

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΦΗΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΥΔΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΙΣΟ-ΕΥΓΕΝΟΛΗΣ ΣΤΗΝ  
ΑΝΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ/ΘΑΝΑΤΩΣΗ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ,  
*Sparus aurata*, ΣΕ ΥΨΗΛΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΚΑΡΑΜΠΟΥΡΝΙΩΤΗ ΜΑΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2015



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΦΗΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΥΔΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΙΣΟ-ΕΥΓΕΝΟΛΗΣ ΣΤΗΝ  
ΑΝΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ/ΘΑΝΑΤΩΣΗ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ,  
*Sparus aurata*, ΣΕ ΥΨΗΛΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ  
ΚΑΡΑΜΠΟΥΡΝΙΩΤΗ ΜΑΡΙΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μήλιου Ελένη Αν. Καθηγήτρια (επιβλέπουσα)

Καρακατσούλη Ναυσικά Επ. Καθηγήτρια

Χαρισμιάδου–Μητσάκου Μαρία Επ. Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ 2015



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τσιπούρα και το λαυράκι αποτελούν τα σημαντικότερα εξαγωγίμα είδη εκτρεφόμενων ιχθύων στην Ελλάδα. Η επιτυχής εκτροφή τους βασίζεται πλέον όχι μόνο στην ισορροπημένη διατροφή και τον έλεγχο των συνθηκών, αλλά και στην ευζωία των ιχθύων. Η ευζωία των εκτρεφόμενων ιχθύων αποτελεί παράγοντα ζωτικής σημασίας για την παραγωγή και τη διακίνηση διότι καθορίζει την απόδοση, την ποιότητα και την ποσότητα της παραγωγής, αλλά και την αποδοχή των διαθέσιμων προϊόντων από το καταναλωτικό κοινό. Η αναισθητοποίηση των ιχθύων έχει αποδειχτεί ότι συμβάλλει στην επίτευξη της ευζωίας των ιχθύων και τη σημαντική βελτίωση της ποιότητας του προϊόντος. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δράση της ισοευγενόλης ως αναισθητικού παράγοντα της εκτρεφόμενης τσιπούρας (*Sparus aurata*), μέσω της χρήσης του εμπορικού προϊόντος AQUI-S®.

Αρχικά, διερευνήθηκε η επίδραση του σωματικού βάρους στο χρόνο επαγωγής στα στάδια 3b και 5 της αναισθησίας, μέσα σε ένα εύρος βαρών 55,6 g έως 443,2 g και σε συγκέντρωση 50 ppm AQUI-S®. Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ του σωματικού βάρους και του χρόνου επαγωγής στο στάδιο αναισθησίας 5. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων αυτών στο στάδιο αναισθησίας 3b. Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών και με την χρήση στατιστικού προγράμματος δημιουργήθηκε ένας πίνακας πρόβλεψης του αναμενόμενου χρόνου επαγωγής στο στάδιο 5 για ιχθύς με διαφορετικό σωματικό βάρος, όταν το AQUI-S® εφαρμόζεται σε συγκέντρωση 50ppm.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης AQUI-S® (30ppm, 50ppm, 70ppm) σε σχέση με τον χρόνο έκθεσης (άθροισμα του χρόνου επαγωγής στο στάδιο 4 και χρόνου παραμονής μέχρι την αιμοληψία) στις τιμές του αιματοκρίτη και της συγκέντρωσης γλυκόζης στο πλάσμα των ιχθύων. Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές του αιματοκρίτη στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναισθητικού (30ppm, 50ppm, 70ppm) και ο χρόνος έκθεσης στο AQUI-S® δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική επίδραση στις τιμές αυτές. Αντίθετα, ο χρόνος έκθεσης στο αναισθητικό επηρέασε σημαντικά την συγκέντρωση της γλυκόζης, υποδηλώνοντας την πιθανή εκδήλωση στρεσικής αντίδρασης. Το σωματικό βάρος (59,4 - 238,2 g) δεν επιρρέασε στατιστικά σημαντικά ούτε τον αιματοκρίτη αλλά ούτε και την γλυκόζη κατά τη διάρκεια της αναισθησίας.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης AQUI-S® κατά την αναισθητοποίηση της τσιπούρας έως το στάδιο 4 (12 min σε 30ppm, 5 min σε 50ppm) πριν την τοποθέτηση σε παγόνερο, στη συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος και στις τιμές του αιματοκρίτη των ιχθύων, σε σχέση με τον χρόνο παραμονής στο παγόνερο έως την θανάτωση τους και την αιμοληψία. Οι ίδιες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν και χωρίς αναισθησία πριν την τοποθέτηση των ιχθύων στο παγόνερο. Στην περίπτωση αυτή, η συγκέντρωση της γλυκόζης παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον χρόνο παραμονής στο παγόνερο. Αντίθετα, όταν είχε πραγματοποιηθεί αναισθησία, η συγκέντρωση της γλυκόζης παρέμενε σταθερή μέχρι τον θάνατο των ιχθύων στο παγόνερο και δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων του AQUI-S®. Τα επίπεδα του αιματοκρίτη δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τριών χειρισμών και δεν επηρεάζονταν σημαντικά από τον χρόνο παραμονής στο παγόνερο. Επίσης, η επίδραση του σωματικού βάρους της τσιπούρας (227 - 457,8g) δεν ήταν σημαντική τόσο στα επίπεδα της γλυκόζης όσο και του αιματοκρίτη και στους τρεις χειρισμούς επίδραση

Η αναισθητοποίηση των ιχθύων με AQUI-S® πριν την τοποθέτησή τους στο παγόνερο συντελεί στην σταθεροποίηση των επιπέδων της γλυκόζης, στην πιο ήρεμη συμπεριφορά των ιχθύων και στην πιο γρήγορη θανάτωση τους. Λόγω αυτής της συμβολής κρίνεται σκόπιμη η περαιτέρω διερεύνηση της πρακτικής εφαρμογής της αναισθητοποίησης με ισο-ευγενόλη πριν τη θανάτωση σε παγόνερο, αντί της απ' ευθείας μεταφοράς στο παγόνερο που συνήθως χρησιμοποιείται στις μονάδες εντατικής εκτροφής τσιπούρας, μετά από μελέτη των επιπέδων της ισο-ευγενόλης στη σάρκα και τον καθορισμό της κατάλληλης συγκέντρωσης στο νερό ανάλογα με τις χρησιμοποιούμενες πρακτικές. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμβάλλουν στη κατανόηση της δράσης του αναισθητικού AQUI-S® και στη βελτίωση της εφαρμογής του σε συνθήκες παραγωγής.

## ABSTRACT

Bream and Bass constitute the most important export of farmed fish in Greece. Fish welfare combined with nutritionally balanced diet and tight control on farming conditions is now acknowledged as a major component of prosperous fish rearing. Due to its determinant role on yield, product quality and quantity as well as on the consumer perception and acceptability of the product, fish welfare is crucial for commercial production and trade. Moreover, the achievement of fish welfare and has been proved to be accommodated by fish anaesthetization which also significantly improves product quality. In the present study, the effectiveness of Isoeugenol as anesthetic agent is examined in the breeding of sea bream (*Sparus aurata*), through the use of the commercial product AQUI-S®.

Firstly, we investigated the influence of body weight on the induction time in steps 3b and 5 of anesthesia. Using these two steps, we then determined the induction time within the weight range of 55,6g to 443,2g using a concentration of 50ppm AQUI-S®. A positive correlation between body weight and induction time in stage 5 of anesthesia was observed whereas there was no statistically significant correlations between the average body weight and induction time in the anesthesia stage 3b. According to these results, a prediction table of the expected induction time in step 5 for fish of different weights, at a concentration of 50ppm AQUI-S® was constructed with the use of the appropriate statistical software.

Further on, we examined the effect of exposure time (the sum of the recorded values of the induction time in step 4 and the time recorded until the blood sampling) on hematocrit values and the concentration of plasma glucose of the fish at three different concentrations of AQUI-S® (30ppm, 50ppm, 70ppm). Data analysis showed that the exposure time and the different concentrations (30ppm, 50ppm, 70ppm) of AQUI-S® had no statistically significant effect on hematocrit value. In contrast, the concentration of glucose seems to be significantly affected by exposure time to AQUI-S®, suggesting a possible stress reaction event.

Finally, the effect of sampling time (the sum of the values of predetermined residence time in AQUI-S® until stage 4 (12 min at 30ppm, 5 min at 50ppm) before the placement of them at the ice water on the concentration of plasma glucose and hematocrit values of the fish in relation to the residence time in the ice water until their killing and blood sampling was

examined. The same measurements were carried out without anesthesia before placing the fish in ice water. It was found that sampling time had statistically significant effect on the time spend inside ice water. On the contrary, when it was performed anesthesia, the glucose concentration remained stable until the death of fish in ice water and did not differ significantly between the two concentrations of AQUI-S®. However the total residence time in anesthesia and ice water showed no statistically significant correlation with the concentration of glucose. Also, there is no effect of the sea breams body weight (227 - 457,8g) for both levels of glucose and hematocrit, at the three operations.

Fish anesthesia with AQUI-S® before there placement into ice water contribute at the level stabilization of glucose, at more sedate fish behavior and a faster death. Because of this contribution is appropriate to further explore the practical application of stunning by iso-eugenol before killing in ice water, instead of directly transfer to ice water normally used in intensive farms of sea bream, after studying the levels of iso-eugenol in the flesh and determining the appropriate concentration in water at used practices. The results of the present study contribute to the comprehension of AQUI-S® effectiveness and the improvement of its implementation under farming conditions.



## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. Η τσιπούρα και η σημασία της στις υδατοκαλλιέργειες .....	9
1.1.1. Συστηματική κατάταξη – χαρακτηριστικά .....	9
1.1.2. Βιολογικός κύκλος - ερμαφροδιτισμός .....	11
1.1.3. Διατροφικές συνήθειες .....	12
1.1.4. Ανάπτυξη.....	12
1.2. Η σημασία της τσιπούρας στις υδατοκαλλιέργειες .....	12
1.3. Αντιδράσεις των ιχθύων σε συνθήκες καταπόνησης (stress).....	14
1.4. Ευζωία (ευημερία) ιχθύων και η σημασία της .....	16
1.5. Ευζωία και μέθοδοι θανάτωσης .....	21
1.6. Μέθοδοι θανάτωσης των εκτρεφόμενων ιχθύων: .....	22
1.7. Η χρήση των αναισθητικών και η σημασία τους .....	24
1.8. Μη χημική αναισθησία.....	32
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	34
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
3.1. Πειραματικές εγκαταστάσεις.....	35
3.2. Καθημερινοί χειρισμοί .....	35
3.2.1 Χορήγηση τροφής .....	36
3.2.2 Καταγραφή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού .....	36
3.2.3 Έλεγχοι- Καθαρισμοί .....	37
3.3 Αναισθητικό μπάνιο .....	37
3.3.1. Προετοιμασία του stock solution .....	37
3.3.2 Προετοιμασία της δεξαμενής αναισθητοποίησης .....	38
3.4. Α Πειραματική περίοδος .....	38
3.5. Β Πειραματική περίοδος .....	40

3.6. Γ Πειραματική περίοδος.....	41
3.7 Δείκτες stress.....	43
3.7.1 Προσδιορισμός του αιματοκρίτη.....	43
3.7.2 Προσδιορισμός της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος.....	43
3.7.3 Στατιστική επεξεργασία.....	43
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	46
4.1 Πείραμα Α. Η Επίδραση του σωματικού βάρους στο χρόνο επαγωγής κατά την έκθεση σε συγκεκριμένη συγκέντρωση AQUI-S®.....	46
4.2 Πείραμα Β. Επίδραση της συγκέντρωσης του AQUI-S® (30ppm, 50ppm, 70ppm) στις τιμές του αιματοκρίτη και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων σε σχέση με τον χρόνο επαγωγής τουλάχιστον έως το στάδιο 4 της αναισθησίας. .	50
4.3. Πείραμα Γ. Επίδραση της συγκέντρωσης του AQUI-S® (0ppm, 30ppm και 50ppm) στις τιμές αιματοκρίτη και της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε σχέση με τον χρόνο δειγματοληψίας (το άθροισμα του προκαθορισμένου χρόνου παραμονής στο AQUI-S®, έως το στάδιο 4 και του χρόνου παραμονής στο παγόνερο έως την θανάτωση των ιχθύων).....	56
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	61
5.1. Πείραμα Α.....	61
5.2 Πείραμα Β.....	63
5.2.1 Αιματοκρίτης.....	63
5.2.2 Συγκέντρωση γλυκόζης.....	63
5.3 Πειραμα Γ.....	64
5.3.2 Αιματοκρίτης.....	64
5.3.1 Συγκέντρωση γλυκόζης.....	64
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Η τσιπούρα και η σημασία της στις υδατοκαλλιέργειες

### 1.1.1. Συστηματική κατάταξη – χαρακτηριστικά

Ταξινόμηση:

Συνομοταξία: Chordata

Υποσυνομοταξία: Vertebrata

Υπερομοταξία: Gnathostomata

Ομοταξία: Osteichthyes

Υφομοταξία: Actinopterygii

Υπέρταξη: Teleostei

Τάξη: Perciformes

Υπόταξη: Percoidae

Οικογένεια: Sparidae

Γένος: *Sparus*

Είδος: *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758)

Η τσιπούρα είναι κατεξοχήν ευρύαλο και ευρύθερμο είδος και ανήκει στην οικογένεια Sparidae. Συνήθως απαντάται σε επίπεδους βυθούς σκληρό υπόστρωμα μέχρι 200 μέτρα βάθος. Προτιμά τους βιοτόπους ρηχών νερών, λιγότερο από 50 μέτρα βάθος, διότι εκεί βρίσκει πιο εύκολα την τροφή της η οποία αποτελείται από όστρακα κυρίως, όπως μύδια, στρείδια και κυδώνια, αλλά και από κεφαλόποδα και ορισμένα είδη ιχθύων.

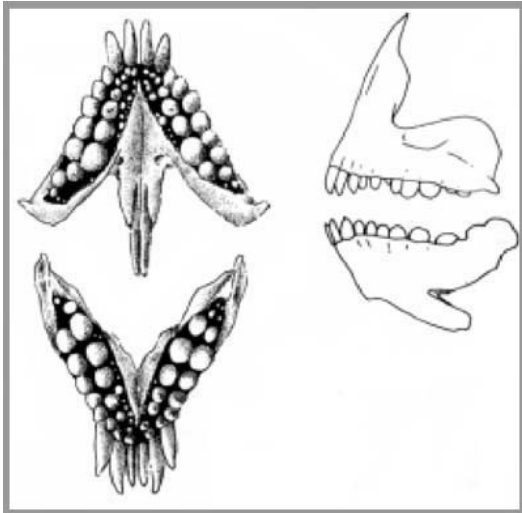
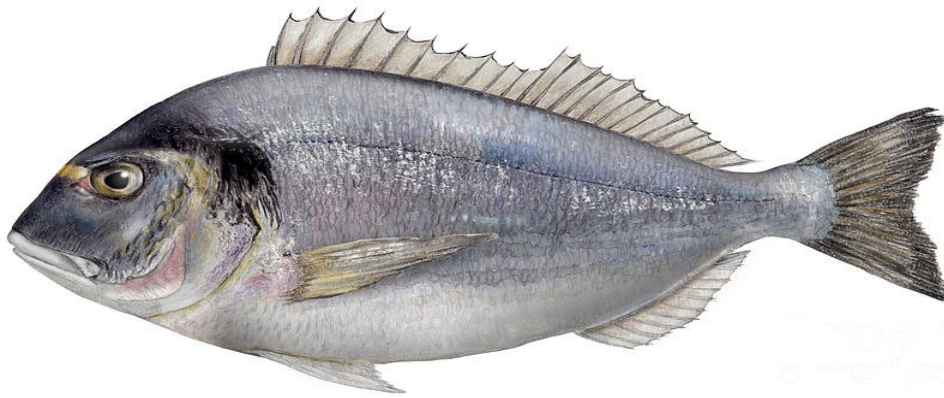
Εξαπλώνεται στη περιοχή της Μεσογείου και των ακτών του βορειοανατολικού Ατλαντικού. Η χωρική κατανομή στον Ατλαντικό περιορίζεται μέχρι τα Κανάρια και το Cape Verde, ενώ

σποραδικές εμφανίσεις αναφέρονται μέχρι και τις ακτές της Μ. Βρετανίας, αλλά και της Μαύρης Θάλασσας (Εικόνα 1.1.1.1).



