συμπεριφορά των ψαριών. Αν και η τσιπούρα στη φύση είναι εξοικειωμένη με όλα τα χρώματα που εξετάζονται εδώ (Basurco et al., 2011), το Κυανό και Ερυθροκαφέ υπόστρωμα μπορεί να έγιναν αντιληπτά ως εγγύτερα του φυσικού περιβάλλοντος που η τσιπούρα προτιμά να διαβιώνει.

Η φυσιολογία των ψαριών όπως εκτιμήθηκε από τις παραμέτρους του ήπατος και του αίματος που αναλύθηκαν ήταν όμοια μεταξύ των επεμβάσεων. Ωστόσο, στις δεξαμενές με Ερυθροκαφέ υπόστρωμα παρατηρήθηκε αυξημένο μέγεθος σπλήνα. Ο μηχανισμός που εμπλέκεται στο φαινόμενο αυτό είναι δύσκολο να εξηγηθεί, ωστόσο, ο σπλήνας αποτελεί σημαντικό όργανο του λεμφικού και αιμοποιητικού συστήματος (Fänge and Nilsson, 1985) και περαιτέρω έρευνα κρίνεται απαραίτητη.

Τέλος ένα θέμα που δεν θα πρέπει να αγνοηθεί είναι τα αυξημένα επίπεδα νιτρωδών ιόντων του νερού στις δεξαμενές με υπόστρωμα. Το υλικό από το οποίο είναι φτιαγμένο το υπόστρωμα δεν αντιδρά χημικά με το νερό. Έτσι, η αύξηση των νιτρωδών ιόντων οφείλεται ενδεχομένως στην ανομοιόμορφη επιφάνεια του υποστρώματος που διευκολύνει τη συγκράτηση οργανικού φορτίου. Αν και θα μπορούσαν να εφαρμοστούν καλύτεροι μέθοδοι καθαρισμού των πειραματικών δεξαμενών (π.χ. αφαίρεση του υποστρώματος και πλύσιμο εκτός της δεξαμενής), η διαδικασία αυτή θα προκαλούσε ιδιαίτερη ανησυχία στα ψάρια και απορρίφθηκε. Ωστόσο η απόλυτη τιμή του επιπέδου των νιτρωδών ιόντων ήταν χαμηλή και εντός των ασφαλών ορίων που αναφέρονται για τη διασφάλιση της ευζωίας της τσιπούρας στα εντατικά συστήματα εκτροφής (Polí, 2009).

2. Πείραμα 2

**Επίδραση του εμπλουτισμού του περιβάλλοντος σε
παραμέτρους της ανάπτυξης, της συμπεριφοράς και της
φυσιολογίας της τσιπούρας όταν εκτρέφεται σε διαφορετικές
πυκνότητες**



2.1 Εισαγωγή - Σκοπός

Μία από τις ιδιαιτερότητες της ιχθυοκαλλιέργειας έγκειται στο γεγονός ότι τα ψάρια χρησιμοποιούν ένα τρισδιάστατο μέσο διαβίωσης. Ο όρος πυκνότητα εκτροφής περιλαμβάνει τον αριθμό των ψαριών στη μονάδα του όγκου (No/m^3) που συνδέεται άμεσα με το βάρος τους στη μονάδα του όγκου (kg/m^3) ή το βάρος των ψαριών σε σχέση με το ρυθμό ανανέωσης του νερού ($\text{L}/\text{min}/\text{kg}$) (Ashley, 2007; Conte, 2004; Ellis et al., 2001; Ellis et al., 2002). Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι εκφράσεις της πυκνότητας βάσει της συνολικής βιομάζας (kg) των εκτρεφόμενων ψαριών στη μονάδα του όγκου επηρεάζουν άμεσα την ποιότητα του νερού. Ωστόσο, άρρηκτα συνδεδεμένα είναι η διάσταση του αντίστοιχου αριθμού ατόμων στον ίδιο όγκο, γεγονός που σχετίζεται άμεσα με τις κοινωνικές σχέσεις των ψαριών. Ο πολυδιάστατος χαρακτήρας της πυκνότητας περιπλέκεται ακόμα περισσότερο ως επακόλουθο της συνεχούς αλλαγής της όσο μεγαλώνουν τα ψάρια. Για τους λόγους αυτούς, η πυκνότητα θεωρείται καθοριστικός παράγοντας για τα παραγωγικά χαρακτηριστικά και για την ευζωία των εκτρεφόμενων ψαριών.

Ο καθορισμός της ιδανικής πυκνότητας εκτροφής είναι μια πολύπλοκη διαδικασία αφού θα πρέπει να συνδυαστούν αρκετοί παράγοντες όπως η συμπεριφορά των ψαριών, η ανάγκη του κάθε είδους για χώρο, η ποιότητα του νερού και η υψηλή παραγωγικότητα διασφαλίζοντας πάντα την ευζωία (Ashley, 2007; EFSA, 2008; Ellis et al., 2002). Ειδικότερα για την τσιπούρα, μελέτες έχουν δείξει ότι αυξημένη πυκνότητα ενδέχεται να βελτιώσει (Yilmaz and Arabaci, 2010), να χειροτερέψει (Canario et al., 1998) ή να μην έχει καμία επίδραση (Montero et al., 1999) στην ανάπτυξη των ψαριών. Επιπλέον, υψηλή πυκνότητα εκτροφής έχει παρατηρηθεί ότι μειώνει την επιθετικότητα σε ορισμένα είδη ψαριών συμπεριλαμβανομένης και της τσιπούρας, κυρίως εξαιτίας της πρακτικής δυσκολίας διεκδίκησης χώρου (Baras et al., 2003; Canario et al., 1998; Damsgård and Huntingford, 2012; van de Nieuwegiessen et al., 2008). Αντίθετα, αυξημένη επιθετικότητα σε υψηλή πυκνότητα εκτροφής έχει επίσης παρατηρηθεί και θεωρείται ότι σχετίζεται με την αυξημένη φυσική επαφή μεταξύ των ψαριών λόγω του περιορισμένου χώρου (Coulibaly et al., 2007).

Στο προηγούμενο πείραμα (Κεφάλαιο Δ1) διαπιστώθηκε η ευεργετική επίδραση του Κυανού και Ερυθροκαφέ υποστρώματος για την τσιπούρα. Στο παρόν πείραμα μελετήθηκε η θετική αυτή επίδραση ως μέσο εμπλουτισμού του περιβάλλοντος διαβίωσης της τσιπούρας σε συνδυασμό με τον παράγοντα της πυκνότητας που είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την εντατική εκτροφή του είδους. Το Πράσινο υπόστρωμα απορρίφθηκε ως επέμβαση αφού τα αποτελέσματα της ανάπτυξης δε διέφεραν από αυτά των δεξαμενών Χωρίς υπόστρωμα (υάλινος πυθμένας). Επιπλέον, αν και τα ψάρια του Πράσινου υποστρώματος παρουσίασαν χαμηλότερη επιθετικότητα από αυτά των δεξαμενών Χωρίς υπόστρωμα, είχαν πιο έντονη επιθετική συμπεριφορά από τα ψάρια των δεξαμενών με Κυανό ή Ερυθροκαφέ υπόστρωμα.

Σκοπός του παρόντος πειράματος ήταν να διερευνηθεί σε ποιο βαθμό τα ευεργετικά αποτελέσματα του Κυανού και Ερυθροκαφέ υποστρώματος μπορούν να

είναι εμφανή ακόμα και όταν η τσιπούρα εκτρέφεται σε διαφορετικές πυκνότητες. Επιπλέον, στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν άτομα μικρότερης ηλικίας ώστε να διαπιστωθεί εάν υπάρχει επίδραση των υποστρωμάτων και σε νεαρότερα άτομα τσιπούρας.

2.2 Υλικά και Μέθοδοι

2.2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την πραγματοποίηση του πειράματος, έγινε προμήθεια νεαρών ατόμων τσιπούρας, *Sparus aurata* τα οποία παρέμειναν σε εργαστηριακές συνθήκες για τουλάχιστον έξι μήνες. Στη συνέχεια 306 ψάρια με μέσο βάρος $25,2 \pm 0,16$ g (ηλικίας 0+) διανεμήθηκαν τυχαία σε 12 πανομοιότυπες δεξαμενές (2 επαναλήψεις/επέμβαση) σύμφωνα με έναν πειραματικό σχεδιασμό 3 x 2. Οι επεμβάσεις περιλάμβαναν δεξαμενές με Κυανό ή Ερυθροκαφέ υπόστρωμα και δεξαμενές Χωρίς υπόστρωμα (ΚΥ, ΕΚΥ και ΧΥ αντίστοιχα). Επιπλέον στις ομάδες εφαρμόστηκαν δύο πυκνότητες εκτροφής, χαμηλότερη πυκνότητα, Π1: 17 ψάρια/δεξαμενή ($192,3$ ψάρια/ m^3 ή $4,9$ kg/ m^3) και υψηλότερη πυκνότητα, Π2: 34 ψάρια/δεξαμενή ($384,6$ ψάρια/ m^3 ή $9,7$ kg/ m^3). Οι πυκνότητες αυτές επιλέχθηκαν ως το κατώτατο και ανώτατο όριο της πυκνότητας που συνήθως εφαρμόζεται σε εντατικά συστήματα εκτροφής της τσιπούρας για αυτό το στάδιο ανάπτυξης (EFSA, 2008). Οι αρχικές ομάδες ήταν ομοιογενείς με την αρχική παραλλακτικότητα βάρους να κυμαίνεται από 10,88% ως 11,65% ($P > 0,05$). Τα ψάρια παρέμειναν στις πειραματικές συνθήκες για 98 ημέρες. Η αναλυτική περιγραφή του υποστρώματος και οι λόγοι επιλογής του αναφέρονται στα Υποκεφάλαια Γ1.4 και Δ1.2.1.

Η χορήγηση της τροφής στα ψάρια γινόταν με το χέρι. Χρησιμοποιήθηκε εμπορικό σιτηρέσιο (βυθιζόμενα σύμπηκτα) κατάλληλο για νεαρά άτομα τσιπούρας (υγρασία 5,33%; πρωτεΐνη 46,73%; λίπη 23,11%; τέφρα 5,91%; ελεύθερες αζώτου εκχυλισματικές ουσίες 18,92%). Η ποσότητα της τροφής που χορηγήθηκε ήταν 3% του ζώντος βάρους τους που προοδευτικά μειώθηκε στο 1,5% ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης των ψαριών και τη θερμοκρασία του νερού (Lupatsch and Kissil, 1998) σε 3 γεύματα όπως περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.1. Τα ψάρια ζυγίζονταν ατομικά κάθε 15 ημέρες και η ποσότητα της τροφής προσαρμοζόταν κατάλληλα. Κατά τη διάρκεια του πειράματος δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα.

Οι δεξαμενές ήταν υάλινες, τετραγωνικές [διαστάσεις 41x49x44 cm (ύψος × πλάτος × μήκος), όγκος 88,4 L] και αποτελούσαν μέρος ενός ημίκλειστου συστήματος θαλασσινού νερού συνολικού όγκου $11 m^3$ (ημερήσια ανανέωση νερού κυκλώματος 3%). Το κύκλωμα διέθετε μηχανικά (σπόγγοι) και βιολογικά (χαλίκια) φίλτρα, καθώς επίσης και λάμπες εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας UV για την αποφυγή ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών. Κάθε δεξαμενή διέθετε σύστημα παροχής νερού, σύστημα παροχής ατμοσφαιρικού αέρα καθώς και σύστημα αποχέτευσης και διατήρησης σταθερής στάθμης νερού. Τα πλάγια αλλά και το πίσω μέρος της κάθε δεξαμενής ήταν καλυμμένο με γαλάζιο φελιζόλ. Η παροχή του νερού ήταν 1,8 L/min/kg

και προσαρμοζόταν ανάλογα με τη βιομάζα των ψαριών ώστε η ποιότητα του νερού να μην επηρεαστεί από το επίπεδο της πυκνότητας εκτροφής. Όλες οι δεξαμενές καθαρίζονταν επιμελώς μία φορά την εβδομάδα όπως έχει περιγραφεί στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.1. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού ελέγχονταν καθημερινά (πριν το 1^ο γεύμα) όπως περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.1.

Η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε σε 12 ώρες φως προς 12 ώρες σκοτάδι και η ένταση του φωτισμού προσαρμόστηκε στα 220 lx στην επιφάνεια κάθε δεξαμενής. Ως πηγή φωτισμού χρησιμοποιήθηκαν λάμπες λευκού φωτός (cool white fluorescence lamps) σε απόσταση ύψους ενός μέτρου από την επάνω πλευρά και 5 cm από την μπροστινή πλευρά της κάθε δεξαμενής. Η προσθήκη υποστρώματος τροποποίησε το φωτεινό περιβάλλον κυρίως λόγω αλλαγών στην αντανάκλαση του φωτός στον πυθμένα της δεξαμενής κάνοντας το περιβάλλον των δεξαμενών με υπόστρωμα να φαίνεται πιο σκούρο για έναν εξωτερικό παρατηρητή.

2.2.2 Παρατηρήσεις επιθετικής συμπεριφοράς

Η επιθετική συμπεριφορά των ψαριών καταγράφηκε τις εβδομάδες 11, 12 και 13 από την μπροστινή πλευρά της κάθε δεξαμενής. Η λήψη video περιορίστηκε στο τελευταίο χρονικό διάστημα της πειραματικής περιόδου αφού σύμφωνα με το προηγούμενο πείραμα (Υποκεφάλαιο Δ1.2.2) τα αποτελέσματα της επιθετικότητας δε διαφοροποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου. Η λήψη του video ήταν διάρκειας 10 λεπτών και πραγματοποιήθηκε μεταξύ των γευμάτων, δηλαδή 8:45 – 10:15 και 11:45 – 13:15 με διάστημα 5 λεπτών μεταξύ των video, 4 φορές την εβδομάδα, από Τρίτη έως Παρασκευή. Τη Δευτέρα δε γινόταν λήψη video για να αποφευχθεί η καταγραφή οποιασδήποτε αλλαγής στην συμπεριφορά των ψαριών λόγω της ασυτίας που υπόκεινται την Κυριακή. Συνυπολογίζοντας την πιθανή επίδραση του χρόνου παρατήρησης στην επιθετική συμπεριφορά των ψαριών σχεδιάστηκε ένα εβδομαδιαίο πρόγραμμα λήψεων ώστε να γίνει καταγραφή της κάθε δεξαμενής κάθε πιθανή ώρα λήψης video. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να πραγματοποιηθούν τελικά ένα video/δεξαμενή ή δύο video/επέμβαση για όλες τις ώρες παρατήρησης. Συνολικά εξασφαλίστηκαν 12 video/δεξαμενή (ή 24 video/επέμβαση). Από κάθε video αναλύθηκαν εννέα λεπτά. Παρά το ότι τα ψάρια ήταν εξοικειωμένα με την παρουσία του πειραματιστή, το πρώτο λεπτό από κάθε video αφαιρούταν για να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα συνυπολογισμού της αναστάτωσης των ψαριών κατά την τοποθέτηση της κάμερας. Η επιθετική συμπεριφορά εκτιμήθηκε όπως περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.2. Τα δεδομένα αφορούν στο σύνολο της ομάδας αφού τα ψάρια δεν ήταν σημασμένα και ήταν αδύνατο να αναγνωρισθεί το ψάρι που πραγματοποιούσε ή δεχόταν μια επίθεση.

2.2.3 Δειγματοληψία και μέθοδοι ανάλυσης

Οι αναλύσεις των νιτροδών ιόντων και της ολικής αμμωνίας περιγράφονται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.3.

Μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας 10 ψάρια από κάθε Π ομάδα και 20 ψάρια από κάθε 2Π ομάδα (δηλαδή 58,8% κάθε ομάδας) θανατώθηκαν με ευθανασία. Χρησιμοποιήθηκε μεγάλη δόση αναισθητικού (2-φαινοξυ-αιθανόλη, 1,5 ml/L) και πραγματοποιήθηκαν ατομικό ζύγισμα (ακρίβεια 0,01 g), σωματομετρήσεις (με χρήση παχύμετρου, ακρίβειας 0,1 mm) αιμοληψία και λήψη εγκέφαλου, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο Δ1. Άμεσα προσδιορίστηκε ο αιματοκρίτης του αίματος με χρήση μικροφυγοκέντρου (12000 g για 10 λεπτά) και στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για να διαχωριστεί το πλάσμα από τα έμμορφα συστατικά του αίματος. Το πλάσμα καταψύχθηκε στους -30 °C μέχρι να γίνει ανάλυση γλυκόζης, χοληστερόλης και τριακυλγλυκεριδίων (ενζυματική φωτομετρική μέθοδος εμπορίου, Elitech Diagnostics, Sees, France), των ολικών πρωτεϊνών (μέθοδος Biuret) και της αλβουμίνης (μέθοδος Bromocresol Green Dye Binding).

Στα ψάρια αυτά πραγματοποιήθηκε επίσης λήψη του εγκέφαλου, από τα δείγματα των οποίων τα μισά αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό των νευροδιαβιβαστών και τα άλλα μισά για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο Δ1. Το βάρος του εγκέφαλου εκφράστηκε ως ποσοστό του ζώντος βάρους (Εγκεφαλοσωματικός Δείκτης). Ο σπλήνας και το ήπαρ απομονώθηκαν και εκφράστηκαν ως ποσοστό του ζώντος βάρους (Σπληνοσωματικός και Ηπατοσωματικός Δείκτης αντίστοιχα). Η απομόνωση και οι αναλύσεις του ήπατος και του ραχιαίου μυϊκού ιστού καθώς επίσης και η ανάλυση της χημικής σύστασης του σώματος περιγράφονται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.3. Τα υπόλοιπα ψάρια κάθε ομάδας, αναισθητοποιήθηκαν (2-φαινοξυ-αιθανόλη, 0,4 ml/L) και στη συνέχεια ζυγίστηκαν ατομικά και πραγματοποιήθηκαν σωματομετρήσεις χωρίς να θανατωθούν.

2.2.4 Υπολογισμοί και ανάλυση δεδομένων

Οι υπολογισμοί που πραγματοποιήθηκαν αναφέρονται στο Κεφάλαιο Δ1.

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με πολυπαραγοντική εγκιβωτισμένη ανάλυση διασποράς (two way nested analysis of variance-ANOVA) με τη χρήση γενικού γραμμικού μοντέλου (General Linear Model). Η δεξαμενή χρησιμοποιήθηκε ως τυχαίος εγκιβωτισμένος παράγοντας (random nested factor) στις επεμβάσεις του υποστρώματος (υπόστρωμα -Y) και της πυκνότητας (πυκνότητα -Π) για να συνυπολογιστεί η επίδρασή της στην ανάλυση. Στην περίπτωση των δεδομένων του εγκέφαλου το σωματικό βάρος χρησιμοποιήθηκε ως συμεταβλητή (covariate). Στα δεδομένα της επιθετικότητας, ο χρόνος παρατήρησης χρησιμοποιήθηκε επίσης ως τυχαίος εγκιβωτισμένος παράγοντας στις επεμβάσεις. Στην περίπτωση που το επίπεδο σημαντικότητας των επεμβάσεων (P_Y ή P_{Π}) ή η αλληλεπίδρασή τους ($P_{Y \times \Pi}$) ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Duncan για τη σύγκριση των μέσων όρων. Όλες οι παράμετροι ελέγχθηκαν για την ισχύ της κανονικότητας και της ομοιογένειας της διασποράς, ενώ έγιναν και οι απαραίτητες μετατροπές (π.χ. λογάριθμος, τετραγωνική ρίζα, κτλ). Οι συσχετίσεις μεταξύ του σωματικού βάρους και των νευροδιαβιβαστών του εγκέφαλου έγιναν με τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης

Pearson. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο κείμενο και στους πίνακες αφορούν σε μέσους όρους \pm το τυπικό σφάλμα χωρίς μετατροπές.

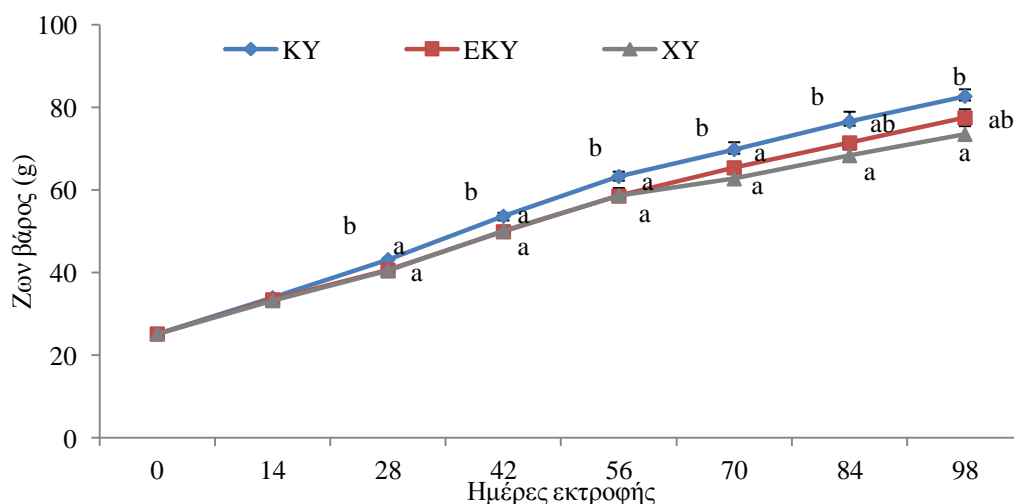
2.3 Αποτελέσματα

2.3.1 Ποιότητα νερού

Τα αποτελέσματα της ποιότητας του νερού δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των επεμβάσεων εκτός από την περίπτωση της περιεκτικότητας του νερού σε νιτρώδη ιόντα. Οι τιμές διατηρήθηκαν ως εξής: θερμοκρασία $20,5 \pm 0,01$ °C, δεσμευμένο οξυγόνο $6,6 \pm 0,03$ mg/L (κορεσμός $90,3 \pm 0,41\%$), pH $7,67 \pm 0,012$, αλατότητα $35,9 \pm 0,04$ g/L, ολική αμμωνία $0,19 \pm 0,026$ mg/L, τοξική αμμωνία $0,004 \pm 0,0001$ mg/L. Ωστόσο, η περιεκτικότητα του νερού σε νιτρώδη ιόντα (mg/L) ήταν αυξημένη στις δεξαμενές με υπόστρωμα σε σχέση με τις δεξαμενές Χωρίς υπόστρωμα ($P < 0,001$, KY: $0,089 \pm 0,0033$, EKY: $0,088 \pm 0,0029$, XY: $0,065 \pm 0,0022$).

2.3.2 Παραγωγικά χαρακτηριστικά – Παράμετροι της φυσιολογίας

Τα ψάρια στις δεξαμενές με KY είχαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο τελικό βάρος, ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (ημέρες 0-98) και επί % αύξηση του ζώντος βάρους (ημέρες 0-98) σε σχέση με τα ψάρια στις δεξαμενές XY (Διάγραμμα 9, Πίνακας 7, 8).

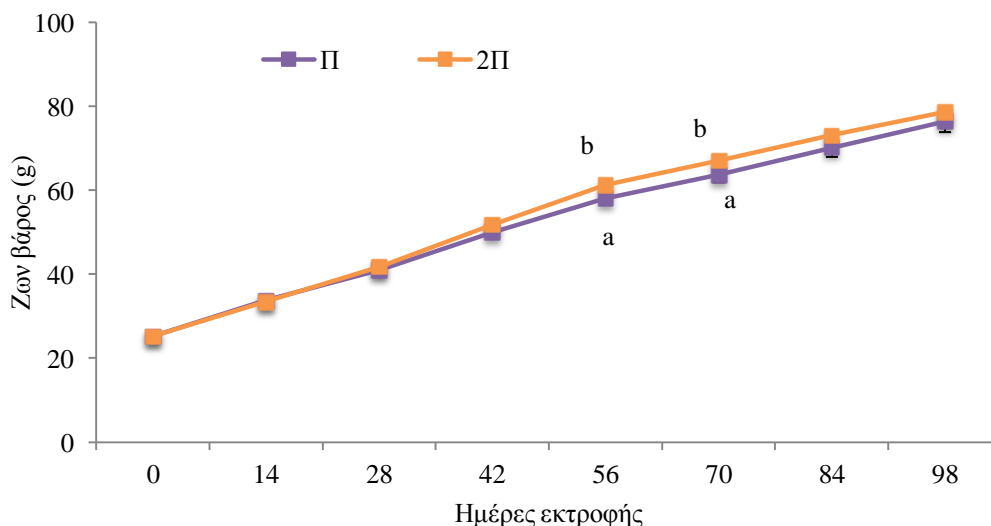


Διάγραμμα 9: Ζων βάρος ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (KY) ή Ερυθροκαφέ (EKY) υπόστρωμα, ή Χωρίς υπόστρωμα (XY) για 98 ημέρες (n=2). Διαφορετικά γράμματα για τις ίδιες ημέρες εκτροφής υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. [(ημέρες 28 και 42: $P < 0,01$, ημέρα 56: $P < 0,05$, ημέρες 70, 84 και 98: $P < 0,01$)].

Η επίδραση του KY στο βάρος των ψαριών ήταν εμφανής ήδη από την 28^η ημέρα εκτροφής και μέχρι το τέλος της πειραματικής περιόδου. Τα ψάρια στις δεξαμενές με

EKY δε διέφεραν ποτέ από τα ψάρια των δεξαμενών XY καθ' όλη την πειραματική περίοδο, ενώ ύστερα από 84 ημέρες εκτροφής δε διέφεραν ούτε από τα ψάρια του KY (Διάγραμμα 9).

Ακόμη, τα ψάρια των 2Π ομάδων είχαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο βάρος σε σχέση με τις Π ομάδες ύστερα από 56 και 70 ημέρες εκτροφής (Διάγραμμα 10). Σημειώνεται ότι η τελική πυκνότητα για τις Π ομάδες ήταν $14,7 \text{ kg/m}^3$ και για τις 2Π ομάδες $29,9 \text{ kg/m}^3$.



Διάγραμμα 10: Ζων βάρος ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κιανό (KY) ή Ερυθροκαφέ (EKY) υπόστρωμα, ή Χωρίς υπόστρωμα (XY) σε δύο διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής (Π: χαμηλότερη πυκνότητα, 2Π: υψηλότερη πυκνότητα) για 98 ημέρες ($n=2$). Διαφορετικά γράμματα για τις ίδιες ημέρες εκτροφής υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα (ημέρες 56: $P<0,05$, ημέρες 70: $P<0,05$).

Τα ψάρια του KY είχαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σταθερό μήκος (KY: $14,3\pm 0,14 \text{ cm}$, EKY: $13,8\pm 0,08 \text{ cm}$, XY: $13,7\pm 0,13 \text{ cm}$, $P<0,05$), ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (ημέρες 15-28), επί % αύξηση του ζώντος βάρους (ημέρες 15-28) και μικρότερες τιμές στο συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής (ημέρες 15-28) σε σχέση με τα ψάρια του EKY και των δεξαμενών XY (Πίνακας 7, 8, 9).

Επιπλέον, τα ψάρια των 2Π ομάδων είχαν στατιστικά σημαντικά καλύτερο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (ημέρες 15-28, Πίνακας 7), επί % αύξηση του ζώντος βάρους (ημέρες 15-28, Πίνακας 8) και συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής (ημέρες 15-28, Πίνακας 9) σε σχέση με τις Π ομάδες. Ο συντελεστής ευρωστίας δεν επηρεάστηκε ούτε από την παρουσία υποστρώματος αλλά ούτε και από την πυκνότητα εκτροφής που εφαρμόστηκε και οι μέσες τιμές κυμάνθηκαν από 2,76 έως 2,87 %.

Πίνακας 7: Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (ΚΥ) ή Ερυθροκαφέ (ΕΚΥ) υπόστρωμα, ή Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ) σε δύο διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής (Π: χαμηλότερη πυκνότητα, 2Π: υψηλότερη πυκνότητα) για 98 ημέρες (n=2).

Ημέρες εκτροφής		0-14	15-28	29-42	43-56	57-70	71-84	85-98	0-98
Υπόστρωμα	Πυκνότητα	Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης							
ΚΥ	Π	2,09±0,035	1,70±0,120	1,44±0,051	1,08±0,057	0,69±0,019	0,69±0,070	0,52±0,038	1,17±0,034
ΕΚΥ	Π	2,12±0,062	1,31±0,114	1,450,147	1,13±0,051	0,66±0,119	0,72±0,051	0,69±0,024	1,16±0,011
ΧΥ	Π	2,04±0,027	1,11±0,077	1,38±0,039	1,00±0,018	0,63±0,103	0,65±0,015	0,61±0,052	1,06±0,008
ΚΥ	2Π	2,13±0,007	1,75±0,007	1,60±0,041	1,23±0,048	0,70±0,222	0,64±0,118	0,55±0,072	1,23±0,070
ΕΚΥ	2Π	1,98±0,076	1,39±0,136	1,51±0,068	1,15±0,141	0,85±0,139	0,58±0,010	0,52±0,027	1,14±0,017
ΧΥ	2Π	1,95±0,017	1,64±0,061	1,49±0,061	1,19±0,034	0,41±0,018	0,60±0,004	0,47±0,067	1,11±0,036
Κύρια επίδραση									
ΚΥ		2,11±0,019	1,73±0,050 b	1,52±0,053	1,15±0,053	0,69±0,091	0,67±0,058	0,54±0,034	1,20±0,035 b
ΕΚΥ		2,05±0,058	1,35±0,076 a	1,48±0,069	1,14±0,061	0,76±0,092	0,65±0,046	0,61±0,051	1,15±0,009 ab
ΧΥ		1,99±0,030	1,38±0,157 a	1,43±0,042	1,09±0,059	0,52±0,075	0,62±0,016	0,54±0,053	1,08±0,020 a
	Π	2,08±0,025	1,38±0,119 a	1,42±0,043	1,07±0,032	0,66±0,042	0,69±0,027	0,61±0,036	1,13±0,024
	2Π	2,02±0,042	1,59±0,077 b	1,53±0,033	1,19±0,042	0,65±0,107	0,61±0,033	0,52±0,030	1,16±0,031
<i>P</i>									
Υπόστρωμα (Υ)		ΜΣ	*	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	*
Πυκνότητα (Π)		ΜΣ	*	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
Αλληλεπίδραση (Υ×Π)		ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

P: Επίπεδο Σημαντικότητας, ΜΣ: Μη Σημαντικό, *P<0,05. Μέσοι όροι για τον ίδιο παράγοντα με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

Πίνακας 8: Επί % αύξηση του ζώντος βάρους ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (ΚΥ) ή Ερυθροκαφέ (ΕΚΥ) υπόστρωμα, ή Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ) σε δύο διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής (Π: χαμηλότερη πυκνότητα, 2Π: υψηλότερη πυκνότητα) για 98 ημέρες (n=2).

Ημέρες εκτροφής		0-14	15-28	29-42	43-56	57-70	71-84	85-98	0-98
Υπόστρωμα	Πυκνότητα	Επί % αύξηση του ζώντος βάρους							
ΚΥ	Π	34,0±0,67	27,0±2,13	22,3±0,87	16,3±0,92	10,1±0,30	10,2±1,08	7,6±0,57	215,7±10,50
ΕΚΥ	Π	34,6±1,17	20,2±1,91	22,5±2,51	17,1±0,83	9,7±1,83	10,7±0,78	10,2±0,37	210,4±3,40
ΧΥ	Π	33,0±0,50	16,9±1,26	21,3±0,67	15,0±0,28	9,2±1,58	9,5±0,23	8,9±0,78	182,4±2,26
ΚΥ	2Π	34,8±0,13	27,7±0,12	25,0±0,72	18,7±0,80	10,4±3,43	9,4±1,80	8,0±1,08	233,8±22,70
ΕΚΥ	2Π	31,9±1,39	21,5±2,31	23,6±1,17	17,5±2,32	12,7±2,19	8,5±0,14	7,6±0,41	206,0±5,08
ΧΥ	2Π	31,3±0,31	25,8±1,06	23,1±1,05	18,2±0,57	5,9±0,26	8,7±0,06	6,8±1,01	195,7±10,44
Κύρια επίδραση									
ΚΥ		34,4±0,36	27,3±0,89 b	23,6±0,92	17,5±0,86	10,2±1,41	9,8±0,88	7,8±0,52	224,8±11,47 b
ΕΚΥ		33,3±1,08	20,9±1,28 a	23,0±1,18	17,3±1,01	11,2±1,44	9,6±0,71	8,9±0,78	208,2±2,80 ab
ΧΥ		32,2±0,55	21,3±2,66 a	22,2±0,72	16,6±0,96	7,5±1,15	9,1±0,25	7,9±0,80	189,0±5,81 a
	Π	33,9±0,47	21,4±2,04 a	22,0±0,74	16,1±0,51	9,70±0,65	10,1±0,41	8,9±0,54	202,8±7,16
	2Π	32,7±0,78	25,0±1,33 b	23,9±0,57	18,1±0,69	9,7±1,64	8,9±0,50	7,5±0,46	211,8±9,76
<i>P</i>									
Υπόστρωμα (Y)		ΜΣ	*	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	*
Πυκνότητα (Π)		ΜΣ	*	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
Αλληλεπίδραση (Y×Π)		ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

P: Επίπεδο Σημαντικότητας, ΜΣ: Μη Σημαντικό, **P*<0,05. Μέσοι όροι για τον ίδιο παράγοντα με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

Πίνακας 9: Συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (ΚΥ) ή Ερυθροκαφέ (ΕΚΥ) υπόστρωμα, ή Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ) σε δύο διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής (Π: χαμηλότερη πυκνότητα, 2Π: υψηλότερη πυκνότητα) για 98 ημέρες (n=2).

Ημέρες εκτροφής		0-14	15-28	29-42	43-56	57-70	71-84	85-98	0-98
Υπόστρωμα	Πυκνότητα	Συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής							
ΚΥ	Π	1,10±0,022	1,08±0,092	1,24±0,048	1,40±0,068	1,59±0,029	1,52±0,161	1,89±0,141	1,35±0,046
ΕΚΥ	Π	1,08±0,037	1,37±0,139	1,24±0,138	1,35±0,041	1,65±0,259	1,45±0,105	1,40±0,051	1,33±0,003
ΧΥ	Π	1,14±0,017	1,61±0,067	1,27±0,025	1,49±0,038	1,72±0,238	1,61±0,040	1,61±0,014	1,45±0,022
ΚΥ	2Π	1,08±0,005	1,04±0,005	1,10±0,032	1,26±0,054	1,74±0,516	1,69±0,323	1,80±0,243	1,31±0,099
ΕΚΥ	2Π	1,18±0,050	1,30±0,095	1,17±0,058	1,35±0,160	1,32±0,283	1,81±0,030	1,88±0,101	1,37±0,050
ΧΥ	2Π	1,20±0,012	1,12±0,046	1,19±0,056	1,30±0,040	2,57±0,097	1,76±0,013	2,14±0,317	1,45±0,054
Κύρια επίδραση									
ΚΥ		1,09±0,012	1,06±0,040 a	1,17±0,046	1,33±0,054	1,67±0,215	1,61±0,155	1,85±0,117	1,33±0,047
ΕΚΥ		1,13±0,037	1,33±0,071 b	1,20±0,064	1,35±0,067	1,49±0,183	1,63±0,114	1,64±0,146	1,35±0,024
ΧΥ		1,17±0,020	1,36±0,146 b	1,23±0,034	1,39±0,060	2,14±0,267	1,69±0,046	1,88±0,208	1,45±0,024
	Π	1,11±0,015	1,35±0,107 b	1,25±0,039	1,41±0,034	1,65±0,094	1,53±0,059	1,63±0,104	1,38±0,026
	2Π	1,15±0,027	1,15±0,057 a	1,15±0,028	1,30±0,047	1,88±0,278	1,75±0,086	1,94±0,124	1,38±0,042
<i>P</i>									
Υπόστρωμα (Υ)		ΜΣ	*	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
Πυκνότητα (Π)		ΜΣ	*	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
Αλληλεπίδραση (Υ×Π)		ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

P: Επίπεδο Σημαντικότητας, ΜΣ: Μη Σημαντικό, **P*<0,05. Μέσοι όροι για τον ίδιο παράγοντα με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

Η παραλλακτικότητα του τελικού βάρους δε διέφερε μεταξύ των ομάδων που βρίσκονταν σε διαφορετικό υπόστρωμα. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου παρατηρήθηκαν ορισμένες διαφοροποιήσεις. Συγκεκριμένα, οι ομάδες του KY ήταν πιο ομοιογενείς από αυτές των δεξαμενών XY (ημέρες 15-28) ή από τις ομάδες του EKY και από αυτές των δεξαμενών XY (ημέρες 29-42, 43-56, 57-70, Πίνακας 10). Επιπλέον, τα ψάρια των 2Π ομάδων ήταν πιο ομοιογενή σχέση με τα ψάρια των Π ομάδων (ημέρες 43-56, 57-70, 71-84, 85-94, 0-98, Πίνακας 10).

Καμία από τις αιματολογικές παραμέτρους που αναλύθηκαν δεν επηρεάστηκε από την παρουσία του υποστρώματος (Πίνακας 11). Ωστόσο, τα ψάρια των 2Π ομάδων είχαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερες τιμές γλυκόζης και χαμηλότερες τιμές τριακυλγλυκεριδίων σε σχέση με τα ψάρια των Π ομάδων (Πίνακας 11). Επίσης ο σπληνοσωματικός δείκτης (ΣΣΔ) ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος για τα ψάρια του EKY και των Π ομάδων, ενώ ο ηπατοσωματικός δείκτης (ΗΣΔ) ήταν σημαντικά μεγαλύτερος για τις 2Π ομάδες (Πίνακας 11).

Η χημική σύσταση του σώματος δεν επηρεάστηκε από τις επεμβάσεις και οι τιμές της κυμάνθηκαν ως εξής: υγρασία 68,6-69,0%, ολική πρωτεΐνη 16,95-18,12%, ολικά λίπη 9,55-9,69%, τέφρα 3,21-3,94%. Η υγρασία του ήπατος ήταν όμοια μεταξύ των επεμβάσεων ενώ τα ολικά λίπη του ήπατος είχαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερες τιμές στις Π ομάδες (Πίνακας 12).

Σχετικά με τη σύσταση του ραχιαίου μυϊκού ιστού, η υγρασία, τα ολικά λίπη και η ποσοστιαία αναλογία των EPA, DPA και DHA (% των ολικών λιπαρών οξέων) δεν επηρεάστηκαν από τις επεμβάσεις. Ωστόσο, τα ολικά λιπαρά οξέα, και η ποσότητα των EPA, DPA και DHA είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές στα ψάρια του KY και EKY (Πίνακας 12). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του αθροίσματος των EPA και DHA για μερίδα 100 g ($P < 0,01$, KY: $346,9 \pm 22,85$ mg, EKY: $331,1 \pm 22,65$ mg, XY: $227,5 \pm 19,06$ mg), ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές για το λόγο ω -3: ω -6 ($P > 0,05$, KY: $1,66 \pm 0,060$, EKY: $1,66 \pm 0,066$, XY: $1,64 \pm 0,094$). Η πυκνότητα δεν επηρέασε καμία από τις παραπάνω παραμέτρους (Πίνακας 12).

Σε κανένα από τα χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν παραπάνω δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των επεμβάσεων.