Εικόνα 1.1.1.1. Η γεωγραφική εξάπλωση του είδους *Sparus aurata* (<http://www.fishbase.org/>).

Χαρακτηρίζεται από ένα ψηλό και πλευρικά συμπιεσμένο σώμα ωοειδούς σχήματος με ψηλή και καμπυλωτή ράχη, λεπτό μίσχο της ουράς, μεγάλα κτενοειδή λέπια και ένα ραχιαίο πτερύγιο με 11 σκληρές και 13 μαλακές άκανθες (Εικόνα 1.1.1.2). Το στόμα της είναι ελαφρά προεκταμένο, περιορισμένου μεγέθους, φέρει στο πάνω μέρος δόντια όμοια με κυνόδοντες και στα πλάγια γομφιόμορφα, κατάλληλα να συντρίβουν το κέλυφος των οστρακοφόρων μαλακίων. Το χρώμα της είναι ασημί-γκρι με μια μεγάλη σκοτεινή κηλίδα στην αρχή της πλευρικής γραμμής. Ανάμεσα στα μάτια φέρει χρυσή απόχρωση, η οποία πάντα περιορίζεται στο κεντρικό τμήμα, και μια μαύρη λωρίδα. Το ραχιαίο πτερύγιο παρουσιάζει μπλε-γκρι απόχρωση με μια μέση μαύρη γραμμή. Το ουραίο πτερύγιο εμφανίζεται γκρίζο-πρασινωπό λευκό με τα ακραία τμήματα μαύρου χρώματος(πηγή: <http://www.fao.org>).



Εικόνα 1.1.1.2. Επάνω: ενήλικο άτομο τσιπούρας *Sparus aurata*, κάτω: άνω και κάτω γνάθος με τη διάταξη των δοντιών.

### 1.1.2. Βιολογικός κύκλος - ερμαφροδιτισμός

Η τσιπούρα είναι πρώτανδρο ερμαφρόδιτο είδος, δηλαδή αρχικά γεννιέται ως αρσενικό άτομο, στο οποίο με τη συμπλήρωση τριών ετών ζωής συμβαίνει αναστροφή φύλου και μετατρέπεται σε θηλυκό. Συνεπώς στα πρώτα δύο χρόνια της ζωής της απαντάται ως αρσενικό άτομο το οποίο έχει 20-30 cm μήκος και ζυγίζει γύρω στα 350-400 g. Στον τρίτο χρόνο, με τη μετατροπή σε θηλυκό, το μήκος της φθάνει συνήθως τα 33-40 cm και ζυγίζει από 600 g και πάνω. Η αναπαραγωγή της τσιπούρας λαμβάνει χώρα από τον Οκτώβριο μέχρι και το Δεκέμβριο στην ανοιχτή θάλασσα. Ένα θηλυκό μπορεί να γεννά 20000-80000 αυγά καθημερινά κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής. Τα νεαρά ιχθύδια κατευθύνονται σε ρηχά νερά, περιβάλλον το οποίο εξασφαλίζει μεγαλύτερη ασφάλεια και αφθονία τροφής, όπου και παραμένουν έως τον επόμενο Οκτώβρη. Στη συνέχεια ενσωματώνονται στο αρχικό κοπάδι. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η διαδικασία αλλαγής φύλου από αρσενικό σε θηλυκό της τσιπούρας μπορεί να διακοπεί, με αποτέλεσμα το άτομο να ξαναπαράγει σπέρμα για την ερχόμενη αναπαραγωγική περίοδο (Χώτος και Ρογδάκης, 1992).

### **1.1.3. Διατροφικές συνήθειες**

Οι διατροφικές της συνήθειες εξαρτώνται από το μέγεθος του ατόμου. Τα μικρής ηλικίας ιχθύδια τρέφονται κυρίως με Πολύχαιτους και μικρού μεγέθους Καρκινοειδή. Τα ενήλικα με Δίθυρα Μαλάκια, Γαστερόποδα και Καρκινοειδή (Χώτος και Ρογδάκης, 1992).

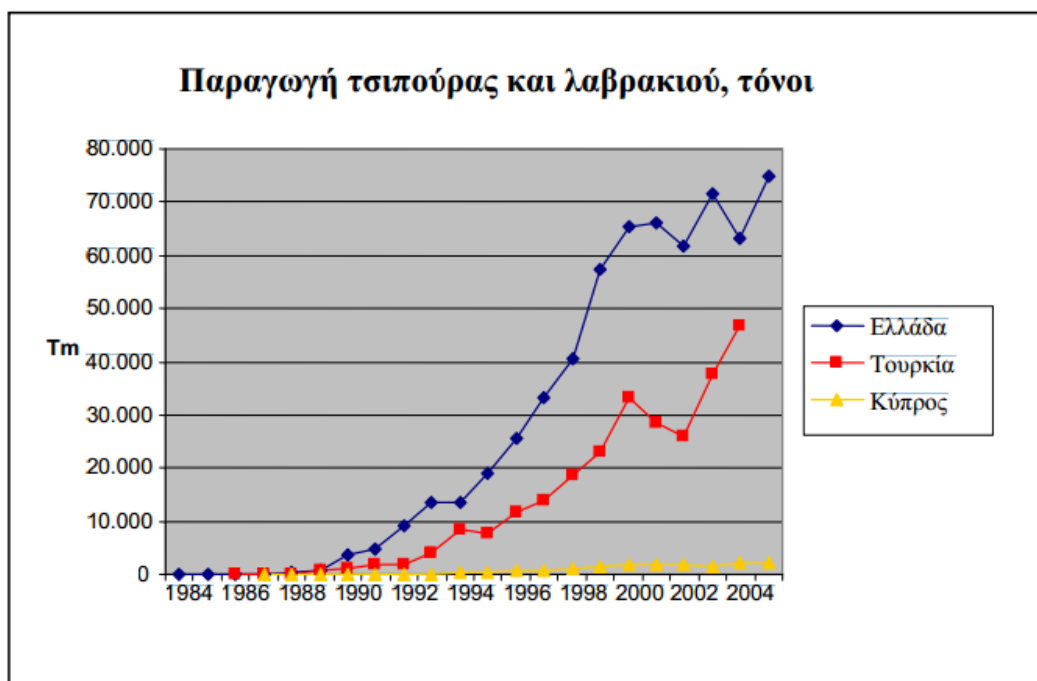
### **1.1.4. Ανάπτυξη**

Η τσιπούρα χαρακτηρίζεται από πολύ γρήγορη ανάπτυξη. Το χαρακτηριστικό αυτό προσδίδει ιδιαίτερο οικονομικό ενδιαφέρον για τη παραγωγή της σε ιχθυοκαλλιέργειες. Μια τσιπούρα τριών ετών μπορεί να φθάσει σε μήκος 40-50 cm και βάρος 600-800 g σε υφάλμυρα νερά, ενώ στη θάλασσα τα 25-30 cm και βάρος 400-500 g.

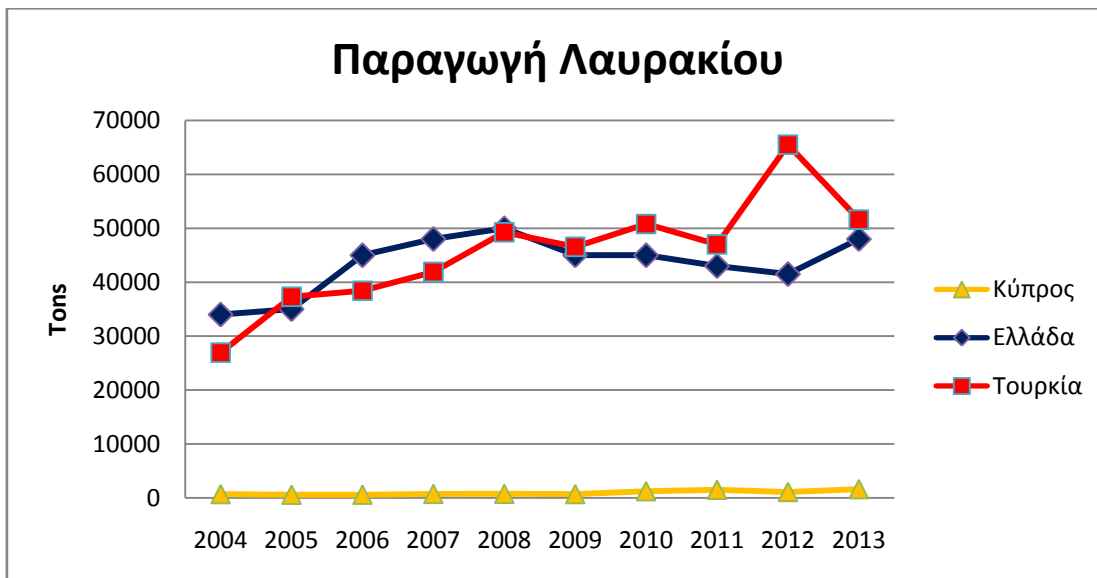
## **1.2. Η σημασία της τσιπούρας στις υδατοκαλλιέργειες**

Η τσιπούρα και το λαυράκι αποτελούν τα πιο σημαντικά εξαγωγικά είδη εκτρεφόμενων ιχθύων στην Ελλάδα. Παρ' ότι άρχισαν να αποτελούν αντικείμενο εντατικής εκτροφής μόλις στις αρχές της δεκαετίας του '80, η μεγάλη έκταση της παράκτιας ζώνης, οι ευνοϊκές κλιματικές συνθήκες και οι σημαντικές ιδιωτικές, δημόσιες και κοινοτικές επενδύσεις που κατευθύνθηκαν προς την υδατοκαλλιέργεια, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη της σχετικής τεχνολογίας, οδήγησαν την ελληνική υδατοκαλλιέργεια στο να αναδειχτεί σε έναν από τους πιο δυναμικούς εξαγωγικούς τομείς της Ελληνικής οικονομίας. Είναι χαρακτηριστικό ότι το 80% περίπου της συνολικής παραγωγής εξάγεται, ενώ η παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού είναι πολύ σημαντική σε σχέση με την παγκόσμια παραγωγή. Στη Μεσόγειο η υδατοκαλλιέργεια απαντάται κυρίως στην Αίγυπτο, τη Γαλλία, την Ελλάδα, το Ισραήλ, την Ιταλία, την Ισπανία και την Τουρκία (Ευρωπαϊκό κοινοβούλιο (Μάρτιος 2007)). Η Κύπρος διαθέτει πολύ μικρότερη παραγωγή σε σύγκριση με την Ελλάδα και την Τουρκία. Από αυτές τις τρεις χώρες προέρχεται πάντως το 70 % της παγκόσμιας παραγωγής τσιπούρας και το 65 % της παραγωγής λαβρακιού. Σύμφωνα με στοιχεία του FAO του 2004, η Ελλάδα αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους προμηθευτές τσιπούρας της Ευρώπης με εξαγωγή 9909 τόνων. Η τσιπούρα και το λαβράκι αποτελούν το 76 % της συνολικής αξίας της παραγωγής

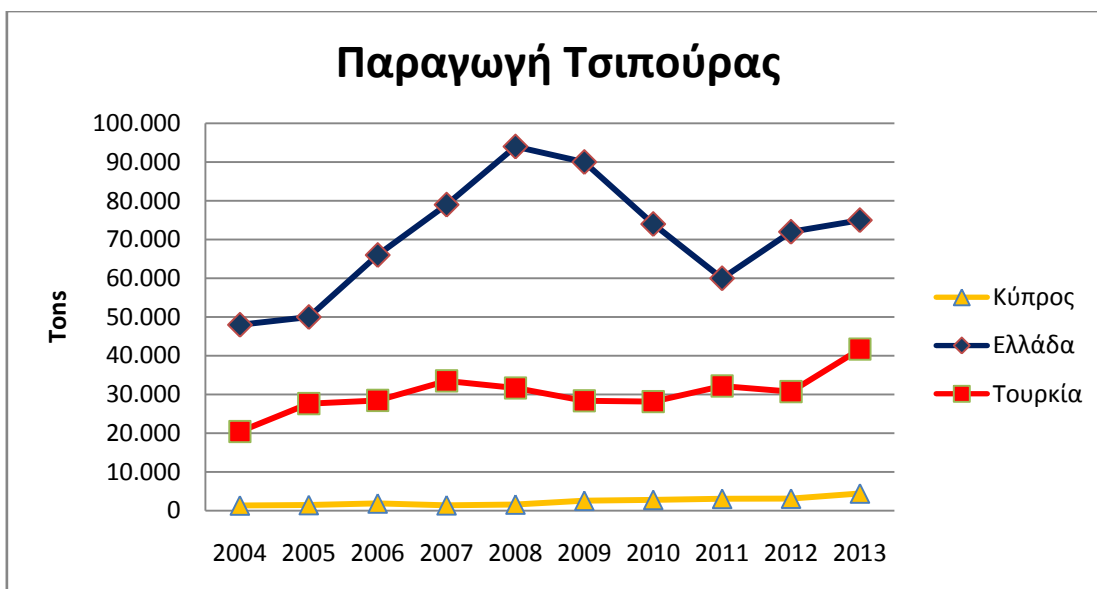
της υδατοκαλλιέργειας στην Ελλάδα, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό είναι 48 % στην Τουρκία και 64 % στην Κύπρο. Μέχρι το 2014 η Ελλάδα υπερτερεί της Τουρκίας και της Κύπρου στην παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού (Διάγραμμα 1.2.1.). Τα τελευταία δέκα έτη, η Ελλάδα αποτελεί πλέον τη χώρα με την υψηλότερη παραγωγή τσιπούρας στην Ευρώπη (σύμφωνα με την Ομοσπονδία Ευρωπαϊών Ιχθυοπαραγωγών, FEAP, 2013) και συνεχίζει να υπερτερεί ως προς την παραγωγή τσιπούρας έναντι της Τουρκίας και της Κύπρου (Διαγράμματα 1.2.2 και 1.2.3). Το 2012 το μέγεθος της ευρωπαϊκής παραγωγής έφθασε συνολικά τους 147.951 τόνους, εκ των οποίων οι 72.000 τόνοι προήλθαν από ελληνικές ιχθυοκαλλιεργητικές μονάδες. Τόσο στην Ελλάδα όσο και στην Τουρκία, οι εξαγωγές τσιπούρας και λαβρακιού παίζουν καίριο ρόλο για το εξωτερικό εμπόριο. Έτσι, στην περίπτωση της Ελλάδας καταλαμβάνουν την τρίτη θέση στις εξαγωγές γεωργικών και αλιευτικών προϊόντων, μετά από το ελαιόλαδο και τον καπνό (Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, Μάρτιος 2007).