Πίνακας 10: Συντελεστής παραλλακτικότητας του βάρους ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (ΚΥ) ή Ερυθροκαφέ (ΕΚΥ) υπόστρωμα, ή Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ) σε δύο διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής (Π: χαμηλότερη πυκνότητα, 2Π: υψηλότερη πυκνότητα) για 98 ημέρες (n=2).

Ημέρες εκτροφής		0	14	28	42	56	70	84	98
Υπόστρωμα	Πυκνότητα	Συντελεστής παραλλακτικότητας του βάρους							
ΚΥ	Π	11,54±0,061	10,57±0,588	11,41±0,534	15,61±0,142	20,44±0,706	23,00±1,389	26,29±2,060	28,33±2,076
ΕΚΥ	Π	11,43±0,075	11,41±0,516	13,97±0,555	18,78±4,380	23,92±6,339	27,03±6,585	29,17±7,941	31,21±8,138
ΧΥ	Π	11,44±0,061	13,37±0,083	18,74±0,120	25,52±1,253	30,71±1,357	33,61±1,958	37,28±3,745	38,23±4,301
ΚΥ	2Π	11,17±0,172	10,52±0,038	10,59±0,484	10,60±0,719	11,97±1,113	12,68±0,954	13,63±1,099	14,65±1,807
ΕΚΥ	2Π	11,30±0,353	11,80±0,837	16,32±4,669	19,36±4,802	21,86±3,989	22,16±2,640	23,84±3,264	24,84±3,723
ΧΥ	2Π	11,02±0,147	11,78±0,444	13,86±0,579	14,95±1,068	15,79±1,265	17,38±0,484	19,16±0,716	20,69±1,096
Κύρια επίδραση									
ΚΥ		11,35±0,131	10,55±0,241 a	11,00±0,379 a	13,10±1,477 a	16,21±2,504 a	17,84±3,058 a	19,96±3,778	21,49±4,106
ΕΚΥ		11,36±0,152	11,60±0,417 ab	15,15±2,040 b	19,07±2,659 b	22,89±3,115 b	24,59±3,219 b	26,51±3,828	28,03±4,089
ΧΥ		11,23±0,137	12,58±0,493 b	16,30±1,430 b	20,23±3,124 b	23,25±4,373 b	25,49±4,758 b	28,22±5,458	29,46±5,378
	Π	11,47±0,037	11,78±0,562	14,71±1,373	19,97±2,190 b	25,03±2,544 b	27,88±2,665 b	30,91±3,123 b	32,59±3,065 b
	2Π	11,16±0,120	11,37±0,363	13,59±1,611	14,97±2,051 a	16,54±2,137 a	17,40±1,881 a	18,88±2,076 a	20,06±2,174 a
<i>P</i>									
Υπόστρωμα (Υ)		ΜΣ	*	*	*	*	*	ΜΣ	ΜΣ
Πυκνότητα (Π)		ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	*	**	**	**	**
Αλληλεπίδραση (Υ×Π)		ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

P: Επίπεδο Σημαντικότητας, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, ΜΣ: Μη Σημαντικό, Μέσοι όροι για τον ίδιο παράγοντα με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

Πίνακας 11: Ηπατοσωματικός (ΗΣΔ) και Σπληνοσωματικός (ΣΣΔ) δείκτης και αιματολογικές παράμετροι ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (ΚΥ) ή Ερυθροκαφέ (ΕΚΥ) υπόστρωμα, ή Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ) σε δύο διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής (Π: χαμηλότερη πυκνότητα, 2Π: υψηλότερη πυκνότητα) για 98 ημέρες (n=2).

Υπόστρωμα	Πυκνότητα	ΗΣΔ	ΣΣΔ	Αιματοκρίτης	Γλυκόζη (mg/dL)	Τριακυλγλυκερίδια (mg/dL)	Χοληστερόλη (mg/dL)	Ολικές πρωτεΐνες (mg/mL)	Αλβουμίνη (mg/mL)
ΚΥ	Π	1,02±0,040	0,12±0,007	33±1,8	66,6±3,57	212,7±11,82	211,9±8,10	28,7±2,75	10,3±0,36
ΕΚΥ	Π	1,04±0,041	0,14±0,007	36±1,6	60,4±3,93	231,1±11,80	190,4±7,66	31,2±0,51	10,6±0,31
ΧΥ	Π	1,03±0,034	0,11±0,005	34±0,1	56,9±2,43	233,2±14,97	199,9±9,54	28,4±1,75	10,9±0,56
ΚΥ	2Π	1,05±0,031	0,12±0,004	35±3,0	76,7±4,50	200,4±9,76	203,0±7,05	29,7±0,90	11,0±0,31
ΕΚΥ	2Π	1,17±0,036	0,12±0,005	38±1,0	70,7±4,45	201,2±8,41	195,3±6,71	31,8±0,09	11,2±0,21
ΧΥ	2Π	1,08±0,028	0,11±0,004	36±1,7	83,6±4,45	219,5±9,46	203,3±6,70	30,1±0,36	10,5±0,38
Κύρια επίδραση									
ΚΥ		1,04±0,024	0,12±0,004 a	34±1,5	73,3±3,25	204,3±7,63	205,9±5,43	29,2±1,21	10,7±0,24
ΕΚΥ		1,13±0,029	0,13±0,004 b	37±1,0	67,2±3,27	211,0±7,04	193,7±5,15	31,5±0,27	11,0±0,18
ΧΥ		1,06±0,022	0,11±0,003 a	35±1,0	75,2±3,54	223,9±7,99	202,2±5,44	29,2±0,88	10,7±0,31
	Π	1,03±0,022 a	0,12±0,004 b	34±0,8	61,5±2,01 a	225,9±7,46 b	200,7±4,95	29,4±1,02	10,6±0,24
	2Π	1,10±0,019 b	0,11±0,003 a	36±1,1	77,1±2,60 b	207,1±5,35 a	200,5±3,92	30,5±0,48	10,9±0,18
<i>P</i>									
Υπόστρωμα (Υ)		ΜΣ	**	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
Πυκνότητα (Π)		*	*	ΜΣ	***	*	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
Αλληλεπίδραση (Υ×Π)		ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

P: Επίπεδο Σημαντικότητας, Τ.Σ.: Τυπικό Σφάλμα, ΜΣ: Μη Σημαντικό, * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$. Μέσοι όροι για τον ίδιο παράγοντα με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

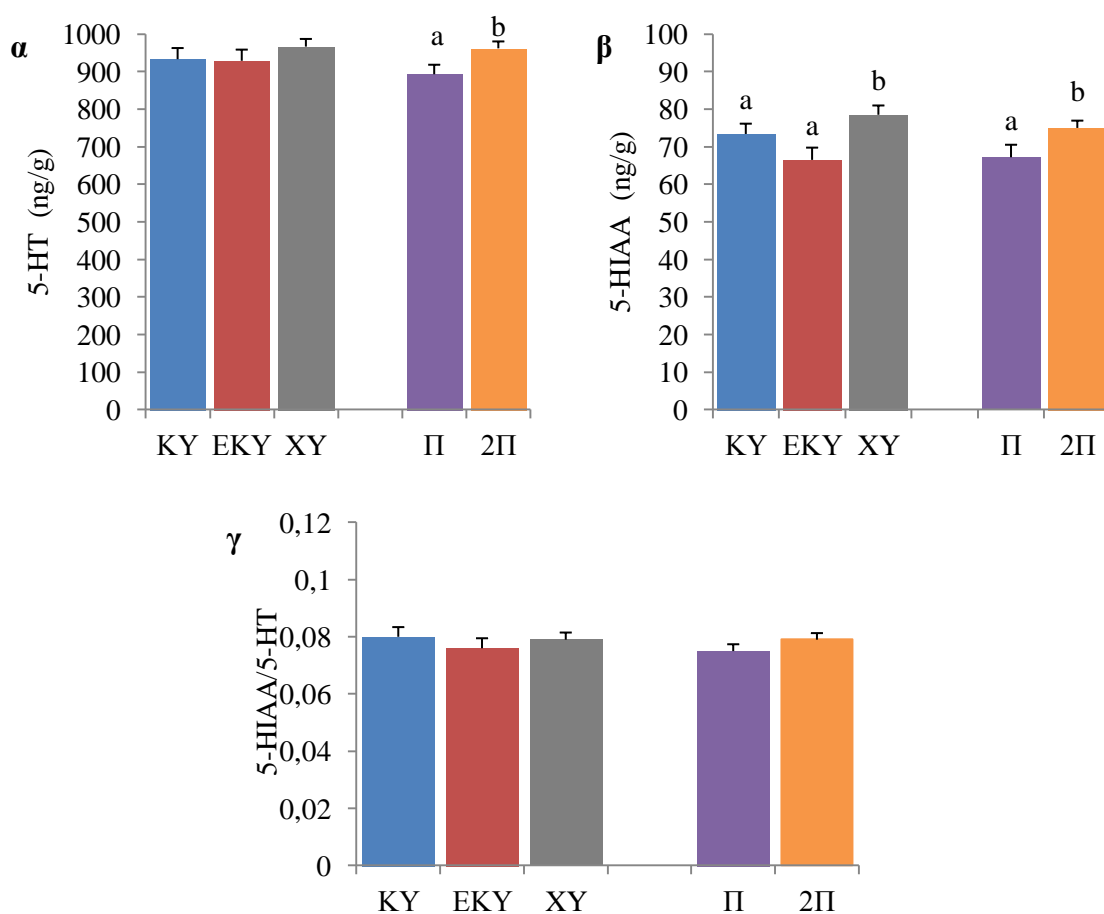
Πίνακας 12: Παράμετροι ήπατος και ραχιαίου μυϊκού ιστού ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (ΚΥ) ή Ερυθροκαφέ (ΕΚΥ) υπόστρωμα, ή Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ) σε δύο διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής (Π: χαμηλότερη πυκνότητα, 2Π: υψηλότερη πυκνότητα) για 98 ημέρες (n=2).

Υπόστρωμα	Πυκνότητα	Ήπαρ		Ραχιαίος μυϊκός ιστός			EPA		DPA		DHA	
		Υγρασία (%)	Ολικά λίπη (%NB)	Υγρασία	Ολικά λίπη (%NB)	Λιπαρά οξέα (mg/g NB)	mg/g NB	% ολικών ΛΟ	mg/g NB	% ολικών ΛΟ	mg/g NB	% ολικών ΛΟ
		ΚΥ	Π	67,7±0,85	14,4±1,47	74,7±0,43	2,8±0,53	16,1±0,64	1,37±0,130	8,48±0,467	0,63±0,074	3,90±0,305
ΕΚΥ	Π	66,6±0,93	16,3±1,17	75,1±0,64	2,9±0,37	18,3±2,22	1,52±0,125	8,380,334	0,72±0,067	3,96±0,113	2,00±0,139	11,0±0,58
ΧΥ	Π	66,5±0,86	17,3±1,09	75,6±0,77	2,2±0,36	12,3±1,49	1,06±0,124	8,65±0,045	0,51±0,045	4,20±0,142	1,51±0,064	12,4±0,98
ΚΥ	2Π	66,7±0,68	15,2±1,04	76,1±0,82	2,6±0,11	18,3±1,30	1,60±0,017	8,79±0,530	0,75±0,026	4,09±0,147	2,14±0,001	11,8±0,83
ΕΚΥ	2Π	67,6±0,71	13,3±0,97	75,5±0,24	2,5±0,12	14,2±2,10	1,29±0,186	9,11±0,043	0,63±0,091	4,42±0,015	1,81±0,251	12,7±0,12
ΧΥ	2Π	66,9±0,80	13,8±0,83	76,0±0,21	2,2±0,01	10,8±0,79	0,85±0,040	7,93±0,945	0,42±0,009	3,90±0,366	1,13±0,048	10,5±1,21
Κύρια επίδραση												
ΚΥ		67,0±0,53	14,9±0,84	75,4±0,54	2,7±0,23	17,2±0,87 b	1,48±0,086 b	8,64±0,302	0,69±0,047 b	3,99±0,149	1,98±0,144 b	11,5±0,62
ΕΚΥ		67,3±0,57	14,3±0,79	75,3±0,30	2,7±0,20	16,2±1,71 b	1,41±0,113 b	8,75±0,251	0,67±0,053 b	4,19±0,142	1,90±0,130 b	11,9±0,55
ΧΥ		66,8±0,60	15,0±0,71	75,8±0,34	2,2±0,15	11,6±0,81 a	0,96±0,080 a	8,29±0,438	0,47±0,033 a	4,05±0,182	1,32±0,115 a	11,4±0,84
	Π	66,9±0,50	15,9±0,73 b	75,2±0,33	2,7±0,24	15,5±1,31	1,32±0,103	8,50±0,157	0,62±0,047	4,02±0,109	1,78±0,121	11,6±0,51
	2Π	67,1±0,42	14,1±0,55 a	75,9±0,25	2,4±0,09	14,4±1,52	1,25±0,146	8,61±0,358	0,60±0,065	4,14±0,141	1,69±0,200	11,7±0,56
<i>P</i>												
Υπόστρωμα (Υ)		ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	*	**	ΜΣ	*	ΜΣ	*	ΜΣ
Πυκνότητα (Π)		ΜΣ	*	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
Αλληλεπίδραση (Υ×Π)		ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

ΛΟ: Λιπαρά οξέα, EPA: εικοσι-πεντανοϊκό οξύ, DPA: εικοσιδυο-πενταενοϊκό οξύ, DHA: εικοσιδυο-εξανοϊκό οξύ, NB: Ναπό Βάρος, *P*: Επίπεδο Σημαντικότητας, ΜΣ: Μη Σημαντικό, **P*<0,05, ***P*<0,01. Μέσοι όροι για τον ίδιο παράγοντα με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

2.3.3 Νευροδιαβιβαστές και λιπαρά οξέα εγκεφάλου

Η σεροτονίνη (5-HT) και η σεροτονινεργική δραστηριότητα (5-HIAA/5-HT) δεν επηρεάστηκαν από την παρουσία του υποστρώματος (Διάγραμμα 11α, γ). Ωστόσο ο μεταβολίτης της σεροτονίνης (5-HIAA) παρουσίασε μεγαλύτερες τιμές στα ψάρια των δεξαμενών XY σε σχέση με αυτά των δεξαμενών με KY και EKY (Διάγραμμα 11β). Επιπλέον, η σεροτονίνη και ο μεταβολίτης της είχαν υψηλότερες τιμές στα ψάρια των 2Π ομάδων σε σχέση με αυτά των Π ομάδων, ενώ η πυκνότητα δεν επηρέασε τη σεροτονινεργική δραστηριότητα (Διάγραμμα 11β, γ).



Διάγραμμα 11: Νευροδιαβιβαστές εγκεφάλου. Σεροτονίνη (α, 5-HT), 5-υδροξυ-ινδολοξικό οξύ (β, 5-HIAA) και σεροτονινεργική δραστηριότητα (γ, 5-HIAA/5-HT) σε άτομα τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (KY) ή Ερυθροκαφέ (EKY) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (XY) σε δύο διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής (Π: χαμηλότερη πυκνότητα, 2Π: υψηλότερη πυκνότητα) για 84 ημέρες (n=2). Δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των επεμβάσεων. Στήλες με διαφορετικά γράμματα για την ίδια επέμβαση διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (5-HT: $P_{\Pi} < 0,05$, 5-HIAA: $P_{\gamma} < 0,01$ και $P_{\Pi} < 0,05$).

Τα επίπεδα της νοραδρεναλίνης του εγκεφάλου δεν επηρεάστηκαν από καμία επέμβαση (Πίνακας 13). Ωστόσο, όσον αφορά στη ντοπαμίνη, στο μεταβολίτη της (DOPAC) και στη ντοπαμινεργική δραστηριότητα (DOPAC/DA), στις 2Π ομάδες δεν παρουσιάστηκε επίδραση του υποστρώματος, ενώ στις Π ομάδες οι ΧΥ δεξαμενές είχαν τις μεγαλύτερες τιμές (Πίνακας 13). Ο μεταβολίτης της ντοπαμίνης HVA και η ντοπαμινεργική δραστηριότητα, όπως εκτιμάται από τους λόγους HVA/DA και (DOPAC+HVA)/DA επηρεάστηκαν μόνο από την πυκνότητα και παρουσίασαν υψηλότερες τιμές στις 2Π ομάδες (Πίνακας 13).

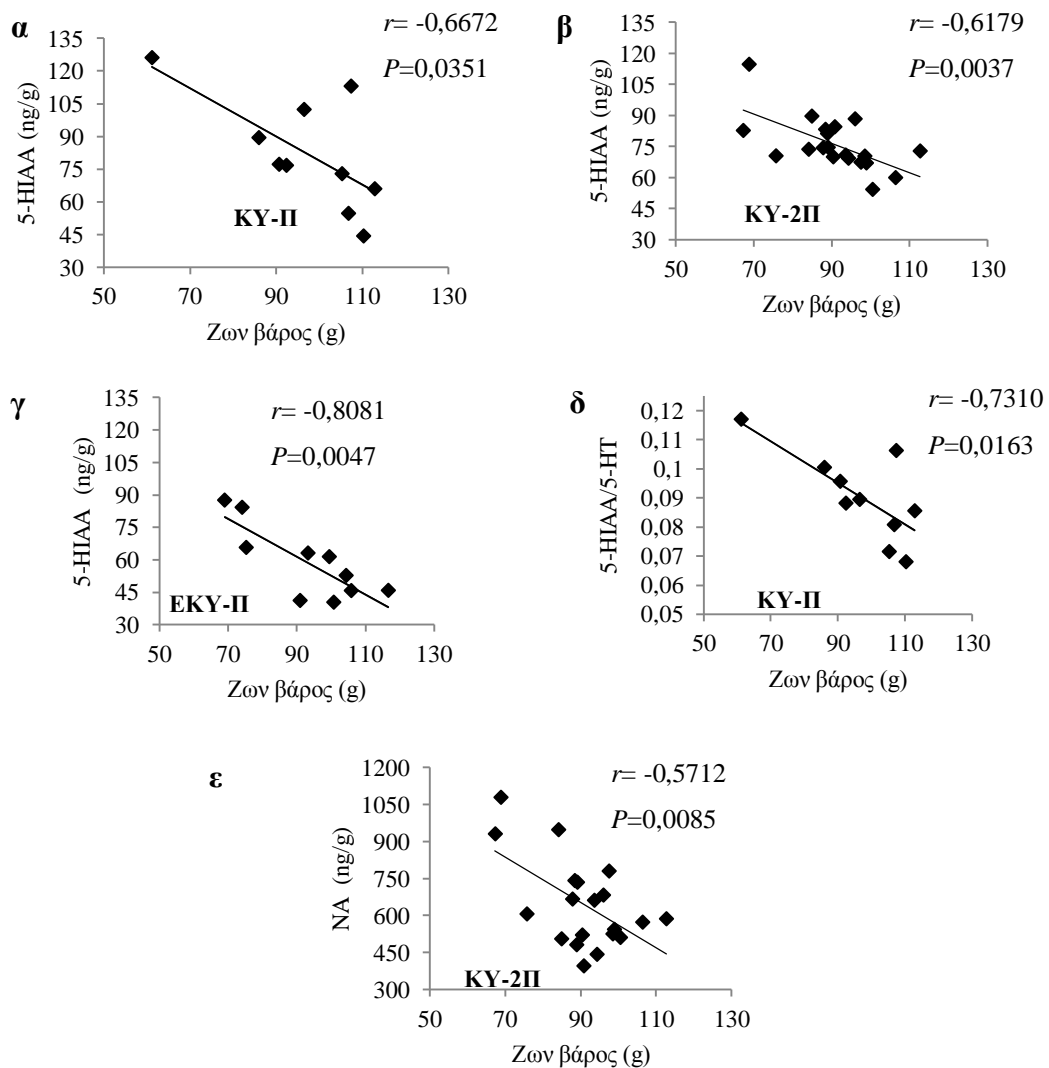
Η περιεκτικότητα του εγκεφάλου σε ολικά λίπη δεν επηρεάστηκε από τις επεμβάσεις και οι τιμές κυμάνθηκαν από 8,19% έως 8,46% νωπού βάρους. Ακόμη, η σύσταση του εγκεφάλου σε λιπαρά οξέα ποιοτικά (% των ολικών λιπαρών οξέων) δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων και οι τιμές τους κυμάνθηκαν ως εξής: α-λινολενικό οξύ (18:3 ω-3), 0,40-0,57%, αραχιδονικό οξύ (20:4 ω-6), 1,37-1,52%, EPA (20:5 ω-3), 4,71-5,36%, DPA (22:5 ω-3), 1,74-1,97%, DHA (22:6 ω-3), 26,2-31,8%, ω-3 PUFA, 33,5-39,7%. Ωστόσο το μέγεθος του εγκεφάλου ήταν μεγαλύτερο στα ψάρια των 2Π ομάδων σε σχέση με αυτά των Π ομάδων (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Νευροδιαβιβαστές, ολικά λίπη και μέγεθος εγκέφαλου απόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (ΚΥ) ή Ερυθροκαφέ (ΕΚΥ) υπόστρωμα, ή Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ) σε δύο διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής (Π: χαμηλότερη πυκνότητα, 2Π: υψηλότερη πυκνότητα) για 98 ημέρες (n=2).

Υπόστρωμα	Πυκνότητα	NA	DA	DOPAC	HVA	DOPAC/DA	HVA/DA	(DOPAC+HVA)/DA	Ο.Λ.	ΕΣΔ
ΚΥ	Π	556,5±33,0	62,2±1,88 a	2,35±0,031 ab	1,29±0,745	0,038±0,0026 ab	0,014±0,0050	0,052±0,0029	8,46±0,159	0,27±0,010
ΕΚΥ	Π	569,5±39,1	60,4±0,81 a	2,07±0,447 a	1,21±0,772	0,032±0,0042 a	0,016±0,0081	0,050±0,0114	8,26±0,182	0,27±0,010
ΧΥ	Π	608,3±42,0	75,2±1,71 b	3,58±0,613 bc	1,69±0,413	0,047±0,0064 b	0,022±0,0053	0,069±0,0027	8,27±0,097	0,29±0,013
ΚΥ	2Π	646,3±72,7	75,6±1,46 b	4,01±0,245 c	2,97±0,213	0,052±0,0035 b	0,037±0,0034	0,089±0,0011	8,24±0,148	0,28±0,005
ΕΚΥ	2Π	623,5±80,8	79,8±1,53 b	3,55±0,434 bc	3,14±0,034	0,044±0,0042 ab	0,041±0,0023	0,085±0,0078	8,21±0,097	0,29±0,006
ΧΥ	2Π	654,9±13,1	76,2±3,93 b	2,92±0,045 abc	2,19±0,077	0,040±0,0032 ab	0,033±0,0037	0,073±0,0037	8,19±0,078	0,30±0,006
Κύρια επίδραση										
ΚΥ		601,4±41,6	68,9±4,00 a	3,18±0,487	2,13±0,578	0,048±0,0028	0,026±0,0072	0,070±0,0109	8,33±0,109	0,28±0,005
ΕΚΥ		596,5±39,8	70,1±5,65 a	2,81±0,497	2,17±0,638	0,040±0,0033	0,029±0,0080	0,067±0,0114	8,23±0,087	0,28±0,005
ΧΥ		631,6±22,4	75,7±1,77 b	3,25±0,315	1,94±0,225	0,042±0,0030	0,027±0,0040	0,071±0,0021	8,21±0,062	0,29±0,006
	Π	578,1±19,7	65,9±3,03 a	2,67±0,353 a	1,40±0,311 a	0,039±0,0030	0,017±0,0032 a	0,057±0,0050 a	8,33±0,089	0,28±0,006 a
	2Π	641,6±28,9	77,2±1,42 b	3,49±0,237 b	2,77±0,193 b	0,045±0,0022	0,037±0,0021 b	0,082±0,0039 b	8,21±0,060	0,29±0,003 b
<i>P</i>										
Υπόστρωμα (Υ)		ΜΣ	*	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ
Πυκνότητα (Π)		ΜΣ	***	*	*	ΜΣ	**	**	ΜΣ	*
Αλληλεπίδραση (Υ×Π)		ΜΣ	*	*	ΜΣ	*	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

NA: νοραδρεναλίνη (ng/g), DA: ντοπαμίνη (ng/g), DOPAC: 3,4 διυδροξυ-φαινυλακετικό οξύ (ng/g), HVA: ομοβανιλλικό οξύ (ng/g), Ο.Λ.: Ολικά Λίπη (% Νωπού Βάρους), ΕΣΔ: Εγκεφαλοσωματικός Δείκτης, *P*: Επίπεδο Σημαντικότητας, ΜΣ: Μη Σημαντικό, **P*<0,05, ***P*<0,01, ****P*<0,001. Μέσοι όροι για τον ίδιο παράγοντα με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.

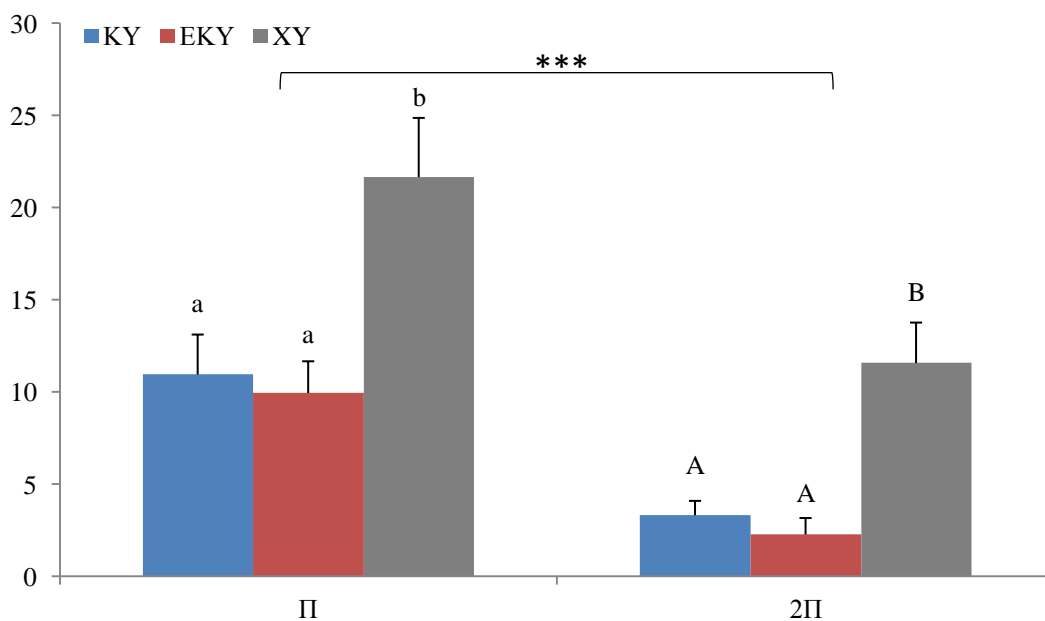
Ο μεταβολίτης της σεροτονίνης του εγκέφαλου παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με το βάρος για τα ψάρια του ΚΥ και στις δύο πυκνότητες εκτροφής (Διάγραμμα 12α, β). Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τα ψάρια του ΕΚΥ στις Π ομάδες (Διάγραμμα 12γ). Ακόμη, η σεροτονινεργική δραστηριότητα (5-HIAA/5-HT) παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με το βάρος για τα ψάρια στο ΚΥ στις Π ομάδες και η νοραδρεναλίνη παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με το βάρος για τα ψάρια στο ΚΥ στις 2Π ομάδες (Διάγραμμα 12δ, ε). Οι μονοαμίνες σεροτονίνη και ντοπαμίνη, οι μεταβολίτες της ντοπαμίνης, DOPAC και HVA και η ντοπαμινεργική δραστηριότητα δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με το βάρος των ψαριών.



Διάγραμμα 12: Συσχετίσεις με συντελεστή συσχέτισης Pearson μεταξύ του ζώντος βάρους και των νευροδιαβιβαστών του εγκέφαλου ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (ΚΥ) ή Ερυθροκαφέ (ΕΚΥ) υπόστρωμα, σε δύο διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής (Π: χαμηλότερη πυκνότητα, 2Π: υψηλότερη πυκνότητα) για 98 ημέρες. α-γ : μεταβολίτης της σεροτονίνης (5-HIAA), δ: σεροτονινεργική δραστηριότητα (5-HIAA/5-HT), ε: νοραδρεναλίνη (NA). (α, γ, δ, n=10; β, ε, n=20).

2.3.4 Επιθετική συμπεριφορά

Η επιθετική συμπεριφορά των ψαριών επηρεάστηκε τόσο από την παρουσία του υποστρώματος όσο και από την πυκνότητα εκτροφής. Η ώρα παρατήρησης δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στην επιθετικότητα ($P>0,05$). Τα ψάρια του ΚΥ και ΕΚΥ είχαν μικρότερο αριθμό επιθετικών ενεργειών σε σχέση με τα ψάρια των δεξαμενών ΧΥ (Διάγραμμα 13). Επιπλέον, τα ψάρια των 2Π ομάδων ήταν λιγότερο επιθετικά από τα ψάρια των Π ομάδων (Διάγραμμα 13).



Διάγραμμα 13: Αριθμός επιθετικών ενεργειών ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (ΚΥ) ή Ερυθροκαφέ (ΕΚΥ) υπόστρωμα, ή Χωρίς υπόστρωμα (Μ) σε δύο διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής (Π: χαμηλότερη πυκνότητα, 2Π: υψηλότερη πυκνότητα) για 98 ημέρες ($n=2$). Σύμβολα με διαφορετικά μικρά ή κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων των ομάδων Π και 2Π αντίστοιχα. ($P_Y<0,001$, $P_{\Pi}<0,001$).

Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκαν, μονοπώληση περιοχής από τα ψάρια ή εκτεταμένη συμπεριφορά ανεύρεσης τροφής.

2.4 Συζήτηση

Στο παρόν πείραμα η παρουσία του Κυανού και Ερυθροκαφέ υποστρώματος επηρέασαν τα παραγωγικά χαρακτηριστικά και τη συμπεριφορά της τσιπούρας ανεξάρτητα από την πυκνότητα εκτροφής που εφαρμόστηκε.

Πιο συγκεκριμένα, το Κυανό υπόστρωμα προήγαγε την ανάπτυξη, μείωσε την επιθετικότητα και βελτίωσε την ποιότητα του ραχιαίου μυϊκού ιστού της τσιπούρας, χωρίς να επηρεάσει τη φυσιολογία των ψαριών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι όμοια με

αυτά που παρατηρήθηκαν στο προηγούμενο πείραμα (Υποκεφάλαιο Δ1.3.2). Η επιβεβαίωση των προηγούμενων αποτελεσμάτων ισχυροποιεί την επίδραση του υποστρώματος για την τσιπούρα, ιδιαίτερα λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν άτομα διαφορετικής γενιάς και ηλικίας. Επίσης, το Κυανό υπόστρωμα μείωσε την παραλλακτικότητα του βάρους. Η γενικότερη επίδραση του Κυανού υποστρώματος που παρατηρήθηκε συμφωνεί με την άποψη ότι ο συνδυασμός υψηλού ρυθμού ανάπτυξης και μειωμένης παραλλακτικότητας βάρους υποδηλώνουν καλές κοινωνικές συνθήκες και συνθήκες εκτροφής (Jobling, 1995). Η παρουσία του Κυανού υποστρώματος μπορεί να συνέβαλλε στη δημιουργία ενός τέτοιου περιβάλλοντος (φυσική παρουσία/χρώμα υποστρώματος, συνθήκες φωτισμού που δημιουργούνται) που είτε έγινε αντιληπτό από την τσιπούρα ως πιο φυσικό είτε ήταν πιο κατάλληλο για την εκτροφή του συγκεκριμένου είδους συγκριτικά με το περιβάλλον της εντατικής εκτροφής που συνήθως δεν περιλαμβάνει τροποποιήσεις. Εξάλλου, η βελτίωση των χαρακτηριστικών της ανάπτυξης των ψαριών που εκτρέφονται σε εμπλουτισμένο περιβάλλον έχει διαπιστωθεί και σε άλλα εκτρεφόμενα είδη (Arndt et al., 2001; Ottesen et al., 2007).

Η παρουσία του Ερυθροκαφέ υποστρώματος μείωσε την επιθετικότητα, όπως είχε παρατηρηθεί και στο προηγούμενο πείραμα (Υποκεφάλαιο Δ1.3.4), αλλά δεν προήγαγε την ανάπτυξη, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με το προηγούμενο πείραμα. Η διαφορά αυτή σε σχέση με το προηγούμενο πείραμα ως προς την επίδραση του Ερυθροκαφέ υποστρώματος μπορεί να σχετίζεται με την ηλικία των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν [0+ στο παρόν πείραμα, 1+ Κεφάλαιο Δ1] ως προς την οπτική τους ικανότητα. Όπως είναι γνωστό, τα ψάρια συνεχίζουν να μεγαλώνουν σε μέγεθος κατά τη διάρκεια της ζωής τους και το ίδιο συμβαίνει και στους οφθαλμούς τους με συνέπεια να παρουσιάζονται τροποποιήσεις στη δομή του αμφιβληστροειδούς χιτώνα και την οπτική οξύτητα (Fernald, 1991). Ακόμη, στη φύση, και καθώς τα ψάρια μεγαλώνουν, συνηθίζουν να διαβιούν σε διαφορετικούς οικοτόπους και η όρασή τους προσαρμόζεται στο κάθε περιβάλλον (Chinen et al., 2005). Τα αποτελέσματα του Ερυθροκαφέ υποστρώματος υποδηλώνουν ότι τα πιο νεαρά σε ηλικία ψάρια του παρόντος πειράματος ενδέχεται να αντιλαμβάνονται το περιβάλλον τους διαφορετικά από ότι τα μεγαλύτερα σε ηλικία ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν στο προηγούμενο πείραμα (Κεφάλαιο Δ1). Η οπτική ευαισθησία της τσιπούρας δεν έχει προσδιοριστεί και συνεπώς οι οπτικές ικανότητες που σχετίζονται με την αντίληψη των χρωμάτων παραμένουν άγνωστες. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι τα νεαρά άτομα βρίσκονται συνήθως στη φύση σε ρηχά νερά ενώ τα μεγαλύτερα σε βαθύτερα νερά (Basurco et al., 2011) όπου οι συνθήκες περιβάλλοντος διαφέρουν (π.χ. φωτισμός).

Στο παρόν πείραμα, κύριος στόχος ήταν να διερευνηθεί σε ποιο βαθμό τα ευεργετικά αποτελέσματα του Κυανού και Ερυθροκαφέ υποστρώματος εξακολουθούν να υφίστανται ακόμα και όταν η τσιπούρα εκτρέφεται σε διαφορετικές πυκνότητες. Ωστόσο, ο παράγοντας της πυκνότητας επηρέασε ορισμένα αποτελέσματα και ο σχολιασμός τους κρίνεται απαραίτητος. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα ψάρια στις δεξαμενές με αυξημένη πυκνότητα είχαν καλύτερη ανάπτυξη σε σχέση με αυτά της μικρότερης πυκνότητας έως την 70^η ημέρα. Στη συνέχεια και ως το τέλος της

πειραματικής περιόδου η διαφορά του βάρους είχε εξαλειφθεί. Αυτό οφείλεται κυρίως στο μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης των ομάδων με χαμηλότερη πυκνότητα συγκριτικά με τις ομάδες με μεγάλη πυκνότητα για το διάστημα εκτροφής ύστερα από 70 ημέρες. Όπως είναι γνωστό, η πυκνότητα εκτροφής δεν αποτελεί ένα σταθερό παράγοντα για τα ψάρια, αφού καθώς τα ψάρια μεγαλώνουν η πυκνότητα εκτροφής αυξάνεται και συνεπώς μειώνεται ο διαθέσιμος όγκος νερού ανά άτομο με αρνητικές συνέπειες για τις κοινωνικές σχέσεις, την ανάπτυξη αλλά και την ποιότητα του νερού που αποτελεί το περιβάλλον τους.

Παρά το γεγονός ότι έχουν γίνει αρκετές μελέτες για την επίδραση της πυκνότητας εκτροφής στην τσιπούρα οι λεπτομέρειες των πειραματικών σχεδιασμών δυσκολεύουν τη σύγκριση μεταξύ των εργασιών, ιδιαίτερα συνυπολογίζοντας τους πολλαπλούς παράγοντες που επηρεάζουν την πυκνότητα, αλλά και εκείνους που η πυκνότητα επηρεάζει (Ashley, 2007; Ellis et al., 2002). Η δυσκολία αυτή γίνεται εμφανής παραθέτοντας τα στοιχεία της βιβλιογραφίας (Πίνακας 14). Για παράδειγμα, οι Yilmaz and Arabaci (2010) διαπιστώνουν ότι η εκτροφή της τσιπούρας στην υψηλότερη από τις τρεις πυκνότητες που εξετάζονται οδηγεί σε καλύτερη ανάπτυξη. Αντίστοιχα, οι Canario et al. (1998) παρατηρούν μείωση της επιθετικότητας και χαμηλότερη ανάπτυξη στην υψηλότερη από τις τρεις πυκνότητες που εξετάζονται. Ωστόσο, η πυκνότητα των Canario et al. (1998) είναι διπλάσια (σε Kg/m^3) από αυτή των Yilmaz and Arabaci (2010), ενώ στο παρόν πείραμα είναι ακόμη μεγαλύτερη. Ακόμη, δε γίνεται να αγνοηθούν άλλες παράμετροι των πειραματικών συνθηκών (π.χ. στάδιο ανάπτυξης των ψαριών, βιομάζα, αριθμός ψαριών, διαθέσιμος χώρος) που εμπλέκονται άμεσα και τροποποιούν την επίδραση της πυκνότητας.

Επιπλέον, η συνδυασμένη δράση του εμπλουτισμού του περιβάλλοντος και της πυκνότητας στην επιθετική συμπεριφορά δεν έχει μελετηθεί ιδιαίτερα. Για παράδειγμα, σε ψάρια του είδους *Ameca splendens* δεν παρατηρήθηκε επίδραση της πυκνότητας στην επιθετικότητα και η εκτροφή του είδους σε εμπλουτισμένο περιβάλλον αύξησε την επιθετική συμπεριφορά μόνο στις ομάδες της μεγαλύτερης πυκνότητας (Kelley et al., 2006). Ακόμη, σε άτομα εκτρεφόμενης ιριδίζουσας πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* η αυξημένη πυκνότητα αύξησε την επιθετικότητα ενώ ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος δεν την επηρέασε (Riley et al., 2009).

Πίνακας 14: Επίδραση της πυκνότητας εκτροφής στην τσιπούρα σε μακροχρόνια πειράματα. Λεπτομέρειες πειραματικών συνθηκών και κύριες επιδράσεις.

Βιβλιογραφία	Πειραματικές συνθήκες									Επίδραση της αυξημένης πυκνότητας εκτροφής			
	Θερμοκρασία (°C)	Ημερήσια ποσότητα τροφής (% Z.B.)	Ημέρες εκτροφής	Αρχικό βάρος (g)	Αρχική (Τελική) πυκνότητα εκτροφής (kg/m ³)	Αριθμός ψαριών/m ³	Αριθμός ψαριών/δεξαμενή	Διαθέσιμος χώρος/ψάρι (L)	Ροή νερού (Όγκος νερού)	Ποιότητα νερού	Ανάπτυξη	Επιθετικότητα	CV
Canario et al., 1998	19	8	70	1,3	0,35 (2,4) 1,3 (8,1) 3,2 (16,7)	269 1,000 2,462	53,8 200,0 492,3	3,7 1,0 0,4	3,3 L/min; χωρίς προσαρμογή στη βιομάζα (0,2 m ³ δεξαμενή)	↓	↓	↓	X.E.
Montero et al., 1999	19-22,5	2,5	105	22	2,6 (10,0) 10,6 (40,8)	120 480	30 120	8,3 2,1	4,0 L/min; χωρίς προσαρμογή στη βιομάζα (0,25 m ³ δεξαμενή)	X.E.	X.E.	–	–
Roncarati et al., 2006	11-26	0,4-1,2	510	2,7	0,18 (21,0) 0,45 (48,0)	68 165	24480 59400	14,7 6,1	0,12-0,3 L/min/kg; προσαρμογή στη βιομάζα (360 m ³ δεξαμενή-raceways)	X.E.	X.E.	–	–
Yilmaz and Arabaci, 2010	20	Κορεσμός	330	36,4	1,3 (11,9) 1,5 (13,5) 1,6 (15,4)	36 40 44	360 400 440	27,8 25,0 22,7	(10 m ³ κλωβοί)	X.E.	↑	–	X.E.
Παρόν πείραμα	20,5	3-1,5	98	25,2	4,9 (14,7) 9,7 (29,9)	192,3 384,6	17 34	5,2 2,6	1,8 L/min/kg; προσαρμογή στη βιομάζα (0,216 m ³ δεξαμενή)	X.E.	↑(56 ως 70 ημέρες)	↓	↓

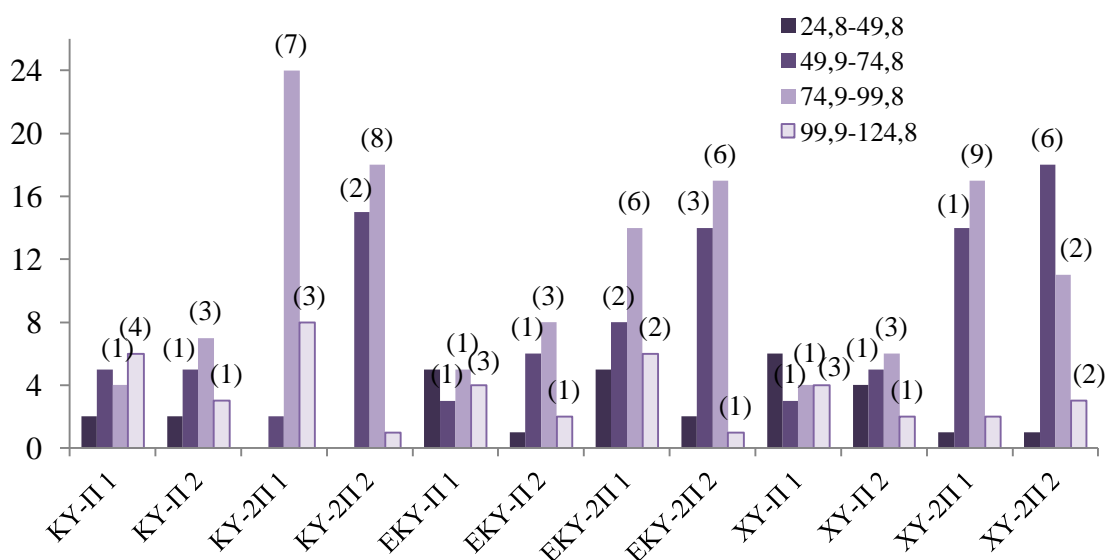
Z.B.: Ζων Βάρος, CV: Συντελεστής Παραλλακτικότητας του Βάρους, X.E.: Χωρίς Επίδραση

Τα αποτελέσματα των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου στο παρόν πείραμα ενισχύουν περαιτέρω την υπόθεση ότι η επίδραση του υποστρώματος συνδέεται με μεταβολές στις κοινωνικές σχέσεις των ψαριών όπως και στο προηγούμενο πείραμα (Υποκεφάλαιο 1.4), αφού παρατηρήθηκε χαμηλότερη δραστηριότητα του σεροτονινεργικού και ντοπαμινεργικού συστήματος, ιδιαίτερα στις ομάδες της χαμηλότερης πυκνότητας. Η πυκνότητα αυτή (Π) που εφαρμόστηκε φαίνεται να ήταν λιγότερο ευνοϊκή εντείνοντας τις κοινωνικές συναναστροφές. Πιο συγκεκριμένα, η αυξημένη επιθετικότητα και η μεγαλύτερη παραλλακτικότητα του βάρους στις δεξαμενές με μικρή πυκνότητα υποδεικνύουν κατάσταση έντονων κοινωνικών συναναστροφών και συνθήκες αυξημένου κοινωνικού stress (Jobling, 1995; North et al., 2006; Rowland et al., 2006). Το ίδιο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες εργασίες με διαφορετικά είδη ψαριών όπου η μείωση της επιθετικότητας σε ομάδες με αυξημένη πυκνότητα σχετίστηκε με το υψηλό ενεργειακό κόστος μιας διαμάχης για τα ψάρια όταν έχουν να αντιμετωπίσουν πολλούς αντιπάλους (Baras et al., 2003; Damsgård and Huntingford, 2012; van de Nieuwegiessen et al., 2008). Παρ' όλα αυτά η προσθήκη Κυανού υποστρώματος άμβλυσε τις αρνητικές επιπτώσεις της χαμηλότερης πυκνότητας εκτροφής. Οι αλλαγές στη συμπεριφορά των ψαριών που οφείλονται στην πυκνότητα, υποδηλώνουν την καθαρή της επίδραση, αφού η προσαρμογή της ανανέωσης του νερού ανάλογα με τη βιομάζα εξασφάλισε καλή και κοινή ποιότητα νερού σε κάθε επέμβαση.

Επιπλέον, από τα αποτελέσματα των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου φαίνεται να υποστηρίζεται η παρουσία χαμηλού κοινωνικού stress στις ομάδες της αυξημένης πυκνότητας (2Π). Ομοίως, μελέτες σε ωοπαραγωγά ορνίθια έχουν δείξει πως όταν εκτρέφονται σε χαμηλό επίπεδο κοινωνικού stress παρουσιάζουν αυξημένη σεροτονινεργική και ντοπαμινεργική δραστηριότητα (Cheng and Fahey, 2009). Ωστόσο, σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα οι πληροφορίες σχετικά με την επίδραση της πυκνότητας εκτροφής στους νευροδιαβιβαστές του εγκεφάλου των ψαριών είναι περιορισμένες. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί αυξημένη ντοπαμινεργική δραστηριότητα στο σαργό *Diplodus sargus*, ένα άλλο είδος της οικογένειας Sparidae, όταν εκτράφηκε σε υψηλή πυκνότητα (τελική πυκνότητα από 4,3 έως 11,2 kg/m³, σαφώς χαμηλότερη από αυτή του παρόντος πειράματος), η οποία ωστόσο είχε αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη (Papoutsoglou et al., 2006).

Η ένταση των κοινωνικών σχέσεων στις ομάδες με τη χαμηλότερη πυκνότητα υποστηρίζεται ακόμα και από τις σημαντικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στη λειτουργία του σεροτονινεργικού συστήματος στις δεξαμενές με υπόστρωμα (αρνητική συσχέτιση στο KY και στο EKY για το μεταβολίτη της σεροτονίνης και στο KY για τη σεροτονινεργική δραστηριότητα). Η παρουσία σημαντικών συσχετίσεων σε αυτό το πείραμα αλλά όχι στο προηγούμενο (Υποκεφάλαιο Δ1.3.3), ίσως υποδηλώνει ότι στα μικρής ηλικίας ψάρια είναι πιο έντονες οι κοινωνικές σχέσεις γεγονός που συμφωνεί με την αυξημένη επιθετικότητα των ψαριών ηλικίας 0+ συγκριτικά με τα αυτά ηλικίας 1+ όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη (Greaves and Tuene, 2001). Επιπλέον, όπως φαίνεται και στον πίνακα της κατανομής συχνοτήτων (Διάγραμμα 14) ο εγκεφαλος των ψαριών που αναλύθηκαν, προέκυψε από ψάρια που ανήκαν και στη μεγάλη κλάση βάρους (άρα πιθανόν κυρίαρχα), αντίθετα με το προηγούμενο πείραμα (Υποκεφάλαιο

Δ1.4) που η τυχαία δειγματοληψία οδήγησε σε ανάλυση εγκεφάλων από τα ψάρια των δύο μεσαίων κλάσεων βάρους.



Διάγραμμα 14: Κατανομή συχνοτήτων (αριθμός ψαριών) σε τέσσερις κλάσεις βάρους (g) που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό (KY), Ερυθροκαφέ (EKY) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (XY) και σε δύο διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής (Π: χαμηλότερη πυκνότητα, 2Π: υψηλότερη πυκνότητα) για 98 ημέρες. Ο αριθμός των ψαριών στα οποία έγινε τυχαία δειγματοληψία αναφέρεται μέσα σε παρένθεση.

Ανεξάρτητα από την παρουσία του υποστρώματος, τα ψάρια της υψηλότερης πυκνότητας παρουσίασαν αυξημένες τιμές ντοπαμινεργικής δραστηριότητας [HVA, HVA/DA, (HVA+DOPAC)/DA]. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της ανάπτυξης και του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της εκτροφής (καλύτερη ανάπτυξη ύστερα από 57 και 70 ημέρες και χαμηλότερες τιμές του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης στο επόμενο διάστημα συγκριτικά με τα αποτελέσματα της χαμηλότερης πυκνότητας) υποδεικνύουν την έναρξη των αρνητικών επιπτώσεων της αυξημένης πυκνότητας και την εμφάνιση stress (Winberg and Nilsson 1993b; DiBattista et al., 2005; Karakatsouli et al., 2012). Η ύπαρξη ενός περιβάλλοντος που προκαλεί stress δεν μπορεί να σχετιστεί με την ποιότητα του νερού η οποία διατηρούταν σε ασφαλή και χαμηλά επίπεδα ή την επιθετικότητα που ήταν χαμηλότερη από αυτή των ψαριών της χαμηλότερης πυκνότητας μόλις μία εβδομάδα πριν τη λήψη του εγκεφάλου. Αντίθετα, ο συνεχής περιορισμός του διαθέσιμου χώρου της κάθε δεξαμενής καθώς τα ψάρια μεγάλωναν ενδέχεται να έφτασε ένα κρίσιμο σημείο ξεπερνώντας τις ανάγκες του είδους για χώρο (Ayllón et al., 2010).

Τα λιπαρά οξέα του εγκεφάλου δε φάνηκαν να διαφοροποιούνται μεταξύ των επεμβάσεων όπως παρατηρήθηκε και σε προηγούμενο πείραμα (Υποκεφάλαιο Δ1.3.3). Αντίθετα, η αύξηση του βάρους του εγκεφάλου στα ψάρια της αυξημένης πυκνότητας αντανακλά ενδεχομένως αλλαγές που σχετίζονται με την κοινωνικότητα. Όπως έχει

παρατηρηθεί, η ομαδική εκτροφή ατόμων του είδους *Pungitius pungitius* οδήγησε σε μικρότερο μέγεθος εγκέφαλου σε σχέση με τα ψάρια που εκτράφηκαν ατομικά (Gonda et al., 2009; Pollen et al., 2007).

Γενικά η φυσιολογία των ψαριών στις δεξαμενές με Κυανό και Ερυθροκαφέ υπόστρωμα δεν επηρεάστηκε. Ωστόσο, το μέγεθος του σπλήνα ήταν αυξημένο στα ψάρια του Ερυθροκαφέ υποστρώματος όπως παρατηρήθηκε και στο προηγούμενο πείραμα (Υποκεφάλαιο Δ1.3.2). Αν και διάφοροι εξωτερικοί παράγοντες όπως το χρώμα φωτισμού ενδέχεται να επηρεάσουν το σπληνοσωματικό δείκτη (Karakatsouli et al., 2010), η διευκρίνιση του μηχανισμού επίδρασης του εμπλουτισμού του περιβάλλοντος σε αυτό το χαρακτηριστικό δεν είναι εφικτή από τα παρόντα δεδομένα. Ωστόσο, η επαναλαμβανόμενη εμφάνιση αυτής της επίδρασης δε θα πρέπει να αγνοηθεί.

Μεταξύ των ατόμων που εκτράφηκαν στις δύο διαφορετικές πυκνότητες παρατηρήθηκαν μεταβολές στην ανάπτυξη, τις αιματολογικές παραμέτρους και τα χαρακτηριστικά του ήπατος που υπονοούν διαφορετική χρήση των αποθεμάτων ενέργειας για να ικανοποιηθούν οι ανάγκες τους. Ωστόσο, τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και τα χαμηλά επίπεδα τριακυλγλυκεριδίων στις 2Π ομάδες ενδεχομένως συμφωνούν με την υπόθεση ότι στις ομάδες αυτές οι δυσμενείς επιπτώσεις της αύξησης της πυκνότητας με το χρόνο άρχισαν να δρουν μετά τις 70 ημέρες εκτροφής ως παράγοντας stress (Barton, 2002).

Τα ψάρια στις δεξαμενές με Κυανό και Ερυθροκαφέ υπόστρωμα χαρακτηρίστηκαν επίσης από καλή ποιότητα ραχιαίου μυϊκού ιστού ως προς την περιεκτικότητά τους σε EPA και DHA λιπαρά οξέα, που μπορεί να καλύψει τις ενδεικνυόμενες ημερήσιες ανάγκες του ανθρώπου [250 mg/ημέρα, (EFSA, 2010)]. Ωστόσο, αν και τα αυξημένα επίπεδα EPA και DHA παρουσιάζονται για δεύτερη φορά για την τσιπούρα που εκτρέφεται με Κυανό υπόστρωμα, η σχέση της ποιότητας του ραχιαίου μυϊκού ιστού με την ευζωία χρήζει περαιτέρω έρευνας.

Τέλος, δευτερεύουσα αλλά σημαντική επίδραση του υποστρώματος παρατηρήθηκε στην περιεκτικότητα του νερού εκτροφής των ψαριών σε νιτρώδη ιόντα. Παρ' όλο που καταβλήθηκε προσπάθεια να αμβλυνθεί το πρόβλημα χωρίς να προκληθεί stress στα ψάρια, διαπιστώθηκε ξανά η αυξημένη συγκέντρωση νιτρωδών ιόντων στις δεξαμενές με υπόστρωμα, η οποία όμως ήταν εντός των προτεινόμενων επιπέδων για την εντατική εκτροφή της τσιπούρας (Poli, 2009).

3. Πείραμα 3

Ατομική ή ομαδική δοκιμή προτίμησης υποστρώματος σε άτομα τσιπούρας



Batzina A., Sotirakoglou, K., Karakatsouli, N. The preference of 0+ and 2+ gilthead seabream *Sparus aurata* for coloured substrates or no-substrate Accepted in *Applied Animal Behaviour Science*.

3.1 Εισαγωγή - Σκοπός

Ένας τρόπος για να εκτιμηθούν οι ανάγκες των ζώων είναι μέσω των δοκιμών προτίμησης οι οποίες δίνουν στο ζώο τη δυνατότητα να εκδηλώσει την προτίμησή του μεταξύ συγκεκριμένων επιλογών (Dawkins, 2004).

Στην περίπτωση των ψαριών έχουν πραγματοποιηθεί δοκιμές προτίμησης ώστε να δώσουν πληροφορίες σχετικά με τη χρήση του φυσικού περιβάλλοντος (Delicio et al., 2006; Fraser et al., 1996; Gotceitas and Brown, 1993; Johnsson et al., 2000; Pappal et al., 2009), την επιλογή τοποθέτησης φωλιάς (Galhardo et al., 2009; Inui et al., 2010; Witte et al., 2009), συντρόφου (Bierbach et al., 2011), ατόμων ενός κοπαδιού (Barba-Escobedo and Gould, 2012; Blakeslee et al., 2009; Gómez-Laplaza and Fuente, 2007; Gómez-Laplaza and Gerlai, 2011), την ανταπόκριση σε έναν κίνδυνο μέσω δοκιμών προτίμησης του βάθους (Blaser and Goldsteinholm, 2012; Blaser and Rosemberg, 2012), την επιλογή προτίμησης τροφής (Fortes-Silva et al., 2011) ή συνθηκών διαβίωσης (Benhaïm et al., 2009; Delicio et al., 2006; Kistler et al., 2011; Luchiari and Pirhonen, 2008; Luchiari et al., 2007; Ullmann et al., 2011).

Ωστόσο, οι δοκιμές προτίμησης αν και βοηθούν στην εκτίμηση της εκλογής μεταξύ δύο ή περισσότερων επιλογών, δε δίνουν καμία πληροφορία σχετικά με τη σημαντικότητα της εκλογής αυτής από το ζώο (Dawkins, 2004), η οποία απαιτεί το σχεδιασμό ειδικών δοκιμών (motivational tests). Αυτές οι δοκιμές εκτιμούν το πόσο σκληρά μπορεί να αγωνιστεί ένα ζώο ώστε να αποκτήσει πρόσβαση σε μια συγκεκριμένη επιλογή ή να την αποφύγει (Dawkins, 2004; Gonyou, 1994).

Οι δοκιμές προτίμησης απαιτούν προσεκτικό σχεδιασμό ώστε η όποια επιλογή των ζώων να είναι αμερόληπτη. Το τελικό αποτέλεσμα μιας δοκιμής προτίμησης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η ηλικία του ζώου, το φύλο, η προηγούμενη του εμπειρία με τις επιλογές που του προσφέρονται ή ακόμα και ο αριθμός των επιλογών αυτών (Bateson, 2004; Dawkins, 2004; Luchiari and Pirhonen, 2008; Widowski, 2009). Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε διαφορετική επιλογή περιβάλλοντος διαβίωσης μεταξύ νεαρών και ενήλικων ατόμων του είδους *Pontogammarus robustoides* (Czarnecka et al., 2010), ενώ το έντομο *Lymantria dispar* αν και επέλεξε μεταξύ δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων ισοπιμαρικού οξέος, δεν κατάφερε να επιλέξει όταν του προσφέρθηκαν πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Raffa et al., 2002). Ακόμη, η προηγούμενη εμπειρία πουλιών σε συγκεκριμένες συνθήκες διαβίωσης επηρέασαν την τελική τους επιλογή (Petherick et al., 1990). Στην περίπτωση των ψαριών, έχει παρατηρηθεί ότι άτομα του είδους *Pterophyllum scalare* προτιμούν να σχηματίζουν ομάδες με άτομα με τα οποία έχουν προηγούμενη εμπειρία κοινής συμβίωσης (Gómez-Laplaza and Fuente, 2007). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, είναι φανερό ότι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων μιας δοκιμής προτίμησης αποτελεί ένα πολυδιάστατο ζήτημα.

Ένα εξίσου σημαντικό θέμα σχετικά με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών προτίμησης είναι ότι η επιλογή που κάνει ένα ζώο ενδέχεται να μην είναι θετική μακροχρόνια όσον αφορά στην υγεία και την ευζωία του (Dawkins, 2004; Widowski, 2009). Για παράδειγμα όταν δόθηκε η δυνατότητα επιλογής σε ορνίθια

κρεοπαραγωγής να επιλέξουν μεταξύ διαφορετικών τύπων φωτισμού (φθορισμού, λευκού φωτός, πυρακτώσεως ή ευαίσθητου φάσματος/spectral-sensitivity matched light), επέλεξαν λάμπες φθορισμού και λευκού φωτός, αλλά μόνο με τις λάμπες φθορισμού παρουσίασαν αυξημένη συμπεριφορά αναζήτησης τροφής (Kristensen et al., 2007). Ομοίως τα ψάρια ενδέχεται να επιλέγουν τις συνθήκες που είναι ευεργετικές για αυτά μακροχρόνια (Luchiarì and Pirhonen, 2008) ή να έχουν διαφορετικές επιλογές (Ullmann et al., 2011).

Στα προηγούμενα πειράματα (Κεφάλαια Δ1 και Δ2) διαπιστώθηκε η θετική επίδραση του χρωματιστού υποστρώματος χαλκιού. Συγκεκριμένα, η παρουσία Κυανού υποστρώματος βελτίωσε την ανάπτυξη και την ποιότητα ραχιαίου μυϊκού ιστού, ενώ μείωσε την επιθετικότητα σε άτομα τσιπούρας ηλικίας 0+ και 1+ ακόμα και σε διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής. Η παρουσία Ερυθροκαφέ υποστρώματος επέφερε εξίσου θετικά αποτελέσματα σε τσιπούρες ηλικίας 1+, ενώ σε άτομα ηλικίας 0+ η επίδραση δεν ήταν τόσο έντονη. Τέλος, η παρουσία Πράσινου υποστρώματος δε διαφοροποίησε τα αποτελέσματα συγκριτικά με την επέμβαση Χωρίς υπόστρωμα (υάλινος πυθμένας).

Σκοπός του παρόντος πειράματος ήταν να διερευνηθούν οι πιθανές επιλογές της τσιπούρας ως προς τα υποστρώματα που είχαν χρησιμοποιηθεί στα προηγούμενα πειράματα. Οι δοκιμές προτίμησης πραγματοποιήθηκαν σε άτομα δύο διαφορετικών ηλικιών (0+ και 2+) ώστε τα αποτελέσματα να συνεκτιμηθούν με αυτά των μακροχρόνιων πειραμάτων (Κεφάλαια Δ1 και Δ2). Επίσης, οι δοκιμές έγιναν στα ψάρια ατομικά και σε ομάδες ώστε να εκτιμηθεί η πιθανή εμπλοκή των κοινωνικών σχέσεων στην προτίμησή τους.

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

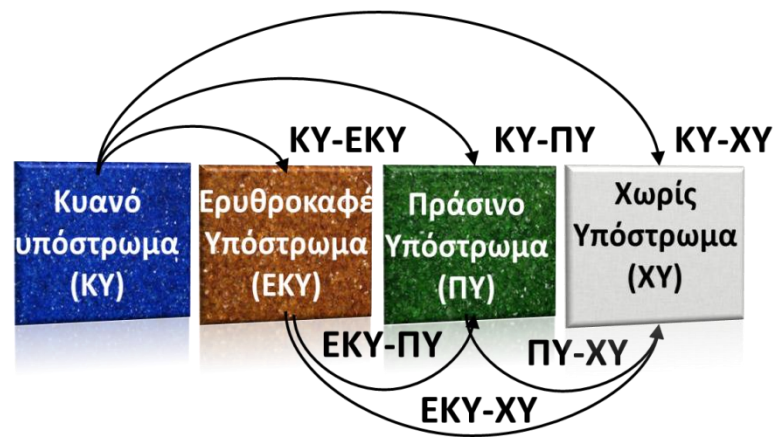
3.2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 123 νεαρά άτομα τσιπούρας ηλικίας 2+ μέσου αρχικού βάρους $84,8 \pm 1,9$ g και μέσου ολικού μήκους $17,7 \pm 0,1$ cm του εργαστηρίου Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Για την ηλικία 0+, έγινε προμήθεια 123 ατόμων τσιπούρας μέσου αρχικού βάρους $21,9 \pm 0,5$ g και μέσου ολικού μήκους $11,5 \pm 0,1$ cm. Τα ψάρια και των δύο ηλικιών παρέμειναν σε εργαστηριακές συνθήκες για εγκλιματισμό σε υάλινες, ορθογώνιες δεξαμενές διαστάσεων $41 \times 49 \times 67,5$ cm, (ύψος \times πλάτος \times μήκος) και όγκου 135,6 L. Τα πλάγια αλλά και το πίσω μέρος της κάθε δεξαμενής ήταν καλυμμένο με γαλάζιο φελιζόλ. Όλες οι δεξαμενές αποτελούσαν μέρος ημίκλειστου συστήματος θαλασσινού νερού που διέθετε μηχανικά (σπόγγοι) και βιολογικά (χαλίκια) φίλτρα, καθώς επίσης και λάμπες εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας UV για την αποφυγή ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών. Κάθε δεξαμενή διέθετε σύστημα παροχής νερού, σύστημα παροχής ατμοσφαιρικού αέρα καθώς και σύστημα αποχέτευσης και διατήρησης σταθερής στάθμης νερού. Όλα τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν δεν είχαν

προηγούμενη εμπειρία με υπόστρωμα χαλκιού στη δεξαμενή, ενώ δεν είχαν χρησιμοποιηθεί σε άλλα πειράματα.

3.2.2 Δοκιμές προτίμησης και πειραματικές δεξαμενές

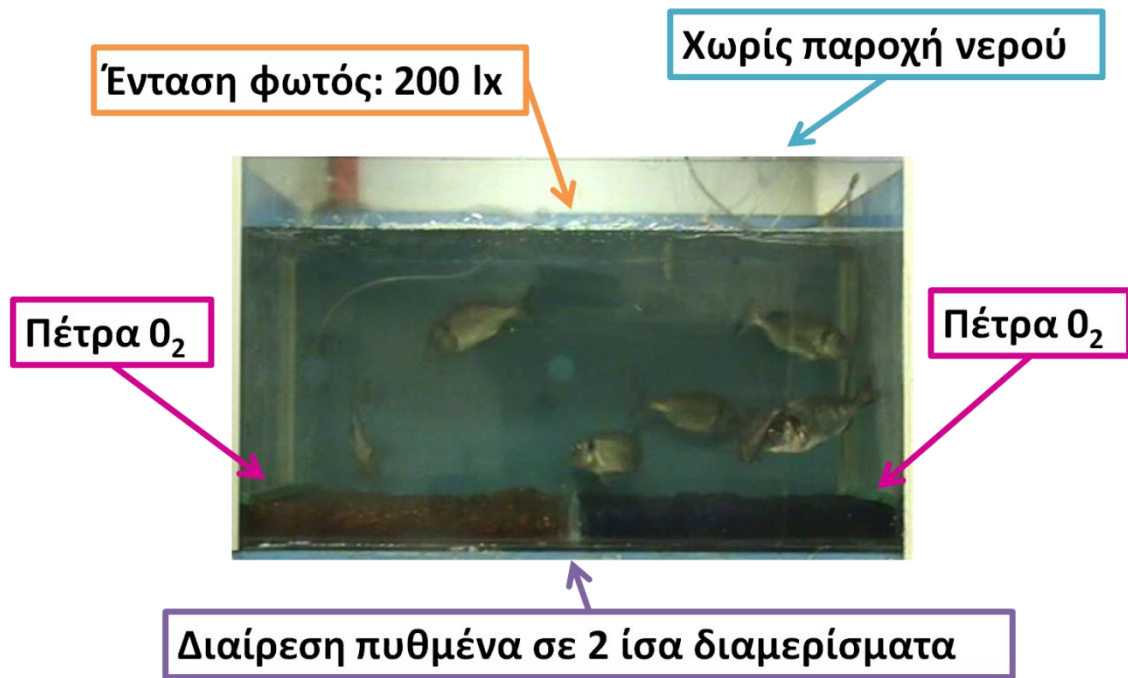
Οι επεμβάσεις που ελέγχθηκαν είχαν ήδη εφαρμοστεί σε προηγούμενα μακροχρόνια πειράματα (Κεφάλαια Δ1 και Δ2), και ήταν οι εξής: Κυανό, Ερυθροκαφέ ή Πράσινο υπόστρωμα και η επέμβαση Χωρίς υπόστρωμα (υάλινος πυθμένας). Οι επεμβάσεις αυτές συνδυάστηκαν ανά δύο με αποτέλεσμα να προκύψουν 6 συνδυασμοί (ΚΥ-ΕΚΥ, ΚΥ-ΠΥ, ΕΚΥ-ΠΥ, ΚΥ-ΧΥ, ΕΚΥ-ΧΥ, ΠΥ-ΧΥ, Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Συνδυασμοί επεμβάσεων δοκιμών προτίμησης.

Τα ψάρια της κάθε ηλικίας δοκιμάστηκαν ατομικά (10 άτομα/συνδυασμό) αλλά και σε ομάδες των 7 ατόμων (3 επαναλήψεις/συνδυασμό) ώστε να διαπιστωθεί πιθανή εμπλοκή των κοινωνικής επίδρασης στην προτίμηση των ψαριών. Στις δοκιμές ατομικά εφαρμόστηκαν όλοι οι συνδυασμοί των επεμβάσεων, ενώ στις δοκιμές σε ομάδες αποκλείστηκαν οι συνδυασμοί που περιλάμβαναν το Πράσινο υπόστρωμα. Η επιλογή αυτή έγινε, βάσει των αποτελεσμάτων των δοκιμών ατομικά αλλά και των αποτελεσμάτων του πρώτου πειράματος (Κεφάλαιο Δ1).

Για τις παρατηρήσεις χρησιμοποιήθηκαν 4 υάλινες ορθογώνιες δεξαμενές διαστάσεων 42x49x83 cm (ύψος × πλάτος × μήκος) και όγκου 171 L. Τα πλευρικά τοιχώματα της κάθε δεξαμενής εκτός από το πρόσθιο ήταν καλυμμένο με γαλάζιο φελιζόλ. Στον πυθμένα κάθε δεξαμενής τοποθετήθηκε διάφανο υάλινο χώρισμα ύψους 5 cm ώστε να διαιρεθεί σε δύο ίσα διαμερίσματα (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Διαμόρφωση δεξαμενών παρατήρησης.

Σε κάθε διαμέρισμα γινόταν τοποθέτηση ενός από τα τρία υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν (ύψους 5 cm) ή παρέμενε χωρίς υπόστρωμα. Στις δοκιμές ατομικά η θέση του υποστρώματος στη δεξαμενή άλλαζε ύστερα από τις μισές δοκιμές για κάθε συνδυασμό επεμβάσεων ώστε να συνεκτιμηθεί η πιθανή επίδραση της θέσης του στην προτίμηση των ψαριών. Στις δοκιμές σε ομάδες η θέση του υποστρώματος δεν άλλαξε βάσει των αποτελεσμάτων της δοκιμής ατομικά (0+, $P>0,05$; 1+, $P>0,05$).

Στο κάθε διαμέρισμα, κατά μήκος του πλευρικού τοιχώματος της δεξαμενής τοποθετήθηκε πέτρα παροχής οξυγόνου (Εικόνα 2). Η ένταση φωτισμού προσαρμόστηκε στα 200 lx στην επιφάνεια κάθε δεξαμενής ώστε να διατηρηθούν κοινές συνθήκες φωτισμού μεταξύ των πειραμάτων (Υποκεφάλαια Δ1.2.1 και Δ2.2.1). Ως πηγή φωτισμού χρησιμοποιήθηκαν λάμπες λευκού φωτός (cool white fluorescence lamps, OSRAM DULUX D/E 26W/840 G24Q-3) στο κέντρο της επάνω πλευρά της κάθε δεξαμενής. Ο χειρισμός της έντασης φωτισμού γινόταν με ειδικό λογισμικό (winDim 4.0e PC), ενώ η μέτρηση της έντασης σε κάθε δεξαμενή γινόταν με τη βοήθεια ψηφιακού φωτόμετρου (RS 180-7133, RS Components Ltd., Corby, Northants, UK). Κατά τη διάρκεια των παρατηρήσεων δε γινόταν ανανέωση του νερού ώστε να εξασφαλιστούν τα ίδια ρεύματα νερού σε κάθε διαμέρισμα της δεξαμενής κυρίως λόγω της παροχής του αέρα. Ωστόσο, το νερό της κάθε δεξαμενής άλλαζε μετά τη δοκιμή του κάθε συνδυασμού. Η ποιότητα του νερού διατηρήθηκε σε επίπεδα ασφαλή για τη διασφάλιση της ευζωίας της τσιπούρας [θερμοκρασία $18,9\pm 0,02$ °C, δεσμευμένο οξυγόνο $7,1\pm 0,03$ mg/L (κορεσμός $96\pm 0,7\%$), pH $7,54\pm 0,015$, αλατότητα $35\pm 0,0$ g/L].

3.2.3 Διαχείριση ψαριών και λήψη video

Η χορήγηση της τροφής στα ψάρια γινόταν σε κορεσμό το πρωί (08:30) της προηγούμενης της ημέρας των δοκιμών στις εργαστηριακές δεξαμενές (135,6 L) (Πίνακας 15). Το απόγευμα της ίδιας ημέρας (17:00), τα ψάρια μεταφέρονταν (ατομικά ή σε ομάδες των επτά ατόμων) στις δεξαμενές εγκλιματισμού [διαστάσεων 42×49×49 cm, (ύψος × πλάτος × μήκος) και όγκου 101 L] που ήταν διαμορφωμένες όμοια με τις δεξαμενές παρατήρησης με εξαίρεση τη συνεχή ανανέωση νερού σε αυτές. Σε προπειραματικές διερευνητικές δοκιμές διαπιστώθηκε ότι εάν τα ψάρια εισέρχονταν απευθείας στις δεξαμενές παρατήρησης (χωρίς εγκλιματισμό) τότε ήταν διστακτικά στο να επισκεφτούν τα διαφορετικά διαμερίσματα της δεξαμενής.

Πίνακας 15: Πρόγραμμα ατομικών και ομαδικών δοκιμών.

		Πρόγραμμα δοκιμών προτίμησης
Ημέρα 0	08:30	Χορήγηση τροφής σε κορεσμό
	17:00	Μεταφορά σε δεξαμενές εγκλιματισμού (παρόμοιες με δεξαμενές παρατήρησης)
Ημέρα 1	0 ώρα	Μεταφορά σε δεξαμενές παρατήρησης
	1 ώρα	Video: 20 λεπτά (δοκιμές ατομικά) 30 λεπτά (δοκιμές σε ομάδες)
	2 ώρες	Video: 20 λεπτά (δοκιμές ατομικά) 30 λεπτά (δοκιμές σε ομάδες)

Την επόμενη ημέρα τα ψάρια μεταφέρονταν στις δεξαμενές παρατήρησης και παρέμεναν εκεί για μία ώρα ώστε να επανέλθουν από το stress κατά τη διαδικασία της αλίευσης. Πραγματοποιήθηκαν 2 λήψεις video για κάθε δοκιμή ατομικά (20 λεπτά) ή για κάθε δοκιμή σε ομάδες (30 λεπτά), μία και δύο ώρες ύστερα από τη μεταφορά τους στις δεξαμενές παρατήρησης. Στο τέλος κάθε δοκιμής, γινόταν αναισθητοποίηση των ψαριών (2-φαινοξυ-αιθανόλη, 0,4 ml/L) και ακολουθούσε ατομικό ζύγισμα (ακρίβειας 0,1 g) και σωματομετρήσεις (με χρήση παχύμετρου, ακρίβειας 0,1 mm).

3.2.4 Καταγραφή και στατιστική επεξεργασία δεδομένων

Στις δοκιμές ατομικά, η προτίμηση των ψαριών εκτιμήθηκε με βάση το χρόνο που διέθεσε το ψάρι σε κάθε διαμέρισμα της δεξαμενής (καταγραφή με χρονόμετρο, % ολικού χρόνου παρατήρησης) και το χρόνο (σε δευτερόλεπτα) που διέθεσε σε κάθε διαμέρισμα ανά επίσκεψη. Επίσης, προσδιορίστηκε η συχνότητα εναλλαγής διαμερισμάτων (φορές/λεπτό). Στις ομαδικές δοκιμές, η προτίμηση των ψαριών εκτιμήθηκε μετρώντας τον αριθμό των ψαριών σε κάθε διαμέρισμα της δεξαμενής ανά

15 δευτερόλεπτα (% του ολικού αριθμού ψαριών). Από το κάθε video αναλύθηκαν 18 λεπτά (δοκιμές ατομικά) ή 28 λεπτά (δοκιμές σε ομάδες). Τα πρώτα δύο λεπτά του κάθε video απορρίφθηκαν ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα συνυπολογισμού της αναστάτωσης των ψαριών κατά την τοποθέτηση της κάμερας.

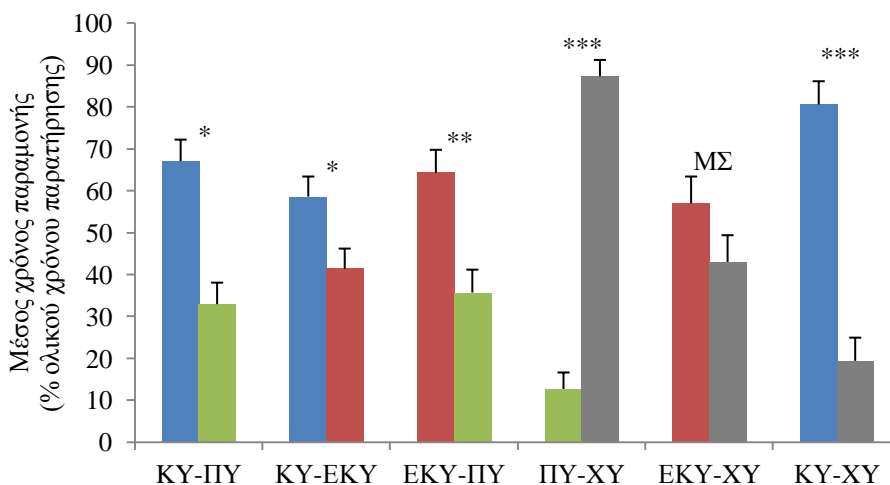
Τα δεδομένα αναλύθηκαν με paired t test ή μη παραμετρικό έλεγχο Wilcoxon sign-rank test σύμφωνα με την κανονική κατανομή των αποτελεσμάτων. Ο χρόνος σε δευτερόλεπτα που διέθεσε το ψάρι σε κάθε διαμέρισμα ανά επίσκεψη εκτιμήθηκε με μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς (one-way ANOVA). Χρησιμοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση διασποράς με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (two way repeated measures ANOVA) με τη χρήση γενικού γραμμικού μοντέλου (General Linear Model) για να αναλυθεί η επίδραση του χρόνου παρατήρησης στην προτίμηση των ψαριών και στη συχνότητα εναλλαγής διαμερισμάτων της δεξαμενής. Όλες οι παράμετροι ελέγχθηκαν για την ισχύ της κανονικότητας και της ομοιογένειας της διασποράς, ενώ έγιναν και οι απαραίτητες μετατροπές (π.χ. λογάριθμος, τετραγωνική ρίζα, κτλ). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο κείμενο και στους πίνακες αφορούν σε μέσους όρους \pm το τυπικό σφάλμα χωρίς μετατροπές.

3.3 Αποτελέσματα

Τόσο στις δοκιμές ατομικά όσο και σε ομάδες, ο χρόνος παρατήρησης (μία ή δύο ώρες μετά τη μεταφορά των ψαριών στις δεξαμενές παρατήρησης) δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά την προτίμηση των ψαριών ($P > 0,985$). Κατά τη διάρκεια των δοκιμών προτίμησης δεν παρατηρήθηκε συμπεριφορά διεκδίκησης κάποιας συγκεκριμένης περιοχής ή επιθετικότητα μεταξύ των ατόμων, ενώ τα ψάρια αλληλεπιδρούσαν με το υπόστρωμα χαλικιού. Ακόμη, σε καμία περίπτωση δε διαπιστώθηκε τα ψάρια να μένουν ακίνητα στις δεξαμενές ή στο διαμέρισμα που τελικά προτίμησαν.