**Διάγραμμα 1.2.1** Η ετήσια παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού κατά την εικοσαετία 1984-2004 σε Ελλάδα, Κύπρο και Τουρκία.



Διάγραμμα 1.2.2 Η ετήσια παραγωγή λαβρακιού κατά τα έτη 2004-2013 σε Ελλάδα, Κύπρο και Τουρκία.



Διάγραμμα 1.2.3 Η ετήσια παραγωγή τσιπούρας κατά τα έτη 2004-2013 σε Ελλάδα, Κύπρο και Τουρκία.

### 1.3. Αντιδράσεις των ιχθύων σε συνθήκες καταπόνησης (stress)

Ο όρος stress factor, stressor (παράγοντας καταπόνησης) αναφέρεται στη δυσμενή επίδραση παραγόντων του περιβάλλοντος, οι οποίοι τείνουν να παρεμποδίσουν την εύρυθμη λειτουργία φυσιολογικών μηχανισμών των οργανισμών. Επομένως η εμφάνιση δυσλειτουργιών σε ένα οργανισμό (αποκλίσεις από τα κανονικά επίπεδα λειτουργίας) αποτελεί ένδειξη ύπαρξης παραγόντων καταπόνησης στο περιβάλλον του.



Με τον όρο stress (καταπόνηση) αποδίδεται η φυσιολογική αντίδραση του οργανισμού σε εξωγενούς ή σε ενδογενούς προέλευσης παράγοντες καταπόνησης, οι οποίοι προκαλούν διαταραχές σε βιοχημικές και νευροορμονικές διεργασίες, οι οποίες με τη σειρά τους επηρεάζουν τη συμπεριφορά των ιχθύων. Η επίδραση των παραγόντων καταπόνησης μπορεί να είναι σύντομη ή παρατεταμένη, έντονη ή ήπια. Στην κατηγορία των εξωγενούς προέλευσης παραγόντων που μπορεί να προκαλέσουν stress στο φυσικό περιβάλλον των ιχθύων μπορεί να ενταχθεί η προσπάθεια αποφυγής φυσικών εχθρών, η προσπάθεια κολύμβησης αντίθετα προς τη ροή υδάτινων ρευμάτων, καθώς και η όποια μεταβολή της χημείας του νερού. Η τελευταία αποτελεί την πιο κοινή περίπτωση και αφορά συνήθως σε αυξομειώσεις της αλατότητας που οφείλονται κυρίως σε αλλαγές ενδιαιτημάτων των ιχθύων (μεταναστεύσεις από και προς τα θαλάσσια νερά, ευρύαλα είδη κ.λπ.) (Παπουτσόγλου, 2008). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια ορισμένοι παράγοντες καταπόνησης είναι πλέον ανθρωπογενούς προέλευσης, όπως η αλλοίωση της σύστασης του υδάτινου περιβάλλοντος από λύματα ή βαρέα μέταλλα. Οι περιπτώσεις αυτές μπορεί να έχουν σοβαρότατες επιπτώσεις στα υδάτινα οικοσυστήματα, διότι ξεπερνούν τα όρια εγκλιματισμού των ιχθύων και απειλούν ακόμη και την επιβίωσή τους.

Η αντίληψη της ύπαρξης παραγόντων καταπόνησης επιτυγχάνεται μέσω των κέντρων επικοινωνίας των ιχθύων με το περιβάλλον τους (όρασης, αφής, όσφρησης, ακοής, θερμοκρασίας κ.ά.). Η αντίληψη στη συνέχεια μεταβιβάζεται μέσω διαδοχικών εξειδικευμένων νευροορμονικών και ενζυμικών διεργασιών προς τον εγκέφαλο, ο οποίος δίδει και τις κατάλληλες εντολές οι οποίες στη συνέχεια καθορίζουν άμεσα και τον τρόπο αντίδρασης ιχθύων. Οι εντολές αυτές έχουν ως προορισμό όργανα, αδένες, ή ακόμη και διάσπαρτα κύτταρα του οργανισμού.

Προκειμένου οι ιχθύες να επιβιώσουν, οι λειτουργίες τους θα πρέπει να είναι ικανές να εγκλιματίζονται στις παρατηρούμενες αλλαγές που αφορούν στις χημικές, φυσικές και βιολογικές συνθήκες του υδάτινου περιβάλλοντος. Οι αλλαγές αυτές μπορούν να κυμαίνονται από τις επιπτώσεις των μεταβολών της χημείας του νερού, έως σε συγκρούσεις συμπεριφοράς που απορρέουν από την κοινωνική κυριαρχία. Στους ωκεανούς, οι περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να είναι σχετικά σταθερές, αλλά οι ιχθύες σε εκβολές ποταμών και σε λίμνες μπορούν να αντιμετωπίσουν ραγδαίες μεταβολές στο περιβάλλον. Ειδικότερα, όσον αφορά σε υδατοκαλλιέργειες ορισμένοι παράγοντες καταπόνησης προκύπτουν λόγω των συνθηκών της εντατικής παραγωγής και δεν απαντώνται στα φυσικά υδάτινα οικοσυστήματα. Παραδείγματα τέτοιου είδους καταπονήσεων αποτελούν η διαχείριση του πληθυσμού, ο συνωστισμός, η μεταφορά και οι θεραπείες, διαδικασίες απαραίτητες στα περισσότερα

εκκολαπτήρια. Άλλοι παράγοντες καταπόνησης αφορούν σε συγκεκριμένους τύπους υδατοκαλλιεργητικών μεθόδων, όπως ταχείες αλλαγές στο ωσμωτικό περιβάλλον του οργανισμού και πτώση στη συγκέντρωση του οξυγόνου του αίματος, συνθήκες που αντιμετωπίζουν τα νεαρά ιχθύδια όταν απελευθερώνονται άμεσα στο θαλασσινό νερό. Σε κάθε περίπτωση, η πιθανότητα επιβίωσης θα αυξηθεί μόνον όταν τα φυσιολογικά συστήματα του οργανισμού αντιδράσουν ανάλογα και ο οργανισμός εγκλιματιστεί στις νέες συνθήκες. Οι αντιδράσεις αυτές των ιχθύων είναι παρόμοιες με τις αντίστοιχες των ζώων (και του ανθρώπου). Περιλαμβάνουν αύξηση των επιπέδων κατεχολαμίνης και στη συνέχεια κορτιζόλης, ως απάντηση στην απώλεια της ομοιόστασης του οργανισμού. Η απάντηση περιλαμβάνει τρία στάδια, αυτό της αντίληψης κινδύνου, της απόκτησης ανθεκτικότητας και της εξάντλησης της δυνατότητας παραγωγής ορμονών stress (Stoskopf 1993; Wedemeyer 1996). Οι απαντήσεις εξαρτώνται επίσης από το δεδομένο επίπεδο οργάνωσης το οποίο αναφέρετε στη συνέχεια: Η πρωτογενής αντίδραση αφορά το ενδοκρινικό σύστημα, η δευτερογενής τις μεταβολές στο αίμα και στους ιστούς, η τριτογενής στο επίπεδο του όλου οργανισμού, ενώ η τεταρτογενής σε επίπεδο πληθυσμού ή οικοσυστήματος (Wedemeyer 1996). Εάν η έκθεση στο παράγοντα καταπόνησης είναι χρόνια, τότε οι επιδράσεις μπορεί να είναι σωρευτικές και να επηρεάζουν όλα τα επίπεδα οργάνωσης. Επομένως διαγνωστικά tests τα οποία περιλαμβάνουν τα δύο πρώτα κυρίως επίπεδα οργάνωσης δίδουν χρήσιμες πληροφορίες για τη κατάσταση stress ενός οργανισμού.

Ωστόσο, οι διαδικασίες εγκλιματισμού απαιτούν τη δαπάνη ενέργειας, επομένως παρατηρείται συνήθως υστέρηση στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή (Wedemeyer 1996). Συνήθως, ο εγκλιματισμός στηρίζεται σε κινητοποίηση μηχανισμών ενέργειας, με την εμπλοκή καταβολικών ορμονών, όπως της κορτιζόλης. Επομένως, οι καταστάσεις stress συνδέονται άμεσα με τη διατροφική κατάσταση και συμπεριφορά των ιχθύων. Οι επιπτώσεις του stress στη διατροφική συμπεριφορά αφορούν σε ένα ευρύ φάσμα βιοχημικών-νευροορμονικών αντιδράσεων που μπορεί να εκδηλωθούν είτε με διακοπή της πρόσληψης, είτε με έντονη κατανάλωση τροφής (Stoskopf 1993; Παπουτσόγλου 2008).

#### **1.4. Ευζωία (ευημερία) ιχθύων και η σημασία της**

Ο όρος ευζωία (welfare) των ζώων εμφανίστηκε και άρχισε να κερδίζει το ενδιαφέρον των ερευνητών σχετικά πρόσφατα (Almazán-Rueda, 2004). Με τον όρο αυτό συνήθως αποδίδεται η υπάρχουσα φυσική και διανοητική κατάσταση ενός ζώου σε σχέση με το περιβάλλον του (Appleby and Hughes, 1997; Duncan and Fraser, 1997). Σύμφωνα με τον παραπάνω ορισμό η

ευζωία αναφέρεται στην ποιότητα ζωής ενός ζώου, περιλαμβάνοντας τις έννοιες της υγείας, της ευτυχίας και της μακροζωίας (Duncan and Fraser, 1997). Η καταπόνηση (stress) μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα διατάραξης της ευζωίας. Συνήθως το έντονο stress συνδέεται με μειωμένη ευημερία, επομένως οι δύο αυτοί όροι είναι διαφορετικοί και ανταγωνιστικοί μεταξύ τους. Ενώ η ευημερία σχετίζεται με το αίσθημα της ευφορίας, ευτυχίας και/ή ευχαρίστησης, η καταπόνηση σχετίζεται με το αίσθημα του πόνου και του φόβου (Broom, 1998). Η απώλεια ευζωίας σε συνθήκες έντονου stress οφείλεται στο φορτίο “αλλόστασης”, το οποίο τείνει να διαταράξει τη φυσιολογική ομοιόσταση του οργανισμού (Segner et al 2012). Η αλλόσταση, ως όρος, αφορά στην προσπάθεια διατήρησης της ομοιόστασης μέσω αλλαγών των φυσιολογικών συστημάτων του οργανισμού. Η αλλόσταση επιτρέπει τη ρύθμιση της φυσιολογίας του οργανισμού ώστε η λειτουργία του να είναι συμβατή με τις αλλαγές στο περιβάλλον του (Segner et al., 2012).

Η ευζωία των ιχθύων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων και ανθρωπογενών. Οι τελευταίοι συμπεριλαμβάνουν την αλιεία, την ιχθυοκαλλιέργεια, την επιστημονική έρευνα ή την εκτροφή ιχθύων σε ενυδρεία ως κατοικίδιων ζώων (Huntingford et al., 2006). Τα ζώα αποκρίνονται σε διάφορα επίπεδα στις αντίξοες συνθήκες διαβίωσης που ποικίλουν από ενδοκρινικές αλλαγές έως άτυπες συμπεριφορές.

Η επιτροπή Brambell (1965) και αργότερα το Βρετανικό Συμβούλιο Ευημερίας Εκτρεφόμενων Ζώων (FAWC) (Ashley 2006), στοχεύοντας στη βελτίωση της ευζωίας των ζώων, διατύπωσε πέντε ελευθερίες κάτω από τις οποίες θα πρέπει να διαβιούν ζώα:

- 1) απαλλαγή από δίψα και πείνα,
- 2) κατάλληλες ανέσεις και καταφύγια,
- 3) αποφυγή δυσφορίας με ταχεία διάγνωση και θεραπεία τραυματισμών και ασθενειών,
- 4) ελευθερία να παρουσιάζουν τα «φυσικά» πρότυπα συμπεριφοράς, μέσω της διαβίωσης σε καταλληλές εγκαταστάσεις και συναναστροφή με άτομα του ίδιου είδους σε ικανοποιητικό χώρο και
- 5) απαλλαγή από το φόβο, διασφαλίζοντας ότι οι συνθήκες διαβίωσης και οι ανθρώπινοι χειρισμοί δεν προκαλούν στο ζώο καταστάσεις ψυχολογικών διαταραχών.

Στην περίπτωση εκτροφής ιχθύων οι πέντε αυτοί γενικοί κανόνες μπορούν να εξειδικευτούν και να συνοψιστούν ως εξής: επαρκής ποσότητα και ποιότητα τροφής, κατάλληλη θερμοκρασία, κατάλληλα επίπεδα οξυγόνου, καλή ποιότητα μέσου εκτροφής (νερό),

ιχθυοφόρτιση που λαμβάνει υπόψη την κολυμβητική συμπεριφορά και τις κοινωνικές αλληλεπιδράσεις, καλές πιθανότητες για αποφυγή αντιλαμβανόμενου κινδύνου και καλή παρακολούθηση της υγείας τους (FAWC, 1996). Τα παραπάνω προϋποθέτουν ότι οι ιχθύες διαθέτουν την ικανότητα αίσθησης δυσφορίας, δηλαδή συναισθηματικής εμπειρίας δυσάρεστων καταστάσεων, πόνο και φόβο, θέμα για το οποίο έχουν εκφραστεί κατά καιρούς εκ διαμέτρου αντίθετες απόψεις (Chandroo et al., 2004; Dawkins, 1998). Ορισμένοι ερευνητές ισχυρίζονται ότι λόγω έλλειψης βασικών περιοχών του φλοιού του εγκεφάλου τους, οι ιχθύες δεν είναι ικανοί να αισθανθούν πόνο και φόβο (Rose, 2002), ενώ άλλοι πιστεύουν ότι υπάρχουν ανατομικές, φυσιολογικές και ηθολογικές ενδείξεις που στηρίζουν το αντίθετο (Braithwaite and Huntingford, 2004; Chandroo et al., 2004; Sneddon, 2002; Sneddon et al., 2003). Οποιαδήποτε απόκλιση από τις συνθήκες διαβίωσης που αναφέρθηκαν παραπάνω αποτελεί παράγοντα καταπόνησης των ιχθύων με αποτέλεσμα την απώλεια της ευζωίας τους.

Η καλή μεταχείριση των εκτρεφόμενων ιχθύων και η ποιότητα του τελικού προϊόντος αποτελούν δύο ζητήματα τα οποία συνδέονται ισχυρά μεταξύ τους (Poli et al 2005). Δεδομένου ότι η παγκόσμια ζήτηση ιχθυοπροϊόντων αυξάνεται συνεχώς, η ευζωία των εκτρεφόμενων ιχθύων αποτελεί πλέον ένα θέμα στο οποίο δίδεται πλέον ιδιαίτερη προσοχή (Ashley, 2007). Σε συνθήκες έντονου συνωστισμού, που είναι τυπικές στα συστήματα εντατικής ιχθυοκαλλιέργειας, οι αλλαγές στη χημεία του νερού, οι διαχειριστικές πρακτικές και οι ηθολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ψαριών αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν την ευζωία των ιχθύων (Martins et al., 2012). Το ενδιαφέρον επίσης των καταναλωτών επικεντρώνεται και προς την εφαρμογή «ανθρώπινων» πρακτικών κατά τους χειρισμούς των εκτρεφόμενων ιχθύων (Bengni et All.2007). Συνεπώς η ευζωία των ιχθύων αποτελεί σημαντικό ζήτημα για το εμπόριο και τη βιομηχανία, όχι μόνο για την αποδοχή των προϊόντων από το καταναλωτικό κοινό, αλλ'α και για την απόδοση, την ποιότητα και την ποσότητα της παραγωγής (Ashley 2006).

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η χρήση ορισμένων δεικτών είναι αναγκαία προκειμένου να υπάρχει μια έμμεση ή άμεση εκτίμηση της ευζωίας του εκτρεφόμενου πληθυσμού. Παρότι είναι παραδεκτό ότι δεν υπάρχει ένα ενιαίο μέτρο της ευζωίας, συνήθως χρησιμοποιείται ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών και βιοχημικών παραμέτρων, καθώς και παραμέτρων συμπεριφοράς για την αξιολόγηση της καλής ευζωίας. Η εκτίμηση μεμονωμένων παραμέτρων δεν θεωρείται αξιόπιστη, συνεπώς θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη περισσότερες της μιας παράμετροι. Κατά καιρούς έχουν προταθεί ορισμένοι εύκολα αναγνωρίσιμοι και μετρήσιμοι δείκτες για την αξιολόγηση της ευζωίας των ιχθύων όπως

είναι: Η στρατηγική αναζήτησης τροφής, ο χρωματισμός, η αναπνευστική δραστηριότητα, η κολυμβητική συμπεριφορά και δραστηριότητα του πληθυσμού της δεξαμενής και του ατόμου, ο βαθμός πρόσληψης τροφής, η ύπαρξη ασθενειών, ο ρυθμός αύξησης και αναπαραγωγής, οι πιθανές μορφολογικές ανωμαλίες, οι τραυματισμοί στο σώμα και τα περύγια (Huntingford et al., 2006). Οι δείκτες αυτοί μπορεί να συνδυαστούν και με άλλες περιβαλλοντικές και διαχειριστικές παραμέτρους, όπως η ποιότητα του νερού, η ιχθυοπυκνότητα, οι χειρισμοί εκτροφής και τέλος η θανάτωση και όλες οι διαδικασίες με τις οποίες συνοδεύεται. Όλοι οι δείκτες που προαναφέρθηκαν διαδραματίζουν από κοινού σημαντικό ρόλο στην ευζωία των εκτρεφόμενων ιχθύων και στην ποιότητα του τελικού προϊόντος (Segner et al., 2012; Pavlidis and Mylonas, 2011). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι τα διαφορετικά εκτρεφόμενα είδη ιχθύων χαρακτηρίζονται από διαφορετικές βιολογικές και περιβαλλοντικές απαιτήσεις και δείχνουν διαφορετικές αποκρίσεις σε συνθήκες υδατοκαλλιέργειας, ως εκ τούτου η αξιολόγηση της ευζωίας τους έχει διαφορετική προσέγγιση.

Οι πρακτικές που προκαλούν stress πριν ή κατά τη θανάτωση των ψαριών μπορεί να έχουν σημαντική επίπτωση στην ποιότητα της σάρκας τους. Βελτιώσεις των μεθόδων θανάτωσης συντελούν σε μία καλύτερη ποιότητα του τελικού προϊόντος. Μέθοδοι που προκαλούν έντονες στρεσσοειδείς αντιδράσεις πριν ή κατά τη θανάτωση συντελούν στην εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων στους μυς, στην παραγωγή γαλακτικού οξέος, στη μείωση του pH στους μυς και στην αύξηση του ρυθμού για την εμφάνιση του rigor mortis. Οι έντονες αλλαγές στο γαλακτικό οξύ και στο pH κατά την πρώτη ημέρα μετά το θάνατο είναι γενικά καλοί και γρήγοροι δείκτες της στρεσσοειδούς αντίδρασης και της μυϊκής δραστηριότητας. Η στρεσσοειδής αντίδραση σε πρακτικές πριν ή κατά τη θανάτωση μπορεί να εκτιμηθεί επίσης από τη συγκέντρωση των παρακάτω ενώσεων: ATP, ADP, AMP, ATP/IMP, inosine (HxR) και hypoxanthine (Hx)(poli et al., 2002).

Με την κατάλληλη διαχείριση, ακόμη και στο εντατικό περιβάλλον εκτροφής, μπορεί να αποφεύγονται δυνητικοί παράγοντες καταπόνησης και να βελτιώνονται μια σειρά από δείκτες ευζωίας. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται σε παράγοντες όπως η ποιότητα του νερού, οι διαχειριστικές πρακτικές, καθώς και οι βιολογικές και κοινωνικές αλληλεπιδράσεις.

Α. Ποιότητα νερού: Ο προσδιορισμός των βέλτιστων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού, που θα εξασφαλίζουν άριστες περιβαλλοντικές συνθήκες σε συστήματα εντατικής εκτροφής, αποτελεί ένα πολύπλοκο ζήτημα. Οι επιδράσεις των συνθηκών ποιότητας του νερού στην υγεία και τη φυσιολογική κατάσταση των ιχθύων ποικίλουν σημαντικά μεταξύ των

διαφορετικών ειδών, των ηλικιών και των μεγεθών. Επιπλέον, ορισμένοι παράγοντες της ποιότητας του νερού, ειδικά η ολική σκληρότητα, το pH, η περιεκτικότητα σε οξυγόνο και η θερμοκρασία επηρεάζουν τις φυσιολογικές επιδράσεις άλλων παραμέτρων. Για ορισμένες από τις παραμέτρους υπάρχει δυνατότητα άμεσης διόρθωσης και επομένως βελτίωσης της ευζωίας των ιχθύων (Πίνακας 1.4.1).

Β. Διαχειριστικές (ιχθυοκαλλιεργητικές) πρακτικές: Διαχειριστικές πρακτικές όπως συνωστισμός, δηλαδή υψηλή πυκνότητα εκτροφής η σύλληψη, ο περιορισμός, ο διαχωρισμός, η διαλογή, η μεταφορά, η αναισθησία καθώς και η μέτρηση βάρους ή μήκους, προκαλούν stress. Οι διαδικασίες πριν και κατά τη θανάτωση θεωρούνται πολύ σημαντικές στη διαχείριση της εκτροφής των ιχθύων. Οι χειρισμοί πριν από το θάνατο και η μέθοδος θανάτωσης των ιχθύων θα πρέπει να είναι κατάλληλοι ώστε να αποφεύγονται καταστάσεις που προκαλούν stress και επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα του τελικού προϊόντος (Ashley 2006; Poli et al., 2005). Επίσης κατά τη διαδικασία μεταφοράς των ιχθύων στο χώρο θανάτωσης, η νάρκωση με χρήση αναισθητικού μπορεί να μειώσει το stress που σχετίζεται με τη μεταφορά τους.

Γ. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιχθύων: Οι ηθολογικές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των ιχθύων στις εντατικές ιχθυοκαλλιέργειες μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή stress (Martins et al., 2012). Μια σειρά από συμπεριφορές έχουν εξελιχθεί στους άγριους πληθυσμούς οι οποίες ενισχύουν την επιτυχία του ατόμου στο συνεχή ανταγωνισμό για τροφή, χώρο, καλή ποιότητα νερού, κάλυψη για προστασία από θηρευτές και εύρεση συντρόφου.

Δ. Αλληλεπιδράσεις ιχθύων με μικροοργανισμούς: Οι αλληλεπιδράσεις των ιχθύων με τους μικροοργανισμούς στο περιβάλλον εκτροφής είναι συνήθως αβλαβείς. Ωστόσο οι αλληλεπιδράσεις αυτές λαμβάνουν χώρα σε ένα δυναμικό περιβάλλον και επομένως μεταβολές στις συνθήκες εκτροφής, όπως της ποιότητας του νερού ή της πυκνότητας του πληθυσμού, μπορεί να προκαλέσουν παθογενείς καταστάσεις (Wedemeyer, 1997).

**Πίνακας 1.4.1. Ορισμένοι παράμετροι που επηρεάζουν την ευζωία των ιχθύων και η δυνατότητα ή μη άμεσης διόρθωσής τους (Segner et al., 2012)**

<b>Παράμετρος</b>	<b>Δυνατότητα άμεσης διόρθωσης</b>
	<i>Ποιότητα νερού</i>
θερμοκρασία	ναι/όχι
αλατότητα	ναι/όχι
pH	ναι/όχι

ροή νερού	ναι/όχι
θολότητα	ναι
BOD	ναι
συγκέντρωση αμμωνίας	ναι
συγκέντρωση νιτρωδών	ναι
συγκέντρωση νιτρικών	ναι
συγκέντρωση φωσφορικών	ναι
<i>Διατροφή</i>	
πρωτεΐνες	
αμινοξέα	ναι
λιπίδια	
λιπαρά οξέα	ναι
υδατάνθρακες	ναι
βιταμίνες	ναι
ιχνοστοιχεία	ναι
αντιοξειδωτικά	ναι
ανοσοδιεγέρτες	ναι
μολυσματικοί παράγοντες	ναι/όχι

## 1.5. Ευζωία και μέθοδοι θανάτωσης

Οι μέθοδοι θανάτωσης που προκαλούν σοβαρές συνθήκες stress στο ζώο μπορούν σε μεγάλο βαθμό να επηρεάσουν την ποιότητα και τις μετέπειτα μεταβολές κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του τελικού προϊόντος (την σάρκα του ιχθύος). Ορισμένα από τα χαρακτηριστικά της ποιότητας καθορίζονται με τον θάνατο, όπως η περιεκτικότητα σε λιπαρά. Πολλά χαρακτηριστικά ποιότητας μπορούν επίσης να αλλάξουν καθώς επηρεάζονται από τις συνθήκες κατά τη στιγμή της θανάτωσης αλλά και κατά το χρονικό διάστημα προετοιμασίας για την θανάτωση, καθώς και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (χειρισμοί και θερμοκρασίες αποθήκευσης).

Για το λόγο αυτό οι μέθοδοι αναισθητοποίησης που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να προκαλούν την άμεση ή ταχεία (σε χρόνο συντομότερο του ενός δευτερολέπτου) απώλεια των αισθήσεων. Φαίνεται ότι οι ιχθύες, παρόλο που θεωρούνται λιγότερο ανεπτυγμένοι οργανισμοί σε σχέση με άλλα εκτρεφόμενα ζώα, διαθέτουν αισθητήρια όργανα τα οποία είναι σε θέση να ανιχνεύσουν επώδυνα ερεθίσματα, να τα επεξεργαστούν και να εκδηλώσουν χαρακτηριστικές αποκρίσεις συμπεριφοράς. Εάν η εφαρμογή της αναισθησίας δεν είναι

άμεση, τότε πρέπει να πραγματοποιηθεί χωρίς πρόκληση πόνου και ταλαιπωρίας. Το προσωπικό διαχείρισης θα πρέπει να είναι έμπειρο και να είναι σε θέση να αναγνωρίσει εάν η εφαρμογή της αναισθησίας ήταν επιτυχής και οι ιχθύες είναι πλέον αναισθητικοί. Στο λαβράκι και στη τσιπούρα, η διαπίστωση απώλειας των αισθήσεων ή θάνατου περιλαμβάνει την απουσία της αναπνοής και την απουσία κίνησης, απουσία κίνησης των οφθαλμών, απουσία απόκρισης σε επώδυνα ερεθίσματα (τσίμπημα) και απώλεια της ισορροπίας. Σε πειραματικές συνθήκες, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν τεχνικές εγκεφαλογραφήματος (EEG) (Kestin et al., 2002). Το βασικό ζήτημα στην εκτίμηση της ευζωίας κατά τη στιγμή της σφαγής είναι η ταλαιπωρία των ζώων, η οποία είναι επίσης δύσκολο να μετρηθεί.

## **1.6. Μέθοδοι θανάτωσης των εκτρεφόμενων ιχθύων:**

Στον πίνακα 1.6.1. παρουσιάζονται οι μέθοδοι που αναλύονται στη συνέχεια (EFSA journal 2009):

### 1. Ασφυξία στον αέρα (Asphyxia in air)

Με τη μέθοδο αυτή θανατώνονται η τσιπούρα και το λαβράκι, σύμφωνα με την οποία οι ιχθύες απομακρύνονται από το νερό και αφήνονται να πεθάνουν στον αέρα. Ο χρόνος που απαιτείται για την θανάτωση των ιχθύων εξαρτάται από την αντοχή τους στην υποξία. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι βίαιες απόπειρες να ξεφύγουν προκαλούν μέγιστες αποκρίσεις stress. Μελέτες έδειξαν ότι η μέθοδος θανάτωσης με χρήση της ασφυξίας σε λαβράκι είναι η πιο αγχωτική μέθοδος θανάτωσης, αφού χαρακτηρίζεται από την πιο παρατεταμένη περίοδο πριν από την πρόκληση θάνατου και μια αξιοσημείωτη φυσική δραστηριότητα.

### 2. Μεταφορά στον πάγο (Live chilling)

Η μέθοδος περιλαμβάνει ταχεία μεταφορά από το νερό (θερμοκρασία περιβάλλοντος) σε: i) νιφάδες πάγου (στερεό πάγο), ii) υγρό πάγο (μέθοδος επίσης γνωστή ως super cold water) σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από -2,3 έως -2,8 ° C) ή iii) παγόνερο (νιφάδες πάγου και νερού σε μία αναλογία που κυμαίνεται από 1:2 έως 1:3).

Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι ο πολτός-πάγου ύδατος σε θερμοκρασίες 0 έως 2 ° C. Ο πολτός αυτός συνήθως παρουσιάζει διαφορά θερμοκρασίας τουλάχιστον 10 ° C σε σχέση με αυτήν που αναπτύχθηκαν οι ιχθύες. Ο υγρός πάγος χρησιμοποιείται μόνο για πειραματικές δοκιμές. Οι ιχθύες μεταφέρονται σε ένα δοχείο με νιφάδες πάγου ή πολτού



πάγου ύδατος με στόχο να χαλαρώσουν και στη συνέχεια να θανατωθούν. Οι νεκροί ιχθύες συσκευάζονται σε μια αναλογία πάγου / ιχθύων από 1: 3.

### 3. Νάρκωση/θανάτωση με χρήση μειγμάτων αερίων (Gas mixtures)

Η νάρκωση με χρήση CO<sub>2</sub> δεν συνίσταται για τη θανάτωση ιχθύων επειδή οι γρήγορες και βίαιες αντιδράσεις τους (επαναλαμβανόμενες κινήσεις προσπαθώντας να δραπετεύσουν και η ανώμαλη δραστηριότητα πριν από την αναισθητοποίηση) συμβάλλουν στην αύξηση του stress. Η συγκέντρωση των αερίων, η θερμοκρασία του νερού (νερό εκτροφής και λουτρού αναισθητοποίησης) και η διάρκεια της έκθεσης είναι βασικές παράμετροι που καθορίζουν την αποτελεσματικότητα των μεθόδων αυτών. Η μέθοδος δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη κλίμακα.

### 4. Ηλεκτρική αναισθητοποίηση (Electrical stunning)

Η μέθοδος της ηλεκτρικής αναισθητοποίησης εξακολουθεί να εφαρμόζεται σε πειραματικό επίπεδο, ωστόσο με βάση τον πρωτότυπο εξοπλισμό μπορεί να κατασκευαστεί ο απαραίτητος εξοπλισμός για την εφαρμογή της σε μεγαλύτερη κλίμακα. Οι ιχθύες τοποθετούνται σε μία δεξαμενή γλυκού νερού με ένα ηλεκτρικό να καλώδιο διασχίζει τη δεξαμενή συνδέοντας δύο ηλεκτρόδια που είναι τοποθετημένα στις αντίθετες πλευρές της δεξαμενής. Ωστόσο, η εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος στο σώμα της τσιπούρας και του λαβρακιού παρουσιάζει διαφορές με αυτή της ηλεκτρικής αναισθητοποίησης άλλων αγροτικών ζώων και πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στην εφαρμογή της.