3.3.1 Δοκιμές ατομικά

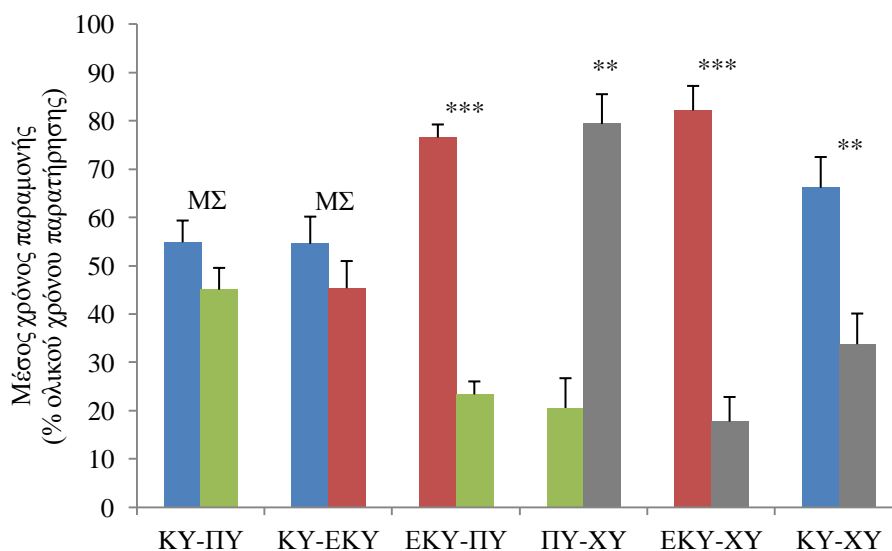
Στις δοκιμές ατομικά μεταξύ ενός υποστρώματος και της επέμβασης Χωρίς υπόστρωμα (συνδυασμοί ΠΥ-ΧΥ, ΕΚΥ-ΧΥ, ΚΥ-ΧΥ), τα ψάρια ηλικίας 2+ παρουσίασαν στατιστικά σημαντική προτίμηση υπέρ του ΚΥ, απέρριψαν το ΠΥ ενώ δεν επέλεξαν μεταξύ του συνδυασμού ΕΚΥ-ΧΥ (Διάγραμμα 15).



Διάγραμμα 15: Μέσος χρόνος παραμονής (% ολικού χρόνου παρατήρησης) ατόμων τσιπούρας ηλικίας 2+ σε διαμέρισμα δεξαμενής με Κυανό (ΚΥ), Ερυθροκαφέ, (ΕΚΥ) ή Πράσινο (ΠΥ) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ) σε όλους τους πιθανούς ανά δύο συνδυασμούς, σε δύο χρόνους παρατήρησης. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, ΜΣ: Μη Σημαντικό (n=10).

Στους συνδυασμούς μεταξύ δύο διαφορετικών υποστρωμάτων (συνδυασμοί ΚΥ-ΠΥ, ΚΥ-EKY, ΕΚΥ-ΠΥ), τα ψάρια της ίδιας ηλικίας (2+) προτίμησαν το ΚΥ όποτε υπήρχε ως επιλογή, ενώ απουσία του ΚΥ στο συνδυασμό ΕΚΥ-ΠΥ προτίμησαν το ΕΚΥ (Διάγραμμα 15).

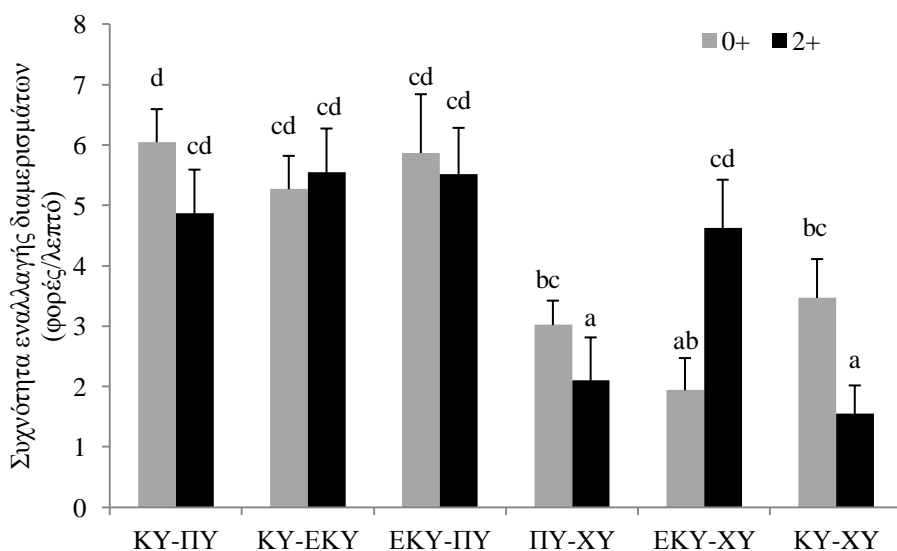
Τα ψάρια ηλικίας 0+, παρουσίασαν στατιστικά σημαντική προτίμηση στο ΚΥ ή ΕΚΥ όταν δίνονταν ως εναλλακτική επιλογή με την επέμβαση ΧΥ, ενώ απέρριψαν το ΠΥ υπέρ της επέμβασης ΧΥ (Διάγραμμα 16).



Διάγραμμα 16: Μέσος χρόνος παραμονής (% ολικού χρόνου παρατήρησης) ατόμων τσιπούρας ηλικίας 0+ σε διαμέρισμα δεξαμενής με Κυανό (KY), Ερυθροκαφέ, (EKY) ή Πράσινο (ΠΥ) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ) σε όλους τους πιθανούς ανά δύο συνδυασμούς, σε δύο χρόνους παρατήρησης. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, ΜΣ: Μη Σημαντικό ($n=10$).

Στις δοκιμές μεταξύ δύο διαφορετικών υποστρωμάτων τα ψάρια ηλικίας 0+ δεν διάλεξαν μεταξύ KY-ΠΥ και KY-EKY, ενώ παρουσίασαν στατιστικά σημαντική προτίμηση για το EKY στο συνδυασμό EKY-ΠΥ (Διάγραμμα 16).

Όσον αφορά στη συχνότητα εναλλαγής διαμερισμάτων, στους συνδυασμούς μεταξύ δύο υποστρωμάτων, όλα τα ψάρια ανεξαρτήτως ηλικίας, παρουσίασαν αυξημένη συχνότητα σε σχέση με τους συνδυασμούς μεταξύ υποστρώματος και ΧΥ (Διάγραμμα 17).



Διάγραμμα 17: Συχνότητα εναλλαγής διαμερισμάτων (φορές/ λεπτό) ατόμων τσιπούρας ηλικίας 0+ ή 2+ σε δεξαμενές με Κυανό (KY), Ερυθροκαφέ, (EKY) ή Πράσινο (ΠΥ) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (XY) σε όλους τους πιθανούς ανά δύο συνδυασμούς, σε δύο χρόνους παρατήρησης (n=10). Στήλες με ίδια τα γράμματα (a-d) δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (αλληλεπίδραση $P < 0,05$).

Ωστόσο, στους συνδυασμούς μεταξύ ενός υποστρώματος και της επέμβασης XY, τα ψάρια ηλικίας 0+ παρουσίασαν συχνότερες εναλλαγές στους συνδυασμούς KY-XY και ΠΥ-XY σε σχέση με τα ψάρια ηλικίας 2+, ενώ το αντίθετο παρουσιάστηκε για το συνδυασμό EKY-XY (Διάγραμμα 17).

Οι επισκέψεις των ψαριών ηλικίας 0+ και στα δύο διαμερίσματα των συνδυασμών KY-ΠΥ και KY-EKY ήταν μικρής διάρκειας (Πίνακας 16). Στις άλλες περιπτώσεις των συνδυασμών μεταξύ δύο υποστρωμάτων για τα ψάρια ηλικίας 0+ (EKY-ΠΥ) και για τα ψάρια ηλικίας 2+ (KY-ΠΥ, KY-EKY, EKY-ΠΥ), ο μέσος χρόνος παραμονής στο διαμέρισμα της επιλογής τους δεν ξεπέρασε το 1 λεπτό (Πίνακας 16). Ωστόσο, στην περίπτωση των συνδυασμών KY-XY και EKY-XY ο μέσος χρόνος παραμονής για τα ψάρια και των δύο ηλικιών στο διαμέρισμα της επιλογής τους ήταν διάρκειας μεταξύ ενός και έξι λεπτών, με εξαίρεση το συνδυασμό EKY-XY για τα ψάρια ηλικίας 2+ όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (Πίνακας 16). Στο συνδυασμό ΠΥ-XY, τα ψάρια και των δύο ηλικιών παρέμειναν στο διαμέρισμα XY για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, όπου στην περίπτωση των ψαριών ηλικίας 2+ διήρκεσε περίπου 9 ½ λεπτά (Πίνακας 16).

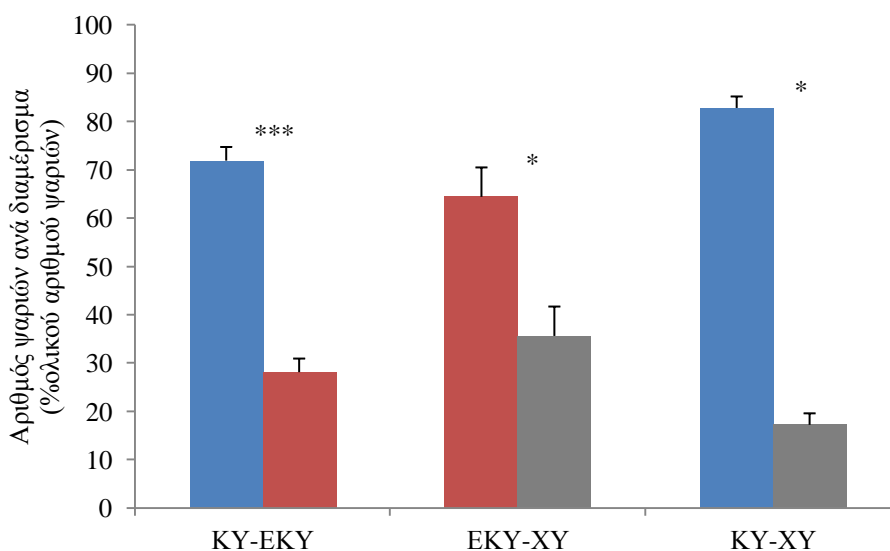
Πίνακας 16: Μέσος χρόνος παραμονής (sec) ανά επίσκεψη σε κάθε διαμέρισμα της δεξαμενής ατόμων τσιπούρας ηλικίας 0+ και 2+ σε ατομικές δοκιμές προτίμησης σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς ανά δύο (n=10).

Συνδυασμοί δοκιμών			P
Ηλικία 2+			
KY-ΠΥ	KY: 42,7±19,3	ΠΥ: 8,5±1,1	**
KY-EKY	KY: 41,8±26,4	EKY: 11,2±2,3	ΜΣ
EKY-ΠΥ	EKY: 12,6±2,2	ΠΥ: 8,2±1,5	**
ΠΥ-ΧΥ	ΠΥ: 2,2±0,7	ΧΥ: 570,4±111,3	***
EKY-ΧΥ	EKY: 9,9±0,8	ΧΥ: 11,1±2,0	ΜΣ
KY-ΧΥ	KY: 355,0±101,4	ΧΥ: 7,8±1,6	**
Ηλικία 0+			
KY-ΠΥ	KY: 9,3±0,7	ΠΥ: 9,3±1,3	ΜΣ
KY-EKY	KY: 14,2±2,4	EKY: 10,8±1,8	ΜΣ
EKY-ΠΥ	EKY: 25,8±4,9	ΠΥ: 4,0±0,2	***
ΠΥ-ΧΥ	ΠΥ: 5,0±0,9	ΧΥ: 44,9±9,4	***
EKY-ΧΥ	EKY: 336,7±105,8	ΧΥ: 6,6±1,3	***
KY-ΧΥ	KY: 57,8±19,5	ΧΥ: 11,9±2,2	*

KY: Κυανό Υπόστρωμα, ΠΥ: Πράσινο Υπόστρωμα, EKY: Ερυθροκαφέ Υπόστρωμα, ΧΥ: Χωρίς υπόστρωμα. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$, ΜΣ: Μη Σημαντικό.

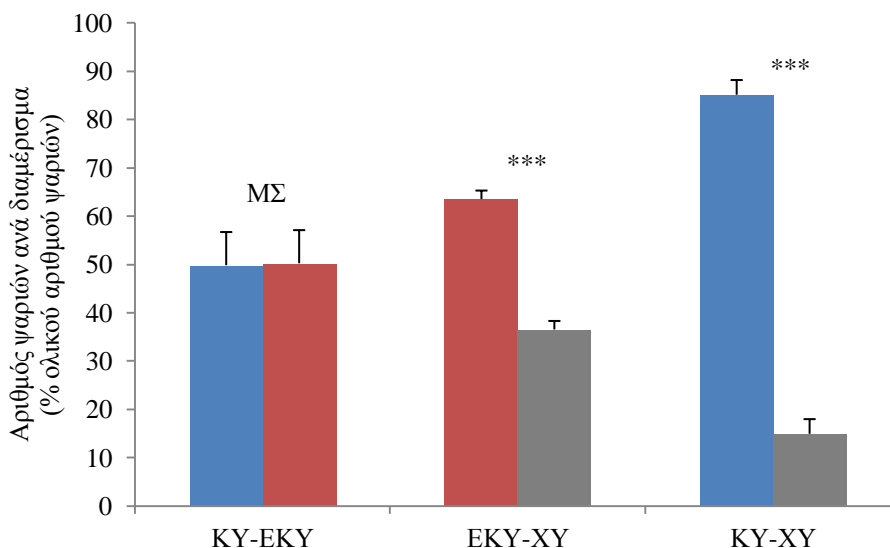
3.3.2 Δοκιμές σε ομάδες

Στις δοκιμές προτίμησης σε ομάδες, τα ψάρια ηλικίας 2+ προτίμησαν το KY και EKY έναντι της επέμβασης XY και το KY έναντι του EKY (Διάγραμμα 18).



Διάγραμμα 18: Προτίμηση [αριθμός ψαριών σε κάθε διαμέρισμα ανά 15 sec (% ολικού αριθμού ψαριών)] ατόμων τσιπούρας ηλικίας 2+ σε τμήματα δεξαμενής με Κυανό (KY) και Ερυθροκαφέ (EKY) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (XY) σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς ανά δύο σε δύο χρόνους παρατήρησης. * $P<0,05$, *** $P<0,001$ (n=3).

Όσον αφορά στα ψάρια ηλικίας 0+, αυτά προτίμησαν το ΚΥ και το ΕΚΥ έναντι της επέμβασης ΧΥ, ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην προτίμηση των ψαριών στο συνδυασμό ΚΥ-ΕΚΥ (Διάγραμμα 19).



Διάγραμμα 19: Προτίμηση [αριθμός ψαριών σε κάθε διαμέρισμα ανά 15 sec (% ολικού αριθμού ψαριών)] ατόμων τσιπούρας ηλικίας 0+ σε τμήματα δεξαμενής με Κυανό (ΚΥ) και Ερυθροκαφέ (ΕΚΥ) υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ) σε όλους τους πιθανούς συνδυασμούς ανά δύο σε δύο χρόνους παρατήρησης. *** $P < 0,001$, ΜΣ: Μη Σημαντικό (n=3).

3.4 Συζήτηση

Η προτίμηση των ψαριών σε δοκιμές ατομικά και σε ομάδες ήταν παρόμοια (δηλαδή είχαν κοινές προτιμήσεις), υποδεικνύοντας την έλλειψη της επίδρασης της κοινωνικότητας τουλάχιστον υπό τις παρούσες πειραματικές συνθήκες όπου δεν παρατηρήθηκε συμπεριφορά διεκδίκησης χώρου ή επιθετικότητα. Αντίστοιχα, άτομα του είδους *Danio rerio* παρουσίασαν ίδιες προτιμήσεις σχηματισμού ομάδας είτε δοκιμάστηκαν ατομικά ή σε ομάδες (Polverino et al., 2012). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ενδεχομένως ότι οι δοκιμές ατομικά είναι αντιπροσωπευτικές της επιλογής τουλάχιστον μικρών ομάδων ψαριών.

Στην περίπτωση των δοκιμών των τριών υποστρωμάτων με την επέμβαση Χωρίς υπόστρωμα, παρατηρήθηκε σαφής προτίμηση του Κυανού και Ερυθροκαφέ υποστρώματος παρά το γεγονός ότι τα ψάρια ήταν εγκλιματισμένα για μεγάλο χρονικό διάστημα σε δεξαμενές χωρίς υπόστρωμα. Η προηγούμενη εμπειρία ή εξοικείωση με μία συγκεκριμένη συνθήκη είναι σημαντικός παράγοντας που καθορίζει το αποτέλεσμα μιας δοκιμής προτίμησης (Gómez-Laplaza and Fuente, 2007; Petherick et al., 1990). Ωστόσο, στη συγκεκριμένη περίπτωση τα ψάρια επέλεξαν ένα εναλλακτικό περιβάλλον που ενδεχομένως γίνεται αντιληπτό ως εγγύτερο του φυσικού τους. Η εξήγηση αυτή δε φαίνεται να ισχύει για το Πράσινο υπόστρωμα αφού τα ψάρια το απέρριπταν επανειλημμένα υποδηλώνοντας την εμπλοκή του χρώματος του υποστρώματος εκτός

από τη φυσική του παρουσία. Σύμφωνα με μελέτες σχετικά με την προτίμηση των ψαριών για το χρώμα του περιβάλλοντός τους (χρώμα φωτός ή χρώμα δεξαμενής), παρατηρήθηκαν σαφείς επιλογές από διάφορα είδη (Avdesh et al., 2012; Luchiani and Pirhonen, 2008; Ullmann et al., 2011). Για παράδειγμα, άτομα του είδους *Danio rerio* προτιμούν το ερυθρό ή πράσινο χρώμα φωτός και αποφεύγουν το κυανό (Avdesh et al., 2012), ενώ άτομα του είδους *Lates calcarifer* προτιμούν το κυανό ή πράσινο χρώμα δεξαμενών έναντι του ερυθρού και του κίτρινου (Ullmann et al., 2011).

Στις δοκιμές επιλογής μεταξύ δύο διαφορετικών υποστρωμάτων, τα ψάρια και των δύο ηλικιών διάλεξαν το Ερυθροκαφέ έναντι του Πράσινου υποστρώματος. Ωστόσο, τα μεγαλύτερα ψάρια επέλεξαν το Κυανό υπόστρωμα έναντι του Ερυθροκαφέ ή Πράσινου ενώ στα νεαρά δεν παρατηρήθηκε κάποια προτίμηση. Αντίθετα με τα αποτελέσματα αυτά, για τον μπακαλιάρο του Ατλαντικού *Gadus morhua* παρατηρήθηκε ότι άτομα δύο διαφορετικών ηλικιών (0+ και 1+) διάλεξαν εξίσου άμμο έναντι χαλικιού ή βότσαλου (Fraser et al., 1996) ανεξάρτητα με την ηλικία τους. Ακόμη, άτομα ηλικίας 0+ και 1+ του είδους *Pseudopleuronectes americanus* παρουσίασαν την ίδια προτίμηση για βότσαλο έναντι της άμμου (Pappal et al., 2012). Στο παρόν πείραμα η μεγαλύτερη διαφορά ηλικίας μεταξύ των ατόμων που μελετήθηκαν ενδέχεται να έχει συμβάλει στη διαφοροποίηση της προτίμησης.

Επίσης, άλλοι παράγοντες όπως το φύλο ή/και η οπτική ικανότητα της τσιπούρας μπορεί να εμπλέκονται. Είναι γνωστό ότι η τσιπούρα είναι πρώτανδρο ερμαφρόδιτο είδος. Το χρονικό διάστημα κατά το οποίο πραγματοποιείται η αναστροφή των αρσενικών σε θηλυκά άτομα εξαρτάται από το σωματικό μήκος/βάρος, την ηλικία ή/και το περιβάλλον. Η αναστροφή της τσιπούρας σε θηλυκά έχει αναφερθεί ύστερα από το δεύτερο έτος ηλικίας με μήκος σώματος τουλάχιστον 26 cm (Basurco et al., 2011b; Bruslé-Sicard and Fourcault, 1997; Chaoui et al., 2006; Emre et al., 2009). Τα ψάρια του παρόντος πειράματος δε θανατώθηκαν και το φύλο τους δεν προσδιορίστηκε, αλλά από το μήκος τους (17 cm) δεν αναμενόταν να έχει αρχίσει η αναστροφή του φύλου. Αναγνωρίζοντας ότι σε άλλα είδη ζώων το φύλο έχει αναφερθεί να επηρεάζει την προτίμηση για τις συνθήκες διαβίωσης (Blom et al., 1995), η εμπλοκή του φύλου στα αποτελέσματα δεν μπορεί να αποκλειστεί. Επιπλέον, διαφορές που σχετίζονται με την ηλικία και τις οπτικές ικανότητες του είδους μπορεί επίσης να έχουν εμπλακεί στα αποτελέσματα. Τα ψάρια συνεχίζουν να μεγαλώνουν κατά τη διάρκεια της ζωής τους και το ίδιο ισχύει και για τους οφθαλμούς τους προκαλώντας αλλαγές στη δομή του αμφιβληστροειδούς χιτώνα και στην οπτική οξύτητα (Fernald, 1991). Παρά την έλλειψη δεδομένων σχετικά με τις οπτικές ικανότητες της τσιπούρας, η αντίληψη για κάθε υπόστρωμα ενδέχεται να μην είναι η ίδια μεταξύ νεαρών και μεγαλύτερων ατόμων. Άρα τα ψάρια ηλικίας 0+ ενδεχομένως να μην μπορούν να διακρίνουν τη διαφορά μεταξύ του Κυανού και των άλλων υποστρωμάτων.

Στις δοκιμές επιλογής μεταξύ δύο διαφορετικών υποστρωμάτων, παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα εναλλαγής διαμερισμάτων για τα ψάρια και των δύο ηλικιών. Η έντονη κολυμβητική δραστηριότητα των ψαριών όταν συναντούν ένα καινούργιο περιβάλλον συνήθως υποδηλώνει αυξημένη εξερευνητική συμπεριφορά που όμως

ελαττώνεται εντός τεσσάρων ωρών [π.χ. *Poecilia reticulata* (Mikheev and Andreev, 1993) και *Gambusia holbrooki* (Ward, 2012)]. Ωστόσο η διάρκεια του εγκλιματισμού των ψαριών στις παρούσες πειραματικές συνθήκες δε δικαιολογεί μια τέτοια εξήγηση. Τα αποτελέσματα ενδεχομένως υποδεικνύουν ότι τα ψάρια ήταν πιο ανήσυχα όταν έρχονταν σε επαφή με δύο καινούργια υποστρώματα (Benhaïm et al., 2013) σε σχέση με τη δοκιμή κάποιου υποστρώματος με την επέμβαση ΧΥ. Η παρουσία του διαμερίσματος Χωρίς υπόστρωμα με το οποίο τα ψάρια ήταν εξοικειωμένα πιθανόν διευκόλυνε την εκδήλωση σαφούς προτίμησης. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι η μειωμένη εναλλαγή διαμερίσματος ή η αυξημένη ακινησία των ψαριών μπορεί επίσης να υποδηλώνει ανησυχία (Ahmad and Richardson, 2013; Blaser and Rosemberg, 2012). Παρ' όλα αυτά αν και τα ψάρια άλλαζαν διαμέρισμα λιγότερο συχνά στις περιπτώσεις των δοκιμών κάποιου υποστρώματος με την επέμβαση Χωρίς υπόστρωμα, κολυπούσαν σε όλο το διαθέσιμο χώρο του διαμερίσματος που τελικά διάλεξαν.

Συνεκτιμώντας τα αποτελέσματα των δοκιμών προτίμησης και τη μακροχρόνια επίδραση των υποστρωμάτων (Κεφάλαια Δ1 και Δ2) προκύπτουν οι παρακάτω παρατηρήσεις. Αρχικά, τα μεγαλύτερα ψάρια αυτού του πειράματος προτίμησαν το Κυανό υπόστρωμα όποτε δινόταν ως επιλογή και η μακροχρόνια εκτροφή ατόμων του ίδιου μεγέθους τσιπούρας με Κυανό υπόστρωμα αποδείχθηκε η πιο ευεργετική για τα ψάρια και την εντατική εκτροφή τους. Αφ' ετέρου, η μακροχρόνια εκτροφή ατόμων ηλικίας 0+ με Κυανό υπόστρωμα αποδείχθηκε εξίσου ευεργετική παρά το γεγονός ότι τα νεαρά άτομα δεν επέλεξαν πάντα το υπόστρωμα αυτό. Επιπλέον, το Πράσινο υπόστρωμα απορρίφθηκε σχεδόν σε όλες τις δοκιμές, ενώ η μακροχρόνια εκτροφή της τσιπούρας με το υπόστρωμα αυτό δεν παρουσίασε σημαντικές διαφοροποιήσεις από την επέμβαση Χωρίς υπόστρωμα. Ακόμη, τα μεγαλύτερα ψάρια του παρόντος πειράματος επέλεξαν το Ερυθροκαφέ υπόστρωμα μόνο στην περίπτωση που δε δινόταν το Κυανό ως επιλογή, ενώ η ανάπτυξη και η συμπεριφορά σε μακροχρόνιο πείραμα με Ερυθροκαφέ υπόστρωμα ήταν παρόμοια με αυτή των ψαριών που εκτράφηκαν με Κυανό. Όσον αφορά στα ψάρια ηλικίας 0+, το Ερυθροκαφέ υπόστρωμα προτιμήθηκε μόνο σε ορισμένους συνδυασμούς, ενώ στο συνδυασμό Ερυθροκαφέ-Κυανό υπόστρωμα τα ψάρια δεν είχαν καμία προτίμηση είτε δοκιμάστηκαν ατομικά είτε σε ομάδες. Η μακροχρόνια εκτροφή των ψαριών με Ερυθροκαφέ υπόστρωμα ήταν εξίσου ασαφής, αφού ήταν ευεργετική για τα ψάρια (μείωση της επιθετικότητας) αλλά όχι για την εντατική εκτροφή τους (δεν προήγαγε την ανάπτυξη).

Παρόμοιες αντιπαραθέσεις της προτίμησης των ψαριών με τη μακροχρόνια επίδραση της συγκεκριμένης επιλογής έχουν αναφερθεί και σε άλλα είδη. Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε βελτίωση της ανάπτυξης για την ιριδίζουσα πέστροφα *Oncorhynchus mykiss* όταν εκτράφηκε σε πράσινο χρώμα φωτός που το είχε διαλέξει σε δοκιμή προτίμησης (Luchiarì and Pirhonen, 2008). Αντίθετα, ψάρια του είδους *Lates calcarifer* παρουσίασαν καλύτερη ανάπτυξη σε ερυθρό χρώμα δεξαμενής ενώ σε δοκιμή προτίμησης διάλεξαν το κυανό και το πράσινο χρώμα δεξαμενής (Ullmann et al., 2011).

4. Πείραμα 4

Διερεύνηση της φύσης της θετικής επίδρασης του Κυανού υποστρώματος στην ελεγχόμενη εκτροφή της τσιπούρας



4.1 Εισαγωγή - Σκοπός

Ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος περιλαμβάνει τροποποιήσεις του περιβάλλοντος διαβίωσης των ζώων που βρίσκονται σε αιχμαλωσία με σκοπό να βελτιώσει την ευζωία τους (Newberry, 1995; Shepherdson et al., 1998).

Για την τσιπούρα η χρήση του υποστρώματος ως μέσο εμπλουτισμού του περιβάλλοντος διαβίωσης επιβεβαιώθηκε σε προηγούμενα πειράματα (Κεφάλαια Δ1 και Δ2). Πιο συγκεκριμένα, η εκτροφή ατόμων τσιπούρας (ηλικίας 1+) σε δεξαμενές με Κυανό ή Ερυθροκαφέ υπόστρωμα οδήγησε σε καλύτερη ανάπτυξη και μειωμένη επιθετικότητα, ενώ στην περίπτωση των ψαριών που εκτράφηκαν με Κυανό υπόστρωμα παρουσιάστηκε και καλύτερη ποιότητα ραχιαίου μυϊκού ιστού σε σχέση με τα ψάρια των δεξαμενών με Πράσινο υπόστρωμα και Χωρίς υπόστρωμα (Κεφάλαιο Δ1). Επιπλέον, η θετική επίδραση του Κυανού υποστρώματος διατηρήθηκε όταν άτομα τσιπούρας (ηλικίας 0+) εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα σε δύο διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής, αντίθετα με τα ψάρια που εκτράφηκαν με Ερυθροκαφέ υπόστρωμα ή Χωρίς υπόστρωμα (Κεφάλαιο Δ2). Τέλος, όταν στην τσιπούρα δόθηκε η δυνατότητα να επιλέξει διαμέρισμα με διαφορετικού χρώματος υποστρώματα (Κυανό, Ερυθροκαφέ, Πράσινο) ή/και Χωρίς υπόστρωμα, παρατηρήθηκε σαφής προτίμηση του Κυανού υποστρώματος σε άτομα ηλικίας 2+ (Κεφάλαιο Δ3).

Τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων υποδεικνύουν ξεκάθαρα την εμπλοκή του χρώματος του υποστρώματος εκτός της φυσικής του παρουσίας στα παραγωγικά χαρακτηριστικά και τη συμπεριφορά των ψαριών. Επιπλέον, δεν μπορεί να αγνοηθεί το γεγονός ότι η προσθήκη υποστρώματος στον πυθμένα της δεξαμενής διαφοροποίησε την αντανάκλαση του φωτός από τον πυθμένα και συνεπώς τροποποίησε τις συνθήκες φωτισμού του περιβάλλοντος των ψαριών. Πιο συγκεκριμένα, οι δεξαμενές με υπόστρωμα φαίνονταν πιο σκούρες για έναν εξωτερικό παρατηρητή, παρά το κοινό προσπίπτον φως (ένταση, μήκος κύματος, κατεύθυνση) στην επιφάνεια του νερού των δεξαμενών. Ωστόσο, σε ποιο βαθμό αυτή η αλλαγή μπορεί να γίνει αντιληπτή από το οπτικό σύστημα των ψαριών δεν είναι γνωστό. Είναι όμως γνωστό ότι το χρώμα του περιβάλλοντος (χρώμα φωτός ή χρώμα δεξαμενής) μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη, τη φυσιολογία (Karakatsouli et al., 2007a; Karakatsouli et al., 2007b) και τη συμπεριφορά των ψαριών (Merighe et al., 2004; Sabri et al., 2012). Επιπλέον, είναι γενικά αποδεκτό ότι η ένταση φωτισμού επηρεάζει πολλές παραμέτρους της βιολογίας των ψαριών (π.χ. Castro and Caballero, 2004; Han et al., 2005) καθώς επίσης ότι ο αμφιβληστροειδής χιτώνας του οφθαλμού τους προσαρμόζεται στις αλλαγές των συνθηκών φωτισμού του περιβάλλοντος (Shand, 1997; Taylor et al., 2011). Ως συνέπεια των παραπάνω προβληματισμών και λαμβάνοντας υπόψη την προτίμηση της τσιπούρας και την επαναλαμβανόμενη θετική επίδραση του Κυανού υποστρώματος στην τσιπούρα, προέκυψε η ανάγκη να αποσαφηνιστεί η συνιστώσα εκείνη του Κυανού υποστρώματος (δηλαδή το χρώμα ή/και η παρουσία ή/και οι τροποποιήσεις των συνθηκών φωτισμού του περιβάλλοντος) στην οποία οφείλεται κυρίως η θετική του επίδραση.

Σκοπός του παρόντος πειράματος ήταν να διευκρινιστεί η φύση της θετικής επίδρασης του Κυανού υποστρώματος (φυσική παρουσία ή/και χρώμα) και η πιθανή εμπλοκή του φωτεινού περιβάλλοντος.

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την πραγματοποίηση του πειράματος έγινε προμήθεια νεαρών ατόμων τσιπούρας *Sparus aurata* τα οποία παρέμειναν σε εργαστηριακές συνθήκες (δεξαμενές με υάλινο πυθμένα) για τουλάχιστον έξι μήνες. Χρησιμοποιήθηκαν 162 άτομα μέσου αρχικού βάρους $20,2 \pm 0,26$ g (ηλικίας 0+) τα οποία διανεμήθηκαν τυχαία σε εννέα δεξαμενές που περιγράφονται στο Υποκεφάλαιο Δ2.2.1, σε ομάδες των 18 ατόμων [αρχική πυκνότητα εκτροφής $4,1 \text{ kg/m}^3$, αρχική παραλλακτικότητα βάρους 16,5% έως 17,3% ($P > 0,05$)]. Τα ψάρια σημάνθηκαν με κόψιμο των πτερυγίων (fin clipping) για να εκτιμηθούν ατομικά τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης. Η σήμανση πραγματοποιούνταν με μερικό κόψιμο ενός πτερυγίου (εκτός του ουραίου) ή σε συνδυασμούς δύο πτερυγίων. Εφαρμόστηκαν τρεις επεμβάσεις (τρεις επαναλήψεις/επέμβαση) και συγκεκριμένα Κυανό Υπόστρωμα, Φωτογραφία του Κυανού Υποστρώματος και δεξαμενές Χωρίς υπόστρωμα (υάλινος πυθμένας) – KY, ΦKY και XY αντίστοιχα. Το KY που προστέθηκε στις δεξαμενές περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.1. Για να απομονωθεί η «παρουσία» από το «χρώμα» του KY και να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή απεικόνισή του, χρησιμοποιήθηκε η φωτογραφία του (όπως παρέχεται από τον κατασκευαστή, Εικόνα 4). Η προσθήκη άχρωμου υποστρώματος, αν και ήταν διαθέσιμο ως υλικό, προκάλούσε έναν υπόλευκο χρωματισμό στον πυθμένα της δεξαμενής που διέφερε από το χρώμα του πυθμένα των δεξαμενών XY. Η φωτογραφία εκτυπώθηκε σε αδιάβροχο υλικό και τοποθετήθηκε κάτω από τον υάλινο πυθμένα της δεξαμενής. Οι δεξαμενές μάρτυρες παρέμειναν άδειες (υάλινος πυθμένας).



Εικόνα 4: Φωτογραφία του Κυανού υποστρώματος όπως δίνεται από τον κατασκευαστή (www.votsalo.net).

Τα ψάρια παρέμειναν σε πειραματικές συνθήκες για 75 ημέρες. Η χορήγηση της τροφής στα ψάρια γινόταν με το χέρι. Χρησιμοποιήθηκε εμπορικό σιτηρέσιο κατάλληλο για το είδος και την ηλικία (Υποκεφάλαιο Δ2.2.1). Η ποσότητα της τροφής

που χορηγήθηκε ήταν 2,5% του ζώντος βάρους που προοδευτικά μειώθηκε σε 1,5% σύμφωνα με τη βιομάζα και τη θερμοκρασία του νερού (Lupatsch and Kissil, 1998). Γινόταν ατομικό ζύγισμα κάθε δύο εβδομάδες και η ποσότητα της τροφής προσαρμοζόταν ανάλογα. Κατά τη διάρκεια του πειράματος δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα.

Οι πειραματικές δεξαμενές ήταν μέρος ενός ημίκλειστου συστήματος θαλασσινού νερού όπως περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο Δ2.2.1. Η παροχή του νερού ήταν 2 L/min/kg και προσαρμοζόταν ανάλογα με τη βιομάζα των ψαριών. Όλες οι δεξαμενές καθαρίζονταν επιμελώς μία φορά την εβδομάδα (Υποκεφάλαιο Δ1.2.1) και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού ελέγχονταν καθημερινά (πριν το 1^ο γεύμα) όπως περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.1. Η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε σε 12 ώρες φως προς 12 ώρες σκοτάδι, ενώ η ένταση του φωτισμού προσαρμόστηκε στα $231 \pm 6,3$ lx στην επιφάνεια κάθε δεξαμενής. Ως πηγή φωτισμού χρησιμοποιήθηκαν λάμπες λευκού φωτός (cool white fluorescence lamps) σε απόσταση ύψους ενός μέτρου από την επάνω πλευρά και 5 cm από την μπροστινή πλευρά της κάθε δεξαμενής.

Όπως ήταν αναμενόμενο η προσθήκη του ΚΥ στον πυθμένα της δεξαμενής έκανε το περιβάλλον των ψαριών πιο σκούρο σε σχέση με τις δεξαμενές του Χωρίς υπόστρωμα (Εικόνα 5). Ακόμη, η προσθήκη της φωτογραφίας δημιούργησε ένα πιο σκούρο πυθμένα χωρίς εμφανείς αλλαγές στις συνθήκες φωτισμού (Εικόνα 5). Αφού το προσπίπτον φως ήταν κοινό σε όλες τις δεξαμενές οι αλλαγές αυτές που παρατηρήθηκαν σχετίζονται με τις διαφορετικές αντανακλάσεις του φωτός από τον πυθμένα της δεξαμενής. Παρά το γεγονός ότι δεν ήταν διαθέσιμος ο κατάλληλος εξοπλισμός ώστε να μετρηθούν οι ακριβείς συνθήκες φωτισμού εντός της δεξαμενής, η απομόνωση ενός τέτοιου παράγοντα πειραματικά δεν είναι εφικτός. Η παρουσία των πολλών ψηφίδων/σωματιδίων του υποστρώματος προκαλεί διάχυτη αντανάκλαση του φωτός σε αντίθεση με την κατοπτρική αντανάκλαση του φωτός που προκαλείται στους λείους πυθμένες των δεξαμενών με ΦΚΥ ή ΧΥ. Για να εκτιμηθεί η πιθανή εμπλοκή των αλλαγών του φωτεινού περιβάλλοντος στην επίδραση του ΚΥ στα ψάρια, επιλέχθηκε ένας έμμεσος τρόπος προσέγγισης, δηλαδή να διερευνηθεί πως το ψάρι αντιλαμβάνεται τις αλλαγές αυτές. Η διερεύνηση αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω ιστολογικών αναλύσεων του αμφιβληστροειδούς χιτώνα. Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας των ψαριών προσαρμόζεται στις αλλαγές των συνθηκών φωτισμού του περιβάλλοντος (Shand, 1997; Taylor et al., 2011) και οι όποιες παρούσες αλλαγές αναμένεται να αντικατοπτριστούν στη δομή του.



Εικόνα 5: Πειραματικές δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (α), Φωτογραφία του Κυανού υποστρώματος (β) και Χωρίς υπόστρωμα (γ).

4.2.2 Παρατηρήσεις επιθετικής συμπεριφοράς

Η επιθετική συμπεριφορά καταγράφηκε σε video από την 57^η ως την 71^η ημέρα εκτροφής όπως περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.2. Οι ημέρες λήψης video ήταν περιορισμένες αφού σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενου πειράματος (Υποκεφάλαιο Δ1.2.2.) η επιθετικότητα δε διαφοροποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου. Από το πρόγραμμα των λήψεων προέκυψαν συνολικά 14 video/δεξαμενή (ή 42 video/επέμβαση). Η επιθετικότητα εκτιμήθηκε από το συνολικό αριθμό των επιθετικών ενεργειών, δηλαδή του κυνηγητού, των τσιμπημάτων ή των δαγκωμάτων μεταξύ των ψαριών. Τα δεδομένα αναφέρονται στο σύνολο των ψαριών αφού η σήμανσή τους δεν επέτρεψε μέσω των λήψεων του video την αναγνώριση του ψαριού που δεχόταν ή πραγματοποιούσε μια επίθεση.

4.2.3 Δειγματοληψία και αναλύσεις

Οι αναλύσεις των νιτροδών ιόντων και της ολικής αμμωνίας περιγράφονται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.3.

Στο τέλος της πειραματικής όλα τα ψάρια θανατώθηκαν (2-φαινοξυ-αιθανόλη, 1,5 ml/L) και ζυγίστηκαν ατομικά (ακρίβεια ζυγού 0,01 g), ενώ πραγματοποιήθηκαν και σωματομετρήσεις (με χρήση παχύμετρου, ακρίβειας 0,1 mm).

Σε έξι ψάρια από κάθε ομάδα αφαιρέθηκε ο αριστερός οφθαλμός για περαιτέρω ιστολογικές αναλύσεις. Ο οφθαλμός διατηρήθηκε σε διάλυμα φορμαλδεΐδης και γλουτεράλδεΐδης 4:1 ώστε να σταθεροποιηθεί ο ιστός. Οι οφθαλμοί αφυδατώθηκαν σταδιακά με διάλυμα αιθανόλης (70-96%) και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε πολυμεριζόμενη ρητίνη (methacrylate resin, Technovit 7100[®], Heraeus Kulzer, Germany). Με τη βοήθεια μικροτόμου (Reichert Jung, Biocut 2035, Germany) πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές τομές των 3 μm. Στις τομές έγινε χρώση με Μπλε του μεθυλενίου (Methylene Blue, Sigma, Germany), Azure II (Sigma, Germany)/Basic Fuchsin (Polysciences, USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Bennett et al. (1976). Σε κάθε οφθαλμό έγινε λήψη μικροφωτογραφιών με μεγέθυνση x40 από κάθε τομή σε

διαφορετικές περιοχές του. Οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με τη βοήθεια λογισμικού (Image J, NIH, USA). Προσδιορίστηκε ο αριθμός των κωνίων, ραβδίων, οριζόντιων, δίπολων, βραχύνων και γαγγλιακών κυττάρων σε έξι διαφορετικά τμήματα μήκους 100 μ (τρία από την περιοχή των οσφρητικών πόρων και τρία από την περιοχή του κορμού του σώματος). Επίσης, ο λόγος των κωνίων προς τα ραβδία και οι λόγοι που εκτιμούν το βαθμό σύγκλισης των κωνίων ή των ραβδίων προς τα γαγγλιακά κύτταρα υπολογίστηκαν ως δείκτες της όρασης σε συνθήκες υψηλής ή χαμηλής φωτεινότητας (φωτοπική ή σκοτοπική όραση) (Shand, 1997).

4.2.4 Υπολογισμοί και ανάλυση δεδομένων

Υπολογίστηκαν ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, η επί % αύξηση του ζώντος βάρους και ο συντελεστής ευρωστίας για το κάθε ψάρι καθώς επίσης ο συντελεστής παραλλακτικότητας του βάρους και ο συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής για το σύνολο των ψαριών της κάθε δεξαμενής όπως περιγράφονται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.4.

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με μονοπαραγοντική εγκιβωτισμένη ανάλυση διασποράς (one way nested analysis of variance-ANOVA) με τη χρήση γενικού γραμμικού μοντέλου (General Linear Model). Η δεξαμενή χρησιμοποιήθηκε ως τυχαίος εγκιβωτισμένος παράγοντας (random nested factor) για να συνυπολογιστεί η επίδραση της δεξαμενής στις επεμβάσεις. Στην περίπτωση των δεδομένων της επιθετικότητας, ο χρόνος παρατήρησης χρησιμοποιήθηκε επίσης ως τυχαίος εγκιβωτισμένος παράγοντας μεταξύ των επεμβάσεων. Η επίδραση της επέμβασης θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική όταν $P < 0,05$. Όλες οι παράμετροι ελέγχθηκαν για την ισχύ της κανονικότητας και της ομοιογένειας της διασποράς, ενώ έγιναν και οι απαραίτητες μετατροπές (π.χ. λογάριθμος, τετραγωνική ρίζα, κτλ). Για την σύγκριση των μέσων όρων χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Duncan. Οι τιμές που παρουσιάζονται στο κείμενο και στους πίνακες είναι μέσες τιμές \pm τυπικό σφάλμα χωρίς μετατροπές.

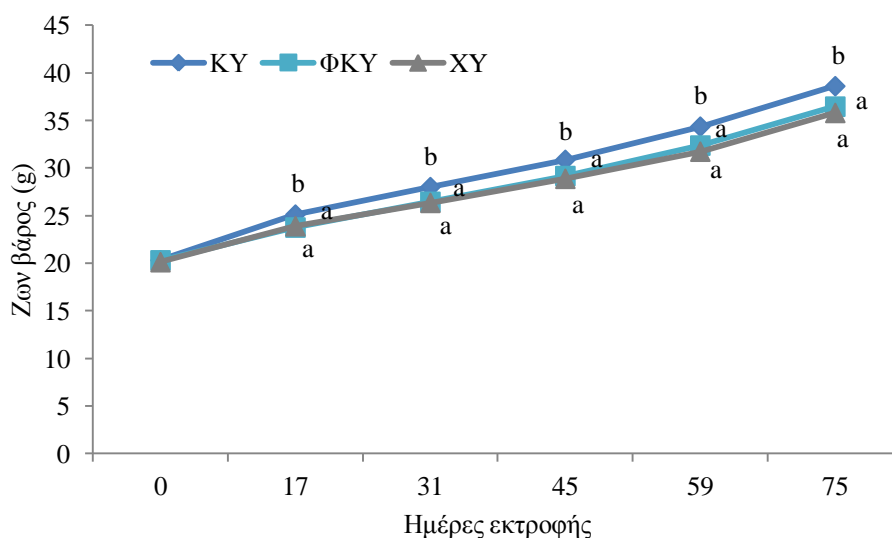
4.3 Αποτελέσματα

4.3.1 Ποιότητα νερού

Τα αποτελέσματα της ποιότητας του νερού δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των επεμβάσεων εκτός από την περίπτωση της περιεκτικότητας του νερού σε νιτρώδη ιόντα. Οι τιμές διατηρήθηκαν ως εξής: θερμοκρασία $16,9 \pm 0,02$ °C, δεσμευμένο οξυγόνο $7,3 \pm 0,02$ mg/L (κορεσμός $93 \pm 0,3\%$), pH $7,36 \pm 0,012$, αλατότητα $34,6 \pm 0,03$ g/L, ολική αμμωνία $0,17 \pm 0,006$ mg/L, τοξική αμμωνία $0,001 \pm 0,0001$ mg/L. Ωστόσο, η περιεκτικότητα του νερού σε νιτρώδη ιόντα (mg/L) ήταν αυξημένη στις δεξαμενές με υπόστρωμα σε σχέση με τις δεξαμενές με ΦΚΥ και ΧΥ [($P=0,0$) KY: $0,101 \pm 0,0055$, ΦΚΥ: $0,055 \pm 0,0013$, ΧΥ: $0,057 \pm 0,0008$].

4.3.2 Ανάπτυξη

Το τελικό ζων βάρος των ψαριών στις δεξαμενές με ΚΥ ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό των ψαριών στις δεξαμενές με ΦΚΥ και ΧΥ (Διάγραμμα 20). Οι διαφορές του ζώντος βάρους για τα ψάρια των δεξαμενών με ΚΥ ήταν εμφανείς από τη 17^η ημέρα εκτροφής και μέχρι το τέλος του πειράματος (Διάγραμμα 20).



Διάγραμμα 20: Ζων βάρος ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (ΚΥ), Φωτογραφία του Κυανού υποστρώματος (ΦΚΥ) ή Χωρίς υπόστρωμα/φωτογραφία (ΧΥ) για 75 ημέρες (n=3).

Η % αύξηση του ζώντος βάρους (ημέρες 0-17) και ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (ημέρες 0-17) είχαν στατιστικά υψηλότερες τιμές στις δεξαμενές με ΚΥ σε σχέση με τις δεξαμενές με ΦΚΥ και ΧΥ (Πίνακας 17). Επίσης, τα ψάρια στις δεξαμενές με ΚΥ παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές στο συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής (ημέρες 0-17) σε σχέση με τα ψάρια στις δεξαμενές με ΦΚΥ και ΧΥ (Πίνακας 17). Λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο της πειραματικής περιόδου (ημέρες 0-75) παρατηρείται ότι για τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης και το συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής τα ψάρια του ΚΥ παρουσιάζουν καλύτερες τιμές σε σχέση με τα ψάρια των δεξαμενών ΧΥ ενώ τα ψάρια στις δεξαμενές με ΦΚΥ έχουν ενδιάμεσες τιμές (Πίνακας 17). Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές διαφορές κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου στους δείκτες της ανάπτυξης (ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, επί % αύξηση του βάρους, συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται για το ολικό και σταθερό μήκος (Πίνακας 17). Ο συντελεστής ευρωστίας δεν επηρεάστηκε από τις επεμβάσεις (Πίνακας 17), όπως και ο συντελεστής παραλλακτικότητας του τελικού βάρους που οι τιμές του κυμάνθηκαν από 16,3 έως 18,2 % ($P>0,05$).

Πίνακας 17: Χαρακτηριστικά ανάπτυξης τσιπούρας που εκτράφηκε σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (ΚΥ), τη Φωτογραφία του Κυανού υποστρώματος (ΦΚΥ) ή Χωρίς υπόστρωμα/φωτογραφία (ΧΥ) για 75 ημέρες (n=3).

	Επεμβάσεις			P
	ΚΥ	ΦΚΥ	ΧΥ	
SGR (ημέρες 0-17)	1,25±0,029 b	0,93±0,027 a	1,02±0,025 a	***
SGR (ημέρες 0-75)	0,84±0,011 b	0,77±0,016 ab	0,75±0,035 a	*
WG (ημέρες 0-17)	23,77±0,588 b	17,31±0,561 a	19,07±0,526 a	***
WG (ημέρες 0-75)	90,65±0,677 b	80,79±0,506 a	79,18±4,121 a	*
FCR (ημέρες 0-17)	1,30±0,035 a	1,78±0,058 b	1,63±0,039 b	**
FCR (ημέρες 0-75)	1,54±0,022 a	1,67±0,017 ab	1,72±0,059 b	*
Ολικό μήκος (cm)	13,2±0,09 b	13,1±0,10 ab	12,9±0,09 a	*
Σταθερό μήκος (cm)	11,5±0,08 b	11,3±0,09 ab	11,2±0,09 a	*
Συντελεστής ευρωστίας	1,66±0,012	1,64±0,013	1,68±0,014	ΜΣ

SGR: Ειδικός Ρυθμός Ανάπτυξης, WG: % Αύξηση βάρους, FCR: Συντελεστής Εκμετάλλευσης της Τροφής, Τ.Σ.: Τυπικό Σφάλμα, * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$, ΜΣ: Μη Σημαντικό

4.3.3 Δομή αμφιβληστροειδούς χιτώνα οφθαλμού

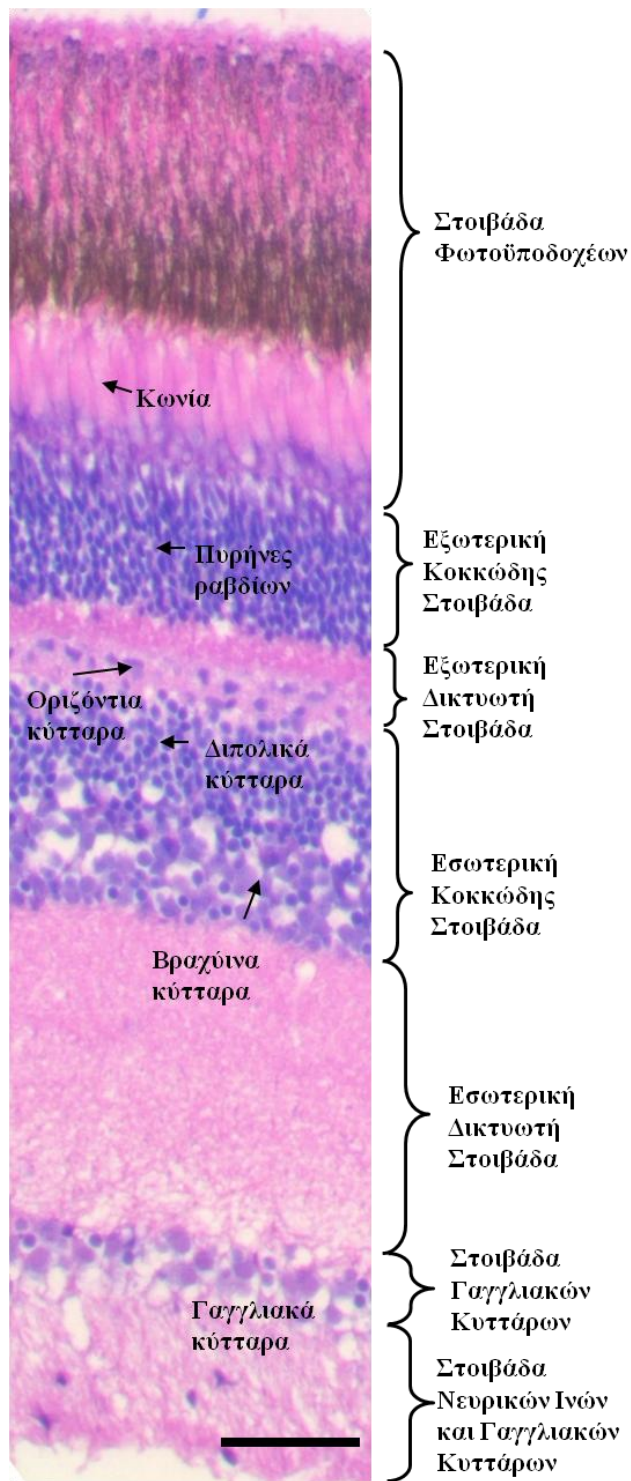
Όσον αφορά στη δομή του αμφιβληστροειδούς χιτώνα, καμία από τις παραμέτρους που προσδιορίστηκαν δεν επηρεάστηκαν από τις επεμβάσεις (Πίνακας 18).

Πίνακας 18: Χαρακτηριστικά αμφιβληστροειδούς χιτώνα (αριθμός κυττάρων/100μ), ο λόγος ραβδίων προς κωνία και οι λόγοι εκτίμησης του βαθμού σύγκλισης ραβδίων και κωνίων προς γαγγλιακά κύτταρα, ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκε σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (ΚΥ), τη Φωτογραφία του Κυανού υποστρώματος (ΦΚΥ) ή Χωρίς υπόστρωμα/φωτογραφία (ΧΥ) για 75 ημέρες (n=3).

	Επεμβάσεις			P
	ΚΥ	ΦΚΥ	ΧΥ	
Ραβδία	140,9±9,68	183,9±9,27	168,0±19,19	ΜΣ
Κωνία	22,4±0,83	23,4±1,22	23,2±0,28	ΜΣ
Οριζόντια κύτταρα	8,79±0,840	10,49±1,091	8,48±0,167	ΜΣ
Διπολικά κύτταρα	92,9±7,37	111,7±12,88	94,9±9,96	ΜΣ
Βραχύινα κύτταρα	42,4±2,88	50,3±8,48	44,8±1,29	ΜΣ
Γαγγλιακά κύτταρα	10,79±1,342	13,76±2,385	11,27±0,755	ΜΣ
Ραβδία/Κωνία	6,34±0,388	8,02±0,747	7,29±0,786	ΜΣ
Ραβδία/Γαγγλιακά κύτταρα	16,55±1,305	17,13±3,278	17,95±2,390	ΜΣ
Κωνία/Γαγγλιακά κύτταρα	2,47±0,112	2,01±0,232	2,50±0,127	ΜΣ

ΜΣ: Μη Σημαντικό

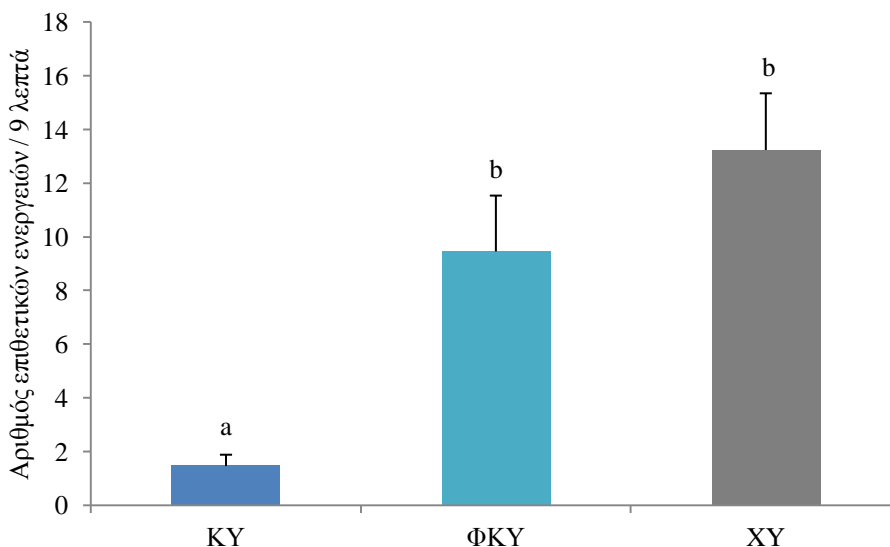
Επιπλέον, παρουσιάζεται χαρακτηριστική τομή οφθαλμού τσιπούρας που ζούσε σε δεξαμενές Χωρίς υπόστρωμα (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Κυτταρική δομή του αμφιβληστροειδούς χιτώνα τσιπούρας που εκτράφηκε σε δεξαμενή Χωρίς υπόστρωμα/φωτογραφία. Η ράβδος αντιστοιχεί σε μήκος 0,025 mm.

4.3.4 Επιθετική συμπεριφορά

Τα ψάρια στις δεξαμενές με ΚΥ παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές επιθετικών ενεργειών σε σχέση με τα ψάρια στις δεξαμενές με ΦΚΥ και ΧΥ (Διάγραμμα 21).



Διάγραμμα 21: Αριθμός επιθετικών ενεργειών από μων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (ΚΥ), Φωτογραφία του Κυανού υποστρώματος (ΦΚΥ) ή Χωρίς υπόστρωμα/φωτογραφία (ΧΥ) για 75 ημέρες ($P < 0,001$, $n=3$).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε συμπεριφορά διεκδίκησης κάποιας περιοχής της δεξαμενής. Ωστόσο, παρατηρήθηκε η αλληλεπίδραση των ψαριών με το υπόστρωμα χαλκιού. Συγκεκριμένα τα ψάρια έπιαναν χαλίκι στο στόμα τους και το πέταγαν ή το «μασούσαν» και το πέταγαν ή σπάνια το κατάπιναν.

4.4 Συζήτηση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα ψάρια του Κυανού υποστρώματος παρουσίασαν καλύτερη ανάπτυξη από τα ψάρια στις δεξαμενές με τη Φωτογραφία του Κυανού υποστρώματος και της επέμβασης Χωρίς υπόστρωμα από τη 17^η ημέρα εκτροφής και ως το τέλος της πειραματικής περιόδου. Η καλύτερη ανάπτυξη των ψαριών στις δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα έναντι Χωρίς υπόστρωμα ήταν αναμενόμενη αφού έχει παρατηρηθεί σε δύο προηγούμενα πειράματα (Κεφάλαια Δ1 και Δ2). Η διαφοροποίηση στην ανάπτυξη μεταξύ των ψαριών στις δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα και Φωτογραφία του Κυανού υποστρώματος υποδεικνύει ότι η παρουσία του Κυανού υποστρώματος και όχι το χρώμα του ευθύνεται κυρίως για τα θετικά αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν. Οι Arndt et al. (2001) παρατήρησαν λιγότερους τραυματισμούς στα περύγια της ιριδιζουσας πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* όταν εκτράφηκε σε υπαίθριες μακρόστενες δεξαμενές με χαλίκι και όχι σε αυτές που είχε ζωγραφισμένο χαλίκι. Ωστόσο, στην περίπτωση ορισμένων παραμέτρων που

σχετίζονται με την ανάπτυξη (ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής, ολικό και σταθερό μήκος), η έλλειψη σημαντικών διαφορών μεταξύ των ατόμων στις δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα και Φωτογραφία του Κυανού υποστρώματος υποδηλώνει ότι το χρώμα του Κυανού υποστρώματος παίζει επίσης κάποιο ρόλο. Παρ' όλα αυτά η επίδραση του χρώματος δε φαίνεται να ήταν αρκετά ισχυρή αφού δεν επέφερε διαφοροποιήσεις μεταξύ των ψαριών στις δεξαμενές με τη Φωτογραφία του Κυανού υποστρώματος σε σχέση με αυτά της επέμβασης Χωρίς υπόστρωμα.

Όσον αφορά στη συμπεριφορά των ψαριών, τα ψάρια του Κυανού υποστρώματος ήταν λιγότερο επιθετικά σε σχέση με αυτά των δεξαμενών με τη Φωτογραφία του Κυανού υποστρώματος ενισχύοντας την ευεργετική δράση της φυσικής παρουσίας του υποστρώματος. Σύμφωνα με μελέτες, αλλαγές στο χρώμα του περιβάλλοντος των ψαριών επηρεάζουν τη συμπεριφορά τους. Για παράδειγμα, η τιλάπια του Νείλου *Oreochromis niloticus* ήταν λιγότερο επιθετική όταν εκτράφηκε με κυανό χρώμα φωτισμού (Sabri et al., 2012), ενώ παρουσίασε αυξημένη ανταγωνιστική συμπεριφορά (agonistic behavior) όταν εκτράφηκε σε δεξαμενές κυανού χρώματος (Merighe et al., 2004). Και στις δύο περιπτώσεις οι αλλαγές του χρώματος αφορούν σε ολόκληρο το περιβάλλον των ψαριών, ενώ στο παρόν πείραμα η επέμβαση της Φωτογραφίας του Κυανού υποστρώματος άλλαξε μόνο το χρώμα του πυθμένα. Το γεγονός αυτό πιθανόν ευθύνεται για την απουσία της επίδρασής της. Επιπλέον, η φυσική παρουσία του υποστρώματος είναι εκείνη που δίνει τη δυνατότητα στα ψάρια να απασχοληθούν με το χαλίκι, ενώ στην περίπτωση των δεξαμενών με Φωτογραφία του Κυανού υποστρώματος και των δεξαμενών Χωρίς υπόστρωμα δε δύναται να παρουσιαστεί τέτοια συμπεριφορά.

Η απουσία στατιστικά σημαντικών διαφοροποιήσεων στη δομή του αμφιβληστροειδούς χιτώνα των οφθαλμών της τσιπούρας υποδεικνύει ενδεχομένως ότι οι όποιες αλλαγές στις συνθήκες φωτισμού των δεξαμενών με υπόστρωμα δεν ήταν αρκετά ισχυρές ώστε να προκαλέσουν ανατομικές αλλαγές στον αμφιβληστροειδή χιτώνα. Ο φωτισμός είναι ένας σημαντικός αβιοτικός παράγοντας του περιβάλλοντος εκτροφής των ψαριών και σε ορισμένα είδη ψαριών, ακατάλληλες συνθήκες μπορεί να προκαλέσουν ακόμη και εκφύλιση στη δομή του αμφιβληστροειδούς χιτώνα, όπως στα κωνία και τα ραβδία (Thomas et al., 2012; Vihtelic and Hyde, 2000). Οι διαφοροποιήσεις στη δομή του αμφιβληστροειδούς χιτώνα εξαρτώνται τόσο από το είδος του ψαριού όσο και από τις συνθήκες φωτισμού. Για παράδειγμα, άτομα πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* που εκτέθηκαν σε ένταση φωτισμού 10000 lx δεν παρουσίασαν σημαντική μείωση του αριθμού των ραβδίων (Allen and Hallows, 1997). Αντίθετα, όταν άτομα του είδους *Astronotus ocellatus* εκτέθηκαν σε ένταση φωτισμού 3000 lx παρουσίασαν μείωση του αριθμού των ραβδίων (Allen et al., 1999). Η οπτική ικανότητα ή η δομή του αμφιβληστροειδούς χιτώνα της τσιπούρας δεν έχουν μελετηθεί. Η παρούσα ιστολογική προσέγγιση του αμφιβληστροειδούς χιτώνα, ο λόγος των ραβδίων προς τα κωνία και οι λόγοι που εκτιμούν το βαθμό σύγκλισης των ραβδίων ή των κωνίων προς τα γαγγλιακά κύτταρα, αναφέρονται για πρώτη φορά για την τσιπούρα. Ωστόσο, ως ποιο βαθμό το οπτικό σύστημα της τσιπούρας είναι ευαίσθητο

στα φωτεινά ερεθίσματα απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Τα δεδομένα του παρόντος πειράματος υποδεικνύουν ότι υπό τις παρούσες πειραματικές συνθήκες, το οπτικό σύστημα της τσιπούρας συνάδει με το φυσικό της περιβάλλον (συνήθως σε βάθος 30 m, Basurco et al., 2011) και με το οπτικό σύστημα ημερόβιων ειδών (diurnal) που ζουν σε βάθος μεταξύ 20-40 m όπου επικρατούν ενδιάμεσες συνθήκες φωτισμού (Shand, 1997).

5. Πείραμα 5

Επίδραση του Κυανού υποστρώματος στην αντίδραση σε οξύ stress ατόμων τσιπούρας



Batzina, A., Kalogiannis, D., Dalla, C., Papadopoulou-Daifoti, Z., Chadio, S., Karakatsouli, N. Blue substrate modifies the time course of stress response in gilthead seabream *Sparus aurata*. Accepted in *Aquaculture*.

5.1 Εισαγωγή – Σκοπός

Ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος διαβίωσης συμβάλλει στην άμβλυνση της αντίδρασης των Θηλαστικών σε καταστάσεις stress (Belz et al., 2003; Fox et al., 2006; Ilin and Richter-Levin, 2009; Moncek et al., 2004; Simpson and Kelly, 2011). Στην περίπτωση των ψαριών, παρά το γεγονός ότι ο μηχανισμός της αντίδρασης στο stress έχει μελετηθεί ιδιαίτερα (Barton, 2002; Iwama, 1998; Tort et al., 2011), η επίδραση της διαφοροποίησης του περιβάλλοντος ως μέσο εμπλουτισμού στη φυσιολογική αντίδραση στο stress δεν έχει ερευνηθεί ενδελεχώς. Για την ακρίβεια, υπάρχουν τρεις σχετικές έρευνες με διφορούμενα αποτελέσματα, αφού καταλήγουν σε θετική ή αρνητική αντίδραση, αλλά και σε απουσία επίδρασης του εμπλουτισμού όσον αφορά στα επίπεδα της κορτιζόλης (Barcellos et al., 2009; Näslund et al., 2013; Zubair et al., 2012).

Στο πλαίσιο της αξιολόγησης του επιπέδου της ευζωίας, ο τρόπος αντίδρασης σε οξύ stress δίνει πληροφορίες σχετικά με τη συνολική κατάσταση του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών, και αποτελεί δείκτη της ικανότητάς τους να αντιμετωπίσουν δυσμενείς συνθήκες (Ashley, 2007; Conte, 2004; Mormède et al., 2007). Η φυσιολογική αντίδραση στο stress περιγράφεται ως πρωτογενής, δευτερογενής και τριτογενής (Barton, 2002; Ellis et al., 2012; Winberg and Nilsson, 1993a). Η πρωτογενής αντίδραση περιλαμβάνει την αύξηση των ορμονών που σχετίζονται με το stress και των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου. Η δευτερογενής αντίδραση, υποκινείται από την πρωτογενή και περιλαμβάνει αλλαγές στο αίμα και τους ιστούς (π.χ. αύξηση στη γλυκόζη και τα ερυθρά αιμοσφαίρια, μείωση των αποθεμάτων ενέργειας στους ιστούς, διαταραχή της ωσμωρρύθμισης) με σκοπό να επιτρέψουν στο ψάρι να αντιμετωπίσει το stress και να διατηρήσει την ομοιόστασή του. Τέλος, η τριτογενής αντίδραση περιλαμβάνει τις επιδράσεις του stress στην απόδοση των ψαριών, δηλαδή μείωση της ανάπτυξης και της επίδοσης της αναπαραγωγής, αυξημένη ευπάθεια σε ασθένειες ή/και θνησιμότητα.

Για την τσιπούρα, η παρουσία Κυανού υποστρώματος στη δεξαμενή έχει αναφερθεί ότι αποτελεί έναν αποτελεσματικό εμπλουτισμό του περιβάλλοντος διαβίωσής της (Κεφάλαια Δ1, Δ2, Δ4). Σκοπός του παρόντος πειράματος ήταν να ερευνηθεί η πιθανή επίδραση του συγκεκριμένου εμπλουτισμού στην αντίδραση της τσιπούρας στο stress. Το πείραμα σχεδιάστηκε με στόχο τη μελέτη της επίδρασης κατά τη διάρκεια εφαρμογής οξέος stress και κατά την επαναφορά των ψαριών μέσω δεικτών πρωτογενούς και δευτερογενούς αντίδρασης.

5.2 Υλικά και Μέθοδοι

5.2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την πραγματοποίηση του πειράματος έγινε προμήθεια νεαρών ατόμων τσιπούρας *Sparus aurata* τα οποία παρέμειναν σε εργαστηριακές συνθήκες για τουλάχιστον έξι μήνες. Στη συνέχεια 324 ψάρια με μέσο αρχικό βάρος $20,3 \pm 0,22$ g (ηλικίας 0+) διανεμήθηκαν τυχαία σε 18 πανομοιότυπες δεξαμενές που περιγράφονται

στο Υποκεφάλαιο Δ2.2.1, σε ομοιογενείς ομάδες των 18 ατόμων. Η αρχική πυκνότητα των ομάδων ήταν $4,1 \pm 0,01 \text{ kg/m}^3$ και η αρχική παραλλακτικότητα του βάρους κυμάνθηκε από 16,6 έως 17,2% ($P > 0,05$). Οι δεξαμενές αποτελούσαν μέρος ενός ημίκλειστου συστήματος θαλασσινού νερού όπως περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο Δ2.2.1. Η παροχή του νερού ήταν 2 L/min/kg και προσαρμοζόταν ανάλογα με τη βιομάζα των ψαριών. Όλες οι δεξαμενές καθαρίζονταν επιμελώς μία φορά την εβδομάδα όπως περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.1. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού ελέγχονταν καθημερινά (πριν το 1^ο γεύμα) όπως περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.1.

Τα ψάρια εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (KY) ή Χωρίς υπόστρωμα (XY) με εννέα επαναλήψεις για κάθε επέμβαση. Τα ψάρια σημάνθηκαν ατομικά με κόψιμο των πτερυγίων (fin clipping) όπως περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο Δ.4.2.1. Στις εμπλουτισμένες δεξαμενές το υπόστρωμα αποτελούσαν από ομοιόμορφο στρώμα μονοχρωματικής υάλινης ψηφίδας όπως περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.1.

Η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε σε 12 ώρες φως προς 12 ώρες σκοτάδι, ενώ η ένταση του φωτισμού προσαρμόστηκε στα 220 lx στην επιφάνεια κάθε δεξαμενής. Ως πηγή φωτισμού χρησιμοποιήθηκαν λάμπες λευκού φωτός (cool white fluorescence lamps) σε απόσταση ύψους ενός μέτρου από την επάνω πλευρά και 5 cm από την μπροστινή πλευρά της κάθε δεξαμενής.

Τα ψάρια παρέμειναν σε πειραματικές συνθήκες για 75 ημέρες. Η χορήγηση της τροφής γινόταν με το χέρι. Χρησιμοποιήθηκε εμπορικό σιτηρέσιο (βυθιζόμενα σύμπηκτα) κατάλληλο για νεαρά άτομα τσιπούρας (Υποκεφάλαιο Δ2.2.1). Η ποσότητα της τροφής που χορηγήθηκε ήταν 2,5% του ζώντος βάρους τους που προοδευτικά μειώθηκε σε 1,5% σύμφωνα με τη βιομάζα και τη θερμοκρασία του νερού (Lupatsch and Kissil, 1998). Γινόταν ατομικό ζύγισμα κάθε δύο εβδομάδες και η ποσότητα της τροφής προσαρμοζόταν ανάλογα. Κατά τη διάρκεια του πειράματος δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα. Η επιθετική συμπεριφορά καταγράφηκε σε video από την 57^η ως την 71^η ημέρα εκτροφής όπως περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.2. Οι ημέρες λήψης video ήταν περιορισμένες αφού σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενου πειράματος (Υποκεφάλαιο Δ1.2.2.) η επιθετικότητα δε διαφοροποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου.

5.2.2 Εφαρμογή οξέος stress

Ύστερα από δύο ημέρες ασιτίας, στα ψάρια έξι δεξαμενών (τρεις KY και τρεις XY) εφαρμόστηκε οξύ stress 90 λεπτών (παραμονή σε συνθήκες έντονου συνωστισμού), μειώνοντας τη στάθμη του νερού στα $4,5 \text{ cm}$ ύψος από τον πυθμένα για τις δεξαμενές Χωρίς υπόστρωμα και $7,0 \text{ cm}$ για τις δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (συμπεριλαμβανομένου του ύψους του υποστρώματος). Το ραχιαίο πτερύγιο των ψαριών βρισκόταν εκτός νερού και η πυκνότητα εκτροφής ήταν $66,8\text{-}70,9 \text{ kg/m}^3$. Η δειγματοληψία έγινε σε ομάδες των έξι ψαριών στα 30, 60 και 90 λεπτά (S30, S60 και

S90 αντίστοιχα). Ύστερα από τη δειγματοληψία κάθε ομάδας ψαριών, ο όγκος του νερού προσαρμοζόταν ώστε να διατηρηθεί σταθερή η πυκνότητα εκτροφής.

Από τις υπόλοιπες δεξαμενές, στα ψάρια τριών KY και τριών XY δεξαμενών εφαρμόστηκε οξύ stress για 90 λεπτά και στη συνέχεια ομάδες των έξι ατόμων μεταφέρθηκαν σε δεξαμενές επαναφοράς (Recovery) όπου η στάθμη του νερού είχε επανέλθει στο αρχικό επίπεδο (88,4 L). Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε ύστερα από 2, 6 και 24 ώρες (R2, R6 και R24 αντίστοιχα).

Στα ψάρια των υπολοίπων έξι δεξαμενών (τρεις KY και τρεις XY) η στάθμη του νερού δε μειώθηκε, τα ψάρια παρέμειναν ανενόχλητα και αποτελούσαν τις ομάδες χωρίς stress (Unstressed-U). Οι τιμές των παραμέτρων που αναλύθηκαν και αφορούν στα ψάρια που δεν υποβλήθηκαν σε stress αναφέρονται στη συνέχεια του κειμένου ως βασικές τιμές. Τα ψάρια χωρίς stress και αυτά που επανήλθαν ύστερα από την εφαρμογή οξέος stress θανατώθηκαν με ευθανασία εντός των δεξαμενών τους, ενώ τα ψάρια που υποβλήθηκαν σε stress θανατώθηκαν με ευθανασία σε κουβά 10 L. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε μεγάλη δόση αναισθητικού (2-φαινοξυ-αιθανόλη, 1,5 ml/L). Από κάθε δεξαμενή με ψάρια χωρίς stress χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα πρώτα έξι άτομα σε αυτό το πείραμα με σκοπό τον κοινό χρόνο παραμονής στο αναισθητικό και της ολοκλήρωσης της δειγματοληψίας για όλες τις πειραματικές ομάδες των επεμβάσεων. Τα υπόλοιπα 12 άτομα που θανατώθηκαν αποτελούσαν πειραματικές ομάδες προηγούμενου πειράματος (Κεφάλαιο Δ4). Κατά την εφαρμογή οξέος stress δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στη διατήρηση υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου στο νερό, αφού κατά το συνωστισμό δε γινόταν ανανέωση του νερού στις δεξαμενές.

5.2.3 Δειγματοληψία και αναλύσεις

Οι αναλύσεις των νιτρικών ιόντων και της ολικής αμμωνίας περιγράφονται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.3.

Έπειτα από την πλήρη αναισθητοποίηση των ψαριών (εντός 1 λεπτού), πραγματοποιήθηκαν ατομικό ζύγισμα (ακρίβειας 0,01 g), σωματομετρήσεις, λήψη αίματος και εγκέφαλου (Υποκεφάλαιο Δ1.2.3). Άμεσα προσδιορίστηκε ο αιματοκρίτης του αίματος με χρήση μικροφυγοκέντρου (12000 g για 10 λεπτά) και στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για να διαχωριστεί το πλάσμα από τα έμμορφα συστατικά του αίματος. Το πλάσμα καταψύχθηκε στους -25 °C μέχρι να γίνει ανάλυση γλυκόζης και τριακυλγλυκεριδίων (ενζυματική φωτομετρική μέθοδος εμπορίου, Elitech Diagnostics, Sees, France), των ολικών πρωτεϊνών (μέθοδος Biuret), της ωσμωμοριακότητας (κρυοσκοπικό ωσμόμετρο, Gonotec Osmomat 010) και της κορτιζόλης, η οποία προσδιορίστηκε ραδιοανοσολογικά με τυποποιημένη μέθοδο εμπορίου (Coat-A-Count Cortisol, DPC, Los Angeles, CA, USA) που έχει αξιολογηθεί και για τα ψάρια (Ainsworth et al., 1985).

Ύστερα από τη λήψη του αίματος, έγινε λήψη του εγκέφαλου όπως περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.3 για τον προσδιορισμό των νευροδιαβιβαστών του εγκέφαλου. Το βάρος του εγκέφαλου εκφράστηκε ως ποσοστό του ζώντος βάρους

(Εγκεφαλοσωματικός Δείκτης). Το σύνολο της διαδικασίας (ατομικό ζύγισμα, λήψη αίματος και εγκέφαλου) διήρκησε περίπου 2,5 λεπτό για κάθε ψάρι και διατηρήθηκε ο ίδιος χρόνος δειγματοληψίας για κάθε πειραματική ομάδα (περίπου 15 λεπτά).

Η ανάλυση των νευροδιαβιβαστών του εγκέφαλου περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.3. Προσδιορίστηκε η νοραδρεναλίνη (NA), η ντοπαμίνη (DA) και ο μεταβολίτης της 3,4 διυδροξυ-φαινοτυλακετικό οξύ (DOPAC), η σεροτονίνη (5-HT) και ο μεταβολίτης της 5-υδροξυ-ινδολοξικό οξύ (5-HIAA). Επιπλέον, οι λόγοι των DOPAC/DA, και 5-HIAA/5-HT υπολογίστηκαν ως δείκτες της σεροτονινεργικής και της ντοπαμινεργικής δραστηριότητας.

Τέλος, απομονώθηκε το ήπαρ από όλα τα ψάρια, ζυγίστηκε (ακρίβειας 0,1 mg) και εκφράστηκε ως ποσοστό του ζώντος βάρους (Ηπατοσωματικός δείκτης).

5.2.4 Υπολογισμοί και ανάλυση δεδομένων

Υπολογίστηκαν ο Ειδικός Ρυθμός Ανάπτυξης (SGR), η εκατοστιαία Αύξηση του Ζώντος Βάρους (WG) και ο Συντελεστής Ευρωστίας (CF) για το κάθε ψάρι καθώς επίσης ο Συντελεστής Παραλλακτικότητας του Βάρους (CV) και ο Συντελεστής Εκμετάλλευσης της Τροφής (FCR) για το σύνολο των ψαριών της κάθε δεξαμενής όπως περιγράφονται στο Υποκεφάλαιο Δ1.2.3.