### 5. Έκθεση σε υπερδοσολογία αναισθητικού (Overdose of anaesthetic)

Η μέθοδος αυτή, λόγω των υψηλών δόσεων αναισθητικού, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θανάτωση ιχθύων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, θα μπορούσε όμως να θεωρηθεί ένας κατάλληλος τρόπος για την ευθανασία ετοιμοθάνατων ή άρρωστων ατόμων.

### 6. Κρουστικό πλήγμα (Knocking or percussive stunning)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συνήθως στο σολομό, την πέστροφα και άλλους μεγαλόσωμους ιχθύς. Η διαδικασία επιτυγχάνεται με χρήση ειδικού εργαλείου που χτυπά απευθείας το κεφάλι του ιχθύος διακόπτοντας άμεσα κάθε εγκεφαλική λειτουργία. Η μέθοδος αυτή μπορεί να θεωρείται ως μη βάνουση για τους ιχθύς, αλλά είναι πάρα πολύ χρονοβόρα για τις παρτίδες των μικρού μεγέθους ειδών.

### 7. Spiking

Χρησιμοποιείται για την θανάτωση του τόνου και του σολομού προκαλώντας τη φυσική καταστροφή του εγκεφάλου με μια αιχμηρή ακίδα, η οποία εισάγεται μέσα στο κρανίο μετακινώντας και καταστρέφοντας τον εγκέφαλο. Αποτελεί μια από τις ταχύτερες και λιγότερο αγχωτικές μεθόδους, μπορεί να θεωρηθεί μη βάνουση για τους ιχθύς, αλλά είναι ακατάλληλη για τις ομάδες των μικρού μεγέθους ειδών.

Πίνακας 1.6.1 Μέθοδοι θανάτωσης και σφαγής που χρησιμοποιούνται σε ευρωπαϊκά ιχθυοτροφεία (Poli et al., 2005)

Οργανισμός	μέθοδος
Σολομός ( <i>Salmo salar</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• αφαίρεση βραγχίων</li> <li>• νάρκωση με CO<sub>2</sub> + αφαίρεση βραγχίων</li> <li>• κτύπημα + αφαίρεση βραγχίων</li> <li>• πάγωμα + αφαίρεση βραγχίων</li> </ul>
Ιριδίζουσα πέστροφα ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ασφυξία</li> <li>• νάρκωση με CO<sub>2</sub> + αφαίρεση βραγχίων</li> <li>• πάγος με νερό</li> <li>• αφαίρεση βραγχίων</li> <li>• ηλεκτρική αναισθητοποίηση + αφαίρεση σπλάχνων</li> </ul>
Τσιπούρα ( <i>Sparus aurata</i> ), Λαβράκι ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) άλλα θαλάσσια είδη	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ασφυξία</li> <li>• πάγος με νερό</li> </ul>
χέλι ( <i>Anguilla anguilla</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• αλατούχο λουτρό + αφαίρεση σπλάχνων (Ολλανδία)</li> <li>• ηλεκτρική αναισθητοποίηση (50 V για 5 λεπτά) + αφαίρεση σπλάχνων (Γερμανία)</li> <li>• πάγος με νερό + αφαίρεση σπλάχνων</li> </ul>

## 1.7. Η χρήση των αναισθητικών και η σημασία τους

Η αναισθησία γενικά ορίζεται ως μια κατάσταση κατά την οποία ένας εφαρμοζόμενος εξωτερικός παράγοντας προκαλεί την αντιστρεπτή απώλεια των αισθήσεων μέσω της

καταστολής του νευρικού συστήματος. Κατά τη διάρκεια της αναισθησίας επικρατεί μειωμένη κινητικότητα και αντίληψη του οργανισμού. Ανάλογα με την εφαρμογή, η αναισθησία μπορεί να είναι τοπική ή ολική. Η χρήση των αναισθητικών διευκολύνει τις εργασίες τόσο στο επίπεδο της έρευνας, (για την διεξαγωγή επεμβατικών μετρήσεων όταν οι ιχθύες πρέπει να παραμείνουν ακίνητοι για παρατεταμένες χρονικές περιόδους), όσο και σε επίπεδο εφαρμογής σε υδατοκαλλιέργειες προκειμένου να γίνουν διάφοροι χειρισμοί όπως μεταφορές, θανάτωση, ταξινομήσεις ή εμβολιασμοί. Στις περιπτώσεις αυτές η αναισθησία χρησιμοποιείται προκειμένου να αποφευχθούν τραυματισμοί και έντονο stress. Η αναισθησία συνήθως επιτυγχάνεται με χρήση χημικών αναισθητικών, ηλεκτρικού ρεύματος ή υποθερμίας (εμβάπτιση σε πάγο/κρύο νερό). Οι αναισθητικές ουσίες συνήθως διαλύονται στο νερό της εκτροφής των ιχθύων. Οι ουσίες αυτές εισέρχονται στον οργανισμό κυρίως μέσω των βραγχίων και δευτερευόντως από το δέρμα και στη συνέχεια διαχέονται στο αρτηριακό αίμα και περνούν στο νευρικό σύστημα καταστέλλοντας τη λειτουργία των νευρώνων. Το αναισθητικό απομακρύνεται από τον οργανισμό με τη μεταφορά των ιχθύων σε καθαρό νερό και αποβάλλεται είτε μέσω των βραγχίων (κυρίως), είτε μέσω του δέρματος και των νεφρών.

Η επιλογή του αναισθητικού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Εάν π.χ. το μέλημα του χειριστή είναι να ελαχιστοποιήσει το stress της μεταφοράς, τότε μπορεί να χρησιμοποιήσει μια ελαφριά νάρκωση, την οποία μπορεί να την επιτύχει χρησιμοποιώντας χαμηλές συγκεντρώσεις ενός αναισθητικού όπως TMS (Tricaine methanesulfonate) (ρυθμισμένο με διττανθρακικό νάτριο εάν είναι απαραίτητο).

Η δράση των αναισθητικών ουσιών εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τη συγκέντρωσή τους και από το χρόνο έκθεσης των ιχθύων σε αυτές. Η αποτελεσματικότητα των περισσότερων αναισθητικών επηρεάζεται από το είδος του ιχθύος, το μέγεθος του σώματος και το βιολογικό στάδιο, την περιεκτικότητα σε λίπος, την πυκνότητα του πληθυσμού στο λουτρό, καθώς και από την ποιότητα του νερού (π.χ., σκληρότητα, θερμοκρασία, ή αλατότητα), οι προκαταρκτικές δοκιμές με μικρό αριθμό ιχθύων επιβάλλονται προκειμένου να καθοριστεί η βέλτιστη δόση και ο χρόνος έκθεσης. Θα πρέπει επίσης να γίνεται σχολαστικός έλεγχος της συγκέντρωσης του αναισθητικού, συνεχής παρακολούθηση των ιχθύων καθώς περνούν μέσα από τα διάφορα στάδια της αναισθησίας (Πίνακα 1.7.1). Η διαδικασία της αναισθησίας περιλαμβάνει συνήθως τρία διακριτά στάδια, το στάδιο της επαγωγής (induction), το στάδιο της παραμονής (maintenance) και το στάδιο της επαναφοράς των αισθήσεων (recovery). Με τη σειρά τους τα στάδια αυτά μπορεί να διαχωριστούν σε επί μέρους (Πίνακας 1.7.1). Για να είναι αποτελεσματικό ένα αναισθητικό θα πρέπει ο χρόνος επαγωγής να είναι μικρότερος από 3 λεπτά και η επαναφορά των αισθήσεων του ιχθύος να πραγματοποιείται μέσα σε 5 λεπτά

από την τοποθέτησή τους σε καθαρό νερό (Marking & Meyer, 1985; Bell, 1987). Το αναισθητικό που επιλέγεται δεν πρέπει να έχει τοξικές παρενέργειες ούτε για τους ιχθύς, ούτε για τον χειριστή. Θα πρέπει να είναι βιοαποικοδομήσιμο και να έχει ιδιότητες οι οποίες να επιτρέπουν την σύντομη απομάκρυνση της ουσίας από τους ιστούς του οργανισμού μετά την έκθεση. Επίσης, δεν θα πρέπει να προκαλεί παρενέργειες στην φυσιολογία, στην ανοσολογία ή στην συμπεριφορά, οι οποίες θα μπορούσαν να μειώσουν την πιθανότητα επιβίωσης. Κατά την επιλογή του αναισθητικού θα πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας και η διαθεσιμότητά του, καθώς και χαρακτηριστικά όπως η δημιουργία αφρού, τα οποία θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν την ανταλλαγή των αερίων εντός της δεξαμενής.

Πίνακας 1.7.1 Τα Τα στάδια αναισθησίας στους ιχθύες (Schoettger and Julin,1967)

Στάδιο	Περιγραφή	Συμπεριφορά ιχθύος
0	φυσιολογικό	Αντίδραση σε εξωτερικά ερεθίσματα, αναπνευστικός ρυθμός και μυϊκός τόνος φυσιολογικοί
1	Ελαφριά νάρκωση	Ελαφριά απώλεια αντίδρασης σε εξωτερικά ερεθίσματα, ελαφριά μείωση στις βραγχιακές κινήσεις, φυσιολογική ισορροπία
2	Βαθιά νάρκωση	Ολική απώλεια σε όλα τα εξωτερικά ερεθίσματα, μείωση στις βραγχιακές κινήσεις, φυσιολογική ισορροπία
3α <sup>α</sup>	Μερική απώλεια ισορροπίας	Μερική απώλεια του μυϊκού τόνου, ασταθής κολύμβηση, αυξημένος αναπνευστικός ρυθμός, αντίδραση μόνο σε τακτικά ερεθίσματα
3b	Ολική απώλεια ισορροπίας	Ολική απώλεια του μυϊκού τόνου και της ισορροπίας, αργός αλλά σταθερός αναπνευστικός ρυθμός, απώλεια αντανακλαστικών της σπονδυλικής στήλης

4	Απώλεια αντίδρασης σε ερεθίσματα	Ολική απώλεια αντιδράσεων, αναπνευστικές κινήσεις αργές και ακανόνιστες, καρδιακός ρυθμός αργός, απώλεια όλων των αντανακλαστικών
5	Ασφυξία (medullary collapse)	Παύση βραγχιακών κινήσεων, που ακολουθείται γρήγορα από καρδιακή ανακοπή

Ορισμένα από τα χημικά αναισθητικά που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες και παρουσιάζονται στον πίνακα 1.7.2 αναλύονται στη συνέχεια:

### **TMS**

Το TMS (MS-222), [3-aminobenzoic acidethyl Tricaine methanesulfonate] αποτελεί το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο αναισθητικό, διότι είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό για την ταχεία επαγωγή της βαθιάς αναισθησίας. Είναι μια λευκή κρυσταλλική σκόνη που διαλύεται εύκολα σε νερό, με μια διαλυτότητα από 1,25g/mL νερού στους 20 °C. Είναι γενικά ασφαλές για τον χειριστή, ωστόσο η επαφή με τα μάτια και τους βλεννογόνους θα πρέπει να αποφεύγεται, καθώς μπορεί να προκύψει ερεθισμός. Το TMS χρησιμοποιείται νόμιμα σε παγκόσμια κλίμακα στις υδατοκαλλιέργειες (Πίοεε αντί Κοεε, 2008), ωστόσο σύμφωνα με τον οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) παρουσιάζει χρόνο παραναμονής (withdrawal time) 21 ημερών.

### **Benzocaine**

Η Benzocaine [p-aminobenzoic acid ethyl ester] είναι γενικά αβλαβές για τον άνθρωπο και χρησιμοποιείται συνήθως ως τοπικό αναισθητικό σε διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα και για κτηνιατρικούς σκοπούς. Ωστόσο, η σκόνη μπορεί να ερεθίσει το αναπνευστικό σύστημα. Η αποτελεσματικότητά του επηρεάζεται από το μέγεθος του ψαριού, σε μικρότερα ψάρια απαιτείται χαμηλότερη δόση, όπως επίσης και από τη θερμοκρασία του νερού (Gilderhus, 1989). Ο χρόνος επαγωγής είναι γενικά μικρότερος από 4 λεπτά και όταν οι ιχθύες τοποθετούνται σε καθαρό νερό η ανάκτηση των αισθήσεων ολοκληρώνεται συνήθως μέσα σε 10 λεπτά.

### **Lidocaine**

Η Lidocaine [2-(diethylamino)-N-(2,6-dimethylphenyl) acetimide] έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με bicarbonate για την αναισθητοποίηση κυπρίνου (*Cyprinus carpio*), τιλάπιας (*Oreochromis/Tilapia mossambica*) και γατόψαρου (*Ictalurus punctatus*) (Carrasco et al., 1984).

### **Metomidate**

Το Metomidate [1-(1-phenylethyl)-1H-imidazole-5-carboxylic acid methyl ester] είναι υδατοδιαλυτό. Μια παρενέργεια από την χρήση του αναισθητικού αυτού είναι η σύσπαση των μυών που μπορεί να προκαλέσει δυσκολίες στη δειγματοληψία αίματος (Massee et al., 1995). Το αναισθητικό αυτό είναι αποτελεσματικό τόσο σε γλυκό και θαλασσινό νερό και έχει αναφερθεί ότι είναι περισσότερο ισχυρό σε ενήλικα άτομα σολομού προσαρμοσμένα στο θαλασσινό νερό (Olsen et al., 1995).

### **Propoxate**

Το Propoxate [propyl-DL-1-(phenylethyl) imidazole-5-carboxylate hydrochloride] είναι κρυσταλλική σκόνη που διαλύεται ελεύθερα τόσο σε γλυκό νερό όσο και σε αλμυρό νερό (100 φορές περισσότερο διαλυτό από το TMS). Παραμένει σταθερό σε διάλυμα για μεγάλες χρονικές περιόδους.