Τα δεδομένα της ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (ζων βάρος, ολικό και σταθερό μήκος, ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, επί % αύξηση του ζώντος βάρους, συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής) και της επιθετικότητας αναλύθηκαν με μονοπαραγοντική εγκιβωτισμένη ανάλυση διασποράς (one way nested analysis of variance-ANOVA) με τη χρήση γενικού γραμμικού μοντέλου (General Linear Model). Τα αποτελέσματα που σχετίζονται με την αντίδραση στο stress (παράμετροι του αίματος, του πλάσματος, του εγκέφαλου και του ήπατος) αναλύθηκαν με πολυπαραγοντική ανάλυση διασποράς (ANOVA) με παράγοντες την παρουσία του υποστρώματος και το σημείο δειγματοληψίας, ενώ ο χρόνος παραμονής των ψαριών στο αναισθητικό και το ζων βάρος χρησιμοποιήθηκαν ως συμεταβλητές. Στην περίπτωση που υπήρχε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων, πραγματοποιούταν μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς (ANOVA) για να εκτιμηθεί η επίδραση του σημείου δειγματοληψίας για κάθε επέμβαση (KY ή XY). Για να προσδιοριστούν πιθανές στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ψαριών του KY και των δεξαμενών XY σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας, τα δεδομένα αναλύθηκαν με μονόπλευρο στατιστικό έλεγχο (one-tail t-test) ή μη παραμετρικό έλεγχο Mann-Whitney (Wilcoxon) σύμφωνα με την κανονική κατανομή ή/και την ομοιογένεια της διασποράς. Σε όλες τις περιπτώσεις, η δεξαμενή χρησιμοποιήθηκε ως τυχαίος εγκιβωτισμένος παράγοντας (nested random factor) για να συνυπολογιστεί η επίδρασή της στην ανάλυση. Οι τιμές που παρουσιάζονται στο κείμενο και στους πίνακες είναι μέσες τιμές ± τυπικό σφάλμα χωρίς μετατροπές.

5.3 Αποτελέσματα

5.3.1 Ποιότητα νερού

Τα αποτελέσματα της ποιότητας του νερού δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των επεμβάσεων εκτός από την περίπτωση της περιεκτικότητας του νερού σε νιτρώδη ιόντα. Οι τιμές διατηρήθηκαν ως εξής: θερμοκρασία $16,9 \pm 0,01$ °C, δεσμευμένο οξυγόνο $7,3 \pm 0,02$ mg/L (κορεσμός $93 \pm 0,2\%$), pH $7,35 \pm 0,006$, αλατότητα $34,6 \pm 0,02$ g/L, ολική αμμωνία $0,17 \pm 0,001$ mg/L, τοξική αμμωνία $0,001 \pm 0,0001$ mg/L. Όσον αφορά στην περιεκτικότητα του νερού σε νιτρώδη ιόντα (mg/L), παρατηρήθηκαν αυξημένες τιμές στις δεξαμενές με υπόστρωμα σε σχέση με τις δεξαμενές Χωρίς υπόστρωμα [($P=0,0$) KY: $0,099 \pm 0,0017$, XY: $0,063 \pm 0,0012$].

5.3.2 Ανάπτυξη και επιθετικότητα

Τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης (ζων βάρος, ολικό και σταθερό μήκος, ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, επί % αύξηση του ζώντος βάρους) και η αξιοποίηση της τροφής είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές στα ψάρια των δεξαμενών με KY σε σχέση με τα ψάρια στις δεξαμενές XY (Πίνακας 19). Ο συντελεστής ευρωστίας και ο συντελεστής παραλλακτικότητας του βάρους δεν επηρεάστηκαν από την παρουσία του υποστρώματος, ενώ τα ψάρια στις δεξαμενές με KY παρουσίασαν τη χαμηλότερη επιθετικότητα (Πίνακας 19).

Πίνακας 19: Χαρακτηριστικά ανάπτυξης και επιθετικότητα ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκε σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (KY) ή Χωρίς υπόστρωμα (XY) για 75 ημέρες (n=9).

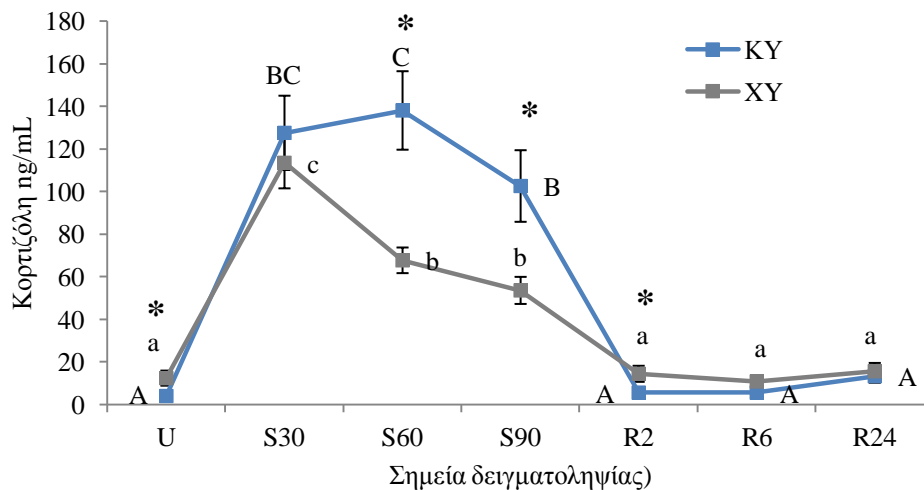
	KY	XY	P
Ζων βάρος (g)	$38,2 \pm 0,70$ b	$36,0 \pm 0,61$ a	*
Ολικό μήκος (cm)	$13,2 \pm 0,08$ b	$12,9 \pm 0,07$ a	*
Σταθερό μήκος (cm)	$11,4 \pm 0,06$ b	$11,2 \pm 0,06$ a	*
Συντελεστής ευρωστίας	$1,66 \pm 0,011$	$1,66 \pm 0,010$	ΜΣ
Συντελεστής παραλλακτικότητας βάρους (%)	$17,9 \pm 0,23$	$17,6 \pm 1,14$	ΜΣ
Ειδικός ρυθμός ανάπτυξης	$0,83 \pm 0,016$ b	$0,76 \pm 0,016$ a	**
Επί % αύξηση ζώντος βάρους	$89,8 \pm 2,22$ b	$73,0 \pm 2,17$ a	***
Συντελεστής εκμετάλλευσης της τροφής	$1,54 \pm 0,016$ a	$1,68 \pm 0,046$ b	*
Επιθετικές ενέργειες (αριθμός/9 λεπτά)	$3,8 \pm 1,30$ a	$10,8 \pm 2,44$ b	*

P: Επίπεδο Σημαντικότητας, ΜΣ: Μη Σημαντικό, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

5.3.3 Εφαρμογή οξέος stress

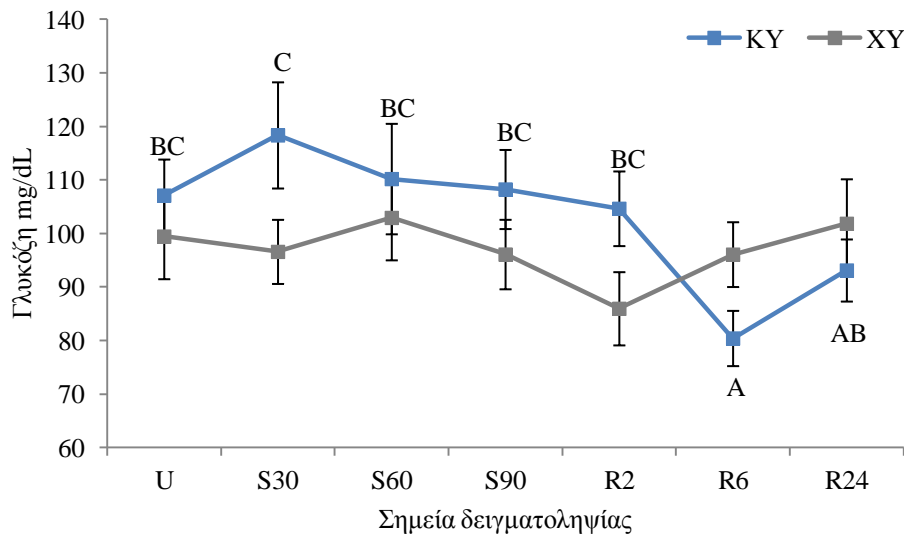
Για τα ψάρια του KY, τα επίπεδα της κορτιζόλης του πλάσματος του αίματος αυξήθηκαν ύστερα από 30 λεπτά stress, παρέμειναν ανεβασμένα ύστερα από 60 λεπτά και μειώθηκαν ύστερα από 90 λεπτά, σε υψηλότερα όμως επίπεδα από αυτά των ψαριών του KY χωρίς stress (Διάγραμμα 22). Στα ψάρια των δεξαμενών XY, η αύξηση

της κορτιζόλης κορυφώθηκε ύστερα από 30 λεπτά, ενώ ύστερα από 60 και 90 λεπτά stress οι τιμές της μειώθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα από τις βασικές τιμές των ψαριών XY. Οι μέγιστες τιμές που παρουσιάστηκαν κατά τη διάρκεια του stress δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ψαριών των δύο επεμβάσεων (KY: $138,1 \pm 18,43$ ng/ml, XY: $113,5 \pm 12,00$ ng/ml, $P > 0,05$). Για τις ομάδες ψαριών και των δύο επεμβάσεων (KY και XY), η κορτιζόλη επανήλθε στο επίπεδο των ομάδων χωρίς stress ύστερα από 2 ώρες επαναφοράς στις αρχικές συνθήκες (Διάγραμμα 22). Τα ψάρια στις δεξαμενές XY χωρίς stress είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές κορτιζόλης ($12,4 \pm 3,55$ ng/ml) από τα αντίστοιχα ψάρια του KY ($4,0 \pm 0,83$ ng/ml, $P < 0,001$). Αντίθετα, ύστερα από 60 και 90 λεπτά stress τα ψάρια των δεξαμενών XY είχαν χαμηλότερες τιμές κορτιζόλης σε σχέση με τα ψάρια του KY ($P < 0,001$). Ύστερα από 2 ώρες επαναφοράς στις αρχικές συνθήκες, η κορτιζόλη των ψαριών XY είχε στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές από τα ψάρια του KY όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των ψαριών χωρίς stress ($P < 0,001$, Διάγραμμα 22).



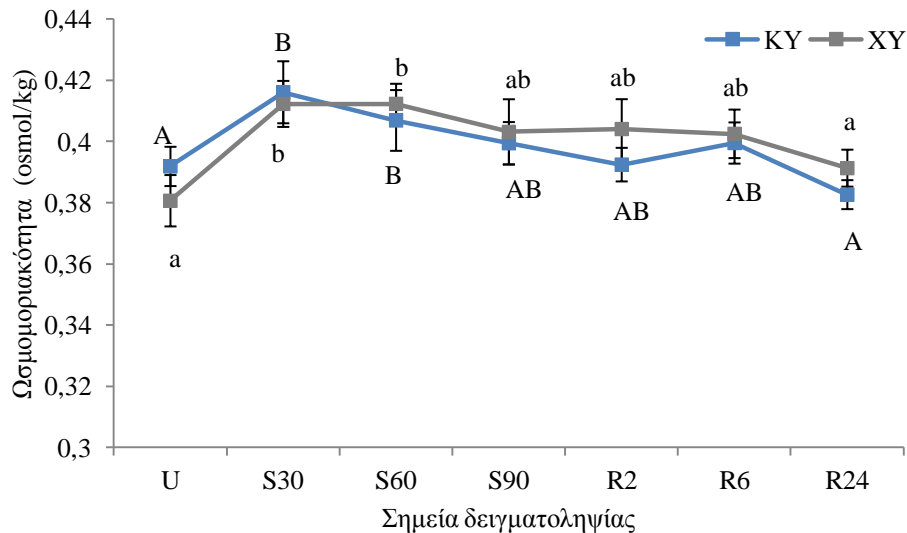
Διάγραμμα 22: Συγκέντρωση κορτιζόλης πλάσματος αίματος ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (KY) ή Χωρίς υπόστρωμα (XY). Τα σημεία δειγματοληψίας αναφέρονται στα ψάρια χωρίς stress (U), ψάρια που υποβλήθηκαν σε 30 (S30), 60 (S60) ή 90 (S90) λεπτά οξύ stress και ψάρια που υποβλήθηκαν σε οξύ stress (90 λεπτά) και επανήλθαν στις αρχικές συνθήκες για 2 (R2), 6 (R6) ή 24 (R24) ώρες (n=3). Σύμβολα με διαφορετικά κεφαλαία ή μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων του KY και του XY αντίστοιχα. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο επεμβάσεων (KY και XY) για το ίδιο σημείο δειγματοληψίας ($P_{KY} < 0,001$, $P_{XY} < 0,001$).

Η συγκέντρωση της γλυκόζης του πλάσματος του αίματος των ψαριών σε δεξαμενές με KY δεν επηρεάστηκε από την εφαρμογή οξέος stress. Ωστόσο, ύστερα από 6 ώρες επαναφοράς στις αρχικές συνθήκες παρατηρήθηκε μείωση των τιμών της γλυκόζης που επανήλθε στις βασικές τιμές ύστερα από 24 ώρες επαναφοράς (Διάγραμμα 23). Στα ψάρια των δεξαμενών XY δεν παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στα επίπεδα της γλυκόζης (Διάγραμμα 23). Οι τιμές μεταξύ των δύο επεμβάσεων δε διέφεραν σε κανένα σημείο δειγματοληψίας.



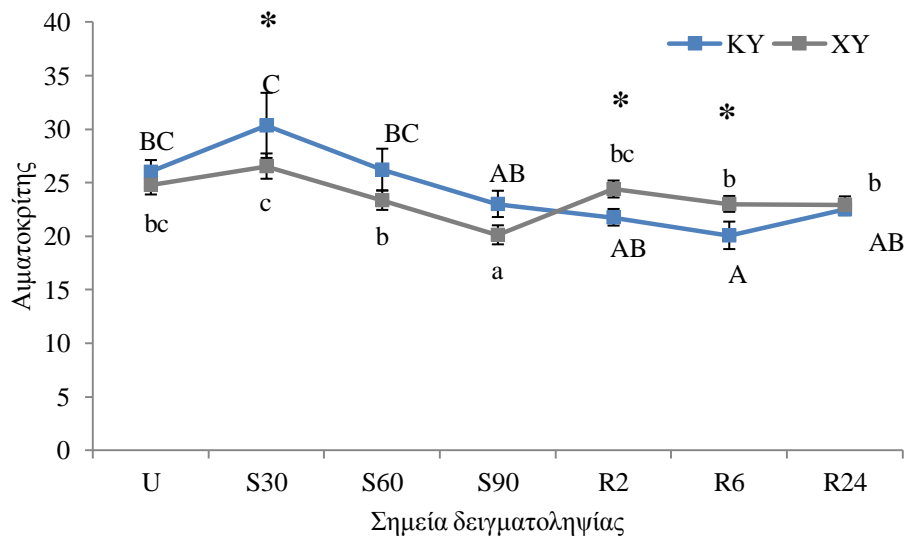
Διάγραμμα 23: Συγκέντρωση γλυκόζης πλάσματος αίματος ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (KY) ή Χωρίς υπόστρωμα (XY). Τα σημεία δειγματοληψίας αναφέρονται στα ψάρια χωρίς stress (U), ψάρια που υποβλήθηκαν σε 30 (S30), 60 (S60) ή 90 (S90) λεπτά οξύ stress και ψάρια που υποβλήθηκαν σε οξύ stress και επανήλθαν στις αρχικές συνθήκες για 2 (R2), 6 (R6) ή 24 (R24) ώρες (n=3). Σύμβολα με διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων του KY. ($P_{KY}<0,05$, $P_{XY}>0,05$).

Η ωσμωμοριακότητα αυξήθηκε ύστερα από 30 και 60 λεπτά stress στα ψάρια και των δύο επεμβάσεων, ενώ ύστερα από 90 λεπτά stress οι τιμές δε διέφεραν από εκείνες των ψαριών χωρίς stress. Επίσης, κατά την επαναφορά, η ωσμωμοριακότητα δε διέφερε από τα βασικά επίπεδα των ψαριών χωρίς stress (Διάγραμμα 24). Οι τιμές μεταξύ των δύο επεμβάσεων δε διέφεραν σε κανένα σημείο δειγματοληψίας.



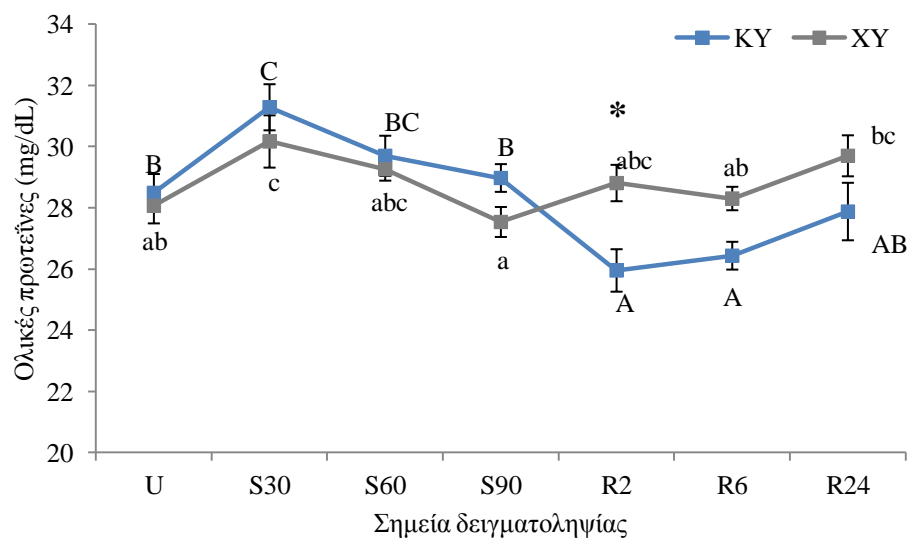
Διάγραμμα 24: Ωσμωμοριακότητα πλάσματος αίματος ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (KY) ή Χωρίς υπόστρωμα (XY). Τα σημεία δειγματοληψίας αναφέρονται στα ψάρια χωρίς stress (U), ψάρια που υποβλήθηκαν σε 30 (S30), 60 (S60) ή 90 (S90) λεπτά οξύ stress και ψάρια που υποβλήθηκαν σε οξύ stress και επανήλθαν στις αρχικές συνθήκες για 2 (R2), 6 (R6) ή 24 (R24) ώρες (n=3). Σύμβολα με διαφορετικά κεφαλαία ή μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων του KY και του XY αντίστοιχα ($P_{KY}<0,05$, $P_{XY}<0,05$).

Ο αιματοκρίτης των ψαριών σε δεξαμενές με KY δεν επηρεάστηκε από την εφαρμογή οξέος stress, ενώ ύστερα από 6 ώρες επαναφοράς οι τιμές του μειώθηκαν, και επανήλθαν στα επίπεδα των ψαριών χωρίς stress ύστερα από 24 ώρες (Διάγραμμα 25). Στα ψάρια των δεξαμενών XY, ο αιματοκρίτης μειώθηκε ύστερα από 90 λεπτά stress και επανήλθε στα βασικά επίπεδα μετά από 2 ώρες επαναφοράς (Διάγραμμα 25). Ο αιματοκρίτης των ψαριών στις δεξαμενές με KY ήταν υψηλότερος σε σχέση με τα ψάρια των δεξαμενών XY ύστερα από 30 λεπτά stress ($P<0,001$), ενώ ήταν χαμηλότερος ύστερα από 2 και 6 ώρες επαναφοράς στις αρχικές συνθήκες ($P<0,001$, Διάγραμμα 25).



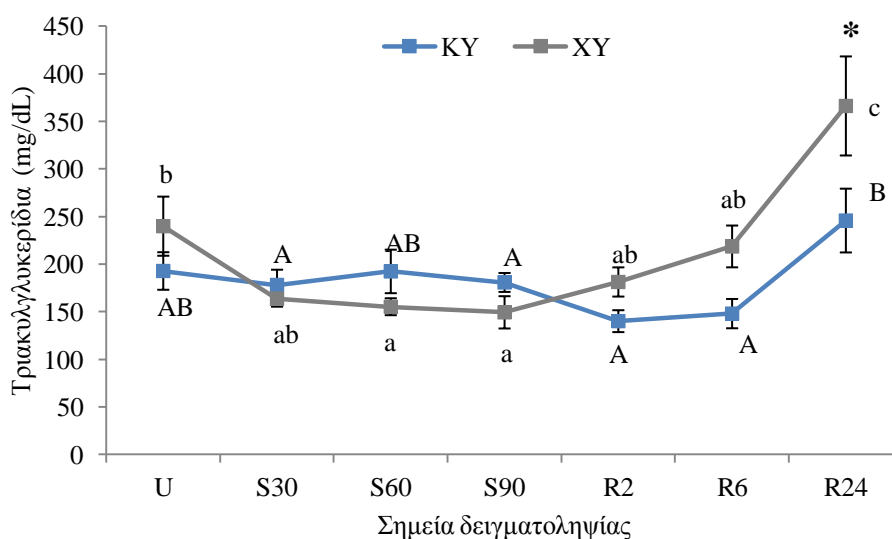
Διάγραμμα 25: Αιματοκρίτης ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (KY) ή Χωρίς υπόστρωμα (XY). Τα σημεία δειγματοληψίας αναφέρονται στα ψάρια χωρίς stress (U), ψάρια που υποβλήθηκαν σε 30 (S30), 60 (S60) ή 90 (S90) λεπτά οξύ stress και ψάρια που υποβλήθηκαν σε οξύ stress και επανήλθαν στις αρχικές συνθήκες για 2 (R2), 6 (R6) ή 24 (R24) ώρες ($n=3$). Σύμβολα με διαφορετικά κεφαλαία ή μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων του KY και του XY αντίστοιχα. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο επεμβάσεων (KY και XY) για το ίδιο σημείο δειγματοληψίας ($P_{KY}<0,001$, $P_{XY}<0,001$).

Οι ολικές πρωτεΐνες του πλάσματος αυξήθηκαν ύστερα από 30 λεπτά stress για τα ψάρια σε δεξαμενές με KY και XY (Διάγραμμα 26). Στα ψάρια του KY στα 60 και 90 λεπτά stress οι τιμές των ολικών πρωτεϊνών επανήλθαν στις βασικές τιμές, αλλά ύστερα από 2 και 6 ώρες επαναφοράς παρατηρήθηκε περαιτέρω μείωσή τους. Ύστερα από 24 ώρες επαναφοράς, οι ολικές πρωτεΐνες των ψαριών του KY επανήλθαν στα βασικά επίπεδα των ψαριών χωρίς stress (Διάγραμμα 26). Ωστόσο, στα ψάρια των δεξαμενών XY οι τιμές των ολικών πρωτεϊνών δε διέφεραν από τις βασικές τιμές, κατά τα 60 και 90 λεπτά του stress αλλά και καθ' όλη την περίοδο της επαναφοράς. Επιπλέον, στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές ολικών πρωτεϊνών παρατηρήθηκαν για τα ψάρια των δεξαμενών XY σε σχέση με αυτά του KY ύστερα από 2 ώρες επαναφοράς ($P<0,01$, Διάγραμμα 26).



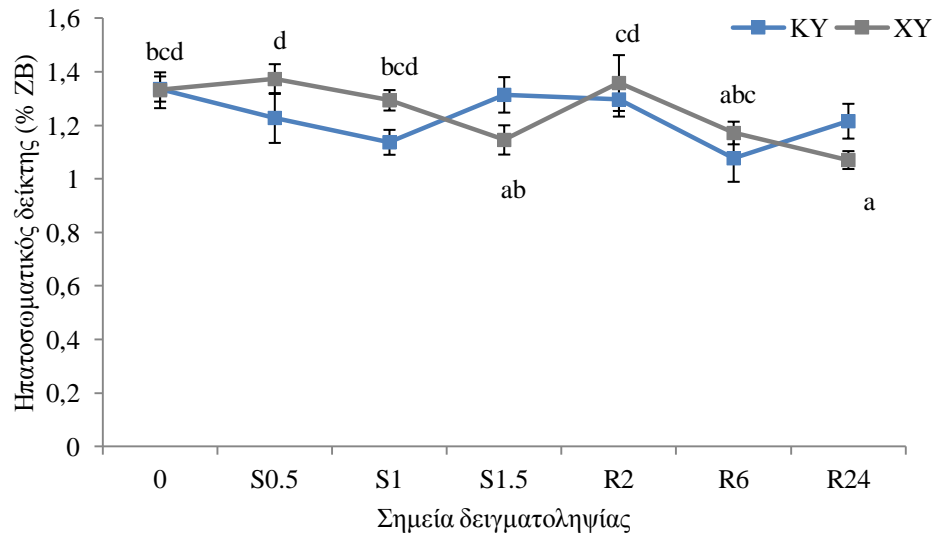
Διάγραμμα 26: Ολικές πρωτεΐνες πλάσματος αίματος ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (KY) ή Χωρίς υπόστρωμα (XY). Τα σημεία δειγματοληψίας αναφέρονται στα ψάρια χωρίς stress (U), ψάρια που υποβλήθηκαν σε 30 (S30), 60 (S60) ή 90 (S90) λεπτά οξύ stress και ψάρια που υποβλήθηκαν σε οξύ stress και επανήλθαν στις αρχικές συνθήκες για 2 (R2), 6 (R6) ή 24 (R24) ώρες ($n=3$). Σύμβολα με διαφορετικά κεφαλαία ή μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων του KY και του XY αντίστοιχα. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο επεμβάσεων (KY και XY) για το ίδιο σημείο δειγματοληψίας ($P_{KY}<0,001$, $P_{XY}<0,05$).

Τα τριακυλγλυκερίδια των ψαριών στις δεξαμενές με KY δεν επηρεάστηκαν από την εφαρμογή του stress (Διάγραμμα 27). Ωστόσο, στα ψάρια των δεξαμενών XY παρατηρήθηκαν μειωμένες τιμές ύστερα από 60 λεπτά stress, παρέμειναν μειωμένες ύστερα από 90 λεπτά, ενώ κατά τη διάρκεια της επαναφοράς στις αρχικές συνθήκες οι τιμές αυξήθηκαν ξεπερνώντας τα επίπεδα των ψαριών χωρίς stress ύστερα από 24 ώρες επαναφοράς (Διάγραμμα 27). Επιπλέον, οι τιμές αυτές ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερες από αυτές των ψαριών με KY για το συγκεκριμένο σημείο δειγματοληψίας ($P < 0,01$, Διάγραμμα 27).



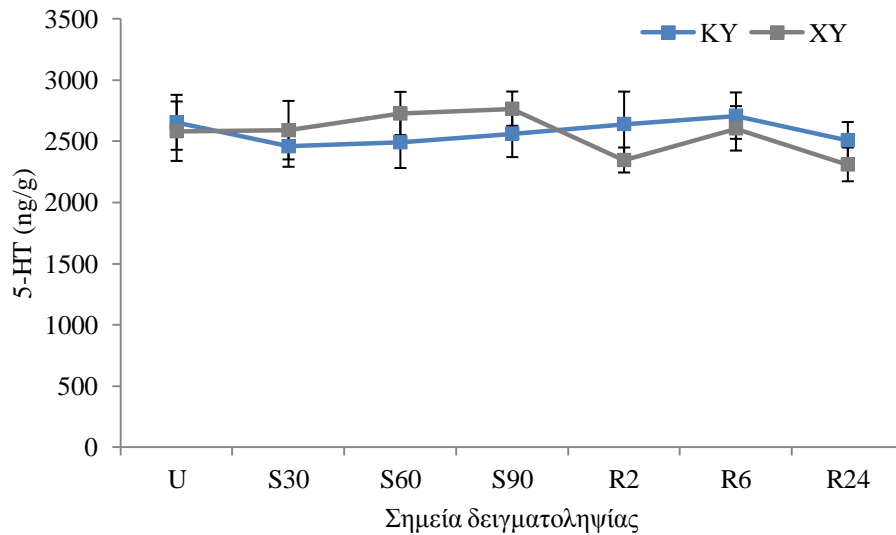
Διάγραμμα 27: Τριακυλγλυκερίδια πλάσματος αίματος ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (KY) ή Χωρίς υπόστρωμα (XY). Τα σημεία δειγματοληψίας αναφέρονται στα ψάρια χωρίς stress (U), ψάρια που υποβλήθηκαν σε 30 (S30), 60 (S60) ή 90 (S90) λεπτά οξύ stress και ψάρια που υποβλήθηκαν σε οξύ stress και επανήλθαν στις αρχικές συνθήκες για 2 (R2), 6 (R6) ή 24 (R24) ώρες ($n=3$). Σύμβολα με διαφορετικά κεφαλαία ή μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων του KY και του XY αντίστοιχα. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο επεμβάσεων (KY και XY) για το ίδιο σημείο δειγματοληψίας ($P_{KY} < 0,01$, $P_{XY} < 0,001$).

Όσον αφορά στον ηπατοσωματικό δείκτη, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις εκτός από τη μείωση των τιμών στα ψάρια των δεξαμενών Χωρίς υπόστρωμα ύστερα από 24 ώρες επαναφοράς σε σχέση με τα ψάρια που δεν υποβλήθηκαν σε stress (Διάγραμμα 28).



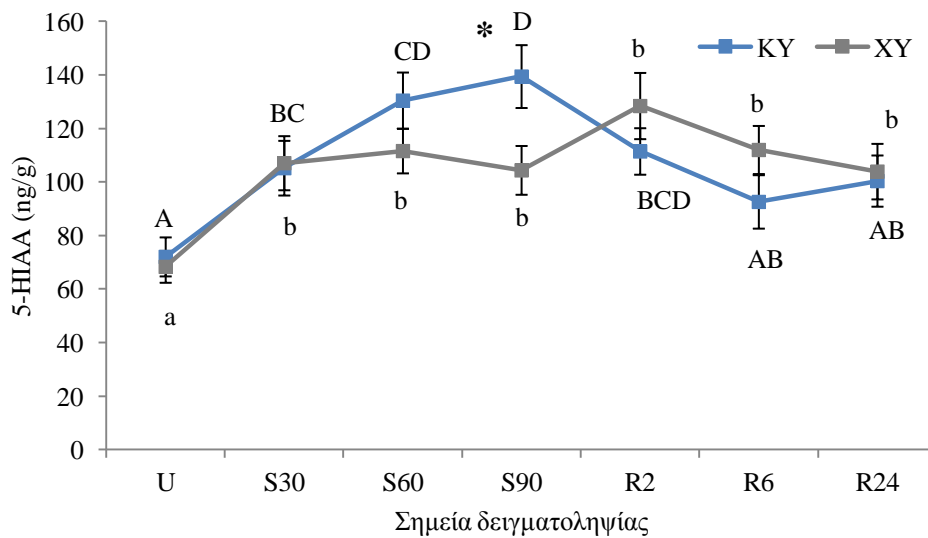
Διάγραμμα 28: Ηπατοσωματικός δείκτης ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κιανό υπόστρωμα (KY) ή Χωρίς υπόστρωμα (XY). Τα σημεία δειγματοληψίας αναφέρονται στα ψάρια χωρίς stress (U), ψάρια που υποβλήθηκαν σε 30 (S30), 60 (S60) ή 90 (S90) λεπτά οξύ stress και ψάρια που υποβλήθηκαν σε οξύ stress και επανήλθαν στις αρχικές συνθήκες για 2 (R2), 6 (R6) ή 24 (R24) ώρες (n=3). Σύμβολα με διαφορετικά μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων των δεξαμενών XY ($P_{KY}>0,05$, $P_{XY}<0,05$).

Σχετικά με τους νευροδιαβιβαστές του εγκεφάλου, η σεροτονίνη (5-HT) δεν επηρεάστηκε από την εφαρμογή του stress ανεξάρτητα από την παρουσία του υποστρώματος (Διάγραμμα 29).



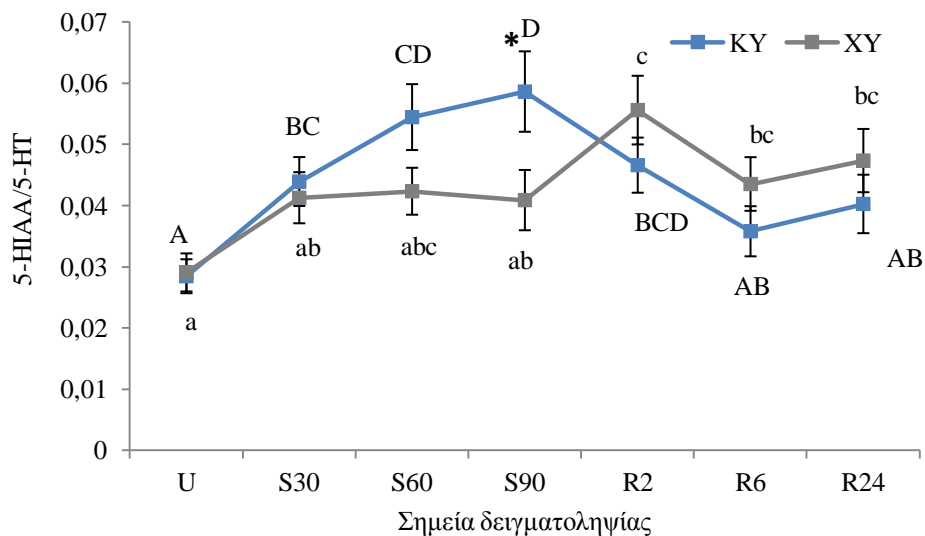
Διάγραμμα 29: Σεροτονίνη (5-HT) ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (KY) ή Χωρίς υπόστρωμα (XY). Τα σημεία δειγματοληψίας αναφέρονται στα ψάρια χωρίς stress (U), ψάρια που υποβλήθηκαν σε 30 (S30), 60 (S60) ή 90 (S90) λεπτά οξύ stress και ψάρια που υποβλήθηκαν σε οξύ stress και επανήλθαν στις αρχικές συνθήκες για 2 (R2), 6 (R6) ή 24 (R24) ώρες ($n=3$; $P_{KY}>0,05$, $P_{XY}>0,05$).

Ο μεταβολίτης της σεροτονίνης (5-HIAA) των ψαριών στις δεξαμενές με KY αυξήθηκε βαθμιαία κατά τη διάρκεια του stress με τις υψηλότερες τιμές ύστερα από 90 λεπτά (Διάγραμμα 30). Ύστερα από 2 ώρες επαναφοράς στις αρχικές συνθήκες, τα επίπεδα του 5-HIAA μειώθηκαν και επανήλθαν στα επίπεδα των ψαριών χωρίς stress ύστερα από 6 ώρες (Διάγραμμα 30). Στα ψάρια των δεξαμενών XY, ο μεταβολίτης της σεροτονίνης αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά ύστερα από 30 λεπτά stress και παρέμεινε στο ίδιο επίπεδο για την υπόλοιπη περίοδο του stress αλλά και κατά την επαναφορά (Διάγραμμα 30). Επιπλέον, τα επίπεδα του μεταβολίτη της σεροτονίνης ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα για τα ψάρια του KY σε σχέση με αυτά των XY ύστερα από 90 λεπτά stress ($P<0,01$).



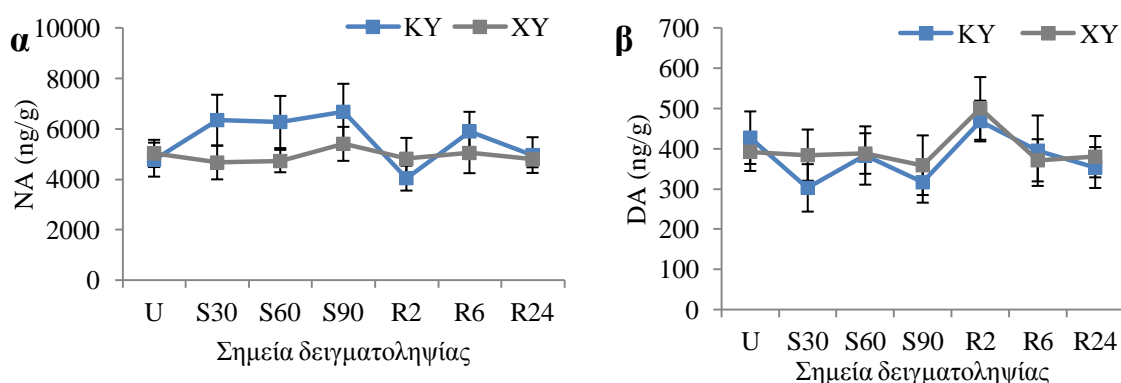
Διάγραμμα 30: Ο μεταβολίτης της σεροτονίνης (5-HIAA) ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (KY) ή Χωρίς υπόστρωμα (XY). Τα σημεία δειγματοληψίας αναφέρονται στα ψάρια χωρίς stress (U), ψάρια που υποβλήθηκαν σε 30 (S30), 60 (S60) ή 90 (S90) λεπτά οξύ stress και ψάρια που υποβλήθηκαν σε οξύ stress και επανήλθαν στις αρχικές συνθήκες για 2 (R2), 6 (R6) ή 24 (R24) ώρες ($n=3$). Σύμβολα με διαφορετικά κεφαλαία ή μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων του KY και του XY αντίστοιχα. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο επεμβάσεων (KY και XY) για το ίδιο σημείο δειγματοληψίας ($P_{KY}<0,001$, $P_{XY}<0,01$).

Η σεροτονινεργική δραστηριότητα όπως εκτιμάται από το λόγο 5-ΗΙΑΑ/5-ΗΤ, παρουσίασε παρόμοια αντίδραση με το μεταβολίτη της σεροτονίνης για τα ψάρια του ΚΥ (Διάγραμμα 31). Στα ψάρια των δεξαμενών ΧΥ, παρά το ότι κατά την περίοδο του stress δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις βασικές τιμές, η σεροτονινεργική δραστηριότητα αυξήθηκε ύστερα από 2 ώρες επαναφοράς και παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα καθ' όλο το χρόνο επαναφοράς που μελετήθηκε (Διάγραμμα 31). Επιπλέον, η σεροτονινεργική δραστηριότητα ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη για τα ψάρια του ΚΥ σε σχέση με αυτή των δεξαμενών ΧΥ ύστερα από 90 λεπτά stress ($P<0,05$).



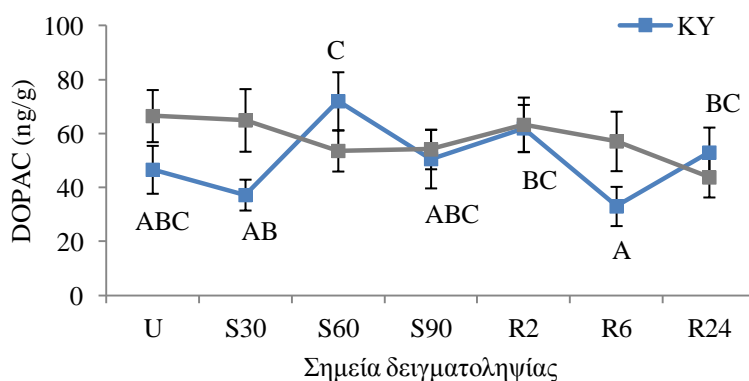
Διάγραμμα 31: Σεροτονινεργική δραστηριότητα (5-ΗΙΑΑ/5-ΗΤ) ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (ΚΥ) ή Χωρίς υπόστρωμα (ΧΥ). Τα σημεία δειγματοληψίας αναφέρονται στα ψάρια χωρίς stress (U), ψάρια που υποβλήθηκαν σε 30 (S30), 60 (S60) ή 90 (S90) λεπτά οξύ stress και ψάρια που υποβλήθηκαν σε οξύ stress και επανήλθαν στις αρχικές συνθήκες για 2 (R2), 6 (R6) ή 24 (R24) ώρες ($n=3$). Σύμβολα με διαφορετικά κεφαλαία ή μικρά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων του ΚΥ και του ΧΥ αντίστοιχα. Ο αστερίσκος (*) υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο επεμβάσεων (ΚΥ και ΧΥ) για το ίδιο σημείο δειγματοληψίας ($P_{KY}<0,001$, $P_{XY}<0,01$).