**Πίνακας 1.7.2 Σύνοψη των χαρακτηριστικών ορισμένων επιλεγμένων αναισθητικών**

Αναισθητικό	Δόση	Χρόνος Επαγωγής	Χρόνος ανάκτησης αισθήσεων	είδος ιχθύος
<b>TMS</b>	25- 480 mg/L	< 5 min	< 10 min	Salmonids, Carp, Minnows, Atlantic halibut, Striped bass, Cod, Tilapia,
<b>Benzocaine hydrochloride</b>	25- 100 mg/L	3- 6.5 min	< 10 min	Cod, Salmonids, Bass, Carp, Tilapia
<b>Lidocaine plus</b>	350 mg/L	53 sec	13 min	Carp
<b>1g/L NaHCO<sub>3</sub> *</b>	250-350 mg/L	<1 min	10-13 min	Catfish, Tilapia
<b>Metomidate</b>	5-60 mg/L	< 5 min	< 20 min	Cod, Striped Bass, Atlantic halibut, Rainbow trout
<b>Etomidate</b>	1-10 mg/L	< 18 min	< 40 min	Salmonids, Tropicals, Catfish, Golden shiners, Striped Bass
<b>Propoxate</b>	1 B 4 mg/L	< 10 min		
<b>Ketamine hydrochloride</b>	30 mg/kg	10 B 300 sec	1 B 2 hrs	Διάφορα είδη σολωμού
<b>Quinaldine sulfate</b>	1,5-70 mg/L	< 3 min	< 60 min	Διάφορα είδη σολωμού γατόψαρο, Bluegill, Largemouth πέρκα
<b>Propanidid</b>	1.5 B 3 mL/L	1 B 4 min	4 B 10 min	Διάφορα είδη σολωμού
<b>Clove oil &amp; AQUI-S®</b>	20-60 mg/L	< 5 min	< 14 min	πέστροφα, Rabbitfish, Damsel fish, σολωμός
<b>2-Phenoxyethanol</b>	100 B 500 mL/L	3 min	< 4 min	Διάφορα είδη σολωμού , Tilapia
<b>Hypothermia</b>	Instant drop of 6EC Εβάπτιση σε παγόνερο			Διάφορα είδη
<b>Carbon Dioxide</b>	200 B 1500 mg/L (50%CO <sub>2</sub> : 50%O <sub>2</sub> ) 290 B 460 mL/min 1 B 1.78 L/min @50%CO <sub>2</sub> 100 B 250 mmHg CO <sub>2</sub>	< 3 min	8.14 min	Διάφορα είδη σολωμού
		20 min	30 min	κυπρίνος κυπρίνος
		30 min	20 B 30 min	κυπρίνος
		~ 30 min	< 40 min	
<b>Sodium bicarbonate</b>	900 mg/L	5 min	12.1 min	ενήλικος σολωμός
<b>Carbonic acid</b>	150 B 600 mg/L H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>			
<b>Electro - anesthesia</b>	12 V DC	Rapid	< 30 sec	Διάφορα είδη σολωμού, Πέρκα

### **Ketamine hydrochloride**

Το Ketamine hydrochloride [2-(0-chlorophenyl)-2-(methyl-amino) cyclohexanone hydrochloride] έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως ένα ιατρικό και κτηνιατρικό αναισθητικό, ασφαλές για το χειριστή. Έχει ένα μεγάλο περιθώριο ασφαλείας μεταξύ θανατηφόρας και αποτελεσματικής δόσης. Επειδή όμως το φάρμακο είναι ενέσιμο, δεν είναι κατάλληλο για μεγάλους πληθυσμούς ιχθύων, έχει όμως εφαρμογή σε ενδομυϊκές ενέσεις με βελάκια πυροβόλων όπλων σε μεμονωμένα άτομα.

### **Quinaldine sulfate**

Το Quinaldine sulfate [2-methylquinoline sulfate] αποτελεί ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αναισθητικά από θαλάσσιους βιολόγους οι οποίοι συλλέγουν παλιρροιακούς οργανισμούς και ιχθύες από κοραλλιογενείς ύφαλους (Munday & Wilson, 1997). Εκτεταμένη έκθεση των ιχθύων σε Quinaldine sulfate έχει αποδειχθεί ότι επιφέρει τοξικά αποτελέσματα και συνεπώς συστήνεται μόνο ως βραχυπρόθεσμο αναισθητικό. Η αποτελεσματική δόση ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με το είδος και το μέγεθος των ιχθύων και τη θερμοκρασία. Το Quinaldine sulfate είναι αποτελεσματικό σε pH του νερού επίπεδα άνω του 6.

### **2-Phenoxyethanol**

Το 2-Phenoxyethanol (2-PE) [1-hydroxy-2-phenoxyethane] είναι ένα άχρωμο, ελαιώδες, αρωματικό υγρό με καυστική γεύση, και έχει μια διαλυτότητα στο νερό της τάξης των 27 g / L στους 20 °C (Merck Company, 1989). Χρησιμοποιείται συνήθως ως τοπικό αναισθητικό. Πρόκειται για μια ήπια τοξίνη και μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό στο δέρμα, ως εκ τούτου οποιαδήποτε επαφή με τα μάτια θα πρέπει να αποφεύγεται (Bell, 1987). Με βάση τα στοιχεία τοξικολογικών ερευνών μπορεί επίσης να προκαλέσει βλάβη του ήπατος και των νεφρών (Summerfelt & Smith, 1990). Η αποτελεσματικότητά του ποικίλλει ανάλογα με το μέγεθος του ψαριού και τη θερμοκρασία του νερού.

### **Methylpentynol**

Το Methylpentynol [3-methyl-1-pentyn-3-ol] έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με την 2-φαινοξυαιθανόλη και η αποτελεσματικότητά του διαφέρει ανάλογα με το μέγεθος και το είδος του ψαριού, καθώς και με την θερμοκρασία του νερού. Άλλες παράμετροι ποιότητας του νερού, όπως pH δεν φαίνεται να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην αποτελεσματικότητα κατά την αναισθησία.



## **Chlorobutanol**

Το αναισθητικό Chlorobutanol [1,1,1-trichloro-2-methyl-2-propanol] παρουσιάζει υψηλή διαλυτότητα σε αλκοόλη [Merck Company, 1989], μολονότι μπορεί να διαλύεται και σε νερό (McFarland & Klontz, 1969). Μητρικά διαλύματα μπορούν να παρασκευαστούν πριν από τη χρήση και να αποθηκεύονται για μεγάλες χρονικές περιόδους στους 4 ° C. Στην Ιατρική το Chlorobutanol χρησιμοποιείται ως οδοντικό αναλγητικό (Merck Company, 1989), αλλά έχει περιορισμένη χρήση στις υδατοκαλλιέργειες καθώς είναι τοξικό για μικρού μεγέθους ιχθύς και η απόκριση των ιχθύων σε αυτό δεν είναι σταθερή (McFarland & Klontz, 1969 Mattson & Riple, 1989).

## **Diethyl ether**

Το Diethyl ether [1,1' -oxybesethane] προκαλεί ερεθισμούς του δέρματος στους ανθρώπους και η εισπνοή μπορεί να οδηγήσει σε νάρκωση και απώλεια των αισθήσεων, ενώ μπορεί να επέλθει θάνατος λόγω αναπνευστικής παράλυσης (Merck Company, 1989). Παρά το γεγονός ότι η χρήση του σε ψάρια κατά τις δεκαετίες του 1940 και του 1950 ήταν εκτεταμένη, ο ερεθισμός των χρηστών έχει αποθαρρύνει την κοινή χρήση του (McFarland & Klontz, 1969).

## **Γαρυφαλλέλαιο και τα παράγωγά του**

Επειδή τα χημικά αναισθητικά που έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί παρουσιάζουν μειονεκτήματα με σημαντικότερο εξ αυτών την ύπαρξη παρενεργειών, το ενδιαφέρον έχει στραφεί προς φυσικά προϊόντα με ανάλογη δράση με σημαντικότερο εκπρόσωπο το γαρυφαλλέλαιο, το οποίο έχει πρόσφατα προταθεί ως εναλλακτική λύση αναισθητικού ιχθύων. Πρόκειται για ένα κίτρινο αιθέριο έλαιο που εκχυλίζεται από τα φύλλα, τα άνθη και το στέλεχος του γαρυφαλλου (*Eugenia* sp.), με δραστικά συστατικά την ευγενόλη (4-allyl-2-methoxyphenol) και την ισο-ευγενόλη (4-hydroxy-3-methoxy-1-propen-1-yl benzene). Οι ουσίες αυτές, καθώς και άλλες που περιέχονται στο γαρυφαλλέλαιο, ανήκουν στην ομάδα των τερπενίων. Το γαρυφαλλέλαιο έχει χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια στην οδοντιατρική ως τοπικό αναισθητικό, αλλά και ως πρόσθετο τροφίμων και χαρακτηρίζεται ως GRAS (Γενικά Αναγνωρισμένο Ως Ασφαλές) από το US FDA για χρήση σε ανθρώπους και ζώα. Το TM25 AQUI-S® αποτελεί ένα φαρμακευτικό παράγωγο που περιέχει το 50% των ενεργών συστατικών του αιθερίου ελαίου και έχει καταχωρηθεί για χρήση σε ιχθύς που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση στη Νέα Ζηλανδία και την Αυστραλία με ένα μηδενικό χρόνο αναμονής. Πιο συγκεκριμένα περιέχει ισοευγενόλη σε αναλογία 54% και polysorbate 80 (sorbitan mono-9-octadecanoate poly (oxy-1,2-ethnediyl) derivatives) που δρα ως

γαλακτωματοποιητής. Ωστόσο, δεν είναι εγκεκριμένο για χρήση σε ιχθύς στην βόρεια Αμερική. Και οι δύο ουσίες είναι ασφαλείς για τον χειριστή, αλλά όπως με όλα τα χημικά αναισθητικά, η επαφή με τα μάτια και τους βλεννογόνους θα πρέπει να αποφεύγεται. Το γαρυφαλλέλαιο παρουσιάζει ελαφρώς μικρότερο χρόνο επαγωγής και μεγαλύτερο χρόνο επαναφοράς από παρόμοιες συγκεντρώσεις TMS (Anderson et al., 1997; Keene et al., 1998). Το TM25 AQUI-S<sup>®</sup> μπορεί να διαλυθεί κατευθείαν σε γλυκό ή αλμυρό νερό, και έχει δειχθεί ότι είναι αποτελεσματικό σε συγκέντρωση 20 mg / L για την αναισθητοποίηση νεαρών ατόμων σολομού (AQUI-S<sup>®</sup> New Zealand Ltd., 2004). Και τα δύο αναισθητικά έχουν ένα ευρύ περιθώριο ασφάλειας μεταξύ της αποτελεσματικής και θανατηφόρας δόσης, ενώ οι ιχθύες δεν δείχνουν σημάδια δυσφορίας όταν έχουν αναισθητοποιηθεί. Επιπλέον με τον κανονισμό 363/2011 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής θεσμοθετήθηκε το ανώτερο όριο των καταλοίπων της ισοευγενόλης στους ιχθύες. Συγκεκριμένα, στο φιλέτο και το δέρμα των ιχθύων (σε φυσιολογική αναλογία) το ανώτερο επιτρεπτό όριο είναι τα 6000 mg/kg.

## **1.8. Μη χημική αναισθησία**

### 1. ηλεκτρική αναισθητοποίηση

Είναι μια κοινή μέθοδος για τη σύλληψη ανήλικων και ενήλικων ψαριών στον τομέα της διαχειριστικής αλιείας (Cowx & Lamarque, 1990; Reynolds, 1996). Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχουν μερικές μακροπρόθεσμες βλαβερές συνέπειες, όπως οξείες φυσιολογικές διαταραχές και ενδείξεις αυξημένης ευαισθησίας στην θήρευση, μετά την επαναφορά των αισθήσεων.

### 2. Υποθερμία

Η υποθερμία επιτυγχάνεται με πτώση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος των ιχθύων με πάγο ή κρύο νερό. Παρότι δεν αποτελεί μια κοινή μέθοδο αναισθησίας, εντούτοις μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά, όταν τα χημικά αναισθητικά δεν είναι διαθέσιμα ή επιθυμητά.

### 3. Διοξείδιο του άνθρακα

Το διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) είναι ένα άχρωμο, άοσμο, μη εύφλεκτο αέριο με μια διαλυτότητα στο νερό από 1,71 L / L νερού στους 0 °C και 760 mm Hg (Bell, 1987). Η χρήση του στον τομέα της αλιείας και της υδατοκαλλιέργειας βασίζεται στην αέρια φύση του, και στο γεγονός ότι δεν αφήνει κατάλοιπα στους ιστούς. Παραταύτα δεν συνίσταται για τη θανάτωση ιχθύων επειδή οι γρήγορες και βίαιες αντιδράσεις τους (επαναλαμβανόμενες

κινήσεις προσπαθώντας να δραπετεύσουν και η έντονη δραστηριότητα πριν από την αναισθητοποίηση) συμβάλλουν στην αύξηση του stress

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σύμφωνα με όσα παρατέθηκαν βάσει βιβλιογραφίας στην εισαγωγή, γίνεται αντιληπτό ότι η εκτροφή τσιπούρας έχει τεράστια σημασία για την ελληνική υδατοκαλλιέργεια. Συνεπώς, κάθε ερευνητική προσπάθεια που αποσκοπεί στη βελτίωση των συνθηκών εκτροφής και χειρισμών συμβάλλει τόσο στην ευζωία, όσο και στην ποιότητα, καθιστώντας την ελληνική τσιπούρα ανταγωνιστικό προϊόν στην παγκόσμια αγορά.

Σ' αυτήν την εργασία εξετάστηκε η χρήση της ισοευγενόλης στην αναισθητοποίηση και στην θανάτωση της τσιπούρας, χρησιμοποιώντας το εμπορικό προϊόν AQUI-S<sup>®</sup>, το οποίο περιέχει 54% ισοευγενόλη. Για το σκοπό της εργασίας το πειραματικό μέρος χωρίστηκε σε τρεις πειραματικές περιόδους.

Πιο συγκεκριμένα, κατά την Α πειραματική περίοδο ως στόχος τέθηκε η διερεύνηση της επίδρασης του σωματικού βάρους στο χρόνο επαγωγής στα στάδια 3b και 5 της αναισθησίας (Πιν. 1.7.1), καθώς επίσης και να προσδιοριστεί ο χρόνος επαγωγής μέχρι τα στάδια αυτά.

Ως στόχος της Β πειραματικής περιόδου τέθηκε η μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του AQUI-S<sup>®</sup> (30ppm, 50ppm, 70ppm) στις τιμές του αιματοκρίτη και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων σε σχέση με τον χρόνο επαγωγής τουλάχιστον έως το στάδιο 4 της αναισθησίας

Τέλος, κατά την Γ πειραματική περίοδο μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του AQUI-S<sup>®</sup> (0ppm, 30ppm και 50ppm) στις τιμές του αιματοκρίτη και της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε σχέση με τον χρόνο παραμονής στο παρόνερρο μέχρι τη θανάτωση και τη δειγματοληψία μετά από προκαθορισμένο χρόνο παραμονής στο AQUI-S<sup>®</sup> και αναισθητοποίηση έως το στάδιο 4.

### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1. Πειραματικές εγκαταστάσεις**

Οι πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα κυκλώματα Νο2, Νο3 και Νο5. Οι δεξαμενές που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούν τμήμα ημίκλειστου κυκλώματος θαλασσινού νερού με μηχανικό και βιολογικό φίλτρο για τον καθαρισμό του νερού εκτροφής και σύστημα αποστείρωσης του νερού μέσω ειδικών λαμπτήρων υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) για τη μείωση του μικροβιακού φορτίου.

Οι δεξαμενές που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα κυκλώματα κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τον όγκο τους σε μικρές και μεγάλες. Ο όγκος των δεξαμενών διέφερε ανάλογα με το κύκλωμα και συγκεκριμένα για το κύκλωμα δύο οι δεξαμενές ήταν χωρητικότητας 147 L, οι δεξαμενές του κυκλώματος τρία ήταν χωρητικότητας 215,5 L και τέλος η χωρητικότητα των δεξαμενών στο κύκλωμα πέντε ήταν 79 L. Η κάθε δεξαμενή διέθετε σωλήνα εισροής νερού με ρυθμιζόμενη παροχή, σωλήνα εκροής νερού και σύστημα παροχής ατμοσφαιρικού αέρα. Καθόλη την πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε ρύθμιση στην παροχή του νερού έτσι ώστε η κάθε δεξαμενή να έχει ανανέωση του νερού 1,5 φορά του συνολικού της όγκου ανά ώρα και ελέγχονταν τουλάχιστον 2 φορές κάθε εβδομάδα. Το σύστημα παροχής αέρα αποτελούνταν από ελαστικό σωλήνα μικρής διατομής όπου συνδέονταν με μια βυθιζόμενη αερόπετρα, έτσι ώστε ο αέρας να διασπάται σε μικροσκοπικές φυσαλίδες και να πραγματοποιείται ευχαιρέστερη διάχυση στο νερό. Σε όλα τα κυκλώματα ο φωτισμός των δεξαμενών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πολλαπλών λαμπτήρων φωτισμού στην οροφή των αιθουσών με σταθερή αλλαγή στον φωτισμό (12 ώρες φως- 12 ώρες σκοτάδι) καθόλη την πειραματική διαδικασία.

Η αλατότητα στις δεξαμενές των κυκλωμάτων παρέμεινε σχετικά σταθερή καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας (μέσος όρος  $30.14 \pm 1,51$  ‰).

#### **3.2. Καθημερινοί χειρισμοί**

Καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν καθημερινές πρωινές μετρήσεις αλατότητας, pH, συγκέντρωσης O<sub>2</sub> στο νερό, καθαρισμός μηχανικών φίλτρων και αντικαταστασή τους με στεγνά, έλεγχος για νεκρούς ιχθύες.

### 3.2.1 Χορήγηση τροφής

Η χορήγηση της τροφής (Style B, IRIDA S.A., σε μορφή συμπύκτων διαμέτρου A5) πραγματοποιήθηκε χειρονακτικά σε συγκεκριμένη ώρα με ένα γεύμα ανά ημέρα. Η ποσότητα της τροφής σε όλες τις δεξαμενές ήταν στα επίπεδα κορεσμού (2% του μέσου σωματικού βάρους). Με τον όρο χειρισμός ορίζονται η αναισθητοποίηση, ζύγιση, μεταφορά και αιμοληψία. Πριν από κάθε χειρισμό πραγματοποιείθηκε 48 ώρες ασιτία στους ιχθύες ώστε να κενωθεί ο πεπτικός σωλήνας, να μειωθεί ο μεταβολισμός και η ανάγκη για κατανάλωση οξυγόνου, και να μειωθεί η παραγωγή αποβλήτων. Εκτός από τη συνεισφορά της στην ευζωία, η μείωση αυτή του μεταβολισμού επιδρά και στην ποιότητα της σάρκας (Gines et al., 2002; Alvez et al., 2008).

### 3.2.2 Καταγραφή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού

Για τον προσδιορισμό του pH του νερού χρησιμοποιήθηκε πεχάμετρο (Oxyguard Handy pH). Για τον προσδιορισμό του δεσμευμένου οξυγόνου και της θερμοκρασίας χρησιμοποιήθηκε φορητό οξυγονόμετρο με ενσωματωμένο ψηφιακό θερμόμετρο (Oxyguard Handy Gamma) και για τον προσδιορισμό της αλατότητας χρησιμοποιήθηκε διαθλασιόμετρο. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων (ppm NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) και της ολικής αμμωνίας (ppm NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) δύο φορές κάθε εβδομάδα πραγματοποιήθηκε λήψη δειγμάτων νερού από κάθε δεξαμενή πριν από την χορήγηση της τροφής. Για την απομάκρυνση των αιωρούμενων σωματιδίων κάθε δείγμα διηθήθηκε σε φίλτρο διηθητικού χαρτιού, ομαδοποιήθηκε ανά δεξαμενή και ανά εβδομάδα και συντηρήθηκε σε πλαστική φιάλη στην κατάψυξη στους -20 °C για τον προσδιορισμό της NH<sub>3</sub>. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτόμετρο σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται από τους Greenberg et al., (1992b ,1992c) και ο υπολογισμός της τοξικής αμμωνίας έγινε με το μαθηματικό τύπο των Bower and Bidwell (1978)

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

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

$$pK_aS(T) = pK_aS(T=298^\circ K) + 0,0324(298 - T^\circ K)$$

$pK_aS(T=298^\circ K)$  = σταθερά που εξαρτάται από την αλατότητα, τη θερμοκρασία και το pH.

T = θερμοκρασία σε °K

### 3.2.3 Έλεγχοι- Καθαρισμοί

Οι καθημερινοί έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν τις πρωινές ώρες και περιελάμβαναν έλεγχο για τραυματισμένους και νεκρούς ιχθύς, έλεγχο της παροχής του νερού και ενδεχόμενων διαρροών που μπορεί να υπήρχαν στο κύκλωμα, και έλεγχο της σωστής λειτουργίας της ελαφρόπετρας. Μισή ώρα μετά την χορήγηση της τροφής στις δεξαμενές, τα υπολείμματα της τροφής απομακρύνθηκε με σιφωνισμό. Στη συνέχεια πραγματοποιούταν καθαρισμός των μηχανικών φίλτρων του συστήματος καθαρισμού και των ινωδών πλεγμάτων από υαλοβάμβακα που ήταν τοποθετημένα κάτω από την παροχή του νερού των δεξαμενών για να μειωθεί το οργανικό φορτίο και τα αιωρούμενα σωματίδια στο κύκλωμα. Κάθε εβδομάδα πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των εσωτερικών τοιχωμάτων των δεξαμενών για την απομάκρυνση των οργανικών καταλοίπων, με παράλληλη απόρριψη του 40% του όγκου του νερού από τις δεξαμενές του κυκλώματος που αναπληρώθηκε από εφεδρική δεξαμενή καθαρού νερού.

## 3.3 Αναισθητικό μπάνιο

### 3.3.1. Προετοιμασία του stock solution

Η παρασκευή ενός stock solution για το προϊόν AQUI-S<sup>®</sup> κρίνεται απαραίτητη λόγω του ότι είναι σχετικά δυσδιάλυτο στο νερό. Το stock solution παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρίας και περιείχε την απαιτούμενη ποσότητα της ουσίας διαλυμένης σε νερό, έτοιμο για την ανάμειξη με την δεξαμενή αναισθητοποίησης. Το βάρος του συμπυκνωμένου προϊόντος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του stock solution υπολογίστηκε με βάση τον όγκο της δεξαμενής στην οποία πραγματοποιήθηκε η αναισθητοποίηση. Για την παρασκευή του χρησιμοποιήθηκε προζυγισμένη γυάλινη φιάλη στην οποία προστέθηκε η ακριβής ποσότητα του αναισθητικού, σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρίας, και δεκαπλάσια ποσότητα απεσταγμένου νερού. Ακολούθησε έντονη ανάδευση έως ότου το μείγμα να αποκτήσει έντονη γαλακτώδη εμφάνιση.

### 3.3.2 Προετοιμασία της δεξαμενής αναισθητοποίησης

Για την προετοιμασία της δεξαμενής αναισθητοποίησης αρχικά εισήχθη νερό από το κύκλωμα των δεξαμενών εκτροφής, ώστε να μην υπάρχουν παράγοντες που να επηρεάσουν τους ιχθύς, εκτός του αναισθητικού. Στη συνέχεια προστέθηκε σύστημα παροχής αέρα για την ανάδευση και οξυγόνωση της δεξαμενής. Το αναισθητικό προστέθηκε στη δεξαμενή πάνω από την αερόπετρα για λόγους καλύτερης διάλυσης και διάχυσης.

### 3.4. Α Πειραματική περίοδος

Κατά την Α πειραματική περίοδο ως στόχος τέθηκε η διερεύνηση της επίδρασης του σωματικού βάρους στο χρόνο επαγωγής στα στάδια 3b και 5 της αναισθησίας, καθώς επίσης και να προσδιοριστεί ο χρόνος επαγωγής μέχρι το στάδια αυτά, σε σταθερή συγκέντρωση AQUI-S® 50ppm. Καθ' όλη τη διάρκεια των δοκιμών πραγματοποιήθηκε βιντεοσκόπηση της δεξαμενής αναισθητοποίησης, για τη καταγραφή των χρόνων παραμονής στο αναισθητικό και τη προσεχτική παρατήρηση της συμπεριφοράς των ιχθύων..Από τους ήδη υπάρχοντες ιχθύς του Εργαστηρίου Εφηρμοσμενης Υδροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, επιλέχτηκαν 121 ιχθύες, από τους οποίους δημιουργήθηκαν οι ιχθυοπληθυσμοί των δεξαμενών, με γνώμονα το μικρό εύρος βάρους της κάθε μιας δεξαμενής, με τις οποίες έγινε το πείραμα Α. Κατά το πείραμα Α έλαβαν χώρα 4 δοκιμές. Στον Πίνακα 3.4.1 παρουσιάζονται οι δοκιμές που έγιναν καθώς και ο αριθμός των ιχθύων που πήραν μέρος σε κάθε δοκιμή με το βάρος αυτών.

Πίνακας 3.4.1 Ορισμένα χαρακτηριστικά των τεσσάρων δοκιμών του πειράματος Α.

Δοκιμές	Αριθμός δεξαμενών	Αριθμός ατόμων	Μέσο σωματικό βάρος και τυπικό σφάλμα (gr)	Αριθμός νεκρών ατόμων	Ποσοστό θνησιμότητας
1	16	92	181,3 ± 12,1	0	0
2	7	49	156,0 ± 29,5	0	0
3	3	23	349,6 ± 43,3	3	13,04%
4	9	60	307,9 ± 35,7	0	0



Πριν από κάθε δοκιμή προηγήθηκε μια περίοδος εγκλιματισμού, κατά την οποία οι καθημερινοί χειρισμοί ήταν ίδιοι και οι ιχθυοπληθυσμοί δεν εκτέθηκαν σε κανένα αναισθητικό παράγοντα. Αναλυτικότερα:

➤ Δοκιμή 1

Κατά την περίοδο εγκλιματισμού που μεσολάβησε μέχρι την δοκιμή 1 το pH ήταν  $7,042 \pm 0,06$ , το δεσμευμένο οξυγόνο ήταν  $6,36 \pm 0,07$  ppm, η θερμοκρασία κυμάνθηκε  $23,5-25,6$  °C .

➤ Δοκιμή 2

Πριν από την δοκιμή 2 προηγήθηκε μια περίοδος εγκλιματισμού 19 ημερών (8-6/27-6), η οποία έλαβε χώρα στο κύκλωμα 2 του εργαστηρίου. Κατά την περίοδο εγκλιματισμού που μεσολάβησε μέχρι την δοκιμή 2 το pH ήταν  $6,813 \pm 0,05$ , το δεσμευμένο οξυγόνο ήταν  $6,08 \pm 0,05$  ppm, η θερμοκρασία κυμάνθηκε  $26,6-27,8$  °C, η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων  $0,234 \pm 0,0$  ppm και της τοξικής αμμωνίας  $0,021 \pm 0,002$  ppm.

➤ Δοκιμή 3

Πριν από την δοκιμή 3 προηγήθηκε μια περίοδος εγκλιματισμού 13 ημερών (28/6-10/7), η οποία έλαβε χώρα στα κυκλώματα 2 και 5 του εργαστηρίου. Κατά την περίοδο εγκλιματισμού που μεσολάβησε μέχρι την δοκιμή 3 το pH ήταν  $6,47 \pm 0,03$ , το δεσμευμένο οξυγόνο ήταν  $5,68 \pm 0,04$  ppm, η θερμοκρασία κυμάνθηκε  $27,8-28,8$  °C , η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων  $0,120 \pm 0,007$  ppm και της τοξικής αμμωνίας  $0,019 \pm 0,004$  ppm.

➤ Δοκιμή 4

Πριν από την δοκιμή 4 προηγήθηκε μια περίοδος εγκλιματισμού 7 ημερών (10/7-17/7), η οποία έλαβε χώρα στο κύκλωμα 3 του εργαστηρίου. Κατά την περίοδο εγκλιματισμού που μεσολάβησε μέχρι την δοκιμή 2 το pH ήταν  $6,813 \pm 0,05$ , το δεσμευμένο οξυγόνο ήταν  $5,97 \pm 0,03$  ppm, η θερμοκρασία κυμάνθηκε  $25,4-28$  °C , η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων  $0,364 \pm 0,023$  ppm και της τοξικής αμμωνίας  $0,043 \pm 0,002$  ppm.

Κατά τη διάρκεια της κάθε δοκιμής πραγματοποιήθηκε συλλογή 6 ιχθύων από κάθε δεξαμενή και εισήχθησαν ταυτόχρονα στη δεξαμενή αναισθησίας και πραγματοποιήθηκε καταγραφή του χρόνου όπου:

- a) Το 50% των ιχθύων έφτανε στο στάδιο αναισθησίας 3b
- b) Το 100% των ιχθύων έφτανε στο στάδιο αναισθησίας 3b
- c) Ο κάθε ιχθύς ξεχωριστά έφτανε στο στάδιο αναισθησίας 5

Στη συνέχεια ο κάθε ιχθύς ζυγιζόταν και τοποθετούταν στη δεξαμενή επαναφοράς και καταγράφονταν ο χρόνος επαναφοράς. Σαν χρόνος επαναφοράς ορίστηκε ως ο χρόνος που χρειάστηκε ο ιχθύς για να επανακτήσει πλήρη κολυμβητική ικανότητα από τη στιγμή της εισαγωγής του στο καθαρό νερό.

Πριν και μετά από την εισαγωγή κάθε εξάδας ιχθύων πραγματοποιούταν καταγραφή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού της δεξαμενής αναισθητοποίησης. Για τη διασφάλιση της σταθερής συγκέντρωσης του AQUI-S® πραγματοποιούταν ανανέωση του αναισθητικού κάθε 3η επανάληψη.

### 3.5. B Πειραματική περίοδος

Για το σκοπό του πειράματος B σχηματίστηκαν 9 ομοιογενείς πληθυσμοί των 5 ιχθύων, οι οποίοι εγκλιματίστηκαν για 20 ημέρες. Το μέσο αρχικό σωματικό βάρος των ιχθύων δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των πλυθησμών. Κατά την περίοδο εγκλιματισμού που μεσολάβησε μέχρι το πείραμα B το pH ήταν  $7,68 \pm 0,01$ , το δεσμευμένο οξυγόνο ήταν  $6,05 \pm 0,02$  ppm, η θερμοκρασία κυμάνθηκε  $25,8-28,8$  °C, η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων  $0,516 \pm 0,015$  ppm και της τοξικής αμμωνίας  $0,047 \pm 0,002$  ppm. Στον Πίνακα 3.5.1 παρουσιάζονται οι ομάδες, όπως αυτές περιγράφονται παρακάτω, που έλαβαν μέρος στην παρούσα πειραματική περίοδο, καθώς και ο αριθμός των ιχθύων και το μέσο σωματικό βάρος αυτών.

Πίνακας 3.5.1 Ορισμένα χαρακτηριστικά των τριών Ομάδων κατά την B πειραματική περίοδο

Ομάδες	Δόση AQUI-S®	Αριθμός ατόμων	Μέσο σωματικό βάρος και τυπικό σφάλμα (gr)	Αριθμός νεκρών ατόμων	Ποσοστό θνησιμότητας
<b>a</b>	30	15	$179.7 \pm 33.3$	0	0
<b>b</b>	50	14	$164.9 \pm 52.4$	0	0
<b>c</b>	70	14	$177.1 \pm 44.7$	0	0

Για τη διεξαγωγή του B πειράματος η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Οι δεξαμενές με τους ιχθύς χωρίστηκαν σε 3 ομάδες:

- a) Σε 3 δεξαμενές πραγματοποιήθηκε αναισθησία με 30 ppm AQUI-S<sup>®</sup>, μέχρι τουλάχιστον το στάδιο 4 και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αιμοληψία.
- b) Σε 3 δεξαμενές πραγματοποιήθηκε αναισθησία με 50 ppm AQUI-S<sup>®</sup>, μέχρι τουλάχιστον το στάδιο 4 και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αιμοληψία.
- c) Σε 3 δεξαμενές πραγματοποιήθηκε αναισθησία με 70 ppm AQUI-S<sup>®</sup>, μέχρι τουλάχιστον το στάδιο 4 και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αιμοληψία από την περιοχή της ουριαίας φλέβας .