Η νοραδρεναλίνη (NA) και η ντοπαμίνη (DA) του εγκεφάλου δεν επηρεάστηκαν από την εφαρμογή του stress σε καμία επέμβαση (Διάγραμμα 32 α, β).



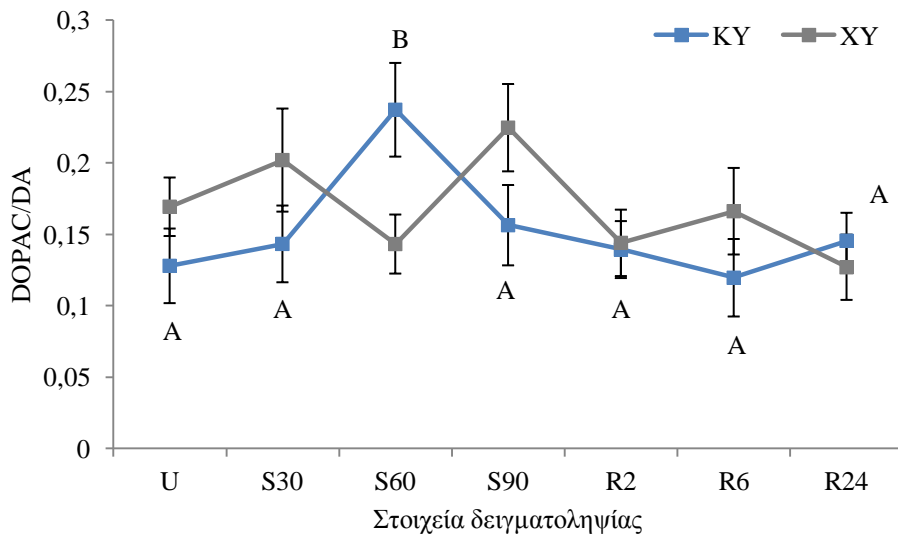
Διάγραμμα 32: Νοραδρεναλίνη, NA (α) και ντοπαμίνη, DA (β) ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (KY) ή Χωρίς υπόστρωμα (XY). Τα σημεία δειγματοληψίας αναφέρονται στα ψάρια χωρίς stress (U), ψάρια που υποβλήθηκαν σε 30 (S30), 60 (S60) ή 90 (S90) λεπτά οξύ stress και ψάρια που υποβλήθηκαν σε οξύ stress και επανήλθαν στις αρχικές συνθήκες για 2 (R2), 6 (R6) ή 24 (R24) ώρες (n=3; $P_{KY}>0,05$, $P_{XY}>0,05$).

Ο μεταβολίτης της ντοπαμίνης DOPAC είχε διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του stress και της επαναφοράς για τα ψάρια του KY αλλά οι τιμές δε διέφεραν από τις τιμές των ψαριών χωρίς stress σε κανένα σημείο δειγματοληψίας (Διάγραμμα 33). Στα ψάρια των δεξαμενών XY ο μεταβολίτης της ντοπαμίνης δεν επηρεάστηκε από την εφαρμογή του stress.



Διάγραμμα 33: Ο μεταβολίτης της ντοπαμίνης DOPAC ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (KY) ή Χωρίς υπόστρωμα (XY). Τα σημεία δειγματοληψίας αναφέρονται στα ψάρια χωρίς stress (U), ψάρια που υποβλήθηκαν σε 30 (S30), 60 (S60) ή 90 (S90) λεπτά οξύ stress και ψάρια που υποβλήθηκαν σε οξύ stress και επανήλθαν στις αρχικές συνθήκες για 2 (R2), 6 (R6) ή 24 (R24) ώρες (n=3). Σύμβολα με διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων του KY ($P_{KY}<0,05$, $P_{XY}>0,05$).

Η ντοπαμινεργική δραστηριότητα όπως εκτιμάται από το λόγο DOPAC/DA αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά ύστερα από 60 λεπτά stress στα ψάρια του KY, ενώ ύστερα από 90 λεπτά stress δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα ψάρια χωρίς stress (Διάγραμμα 34). Κατά τη διάρκεια της επαναφοράς στις αρχικές συνθήκες η ντοπαμινεργική δραστηριότητα δε διέφερε από αυτή των ψαριών χωρίς stress. Στα ψάρια των δεξαμενών XY ο λόγος DOPAC/DA δεν επηρεάστηκε από την εφαρμογή του stress (Διάγραμμα 34).



Διάγραμμα 34: Ντοπαμινεργική δραστηριότητα DOPAC/DA ατόμων τσιπούρας που εκτράφηκαν σε δεξαμενές με Κυανό υπόστρωμα (KY) ή Χωρίς υπόστρωμα (XY). Τα σημεία δειγματοληψίας αναφέρονται στα ψάρια χωρίς stress (U), ψάρια που υποβλήθηκαν σε 30 (S30), 60 (S60) ή 90 (S90) λεπτά οξύ stress και ψάρια που υποβλήθηκαν σε οξύ stress και επανήλθαν στις αρχικές συνθήκες για 2 (R2), 6 (R6) ή 24 (R24) ώρες (n=3). Σύμβολα με διαφορετικά κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων του KY ($P_{KY}<0,05$, $P_{XY}>0,05$).

σ

5.4 Συζήτηση

Τα παραγωγικά χαρακτηριστικά (ανάπτυξη, ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, επί % αύξηση του ζώντος βάρους, αξιοποίηση της τροφής), η επιθετικότητα και η φυσιολογία των ψαριών κατά τη διάρκεια της εκτροφής ήταν καλύτερα υπό την παρουσία του Κυανού υποστρώματος όπως παρατηρήθηκε και στα προηγούμενα πειράματα (Κεφάλαια Δ1 και Δ2). Οι βασικές τιμές κορτιζόλης στο παρόν πείραμα για τα ψάρια του Κυανού υποστρώματος συμφωνούν με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για την τσιπούρα (<10 ng/ml, Karakatsouli et al., 2007b; Papoutsoglou et al., 1999; Tort et al., 2011) ενισχύοντας την ευεργετική επίδραση του συγκεκριμένου υποστρώματος. Όμοια με τα παρόντα αποτελέσματα, χαμηλότερα επίπεδα κορτιζόλης σε ψάρια χωρίς stress παρατηρήθηκαν σε άτομα του είδους *Rhamdia quelen* (Barcellos et al., 2009), στο σολομό *Salmo salar* (Näslund et al., 2013) και σε οξύρρυγχους του είδους *Acipenser fulvescens* (Zubair et al., 2012) όταν εκτράφηκαν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον σε σχέση με τα αντίστοιχα ψάρια του μη εμπλουτισμένου περιβάλλοντος. Αντίθετα, αυξημένες τιμές κορτιζόλης παρατηρήθηκαν σε άτομα του είδους *Danio rerio* όταν εκτράφηκαν σε εμπλουτισμένο περιβάλλον (von Krogh et al., 2010), ενώ σε άτομα του ίδιου είδους και σε οξύρρυγχους του είδους *Acipenser oxyrinchus* τα επίπεδα της κορτιζόλης στα ψάρια χωρίς stress δεν επηρεάστηκαν από τον εμπλουτισμό του περιβάλλοντος (Gessner et al., 2009; Wilkes et al., 2012). Ωστόσο, η ελαφρά παρατεταμένη αύξηση της κορτιζόλης στα ψάρια Χωρίς υπόστρωμα συμφωνεί με τα επίπεδα κορτιζόλης ατόμων τσιπούρας που βρίσκονται σε χρόνιο stress (16,3 ng/ml, Alves et al., 2010; Montero et al., 1999 και 13,4 ng/ml Bermejo-Nogales et al., 2008).

Κατά τη διάρκεια του stress συνωστισμού, η πρωτογενής αντίδραση (αυξημένη κορτιζόλη πλάσματος αίματος και νευροδιαβιβαστές εγκέφαλου) παρατηρήθηκε στα ψάρια και των δύο επεμβάσεων. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα δεδομένα που έχουν αναφερθεί για άλλα είδη ψαριών που υποβλήθηκαν σε stress (Backström et al., 2011; Gesto et al., 2008; Karakatsouli et al., 2012; Lepage et al., 2002; López-Patiño et al., 2013). Ωστόσο, οι παράμετροι που εξετάστηκαν κατά τη διάρκεια του stress και ύστερα από την επαναφορά των ομάδων στις αρχικές συνθήκες υποδεικνύουν ότι τα ψάρια του Κυανού υποστρώματος και Χωρίς υπόστρωμα παρουσίασαν διαφορετική αντίδραση στο stress.

Στο παρόν πείραμα, κατά τη διάρκεια του stress συνωστισμού παρατηρήθηκε αύξηση των τιμών της κορτιζόλης (30 λεπτά stress) και μετέπειτα μείωση των τιμών της (60 και 90 λεπτά stress) υποδεικνύοντας ενδεχομένως την ενεργοποίηση των μηχανισμών αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (negative feedback) (Barton and Iwama, 1991). Παρόμοια μείωση της κορτιζόλης έχει παρατηρηθεί ξανά για την τσιπούρα (Arends et al., 1999; Breves et al., 2010; Saera-Vila et al., 2009) αλλά και άλλα είδη ψαριών (Hur et al., 2007; Li et al., 2009). Αντίθετα, έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα της κορτιζόλης στην τσιπούρα μπορεί να παραμείνουν υψηλά όταν υποβάλλεται σε stress συνωστισμού για 4 (Rotllant et al., 2001) ή ακόμα και 24 ώρες (Rotllant et al., 2000).

Στο παρόν πείραμα, η μείωση των τιμών της κορτιζόλης παρουσιάστηκε νωρίτερα στα ψάρια των δεξαμενών Χωρίς υπόστρωμα σε σχέση με αυτά του Κυανού υποστρώματος. Παρά το ότι, η αντίδραση αυτή θα μπορούσε να θεωρηθεί ως καλύτερη για τα ψάρια Χωρίς υπόστρωμα, τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης λόγω χρόνιου stress κατά τη διάρκεια της εκτροφής μπορεί να υποδηλώνουν εγκλιματισμό ή/και απευαισθητοποίηση του ενδονεφρικού συστήματος (interrenal tissue) που άμβλυνε την αντίδραση σε έναν επιπρόσθετο παράγοντα stress (Barton, 2002; van de Nieuwegiessen et al., 2008). Συγκεκριμένα στην περίπτωση της τσιπούρας, όταν υποβλήθηκε σε χρόνιο stress 14 ημερών παρουσίασε αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης, ενώ σε επακόλουθο οξύ stress παρατηρήθηκε καταστολή της αντίδρασης των ψαριών (Barton et al., 2005). Παρά τις διαφορές που παρουσιάστηκαν στα επίπεδα της κορτιζόλης κατά τη διάρκεια του stress, οι τιμές της για τα ψάρια και των δύο επεμβάσεων επανήλθαν στα βασικά επίπεδα 2 ώρες μετά την επαναφορά των ψαριών στις αρχικές συνθήκες.

Οι εργασίες που σχετίζονται με την αντίδραση στο stress των ψαριών που εκτρέφονται σε εμπλουτισμένο ή μη περιβάλλον δεν είναι πολλές. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Barcellos et al. (2009), τα επίπεδα της κορτιζόλης ατόμων του είδους *Rhamdia quelen* που υποβλήθηκαν σε οξύ stress (60 δευτερόλεπτα «κυνηγητό» με απόχη) επανήλθαν στα βασικά επίπεδα ύστερα από 12 ώρες επαναφοράς όταν τα ψάρια εκτρέφονταν σε λευκές δεξαμενές με καταφύγιο (πλαστικός σωλήνας). Αντίθετα στα ψάρια των δεξαμενών χωρίς καταφύγιο οι τιμές της κορτιζόλης επανήλθαν ύστερα από 24 ώρες. Σε αντίθεση με το παραπάνω, η ολική κορτιζόλη του σώματος νεαρών ιχθυδίων οξύρρυγχου του είδους *Acipenser fulvescens* που υποβλήθηκαν σε οξύ stress (5 λεπτά «κυνηγητό» με απόχη), επανήλθε ύστερα από 4 ώρες στα άτομα που εκτρέφονταν σε δεξαμενές χωρίς υπόστρωμα, ενώ στις δεξαμενές με υπόστρωμα η κορτιζόλη των ψαριών παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα (Zubair et al., 2012). Επιπλέον, τα επίπεδα κορτιζόλης του σολομού *Salmo salar* που υποβλήθηκε σε 30 λεπτά stress συνωστισμού δε διαφοροποιήθηκαν μεταξύ των ατόμων που εκτρέφονταν σε εμπλουτισμένες ή μη δεξαμενές (Näslund et al., 2013). Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν διαφορές στον πειραματικό σχεδιασμό κάθε μελέτης που δεν επιτρέπουν τη σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων (π.χ. παράγοντας stress που εφαρμόστηκε, είδος ψαριού, είδος εμπλουτισμού, σημεία δειγματοληψίας), διαπιστώνεται ότι ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος μπορεί να τροποποιήσει την αντίδραση της κορτιζόλης των ψαριών που υπόκεινται σε stress.

Όσον αφορά στις μονοαμίνες του εγκεφάλου, ο μεταβολίτης της σεροτονίνης (5-HIAA) ή/και η σεροτονινεργική δραστηριότητα (5-HIAA/5-HT) αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια του stress στα ψάρια και των δύο επεμβάσεων. Ενεργοποίηση του σεροτονινεργικού συστήματος έχει παρατηρηθεί σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου της ιριδίζουσας πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* όταν υποβλήθηκε σε stress συνωστισμού για 30 λεπτά και ως 3 ώρες (Backström et al., 2011; Schjolden et al., 2006). Ωστόσο, στο παρόν πείραμα, η σεροτονινεργική δραστηριότητα αυξήθηκε βαθμιαία εντός των 90 λεπτών του stress για τα ψάρια του Κυανού υποστρώματος, ενώ στα ψάρια Χωρίς υπόστρωμα παρέμεινε σταθερά σε υψηλά επίπεδα ύστερα από την πρώτη αύξηση που παρουσιάστηκε στα 30 λεπτά. Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να

σχετίζεται με τη διαφορετική αντίδραση που παρατηρήθηκε στην κορτιζόλη. Ο άξονας Υποθάλαμος-Υπόφυση-Ενδονεφρικό σύστημα των ψαριών συνδέεται με το σύστημα της σεροτονίνης του εγκέφαλου, όπως συμβαίνει και στα Θηλαστικά. Έχει αναφερθεί ότι η έγχυση κορτιζόλης ή αγωνιστών των υποδοχέων της σεροτονίνης επιφέρουν αλλαγές στα επίπεδα των μονοαμινών του εγκέφαλου ή της κορτιζόλης του πλάσματος αντίστοιχα (DiBattista et al., 2005; Medeiros and McDonald, 2013; Medeiros et al., 2010; Winberg et al., 1997). Στο παρόν πείραμα, αν και δεν μπορεί να συναχθεί κάποιο συμπέρασμα όσον αφορά στη σχέση αιτίου-αιτιατού μεταξύ της κορτιζόλης και της σεροτονίνης, αξίζει να σημειωθεί ότι η αύξηση της κορτιζόλης πραγματοποιήθηκε είτε προγενέστερα της ενεργοποίησης του σεροτονινεργικού συστήματος (για τα ψάρια του KY) είτε ταυτόχρονα με αυτό (για τα ψάρια Χωρίς υπόστρωμα).

Σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια επαναφοράς των ψαριών στις αρχικές συνθήκες, ο μεταβολίτης της σεροτονίνης και η σεροτονινεργική δραστηριότητα παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα για τα ψάρια Χωρίς υπόστρωμα. Αυτό υποδηλώνει ότι τα ψάρια που ζούσαν στο μη εμπλουτισμένο περιβάλλον δεν κατάφεραν να αντιμετωπίσουν το stress τουλάχιστον για το χρονικό διάστημα που μελετήθηκε. Τα δεδομένα που αφορούν στην αντίδραση του συστήματος της σεροτονίνης κατά την επαναφορά από μια κατάσταση stress είναι διφορούμενα. Για παράδειγμα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη σεροτονινεργική δραστηριότητα της ιριδιζουσας πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* ούτε όταν υποβλήθηκε σε 30 λεπτά stress συνωστισμού, αλλά ούτε και κατά τη διάρκεια των επακόλουθων 20 ωρών επαναφοράς (McKenzie et al., 2012). Αντίθετα, ο λόγος 5-ΗΙΑΑ/5-ΗΤ παρουσιάστηκε αυξημένος στην πέρκα *Perca flavescens* 9, 12 και 24 ώρες μετά από το οξύ stress (Haukenes et al., 2011). Ωστόσο, όμοια με τα ψάρια Χωρίς υπόστρωμα, το σύστημα της σεροτονίνης παρέμεινε ενεργοποιημένο 2 ώρες μετά από stress σε ποντίκια (unpredictable tail-shock, Adell et al., 1988).

Όσον αφορά στη ντοπαμινεργική δραστηριότητα, παρατηρήθηκε μόνο μια παροδική αύξηση στα ψάρια του Κυανού υποστρώματος. Παρόμοια αύξηση έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη ψαριών όταν υποβλήθηκαν σε διάφορους παράγοντες stress (DiBattista et al., 2005; Karakatsouli et al., 2012; Winberg and Nilsson, 1993b). Η αντίδραση αυτή όμως δεν παρουσιάστηκε στα ψάρια των δεξαμενών Χωρίς υπόστρωμα. Δυστυχώς, δεν υπάρχουν εργασίες που να μελετούν τους νευροδιαβιβαστές του εγκέφαλου των ψαριών που ζουν σε εμπλουτισμένο ή μη περιβάλλον και υπόκεινται σε οξύ stress. Παρ' όλα αυτά, τα δεδομένα που αφορούν σε άλλα σπονδυλωτά (π.χ. τρωκτικά), συμφωνώντας με τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος, υποδηλώνουν ότι ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος μπορεί να τροποποιήσει την κατεχολαμινεργική δραστηριότητα του εγκέφαλου που παρουσιάζεται λόγω του stress (Garrido et al., 2013; Hendriksen et al., 2010; Segovia et al., 2008).

Όσον αφορά στη γλυκόζη του πλάσματος, δεν παρατηρήθηκε η τυπική αύξηση που προκαλείται από το stress (Barton, 2002). Τα σχετικά υψηλά επίπεδα γλυκόζης των ψαριών χωρίς stress (99-107 mg/dL) σε σχέση με αυτά που αναφέρονται στη

βιβλιογραφία για την τσιπούρα που τρέφεται με περιορισμένο σιτηρέσιο σύμφωνα με το ζων βάρος και τη θερμοκρασία του νερού (40-60 mg/dL, Arends et al., 1999; Barton et al., 2005; Montero et al., 1999; Rotllant et al., 2001), μπορεί να υποδηλώνουν ότι τα ψάρια ήταν σε καλή διατροφική κατάσταση. Έτσι, τα αποθέματα υδατανθράκων για ενέργεια ενδέχεται να ήταν επαρκή ώστε να καλύψουν τις αυξημένες ανάγκες σε ενέργεια εξαιτίας του stress και συνεπώς να μην ενεργοποιήθηκε η γλυκογονόλυση ή/και η γλυκονογένεση (Barton, 2002). Η μείωση των τιμών της γλυκόζης για τα ψάρια του Κυανού υποστρώματος 6 ώρες μετά την επαναφορά, ενδεχομένως υποδεικνύει μια παροδική εξάντληση των αποθεμάτων της, που τελικά επανήλθαν στις βασικές τιμές ύστερα από 24 ώρες επαναφοράς.

Στα ψάρια Χωρίς υπόστρωμα δεν παρατηρήθηκε παρόμοια αντίδραση για τη γλυκόζη. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μια προτίμηση κατανάλωσης των λιπών για να ικανοποιηθούν οι ανάγκες των ψαριών σε ενέργεια, όπως φαίνεται από τη μείωση των τριακυλγλυκεριδίων κατά τη διάρκεια του stress. Επιπλέον, οι υψηλότερες τιμές των τριακυλγλυκεριδίων που παρατηρήθηκαν μετά από 24 ώρες επαναφοράς ήταν ταυτόσημες χρονικά με τη μείωση του ηπατοσωματικού δείκτη, υποδηλώνοντας κινητοποίηση των λιπών. Τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος επισημαίνουν μια διαφοροποίηση στον ενδιάμεσο μεταβολισμό μεταξύ των ψαριών του Κυανού υποστρώματος και Χωρίς υπόστρωμα που απαιτεί περαιτέρω έρευνα.

Ανεξάρτητα από την παρουσία του υποστρώματος, η αύξηση της ωσμωμοριακότητας και των ολικών πρωτεϊνών του πλάσματος του αίματος στα 30 λεπτά stress πιθανόν αντανακλούν μεταβολές στους μηχανισμούς ωσμωρύθμισης (Barton, 2002). Παρά τις μικρές διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν στη συνέχεια στις ολικές πρωτεΐνες αλλά και στον αιματοκρίτη, οι τιμές τους επανήλθαν στα βασικά επίπεδα μετά από 24 ώρες επαναφοράς. Τα δεδομένα του παρόντος πειράματος δεν υποδεικνύουν σοβαρή διαταραχή της ωσμωτικής και ιοντικής ισορροπίας των ψαριών σε καμία από τις δύο επεμβάσεις κατά τη διάρκεια του stress.

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος υποδεικνύουν ότι το Κυανό υπόστρωμα, μέσω της φυσικής του παρουσίας και όχι μόνο του χρώματός του είναι ευεργετικό για την ελεγχόμενη εκτροφή της τσιπούρας *Sparus aurata*, αφού βελτιώνει τα παραγωγικά της χαρακτηριστικά αλλά και αυτά που σχετίζονται με τη συμπεριφορά της. Τα δεδομένα αυτά προάγουν την ευζωία της τσιπούρας σε άτομα διαφορετικής ηλικίας και γενιάς. Επιπλέον, οι πιθανές διαφοροποιήσεις στις συνθήκες φωτισμού που δημιουργούνται στη δεξαμενή με την παρουσία του Κυανού υποστρώματος δεν επηρέασαν τα θετικά αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν με τη συνθήκη αυτή.

Η χρήση του Κυανού υποστρώματος ως μέσο εμπλουτισμού του περιβάλλοντος εκτροφής ενισχύεται ακόμη από την ισχυρή θετική επίδραση που παρουσίασε όταν άτομα τσιπούρας εκτράφηκαν σε διαφορετικές πυκνότητες. Συγκεκριμένα, η ευεργετική επίδραση του υποστρώματος εμφανίστηκε ανεξάρτητα από την πυκνότητα εκτροφής που εφαρμόστηκε αμβλύνοντας τις αρνητικές επιπτώσεις της χαμηλότερης πυκνότητας εκτροφής και προάγοντας την ανάπτυξη και τη συμπεριφορά των ψαριών της μεγάλης πυκνότητας. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη ότι η πρόκληση οξέος stress και η ικανότητα αντιμετώπισής του από το ψάρι είναι σημαντικός δείκτης της ευζωίας, φαίνεται ότι τα ψάρια του Κυανού υποστρώματος είναι σε καλύτερη φυσική κατάσταση ώστε να αντιμετωπίσουν μια δυσάρεστη κατάσταση σε σχέση με τα ψάρια που εκτράφηκαν σε δεξαμενές χωρίς εμπλουτισμό, αφού η παρουσία του τροποποίησε ευνοϊκά την αντίδραση τόσο κατά τη διάρκεια του stress όσο και κατά την επαναφορά τους στις αρχικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, τα ψάρια των δεξαμενών του Κυανού υποστρώματος παρουσίασαν μεγαλύτερης διάρκειας αντίδραση στην κορτιζόλη αλλά επαναφορά της σεροτονινεργικής δραστηριότητας στις αρχικές τιμές.

Ακόμη και όταν δόθηκε η δυνατότητα στην τσιπούρα να επιλέξει μεταξύ των υποστρωμάτων, παρατηρήθηκε ότι τα ψάρια δύο ηλικιών (0+ και 2+) προτίμησαν να βρίσκονται στο Κυανό υπόστρωμα σε σχέση με την επέμβαση Χωρίς υπόστρωμα, γεγονός που συμφωνεί και με τα θετικά αποτελέσματα των μακροχρόνιων πειραμάτων. Έτσι, ενισχύεται η άποψη ότι το Κυανό υπόστρωμα προάγει την ευζωία της τσιπούρας. Λαμβάνοντας υπόψη ότι όταν τα ψάρια είναι υγιή και καλύπτουν τις ανάγκες τους (έχουν αυτό που ζητούν), μπορούμε να θεωρήσουμε ότι βελτιώνεται η ευζωία τους (Dawkins, 2004). Παρ' όλα αυτά, τα θετικά αποτελέσματα θα ενισχύονταν περαιτέρω εάν πραγματοποιούνταν δοκιμές που θα επιβεβαίωναν ότι οι επιλογές αυτές έχουν αξία για την τσιπούρα (motivational tests).

Εκτιμώντας τα άλλα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα αυτό, διαπιστώνεται ότι το Ερυθροκαφέ υπόστρωμα αν και αρχικά παρουσίασε θετικά αποτελέσματα σε ψάρια ηλικίας 1+, σε επόμενη πειραματική δοκιμή με ψάρια ηλικίας 0+ τα θετικά αποτελέσματα των παραγωγικών χαρακτηριστικών ατόνησαν. Είναι πιθανό ότι στην επίδραση του Ερυθροκαφέ υποστρώματος στην τσιπούρα εμπλέκονται διάφοροι βιοτικοί ή/και αβιοτικοί παράγοντες που θα πρέπει να διερευνηθούν πριν τη χρήση του συγκεκριμένου υποστρώματος ως μια κοινή συνθήκη στις ελεγχόμενες εκτροφές.

Όσον αφορά στο Πράσινο υπόστρωμα, φαίνεται ότι δε διαφοροποίησε αρκετά το περιβάλλον εκτροφής ώστε να επηρεάσει την τσιπούρα. Αν και ένας εξωτερικός παρατηρητής θα θεωρούσε ότι το πράσινο χρώμα είναι πιο κοντά στα χρώματα που συναντά η τσιπούρα στο φυσικό της περιβάλλον, φαίνεται πως αφενός η «αντίληψη» του ψαριού είναι διαφορετική και απαιτεί περαιτέρω έρευνα και αφετέρου σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το Πράσινο υπόστρωμα δε διέφερε από το περιβάλλον της επέμβασης. Χωρίς υπόστρωμα και ίσως δε «διέγειρε» αρκετά το ψάρι. Επιπλέον, το γεγονός ότι η τσιπούρα απέφυγε το Πράσινο υπόστρωμα σε όλες σχεδόν τις δοκιμές προτίμησης, ενδεχομένως υποδεικνύει άλλους μηχανισμούς που σχετίζονται με το ψάρι και απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση.

Όσον αφορά στα αποτελέσματα των μονοαμινών του εγκεφάλου σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της επιθετικής συμπεριφοράς, φαίνεται να ενισχύουν την υπόθεση ότι η ευεργετική επίδραση του εμπλουτισμού του περιβάλλοντος (Κυανό ή Ερυθροκαφέ υπόστρωμα) σχετίζεται με διαφοροποίηση των κοινωνικών συναναστροφών μεταξύ των ψαριών. Έτσι, υποδεικνύεται η εγκαθίδρυση μιας κοινωνικής ιεραρχίας που προκαλεί λιγότερο stress στα ψάρια που εκτρέφονται σε δεξαμενές με εμπλουτισμό. Η εμπλοκή των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου στη συμπεριφορά των ψαριών παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με αυτή των Θηλαστικών (Winberg and Nilsson, 1993a) και αποτελεί έναυσμα για τη μελέτη της ικανότητας των ψαριών να αξιολογούν το περιβάλλον τους (Galhardo and Oliveira, 2009).

Παράπλευρη, αλλά ιδιαίτερης σημασίας παρατήρηση της παρούσας μελέτης είναι τα αυξημένα επίπεδα νιτρωδών ιόντων στις δεξαμενές με υπόστρωμα, παρά τις κλιμακούμενες προσπάθειες που καταβλήθηκαν ώστε να αποφευχθεί το πρόβλημα αυτό. Χωρίς αμφιβολία, η προσθήκη υποστρώματος σε μονάδες εντατικής εκτροφής χερσαίων εγκαταστάσεων θα όξυνε το πρόβλημα. Συνυπολογίζοντας όμως τα ευεργετικά αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν με την παρουσία του Κυανού υποστρώματος στην ανάπτυξη και τη συμπεριφορά των ψαριών, είναι σημαντική η ανεύρεση λύσεων. Για παράδειγμα, η χρήση του υποστρώματος ως βιολογικό φίλτρο με σύστημα διπλού πυθμένα (Brunty, 1995) θα μπορούσε να εκμηδενίσει την αύξηση των νιτρωδών ιόντων.

Ασφαλώς, η προσθήκη του Κυανού υποστρώματος δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί σε κλωβούς που αποτελούν και το κύριο σύστημα εκτροφής της τσιπούρας. Ωστόσο, το αναδυόμενο ενδιαφέρον προς τα κλειστά συστήματα παραγωγής και την τεχνολογία κλειστών πλωτών συστημάτων (closed-containment technology) (Chadwick et al., 2010) ανοίγουν νέους ορίζοντες ως προς την εφαρμογή ενός τέτοιου αποτελεσματικού εμπλουτισμού. Η χρήση του σε χερσαία συστήματα εντατικής εκτροφής θα προήγαγε την παραγωγικότητα, ενώ σε πειραματικές εργαστηριακές εγκαταστάσεις θα βοηθούσε στη διεξαγωγή πειραμάτων με ομάδες βελτιωμένης φυσιολογίας. Θεωρείται ιδιαίτερα ενθαρρυντικό το γεγονός ότι μια τόσο απλή βελτίωση του περιβάλλοντος διαβίωσης (όπως η προσθήκη του συγκεκριμένου υποστρώματος) επέφερε πολλαπλά οφέλη τόσο στο ψάρι όσο και στην παραγωγή. Σύμφωνα με τη Sneddon (2007), μια μικρή αλλαγή στις συνήθεις διαδικασίες που ακολουθούνται στις

ιχθυοκαλλιέργειες μπορεί να προκαλέσει πραγματική αλλαγή στην ανάπτυξη των ψαριών και τελικά να βελτιώσει την ευζωία τους και τα οικονομικά οφέλη.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adell, A., Trullas, R., Gelpi, E., (1988). Time course of changes in serotonin and noradrenaline in rat brain after predictable or unpredictable shock. *Brain Research*, 459: 54-59.
- Ahmad, F., Richardson, M.K., (2013). Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: Impact of environmental complexity. *Behavioural Processes*, 92: 88-98.
- Ainsworth, A.J., Bowser, P.R., Beleau, M.H., (1985). Serum cortisol levels in channel catfish, from production ponds. *The Progressive Fish-Culturist*, 47: 176-181.
- Allen, D.M., Hallows, T.E., (1997). Solar pruning of retinal rods in albino rainbow trout. *Visual neuroscience*, 14: 589-600.
- Allen, D.M., Pipes, C., Deramus, K., Hallows, T.E. (1999). A comparison of light-induced rod degeneration in two teleost models. In "Retinal degenerative diseases and experimental therapy" Ed. Hollyfield, J.G., Anderson, R.E., LaVail, M.M., Springer US, New York, pp. 337-350.
- Almazán-Rueda, P., Schrama, J.W., Verreth, J.A.J., (2004). Behavioural responses under different feeding methods and light regimes of the African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. *Aquaculture*, 231: 347-359.
- Alves, R.N., Cordeiro, O., Silva, T.S., Richard, N., de Vareilles, M., Marino, G., Di Marco, P., Rodrigues, P.M., Conceição, L.E.C., (2010). Metabolic molecular indicators of chronic stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) using comparative proteomics. *Aquaculture*, 299: 57-66.
- AOAC, (1984). Official methods of the Association of Official Analytical Chemists.
- Arends, R.J., Mancera, J.M., Munoz, J.L., Bonga, S.E.W., Flik, G., (1999). The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology*, 163: 149-157.
- Arndt, R.E., Routledge, M.D., Wagner, E.J., Mellenthin, R.F., (2001). Influence of raceway substrate and design on fin erosion and hatchery performance of rainbow trout. *North American Journal of Aquaculture*, 63: 312-320.
- Ashley, P.J., (2007). Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104: 199-235.
- Avdesh, A., Martin-Iverson, M.T., Mondal, A., Chen, M., Askraha, S., Morgan, N., Lardelli, M., Groth, D.M., Verdile, G., Martins, R.N., (2012). Evaluation of color preference in zebrafish for learning and memory. *Journal of Alzheimer's Disease*, 28: 459-469.

- Ayllón, D., Almodóvar, A., Nicola, G.G., Elvira, B., (2010). Modelling brown trout spatial requirements through physical habitat simulations. *River Research and Applications*, 26: 1090-1102.
- Backström, T., Schjolden, J., Øverli, Ø., Thörnqvist, P.-O., Winberg, S., (2011). Stress effects on AVT and CRF systems in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) divergent in stress responsiveness. *Hormones and Behavior*, 59: 180-186.
- Baras, E., Kestemont, P., Mélard, C., (2003). Effect of stocking density on the dynamics of cannibalism in sibling larvae of *Perca fluviatilis* under controlled conditions. *Aquaculture*, 219: 241-255.
- Barba-Escobedo, P.A., Gould, G.G., (2012). Visual social preferences of lone zebrafish in a novel environment: strain and anxiolytic effects. *Genes, Brain and Behavior*, 11: 366-373.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., da Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E., (2009). Influence of color background and shelter availability on jundiá (*Rhamdia quelen*) stress response. *Aquaculture*, 288: 51-56.
- Barreto, R.E., Carvalho, G.G.A., Volpato, G.L., (2011). The aggressive behavior of Nile tilapia introduced into novel environments with variation in enrichment. *Zoology*, 114: 53-57.
- Barton, B.A., (2002). Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 517-525.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1: 3-26.
- Barton, B.A., Ribas, L., Acerete, L., Tort, L., (2005). Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. *Aquaculture Research*, 36: 172-179.
- Bartussek, H., (1999). A review of the animal needs index (ANI) for the assessment of animals' well-being in the housing systems for Austrian proprietary products and legislation. *Livestock Production Science*, 61: 179-192.
- Basquill, S.P., Grant, J.W.A., (1998). An increase in habitat complexity reduces aggression and monopolization of food by zebra fish (*Danio rerio*). *Canadian Journal of Zoology*, 76: 770-772.
- Basurco, B., Lovatelli, A., García, B. (2011) Current status of Sparidae aquaculture. In "Sparidae: Biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species" Ed. Pavlidis, M., Mylonas, C., Blackwell Publishing Ltd., Iraklion, Crete, pp. 1-50.

- Bateson, M., (2004). Mechanisms of decision-making and the interpretation of choice tests. *Animal Welfare*, 13: 115-120.
- Belz, E.E., Kennell, J.S., Czambel, R.K., Rubin, R.T., Rhodes, M.E., (2003). Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 76: 481-486.
- Benhaïm, D., Leblanc, C.A., Lucas, G., (2009). Impact of a new artificial shelter on Arctic charr (*Salvelinus alpinus*, L.) behaviour and culture performance during the endogenous feeding period. *Aquaculture*, 295: 38-43.
- Benhaïm, D., Bégout, M.-L., Chatain, B., (2013). Unfamiliar congener used as a visual attractor in wild caught and domesticated sea bass (*Dicentrarchus labrax*) placed in a T-maze. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 4.
- 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: 71-97.
- Bergqvist, J., Gunnarsson, S., (2011). Finfish aquaculture: Animal welfare, the environment, and ethical implications. *Journal Agricultural and Environmental Ethics*, 26: 75-99.
- Bermejo-Nogales, A., Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A., Pérez-Sánchez, J., (2008). Confinement exposure induces glucose regulated protein 75 (GRP75/mortalin/mtHsp70/PBP74/HSPA9B) in the hepatic tissue of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 149: 428-438.
- Bessinis, D.P., Dalla, C., Papadopoulou Daifoti, Z., Tiligada, E., (2012). Histamine involvement in visual development and adaptation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53: 7498-7503.
- Bierbach, D., Schulte, M., Herrmann, N., Tobler, M., Stadler, S., Jung, C.T., Kunkel, B., Riesch, R., Klaus, S., Ziege, M., (2011). Predator-induced changes of female mating preferences: innate and experiential effects. *BMC Evolutionary Biology*, 11: 190.
- Blakeslee, C., McRobert, S.P., Brown, A.C., Clotfelter, E.D., (2009). The effect of body coloration and group size on social partner preferences in female fighting fish (*Betta splendens*). *Behavioural Processes*, 80: 157-161.
- Blaser, R.E., Goldsteinholm, K., (2012). Depth preference in zebrafish, *Danio rerio*: control by surface and substrate cues. *Animal Behaviour*, 83: 953-959.
- Blaser, R.E., Rosemberg, D.B., (2012). Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): Dissociation of black/white preference and novel tank test. *PloS one*, 7: e36931.

- Blom, H.J.M., Tintelen, G.V., Baumans, V., Broek, J., Beynen, A.C., (1995). Development and application of a preference test system to evaluate housing conditions for laboratory rats. *Applied Animal Behaviour Science*, 43: 279-290.
- Bone, Q., Moore, R.H. (2008). *Biology of fishes*. 3d ed. Taylor & Francis Group, Abingdon.
- Boissy, A., Manteuffel, G., Jensen, M.B., Moe, R.O., Spruijt, B., Keeling, L.J., Winckler, C., Forkman, B., Dimitrov, I., Langbein, J., Bakken, M., Veissier, I., Aubert, A., (2007). Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiology and Behavior*, 92:375–397.
- Bower, C.F., Bidwell, J.P., (1978). Ionisation of ammonia in sea water: Effects of temperature, pH and salinity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 35: 1112-1016.
- Braithwaite, V., 2010. *Do fish feel pain?* Oxford University Press, New York, 194 pp.
- Braithwaite, V.A., Salvanes, A.G.V., (2005). Environmental variability in the early rearing environment generates behaviourally flexible cod: implications for rehabilitating wild populations. *Proceedings of the Royal Society B*, 272: 1107-1113.
- Brenes, J.C., Rodríguez, O., Fornaguera, J., (2008). Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 89: 85-93.
- Breves, J.P., Hirano, T., Grau, E.G., (2010). Ionoregulatory and endocrine responses to disturbed salt and water balance in Mozambique tilapia exposed to confinement and handling stress. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A*, 155: 294-300.
- Broom, D.M., (1991). Animal welfare: concepts and measurement. *Journal of Animal Science*, 69: 4167.
- Brunty, J.L. (1995). *Biological filtration for ornamental fish production and factors affecting total ammonia nitrogen and nitrate removal rates*. University of Florida.
- Bruslé-Sicard, S., Fourcalt, B., (1997). Recognition of sex-inverting protandric *Sparus aurata*: ultrastructural aspects. *Journal of Fish Biology*, 50: 1094-1103.
- Brydges, N.M., Braithwaite, V.A., (2009). Does environmental enrichment affect the behaviour of fish commonly used in laboratory work? *Applied Animal Behaviour Science*, 118: 137-143.
- Burns, J.G., Saravanan, A., Helen Rodd, F., (2009). Rearing Environment Affects the Brain Size of Guppies: Lab-Reared Guppies have Smaller Brains than Wild-Caught Guppies. *Ethology*, 115: 122-133.

- Cammarata, M., Vazzana, M., Accardi, D., Parrinello, N., (2012). Seabream (*Sparus aurata*) long-term dominant-subordinate interplay affects phagocytosis by peritoneal cavity cells. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26: 580-587.
- Canario, A.V.M., Condeca, J., Power, D.M., Ingleton, P.M., (1998). The effect of stocking density on growth in the gilthead sea-bream, *Sparus aurata* (L.). *Aquaculture Research*, 29: 177-181.
- Castellini, C., Mugnai, C., Dal Bosco, A., (2002). Effect of organic production system on broiler carcass and meat quality. *Meat Science*, 60: 219-225.
- Castro, J.J., Caballero, C., (2004). Effect of the light intensity upon the agonistic behaviour of juvenile of white-seabream (*Diplodus sargus cadenati* de la Paz, Bauchot and Daget, 1974). *Aggressive Behavior*, 30: 313-318.
- Chadwick, E.M.P., Parsons, G.J., Sayavong, B. (2010). Evaluation of Closed-containment Technologies for Saltwater Salmon Aquaculture. NRC Research Press, Ottawa, Ontario, Canada.
- Chaoui, L., Kara, M.H., Faure, E., Quignard, J.P., (2006). Growth and reproduction of the gilthead seabream *Sparus aurata* in Mellah lagoon (north-eastern Algeria). *Scientia Marina*, 70: 545-552.
- Chen, H.F., Su, H.M., (2012). Fish oil supplementation of maternal rats on an n-3 fatty acid-deficient diet prevents depletion of maternal brain regional docosahexaenoic acid levels and has a postpartum anxiolytic effect. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23: 299-305.
- Cheng, H.W., Fahey, A., (2009). Effects of group size and repeated social disruption on the serotonergic and dopaminergic systems in two genetic lines of White Leghorn laying hens. *Poultry Science*, 88: 2018-2025.
- Chinen, A., Matsumoto, Y., Kawamura, S., (2005). Spectral differentiation of blue opsins between phylogenetically close but ecologically distant goldfish and zebrafish. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 9460-9466.
- Christie, W.W., (1990) Preparation of methyl esters-Part 1. *LipidTechnology* 2:48-49.
- Colwill, R.M., Raymond, M.P., Ferreira, L., Escudero, H., (2005). Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural processes*, 70: 19-31.
- Conte, F.S., (2004). Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 86: 205-223.
- Coulibaly, A., Ouattara, I.N., Koné, T., N'Douba, V., Snoeks, J., Gooré Bi, G., Kouamélan, E.P., (2007). First results of floating cage culture of the African catfish *Heterobranchus longifilis* Valenciennes, 1840: Effect of stocking density on survival and growth rates. *Aquaculture*, 263: 61-67.

- Council Decision 78/923/EEC of 19 June 1978 concerning the conclusion of the European Convention for the Protection of Animals kept for Farming Purposes. *Official Journal of European Communities*, L 323, 12–22.
- Couppis, M.H., Kennedy, C.H., (2008). The rewarding effect of aggression is reduced by nucleus accumbens dopamine receptor antagonism in mice. *Psychopharmacology*, 197: 449-456.
- Cuadros-Rodríguez, L., Bagur-González, M.G., Sánchez-Viñas, M., González-Casado, A., Gómez-Sáez, A.M., (2007). Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. *Journal of Chromatography A*, 1158: 33-46.
- Cubitt, K.F., Winberg, S., Huntingford, F.A., Kadri, S., Crampton, V.O., Øverli, Ø., (2008). Social hierarchies, growth and brain serotonin metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) kept under commercial rearing conditions. *Physiology & Behavior*, 94: 529-535.
- Czarnecka, M., Kobak, J., Wiśniewski, R., (2010). Preferences of juveniles and adults of the invasive Ponto-Caspian amphipod *Pontogammarus robustoides* for various species of macrophytes and artificial substrata. *Hydrobiologia*, 655: 79-88.
- Dalla, C., Antoniou, K., Drossopoulou, G., Xagoraris, M., Kokras, N., Sfikakis, A., Papadopoulou-Daifoti, Z., (2005). Chronic mild stress impact: Are females more vulnerable? *Neuroscience*, 135: 703-714.
- Dalla, C., Antoniou, K., Kokras, N., Drossopoulou, G., Papathanasiou, G., Bekris, S., Daskas, S., Papadopoulou-Daifoti, Z., (2008). Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission. *Physiology & Behavior*, 93: 595-605.
- Damsgård, B., Huntingford, F. (2012) Fighting and aggression. In "Aquaculture and Behaviour" Ed. Huntingford, F., Jobling, M., Kadri, S., Wiley Online Library, Pondicherry, India, pp. 248-285.
- Dawkins, M.S., (2004). Using behaviour to assess animal welfare. *Animal Welfare*, 13: 3-7.
- Delicio, H.C., Barreto, R.E., Normandes, E.B., Luchiari, A.C., Marcondes, A.L., (2006). A place preference test in the fish Nile tilapia. *Journal of Experimental Animal Science*, 43: 141-148.
- DeMar Jr, J.C., Ma, K., Bell, J.M., Igarashi, M., Greenstein, D., Rapoport, S.I., (2006). One generation of n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and aggression test scores in rats. *Journal of Lipid Research*, 47: 172-180.
- Desjardins, J.K., Fernald, R.D., (2010). What do fish make of mirror images? *Biology Letters*, 6: 744-747.

- DiBattista, J.D., Anisman, H., Whitehead, M., Gilmour, K.M., (2005). The effects of cortisol administration on social status and brain monoaminergic activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology*, 208: 2707-2718.
- Dou, S., Seikai, T., Tsukamoto, K., (2000). Cannibalism in Japanese flounder juveniles, *Paralichthys olivaceus*, reared under controlled conditions. *Aquaculture*, 182: 149-159.
- EFSA (European Food Safety Authority), (2008). Scientific report of EFSA prepared by working group on seabass/seabream welfare on animal welfare aspects of husbandry systems for farmed european seabass and gilthead seabream. *The EFSA Journal*, Annex I: 844: 1-89.
- EFSA (European Food Safety Authority), (2009). General approach to fish welfare and to the concept of sentience in fish-Scientific opinion of the panel on animal health and welfare. *The EFSA Journal*, 954: 1-27.
- EFSA (European Food Safety Authority), (2010). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol 1. *The EFSA Journal*, 8: 1-107.
- Ellis, T., Scott, S., Bromage, N., North, B., Porter, M., (2001). What is stocking density? *Trout News*: 35-37.
- Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N.R., Porter, M., Gadd, D., (2002). The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 61: 493-531.
- Ellis, T., Yildiz, H.Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M.T., Tort, L., Øverli, Ø., Martins, C.I.M., (2012). Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 163-188.
- Emerson, K., Russo, R.C., Lund, R.E., Thurston, R.V., (1975). Aqueous ammonia equilibrium calculations: Effect of pH and temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32: 2379-2383.
- Emre, Y., Balık, İ., Sümer, C., Oskay, D.A., Yesilçimen, H.Ö., (2009). Growth and reproduction studies on gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Beymelek Lagoon, Turkey. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 8: 103-114.
- Fänge, R., Nilsson, S., (1985). The fish spleen: structure and function. *Experientia*, 41: 152-158.
- FAWK, (Farmed Animal Welfare Council), (1996). Report on the Welfare of Farmed Fish. Surrey, Surbiton.
- Fernald, R.D., (1991). Teleost vision: seeing while growing. *Journal of Experimental Zoology*, 256: 167-180.

- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
- Fortes-Silva, R., Sánchez-Vázquez, F.J., Martínez, F.J., (2011). Effects of pretreating a plant-based diet with phytase on diet selection and nutrient utilization in European sea bass. *Aquaculture*, 319: 417-422.
- Fox, C., Merali, Z., Harrison, C., (2006). Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behavioural Brain Research*, 175: 1-8.
- Fraser, S., Gotceitas, V., Brown, J.A., (1996). Interactions between age-classes of Atlantic cod and their distribution among bottom substrates. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53: 305-314.
- Galhardo, L., Oliveira, R.F., (2009). Psychological stress and welfare in fish. *Annual Review of Biomedical Sciences*, 11: 1-20.
- Galhardo, L., Almeida, O., Oliveira, R.F., (2009). Preference for the presence of substrate in male cichlid fish: Effects of social dominance and context. *Applied Animal Behaviour Science*, 120: 224-230.
- Garrido, P., De Blas, M., Ronzoni, G., Cordero, I., Antón, M., Giné, E., Santos, A., Del Arco, A., Segovia, G., Mora, F., (2013). Differential effects of environmental enrichment and isolation housing on the hormonal and neurochemical responses to stress in the prefrontal cortex of the adult rat: relationship to working and emotional memories. *Journal of Neural Transmission*, 120: 829-843.
- Gessner, J., Kamerichs, C.M., Kloas, W., Wuertz, S., (2009). Behavioural and physiological responses in early life phases of Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus* Mitchill 1815) towards different substrates. *Journal of Applied Ichthyology*, 25: 83-90.
- Gesto, M., Soengas, J.L., Míguez, J.M., (2008). Acute and prolonged stress responses of brain monoaminergic activity and plasma cortisol levels in rainbow trout are modified by PAHs (naphthalene, β -naphthoflavone and benzo (α) pyrene) treatment. *Aquatic Toxicology*, 86: 341-351.
- Goldan, O., Popper, D., Karplus, I.I., (2003). Food competition in small groups of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Israeli Journal of Aquaculture*, 55: 94-106.
- Gómez-Laplaza, L.M., Fuente, A., (2007). Shoaling decisions in angelfish: the roles of social status and familiarity. *Ethology*, 113: 847-855.
- Gómez-Laplaza, L.M., Gerlai, R., (2011). Spontaneous discrimination of small quantities: shoaling preferences in angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Animal Cognition*, 14: 565-574.

- Gonda, A., Herczeg, G., Merilä, J., (2009). Habitat-dependent and-independent plastic responses to social environment in the nine-spined stickleback (*Pungitius pungitius*) brain. *Proceedings of the Royal Society B*, 276: 2085-2092.
- Gonyou, H.W., (1994). Why the study of animal behavior is associated with the animal welfare issue. *Journal of Animal Science*, 72: 2171-2177.
- Gotceitas, V., Brown, J.A., (1993). Substrate selection by juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*): effects of predation risk. *Oecologia*, 93: 31-37.
- Greaves, K., Tuene, S., (2001). The form and context of aggressive behaviour in farmed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 193: 139-147.
- Greenberg, A.E., Clesceri, L.S., Eaton, A.D., (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, pp. 4-85.
- Hamazaki, T., Hamazaki, K., (2008). Fish oils and aggression or hostility. *Progress in Lipid Research*, 47: 221-232.
- Han, D., Xie, S., Lei, W., Zhu, X., Yang, Y., (2005). Effect of light intensity on growth, survival and skin color of juvenile Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Günther). *Aquaculture*, 248: 299-306.
- Haukenes, A.H., Barton, B.A., Renner, K.J., (2011). Plasma cortisol and hypothalamic monoamine responses in yellow perch *Perca flavescens* after intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37: 425-432.
- Hendriksen, H., Prins, J., Olivier, B., Oosting, R.S., (2010). Environmental enrichment induces behavioral recovery and enhanced hippocampal cell proliferation in an antidepressant-resistant animal model for PTSD. *PloS one*, 5: e11943.
- Höjesjö, J., Johnsson, J., Bohlin, T., (2004). Habitat complexity reduces the growth of aggressive and dominant brown trout (*Salmo trutta*) relative to subordinates. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 56: 286-289.
- Huntingford, F., Kadri, S., Jobling, M. (2012) Introduction: Aquaculture and Behaviour. In "Aquaculture and Behavior" Ed. Huntingford, F., Kadri, S., Jobling, M., Blackwell Publishing Ltd., Chichester, West Sussex, UK, pp. 1-35.
- Huntingford, F.A., Metcalfe, N.B., Thorpe, J.E., Graham, W.D., Adams, C.E., (1990). Social dominance and body size in Atlantic salmon parr, *Salmo solar* L. *Journal of Fish Biology*, 36: 877-881.
- Huntingford, F.A., Adams, C., Braithwaite, V.A., Kadri, S., Pottinger, T.G., Sandøe, P., Turnbull, J.F., (2006). Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology*, 68: 332-372.
- Hur, J.W., Park, I.-S., Chang, Y.J., (2007). Physiological responses of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, to a series stress during the transportation process. *Ichthyological Research*, 54: 32-37.

- Ilin, Y., Richter-Levin, G., (2009). Enriched environment experience overcomes learning deficits and depressive-like behavior induced by juvenile stress. *PLoS one*, 4: e4329.
- Inui, R., Onikura, N., Kawagishi, M., Nakatani, M., Tomiyama, Y., Oikawa, S., (2010). Selection of spawning habitat by several gobiid fishes in the subtidal zone of a small temperate estuary. *Fisheries Science*, 76: 83-91.
- Iwama, G.K., (1998). Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851: 304-310.
- Jobling, M., (1995). Simple indices for the assessment of the influences of social environment on growth performance, exemplified by studies on Arctic charr. *Aquaculture International*, 3: 60-65.
- Johnsson, J.I., Carlsson, M., Sundström, L.F., (2000). Habitat preference increases territorial defence in brown trout (*Salmo trutta*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 48: 373-377.
- Johnsson, J.I., Winberg, S., Sloman, K.A. (2006) Social Interactions. In "Behaviour and Physiology of Fish" Ed. Sloman, K.A., Wilson, R.W., S., B., Elsevier, San Diego, pp. 151-196.
- Jones, K.A., Godin, J.G.J., (2010). Are fast explorers slow reactors? Linking personality type and anti-predator behaviour. *Proceedings of the Royal Society B*, 277: 625-632.
- Kadry, V.O., Barreto, R.E., (2010). Environmental enrichment reduces aggression of pearl cichlid (*Geophagus brasiliensis*) during resident-intruder interactions. *Neotrop. Ichthyol.*, 8: 329-332.
- Karakatsouli, N., Papoutsoglou, S.E., Manolessos, G., (2007a). Combined effects of rearing density and tank colour on the growth and welfare of juvenile white sea bream *Diplodus sargus* L. in a recirculating water system. *Aquaculture Research*, 38: 1152-1160.
- Karakatsouli, N., Papoutsoglou, E.S., Sotiropoulos, N., Mourtikas, D., Stigen-Martinsen, T., Papoutsoglou, S.E., (2010). Effects of light spectrum, rearing density and light intensity on growth performance of scaled and mirror common carp *Cyprinus carpio* reared under recirculating system conditions. *Aquacultural Engineering*, 42: 121-127.
- Karakatsouli, N., Katsakoulis, P., Leondaritis, G., Kalogiannis, D., Papoutsoglou, S.E., Chadio, S., Sakellaridis, N., (2012). Acute stress response of European sea bass *Dicentrarchus labrax* under blue and white light. *Aquaculture*, 364-365: 48-52.
- Karakatsouli, N., Papoutsoglou, S.E., Pizzonia, G., Tsatsos, G., Tsopelakos, A., Chadio, S., Kalogiannis, D., Dalla, C., Polissidis, A., Papadopoulou-Daifoti, Z., (2007b). Effects of light spectrum on growth and physiological status of gilthead

- seabream *Sparus aurata* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reared under recirculating system conditions. *Aquacultural Engineering*, 36: 302-309.
- Karplus, I., Popper, D., Goldan, O., (2000). The effect of food competition and relative size of group members on growth of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 22: 119-123.
- Kelley, J.L., Magurran, A.E., Macías García, C., (2006). Captive breeding promotes aggression in an endangered Mexican fish. *Biological Conservation*, 133: 169-177.
- Kidd, P.M., (2007). Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids. *Alternative medicine review*, 12: 207.
- Kihlslinger, R.L., Nevitt, G.A., (2006). Early rearing environment impacts cerebellar growth in juvenile salmon. *Journal of Experimental Biology*, 209: 504-509.
- Kihlslinger, R.L., Lema, S.C., Nevitt, G.A., (2006). Environmental rearing conditions produce forebrain differences in wild Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 145: 145-151.
- Kistler, C., Hegglin, D., Würbel, H., König, B., (2011). Preference for structured environment in zebrafish (*Danio rerio*) and checker barbs (*Puntius oligolepis*). *Applied Animal Behaviour Science*, 135: 318-327.
- Kotrschal, A., Taborsky, B., (2010). Environmental change enhances cognitive abilities in fish. *PLoS Biology*, 8: e1000351.
- Kristensen, H.H., Prescott, N.B., Perry, G.C., Ladewig, J., Ersbøll, A.K., Overvad, K.C., Wathes, C.M., (2007). The behaviour of broiler chickens in different light sources and illuminances. *Applied Animal Behaviour Science*, 103: 75-89.
- Lee, J.S.F., Berejikian, B.A., (2008). Effects of the rearing environment on average behaviour and behavioural variation in steelhead. *Journal of Fish Biology*, 72: 1736-1749.
- Lepage, O., Tottmar, O., Winberg, S., (2002). Elevated dietary intake of L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 205: 3679-3687.
- Li, P., Ray, B., Gatlin, D.M., Sink, T., Chen, R., Lochmann, R., (2009). Effect of handling and transport on cortisol response and nutrient mobilization of golden shiner, *Notemigus crysoleucas*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40: 803-809.
- Lillesaar, C., (2011). The serotonergic system in fish. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 41: 294-308.

- Lin, Q., Lin, J., Huang, L., (2009). Effects of substrate color, light intensity and temperature on survival and skin color change of juvenile seahorses, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture*, 298: 157-161.
- López-Patiño, M.A., Conde-Sieira, M., Gesto, M., Librán-Pérez, M., Soengas, J.L., Míguez, J.M., (2013). Melatonin partially minimizes the adverse effects of stress in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 388-391: 165-172.
- Luchiari, A.C., Pirhonen, J., (2008). Effects of ambient colour on colour preference and growth of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Biology*, 72: 1504-1514.
- Luchiari, A.C., do Amaral Duarte, C.R., de Morais Freire, F.A., Nissinen, K., (2007). Hierarchical status and colour preference in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Ethology*, 25: 169-175.
- Lund, V., Mejdell, C.M., Rocklinsberg, H., Anthony, R., Hastein, T., (2007). Expanding the moral circle: farmed fish as objects of moral concern. *Diseases of Aquatic Organisms*, 75: 109.
- Lupatsch, I., Kissil, G.W., (1998). Predicting aquaculture waste from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) culture using a nutritional approach. *Aquatic Living Resources*, 11: 265-268.
- Martins, C.I.M., Galhardo, L., Noble, C., Damsgård, B., Spedicato, M.T., Zupa, W., Beauchaud, M., Kulczykowska, E., Massabuau, J.C., Carter, T., (2012). Behavioural indicators of welfare in farmed fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 17-41.
- Mason, G., Rushen, J., 2006. Stereotypic Animal Behaviour: Fundamentals and Applications to Welfare. CABI, Oxfordshire, UK.
- McKenzie, D.J., Höglund, E., Dupont-Prinet, A., Larsen, B.K., Skov, P.V., Pedersen, P.B., Jokumsen, A., (2012). Effects of stocking density and sustained aerobic exercise on growth, energetics and welfare of rainbow trout. *Aquaculture*, 338: 216-222.
- McQuaid, R.J., Audet, M.C., Jacobson-Pick, S., Anisman, H., (2012). The differential impact of social defeat on mice living in isolation or groups in an enriched environment: plasma corticosterone and monoamine variations. *Int. J. Neuropsychop.*, 1: 1-13.
- Medeiros, L.R., McDonald, M.D., (2013). Cortisol-mediated downregulation of the serotonin 1A receptor subtype in the Gulf toadfish, *Opsanus beta*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 164: 612-621.
- Medeiros, L.R., Mager, E.M., Grosell, M., McDonald, M.D., (2010). The serotonin subtype 1A receptor regulates cortisol secretion in the Gulf toadfish, *Opsanus beta*. *General and Comparative Endocrinology*, 168: 377-387.

- Mellen, J., MacPhee, M.S., (2001). Philosophy of environmental enrichment: past, present, and future. *Zoo Biol.*, 20: 211-226.
- Mendes, A.S., Paixão, S.J., Restelatto, R., Morello, G.M., de Moura, D.J., Possenti, J.C., (2013). Performance and preference of broiler chickens exposed to different lighting sources. *The Journal of Applied Poultry Research*, 22: 62-70.
- Merighe, G.K.F., Pereira-da-Silva, E.M., Negrão, J.A., Ribeiro, S., (2004). Effect of background color on the social stress of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33: 828-837.
- Mikheev, V.N., Andreev, O.A., (1993). Two-phase exploration of a novel environment in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Journal of Fish Biology*, 42: 375-383.
- Mikheev, V.N., Pasternak, A.F., Tischler, G., Wanzenböck, J., (2005). Contestable shelters provoke aggression among 0+ perch, *Perca fluviatilis*. *Environmental Biology of Fishes*, 73: 227-231.
- Mohammed, A.H., Zhu, S.W., Darmopil, S., Hjerling-Leffler, J., Ernfors, P., Winblad, B., Diamond, M.C., Eriksson, P.S., Bogdanovic, N., (2002). Environmental enrichment and the brain. *Progress in Brain Research*, 138: 109-133.
- Moncek, F., Duncko, R., Johansson, B.B., Jezova, D., (2004). Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *Journal of neuroendocrinology*, 16: 423-431.
- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., (1999). High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry*, 20: 53-60.
- Montero, D., Lalumera, G., Izquierdo, M.S., Caballero, M.J., Saroglia, M., Tort, L., (2009). Establishment of dominance relationships in gilthead sea bream *Sparus aurata* juveniles during feeding: effects on feeding behaviour, feed utilization and fish health. *Journal of Fish Biology*, 74: 790-805.
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., van Reenen, C.G., (2007). Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior*, 92: 317-339.
- Naka, F., Shiga, T., Yaguchi, M., Okado, N., (2002). An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. *Brain Research*, 924: 124-126.
- Näslund, J., Aarestrup, K., Thomassen, S.T., Johnsson, J.I., Post, J., (2012). Early enrichment effects on brain development in hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*): no evidence for a critical period. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 69: 1481-1490.

- Näslund, J., Rosengren, M., Del Villar, D., Gansel, L., Norrgård, J.R., Persson, L., Winkowski, J.J., Kvingedal, E., (2013). Hatchery tank enrichment affect cortisol levels and shelter seeking in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70: 585-590.
- Newberry, R.C., (1995). Environmental enrichment: increasing the biological relevance of captive environments. *Applied Animal Behaviour Science*, 44: 229-243.
- Nijman, V., Heuts, B.A., (2000). Effect of environmental enrichment upon resource holding power in fish in prior residence situations. *Behavioural Processes*, 49: 77-83.
- Nijman, V., Heuts, B.A., (2011). Aggression and dominance in cichlids in resident-intruder tests: the role of environmental enrichment. *Neotropical Ichthyology*, 9: 543-545.
- North, B.P., Turnbull, J.F., Ellis, T., Porter, M.J., Migaud, H., Bron, J., Bromage, N.R., (2006). The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 255: 466-479.
- Oldfield, R.G., (2011). Aggression and welfare in a common aquariumfish, the Midas Cichlid. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 14: 340-360.
- Ottesen, O.H., Noga, E.J., Sandaa, W., (2007). Effect of substrate on progression and healing of skin erosions and epidermal papillomas of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 30: 43-53.
- Papadopoulou-Daifoti, Z., Antoniou, K., Vamvakides, A., Kalliteraki, I., Varonos, D.D., (1995). Neurochemical changes in dopamine and serotonin turnover rate in discrete regions of rat brain after the administration of glucinergic compounds. *Acta Therapeutica*, 21: 5-18.
- Papoutsoglou, S.E., (2012). The role of the brain in farmed fish. *Reviews in Aquaculture*, 4: 1-10.
- Papoutsoglou, S.E., Karakatsouli, N., Batzina, A., Papoutsoglou, E.S., Tsopelakos, A., (2008). Effect of music stimulus on gilthead seabream *Sparus aurata* physiology under different light intensity in a re-circulating water system. *Journal of Fish Biology*, 73: 980-1004.
- Papoutsoglou, S.E., Karakatsouli, N., Louizos, E., Chadio, S., Kalogiannis, D., Dalla, C., Polissidis, A., Papadopoulou-Daifoti, Z., (2007). Effect of Mozart's music (Romanze-Andante of "Eine Kleine Nacht Musik", sol major, K525) stimulus on common carp (*Cyprinus carpio* L.) physiology under different light conditions. *Aquacultural Engineering*, 36: 61-72.
- Papoutsoglou, S.E., Karakatsouli, N., Papoutsoglou, E.S., Vasilikos, G., (2010). Common carp (*Cyprinus carpio*) response to two pieces of music ("Eine Kleine Nacht Musik" and "Romanza") combined with light intensity, using recirculating water system. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36: 539-554.

- Papoutsoglou, S.E., Karakatsouli, N., Pizzonia, G., Dalla, C., Polissidis, A., Papadopoulou-Daifoti, Z., (2006). Effects of rearing density on growth, brain neurotransmitters and liver fatty acid composition of juvenile white sea bream *Diplodus sargus* L. *Aquaculture Research*, 37: 87-95.
- Papoutsoglou, S.E., Karakatsouli, N., Skouradakis, C., Papoutsoglou, E.S., Batzina, A., Leondaritis, G., Sakellaridis, N., (2013). Effect of musical stimuli and white noise on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth and physiology in recirculating water conditions. *Aquacultural Engineering*, 55: 16-22.
- Papoutsoglou, S.E., Miliou, H., Chadio, S., Karakatsouli, N., Zarkada, A., (1999). Studies on stress responses and recovery from removal in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) using recirculating seawater system. *Aquaculture Engineering*, 21: 19-32.
- Pappal, A.L., MacDonald, D.G., Rountree, R.A., (2009). Evidence of cobble habitat preference in age-0 winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 42: 43-53.
- Pappal, A.L., Rountree, R.A., MacDonald, D.G., (2012). Relationship between body size and habitat complexity preference in age-0 and-1 year winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Journal of Fish Biology*, 81: 220-229.
- Petherick, J.C., Duncan, I.J.H., Waddington, D., (1990). Previous experience with different floors influences choice of peat in a Y-maze by domestic fowl. *Applied Animal Behaviour Science*, 27: 177-182.
- Pignatelli, V., Champ, C., Marshall, J., Vorobyev, M., (2012). Double cones are used for colour discrimination in the reef fish, *Rhinecanthus aculeatus*. *Biology letters*, 6: 537-539.
- Poli, B.M., (2009). Farmed fish welfare-suffering assessment and impact on product quality. *Italian Journal of Animal Science*, 8: 137-160.
- Pollen, A.A., Dobberfuhl, A.P., Scace, J., Igulu, M.M., Renn, S.C.P., Shumway, C.A., Hofmann, H.A., (2007). Environmental complexity and social organization sculpt the brain in Lake Tanganyikan cichlid fish. *Brain Behavior and Evolution*, 70: 21-39.
- Polverino, G., Abaid, N., Kopman, V., Macrì, S., Porfiri, M., (2012). Zebrafish response to robotic fish: preference experiments on isolated individuals and small shoals. *Bioinspiration & Biomimetics*, 7: 036019.
- Popova, N.K., (2006). From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. *Bioessays*, 28: 495-503.
- Raffa, K.F., Havill, N.P., Nordheim, E.V., (2002). How many choices can your test animal compare effectively? Evaluating a critical assumption of behavioral preference tests. *Oecologia*, 133: 422-429.

- Rasmuson, S., Olsson, T., Henriksson, B.G., Kelly, P.A.T., Holmes, M.C., Seckl, J.R., Mohammed, A.H., (1998). Environmental enrichment selectively increases 5-HT_{1A} receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus. *Molecular Brain Research*, 53: 285-290.
- Réale, D., Reader, S.M., Sol, D., McDougall, P.T., Dingemans, N.J., (2007). Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews*, 82: 291-318.
- Richard, M., Maurice, J.T., Anginot, A., Paticat, F., Verdegem, M.C.J., Hussenot, J.M.E., (2010). Influence of periphyton substrates and rearing density on *Liza aurata* growth and production in marine nursery ponds. *Aquaculture*, 310: 106-111.
- Riley, S.C., Tatara, C.P., Berejikian, B.A., Flagg, T.A., (2009). Behavior of steelhead fry in a laboratory stream is affected by fish density but not rearing environment. *North American Journal of Fisheries Management*, 29: 1806-1818.
- Roncarati, A., Melotti, P., Dees, A., Mordenti, O., Angellotti, L., (2006). Welfare status of cultured seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) and seabream (*Sparus aurata* L.) assessed by blood parameters and tissue characteristics. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 225-234.
- Roberts, L.J., Taylor, J., Garcia de Leaniz, C., (2011). Environmental enrichment reduces maladaptive risk-taking behavior in salmon reared for conservation. *Biological Conservation*, 144: 1972-1979.
- Rose, J.D., (2002). The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. *Reviews in Fisheries Science*, 10: 1-38.
- Rotllant, J., Balm, P.H.M., Perez-Sanchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E., Tort, L., (2001). Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *General and Comparative Endocrinology*, 121: 333-342.
- Rotllant, J., Arends, R.J., Mancera, J.M., Flik, G., Bonga, S.E.W., Tort, L., (2000). Inhibition of HPI axis response to stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with physiological plasma levels of cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 23: 13-22.
- Rowland, S.J., Mifsud, C., Nixon, M., Boyd, P., (2006). Effects of stocking density on the performance of the Australian freshwater silver perch (*Bidyanus bidyanus*) in cages. *Aquaculture*, 253: 301-308.
- Sabri, D.M., Elnwshy, N., Nwonwu, F., (2012). Effect of environmental color on the behavioral and physiological response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Global Journal of Science Frontier Research* 12: 11-20.
- Saera-Vila, A., Caldach-Giner, J.A., Prunet, P., Pérez-Sánchez, J., (2009). Dynamics of liver GH/IGF axis and selected stress markers in juvenile gilthead sea bream

- (*Sparus aurata*) exposed to acute confinement: Differential stress response of growth hormone receptors. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 154: 197-203.
- Salvanes, A.G.V., Braithwaite, V., (2006). The need to understand the behaviour of fish reared for mariculture or restocking. *ICES Journal of Marine Science*, 63: 345-354.
- Saxby, A., Adams, L., Snellgrove, D., Wilson, R.W., Sloman, K.A., (2010). The effect of group size on the behaviour and welfare of four fish species commonly kept in home aquaria. *Applied Animal Behaviour Science*, 125: 195-205.
- Schjolden, J., Pulman, K.G.T., Pottinger, T.G., Tottmar, O., Winberg, S., (2006). Serotonergic characteristics of rainbow trout divergent in stress responsiveness. *Physiology & Behavior*, 87: 938-947.
- Scholz, B., Urselmans, S., Kjaer, J.B., Schrader, L., (2010). Food, wood, or plastic as substrates for dustbathing and foraging in laying hens: A preference test. *Poultry Science*, 89: 1584-1589.
- Segovia, G., Del Arco, A., de Blas, M., Garrido, P., Mora, F., (2008). Effects of an enriched environment on the release of dopamine in the prefrontal cortex produced by stress and on working memory during aging in the awake rat. *Behavioural Brain Research*, 187: 304-311.
- Shand, J., (1997). Ontogenetic changes in retinal structure and visual acuity: a comparative study of coral-reef teleosts with differing post-settlement lifestyles. *Environmental Biology of Fishes*, 49: 307-322.
- Sharp, T., Zetterström, T., Series, H.G., Carlsson, A., Grahame-Smith, D.G., Ungerstedt, U., (1987). HPLC-EC analysis of catechols and indoles in rat brain dialysates. *Life Sciences*, 41: 869-872.
- Shepherdson, D.J., Mellen, J.D., Hutchins, M., 1998. *Second nature: environmental enrichment for captive animals*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Siebeck, U.E., Wallis, G.M., Litherland, L., (2008). Colour vision in coral reef fish. *Journal of Experimental Biology*, 211: 354-360.
- Simpson, J., Kelly, J.P., (2011). The impact of environmental enrichment in laboratory rats-behavioural and neurochemical aspects. *Behavioural Brain Research*, 222: 246-264.
- Simsek, U.G., Dalkilic, B., Ciftci, M., Cerci, I.H., Bahsi, M., (2009). Effects of enriched housing design on broiler performance, welfare, chicken meat composition and serum cholesterol. *Acta Veterinaria Brno*, 78: 67-74.
- Sloman, K.A., Baldwin, L., McMahon, S., Snellgrove, D., (2011). The effects of mixed-species assemblage on the behaviour and welfare of fish held in home aquaria. *Applied Animal Behaviour Science*, 135: 160-168.

- Sneddon, I.A., Beattie, V.E., (1995). Improving the welfare of pigs. *The Irish Journal of Psychology*, 16: 418-425.
- Sneddon, L.U., (2007). Fish behaviour and welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 104: 173-175.
- Stairs, D.J., Bardo, M.T., (2009). Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92: 377-382.
- Strand, D.A., Utne-Palm, A.C., Jakobsen, P.J., Braithwaite, V.A., Jensen, K.H., Salvanes, A.G.V., (2010). Enrichment promotes learning in fish. *Marine Ecology Progress Series*, 412: 273-282.
- Taylor, S.M., Loew, E.R., Grace, M.S., (2011). Developmental shifts in functional morphology of the retina in Atlantic tarpon, *Megalops atlanticus* (Elopomorpha: Teleostei) between four ecologically distinct life-history stages. *Visual Neuroscience*, 28: 309-323.
- Thomas, J.L., Nelson, C.M., Luo, X., Hyde, D.R., Thummel, R., (2012). Characterization of multiple light damage paradigms reveals regional differences in photoreceptor loss. *Experimental Eye Research*, 97: 105-116.
- Timmer, R., Magellan, K., (2011). The effects of light intensity and colour on aggressive interactions in the dusky kob, *Argyrosomus japonicus*. *Israeli Journal of Aquaculture*, 63: IIC: 63.2011. 2532.
- Torrezani, C.S., Pinho-Neto, C.F., Miyai, C.A., Sanches, F.H.C., Barreto, R.E., (2013). Structural enrichment reduces aggression in *Tilapia rendalli*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 46: 183-190.
- Tort, L., Pavlidis, M., Woo, N.Y.S. (2011) Stress and welfare in sparid fishes. In "Sparidae: Biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species" Ed. Pavlidis, M., Mylonas, C., Blackwell Publishing Ltd., Iraklion, Crete, pp. 74-94.
- Ullmann, J.F.P., Gallagher, T., Hart, N.S., Barnes, A., Smullen, R.P., Collin, S.P., Temple, S.E., (2011). Tank color increases growth, and alters color preference and spectral sensitivity, in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*, 322-323: 235-240.
- van de Nieuwegiessen, P.G., Boerlage, A.S., Verreth, J.A.J., Schrama, J.W., (2008). Assessing the effects of a chronic stressor, stocking density, on welfare indicators of juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell. *Applied Animal Behaviour Science*, 115: 233-243.
- Van Loo, P.L.P., Van der Meer, E., Kruitwagen, C., Koolhaas, J.M., Van Zutphen, L.F.M., Baumans, V., (2004). Long-term effects of husbandry procedures on stress-related parameters in male mice of two strains. *Laboratory Animals*, 38: 169-177.

- Vancassel, S., Blondeau, C., Lallemand, S., Cador, M., Linard, A., Lavialle, M., Dellu-Hagedorn, F., (2007). Hyperactivity in the rat is associated with spontaneous low level of n-3 polyunsaturated fatty acids in the frontal cortex. *Behavioural Brain Research*, 180: 119-126.
- Vancassel, S., Leman, S., Hanonick, L., Denis, S., Roger, J., Nollet, M., Bodard, S., Kousignian, I., Belzung, C., Chalon, S., (2008). n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice. *Journal of Lipid Research*, 49: 340-348.
- Vihtelic, T.S., Hyde, D.R., (2000). Light-induced rod and cone cell death and regeneration in the adult albino zebrafish (*Danio rerio*) retina. *Journal of Neurobiology*, 44: 289-307.
- Vines, A., Delattre, A.M., Lima, M., Rodrigues, L.S., Suchecki, D., Machado, R.B., Tufik, S., Pereira, S.I.R., Zanata, S.M., Ferraz, A.C., (2012). The role of 5-HT_{1A} receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: A possible antidepressant mechanism. *Neuropharmacology*, 62: 184-191.
- von Krogh, K., Sørensen, C., Nilsson, G.E., Øverli, Ø., (2010). Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments. *Physiology & Behavior*, 101: 32-39.
- Ward, A.J.W., (2012). Social facilitation of exploration in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66: 223-230.
- Wells, D.L., (2009). Sensory stimulation as environmental enrichment for captive animals: a review. *Applied Animal Behaviour Science*, 118: 1-11.
- Widowski, T. (2009) Why Are Behavioural Needs Important? In "Improving animal welfare: a practical approach" Ed. Grandin, T., CABI, Oxfordshire, pp. 290-307.
- Wilkes, L., Owen, S.F., Readman, G.D., Sloman, K.A., Wilson, R.W., (2012). Does structural enrichment for toxicology studies improve zebrafish welfare? *Applied Animal Behaviour Science*, 139: 143-150.
- Williams, T.D., Readman, G.D., Owen, S.F., (2009). Key issues concerning environmental enrichment for laboratory-held fish species. *Laboratory Animals*, 43: 107-120.
- Winberg, S., Nilsson, G.E., (1993a). Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 106: 597-614.
- Winberg, S., Nilsson, G.E., (1993b). Time course of changes in brain serotonergic activity and brain tryptophan levels in dominant and subordinate juvenile Arctic charr. *Journal of Experimental Biology*, 179: 181-195.

- Winberg, S., Nilsson, G.E., Olsén, K.H., (1991). Social rank and brain levels of monoamines and monoamine metabolites in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Comparative Physiology A*, 168: 241-246.
- Winberg, S., Nilsson, G.E., Olsén, K.H., (1992). Changes in brain serotonergic activity during hierarchic behavior in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) are socially induced. *Journal of Comparative Physiology A*, 170: 93-99.
- Winberg, S., Nilsson, A., Hylland, P., Söderstöm, V., Nilsson, G.E., (1997). Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. *Neuroscience letters*, 230: 113-116.
- Winberg, S., Carter, C.G., McCarthy, I.D., He, Z.Y., Nilsson, G.E., Houlihan, D.F., (1993). Feeding rank and brain serotonergic activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology*, 179: 197-211.
- Witte, C.C., Wildhaber, M.L., Arab, A., Noltie, D.B., (2009). Substrate choice of territorial male Topeka shiners (*Notropis topeka*) in the absence of sunfish (*Lepomis* sp.). *Ecology of Freshwater Fish*, 18: 350-359.
- Wolf, B.T., Molloy, H.R.B., Trayte, M.J., Rose, M.T., (2010). Behaviour of growing lambs housed on straw or woodchip bedding materials and their preference for floor type. *Applied Animal Behaviour Science*, 124: 45-50.
- Yerkes, R.M., 1925. Almost human. The Century Co., New York, 278 pp.
- Yilmaz, Y., Arabaci, M., (2010). The influence of stocking density on growth and feed efficiency in gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9: 1280-1284.
- Zimmermann, E.W., Purchase, C.F., Fleming, I.A., (2012). Reducing the incidence of net cage biting and the expression of escape-related behaviors in Atlantic cod (*Gadus morhua*) with feeding and cage enrichment. *Applied Animal Behaviour Science*, 141: 71-78.
- Zubair, S.N., Peake, S.J., Hare, J.F., Anderson, W.G., (2012). The effect of temperature and substrate on the development of the cortisol stress response in the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, Rafinesque (1817). *Environmental Biology of Fishes*, 93: 577-587.