Για την κάθε ομάδα ακολούθηθηκε η διαδικασία όπου πέντε άτομα από κάθε δεξαμενή μεταφέρθηκαν στη δεξαμενή αναισθητοποίησης έως το στάδιο 4 της αναισθησίας. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ζύγιση των ιχθύων και αιμοληψία τους. Τέλος οι ιχθύες μεταφέρονταν στη δεξαμενή επαναφοράς για την πλήρη επαναφορά των αισθήσεων τους.

Μετά το πέρας της αιμοληψίας οι ιχθύες μεταφέρθηκαν σε δεξαμενή επαναφοράς.

Πραγματοποιήθηκε βιντεοσκόπηση της δεξαμενής αναισθητοποίησης.

Για την πραγματοποίηση της αιμοληψίας στην τρέχουσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν σύριγγες του 1ml και πλαστικοί σωλήνες με πώμα όγκου 1,5 ml (Eppendorf safe-lock). Για την αποφυγή της πήξης του αίματος τα εσωτερικά τους τοιχώματα είχαν καλυφτεί με άλας ηπαρίνης (Heparin Lithium salt, Fluka), ποσότητας 60 IU. Η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε από την περιοχή της ουριαίας φλέβας (caudal vein). Στη συνέχεια το αίμα μεταγγίστηκε σε eppendorf. Μια μικρή ποσότητα από αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αιματοκρίτη, και το υπόλοιπο φυγοκεντρήθηκε στις 10000 rpm για 10 λεπτά (Hettich Microliter centrifuge) με στόχο να διαχωριστεί το πλάσμα και να τοποθετηθεί σε eppendorf το οποίο συντηρήθηκε στους -20 °C.

### **3.6. Γ Πειραματική περίοδος**

Για το σκοπό του πειράματος Γ σχηματίστηκαν 9 ομοιογενείς πληθυσμοί των 4 ιχθύων, οι οποίοι εγκλιματίστηκαν για 7 ημέρες. Κατά την περίοδο εγκλιματισμού που μεσολάβησε μέχρι το πείραμα Γ το pH ήταν  $7,16 \pm 0,02$ , το δεσμευμένο οξυγόνο ήταν  $6,21 \pm 0,03$  ppm, η θερμοκρασία κυμάνθηκε  $25-27,4$  °C , η συγκέντρωση των νιτροδών ιόντων ήταν  $0,136 \pm 0,016$  ppm και της τοξικής αμμωνίας  $0,022 \pm 0,005$  ppm. Στον Πίνακα 3.6.1 παρουσιάζονται οι ομάδες, όπως αυτές περιγράφονται παρακάτω, που έλαβαν μέρος στην παρούσα πειραματική περίοδο, καθώς και ο αριθμός των ιχθύων και το μέσοσωματικό βάρος αυτών.

Πίνακας 3.6.1 Ορισμένα χαρακτηριστικά των τριών ομάδων κατά την Γπειραματική περίοδο

Ομάδες	Δόση AQUI-S®	Αριθμός ατόμων	Μέσο σωματικό βάρος και τυπικό σφάλμα (gr)
<b>d</b>	0	12	310.9 ± 52.2
<b>e</b>	30	12	319.8 ± 55.9
<b>f</b>	50	12	327.1 ± 71.8

Για την διεξαγωγή του τελικού πειράματος η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Οι δεξαμενές με τους ιχθύς χωρίστηκαν σε 3 ομάδες:

- d) 3 δεξαμενές χρησιμοποιήθηκαν για την θανάτωση των ιχθύων σε παγόνερο (2 °C) όπου δεν προηγήθηκε αναισθητοποίησή τους.
- e) Σε 3 δεξαμενές πραγματοποιήθηκε αναισθησία με 30 ppm AQUI-S®, για προκαθορισμένο χρόνο, και στη συνέχεια εισαγωγή των ιχθύων σε παγόνερο.
- f) Σε 3 δεξαμενές πραγματοποιήθηκε αναισθησία με 50 ppm AQUI-S®, για προκαθορισμένο χρόνο, και στη συνέχεια εισαγωγή των ιχθύων σε παγόνερο.

Ανάλογα με την ποσότητα του αναισθητικού διέφερε και ο χρόνος παραμονής των ιχθύων στο αναισθητικό. Για τα 30 ppm ο χρόνος παραμονής ήταν 12 λεπτά και για τα 50 ppm ήταν 5 λεπτά.

Πραγματοποιήθηκε βιντεοσκόπηση της δεξαμενής αναισθητοποίησης καθώς και της δεξαμενής που περιείχε το παγόνερο.

Η κάθε δεξαμενή αποτελούσε μια επανάληψη και αποτελούντο από πληθυσμό 5 ιχθύων. Κάθε πεντάδα, πλην των δεξαμενών μαρτύρων, εισήχθη στη δεξαμενή αναισθητοποίησης για τον χρόνο που προαναφέρθηκε και στη συνέχεια μεταφέρθηκε στη δεξαμενή με το παγόνερο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εξαγωγή ένας προς ένας οι ιχθύες, ζυγίσθηκαν και πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και λήψη εγκεφάλου. Ακολούθησε αφαίρεση των λεπιών και λήψη δεξιού και αριστερού φιλέτου συμπεριλαμβανομένου και τού δέρματος πάνω από την πλευρική γραμμή και τεμαχισμός αυτών σε 3 οριζόντια τμήματα (ανώτερο-μέσο-κατώτερο) ανάλογα με τη θέση τους ως προς το ραχιαίο τμήμα τού σώματος.

### **3.7 Δείκτες stress**

#### **3.7.1 Προσδιορισμός του αιματοκρίτη**

Μικρή ποσότητα αίματος, από τα δείγματα που λήφθηκαν κατά τα πειράματα Β και Γ, εισήχθη σε σωλήνα ειδικό για τον προσδιορισμό του αιματοκρίτη (Micro Haematocrit tubes, VITREX Medical A/S) και ακολούθησε φυγοκέντριση στις 12000 rpm για 4 λεπτά σε φυγόκεντρο (Micro haematocrit Centrifuge, Hawsley & Sons Ltd).

#### **3.7.2 Προσδιορισμός της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος**

Στο πλάσμα του αίματος προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της γλυκόζης με τη βοήθεια τυποποιημένης συσκευασίας αντιδραστηρίων μέσω τυποποιημένης φωτομετρικής ενζυμικής μεθόδου (Elitech Glucose PAP SL) με χρήση φασματοφωτόμετρου (Helias a, Thermo Electron Cooperodion).

#### **3.7.3 Στατιστική επεξεργασία**

Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με την χρήση του στατιστικού προγράμματος STATGRAPHICS Version 16.1.11.

Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της Α πειραματικής διαδικασίας εφαρμόστηκε απλή ανάλυση παλινδρόμησης, μεταξύ του σωματικού βάρους (body weight) και του χρόνου επαγωγής (induction time), για κάθε στάδιο αναισθησίας.

Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της Β πειραματικής διαδικασίας αρχικά εξετάστηκε η παραλλακτικότητα του σωματικού βάρους μεταξύ των πληθυσμών. Μέσω ανάλυσης διακύμανσης (One-way ANOVA) διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές του μέσου σωματικού βάρους μεταξύ των πληθυσμών. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (multifactor ANOVA) για τη διερεύνηση της πιθανής επίδρασης των διαφορετικών συγκεντρώσεων AQUI-S® με συμμεταβλητές τον χρόνο έκθεσης στο αναισθητικό και το σωματικό βάρος στα επίπεδα του αιματοκρίτη. Επειδή η επίδραση και των δύο συμμεταβλητών δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $P > 0,05$ ), η σύγκριση των μέσων όρων των τιμών του αιματοκρίτη έγινε με one-

way ANOVA εφαρμόζοντας έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων με την μέθοδο ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD). Επιπλέον, εξετάστηκε μέσω ανάλυσης απλής παλινδρόμησης (Simple regression) η επίδραση του χρόνου έκθεσης στην συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων σε κάθε συγκέντρωση του αναισθητικού. Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση των γραμμών συσχέτισης μεταξύ των συγκεντρώσεων (Comparison of regression lines). Εφαρμόστηκε πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (multifactor ANOVA) για τη διερεύνηση της πιθανής επίδρασης των διαφορετικών συγκεντρώσεων AQUI-S® με συμμεταβλητές τον χρόνο παραμονής στο αναισθητικό και το σωματικό βάρος στα επίπεδα της γλυκόζης. Από τις δύο συμμεταβλητές, μόνο το σωματικό βάρος δεν επιρρέασε σημαντικά τα επίπεδα της γλυκόζης ( $P>0,05$ ). Πραγματοποιήθηκε έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης με συμμεταβλητή τον χρόνο παραμονής στο αναισθητικό και έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων με την μέθοδο ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD) για την διερεύνηση ύπαρξης στατιστικά σημαντικών διαφορών στα επίπεδα γλυκόζης μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων AQUI-S®.

Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της Γ πειραματικής διαδικασίας αρχικά εξετάστηκε η παραλλακτικότητα του σωματικού βάρους μεταξύ των πλξθυσμών. Μέσω ανάλυσης διακύμανσης (One-way ANOVA) διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές του μέσου σωματικού βάρους μεταξύ των πληθυσμών. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (multifactor ANOVA) για τη διερεύνηση της πιθανής επίδρασης των διαφορετικών συγκεντρώσεων AQUI-S® με συμμεταβλητές τον χρόνο παραμονής στο παγόνερο και το σωματικό βάρος στα επίπεδα του αιματοκρίτη. Επειδή η επίδραση και των δύο συμμεταβλητών δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $P>0,05$ ), η σύγκριση των μέσων όρων των τιμών του αιματοκρίτη έγινε με one-way ANOVA εφαρμόζοντας έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων με την μέθοδο ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD). Επιπλέον, εξετάστηκε μέσω ανάλυσης απλής παλινδρόμησης (Simple regression) η επίδραση του χρόνου παραμονής στο παγόνερο στην συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων σε κάθε συγκέντρωση του αναισθητικού. Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση των γραμμών συσχέτισης μεταξύ των συγκεντρώσεων (Comparison of regression lines). Εφαρμόστηκε πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (multifactor ANOVA) για τη διερεύνηση της πιθανής επίδρασης των διαφορετικών συγκεντρώσεων AQUI-S® με συμμεταβλητές τον χρόνο παραμονής στο παγόνερο και το σωματικό βάρος στα επίπεδα της γλυκόζης. Από τις δύο συμμεταβλητές, μόνο το σωματικό βάρος δεν επιρρέασε σημαντικά τα επίπεδα της γλυκόζης ( $P>0,05$ ). Πραγματοποιήθηκε έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης με συμμεταβλητή τον χρόνο παραμονής στο παγόνερο και έλεγχος

πολλαπλών συγκρίσεων με την μέθοδο ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD) για την διερεύνηση ύπαρξης στατιστικά σημαντικών διαφορών στα επίπεδα γλυκόζης μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων AQUI-S®.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Πείραμα Α. Η Επίδραση του σωματικού βάρους στο χρόνο επαγωγής κατά την έκθεση σε συγκεκριμένη συγκέντρωση AQUI-S®

Κατά το Πείραμα Α διενεργήθηκαν 4 δοκιμές σε σταθερή συγκέντρωση AQUI-S® 50ppm και καταγράφηκε ο χρόνος επαγωγής στο στάδιο **αναισθησίας** 5 για κάθε ιχθύ.

Στόχος του πειράματος ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του σωματικού βάρους στο χρόνο επαγωγής. Όπως προκύπτει από την απλή ανάλυση παλινδρόμησης, υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του σωματικού βάρους (body weight) και του χρόνου επαγωγής (induction time) η οποία ακολουθεί το γραμμικό μοντέλο (Γράφημα 4.1.1) Η συσχέτιση περιγράφεται από την εξίσωση, όπως περιγράφεται από τη στατιστική επεξεργασία:

Χρόνος επαγωγής (sec) = 214.136 + 0.953469 \* Σωματικό βάρος εξίσωση 4.1.1

n=203,

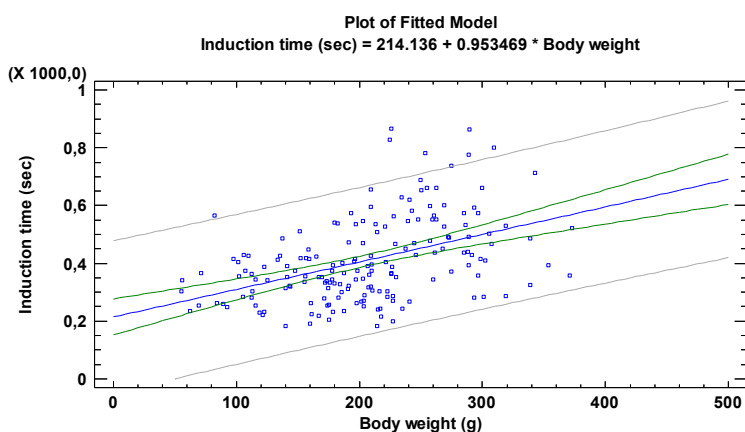
επίπεδο σημαντικότητας 95,0% (P value<0.0001),

Intercept P value<0.0001 ,

Slope P value<0.0001,

Correlation Coefficient = 0,442346

R-squared = 19,567.



Γράφημα 4.1.1 Ο χρόνος επαγωγής στο στάδιο 5 αναισθησίας συναρτήσει του σωματικού βάρους των ιχθύων.



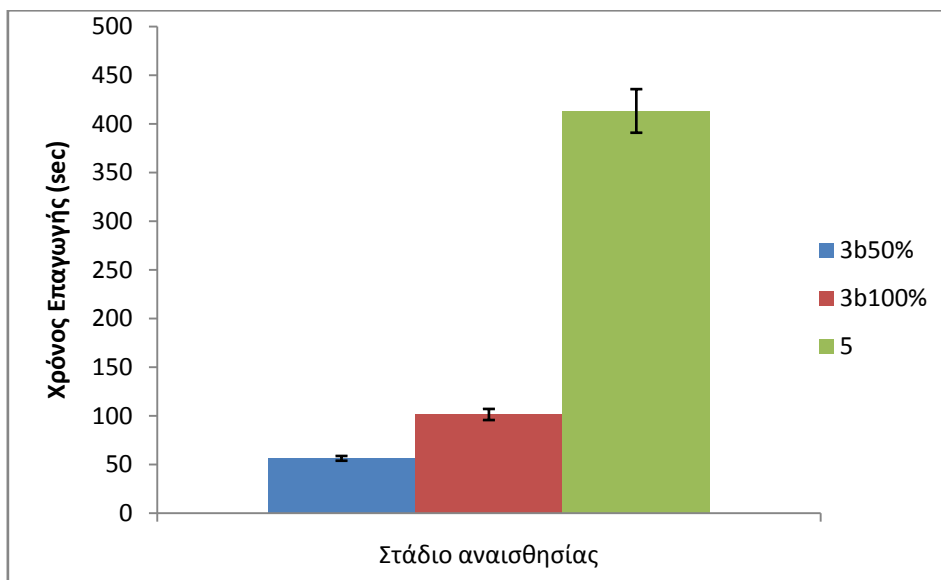
Στην παραπάνω συσχέτιση ελήφθησαν υπόψη τα αποτελέσματα και από τις τέσσερις δοκιμές. Προηγήθηκε ανάλυσηπαλινδρόμησης για κάθε δοκιμή ξεχωριστά. Η σύγκριση των τεσσάρων γραμμών συσχέτισης, (Comparison of regression lines) έδειξε ότι δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά (Intercept  $P > 0.05$ , Slope  $P > 0.05$ ).

Στον Πίνακα (4.1.2) δίνεται ο αναμενόμενος χρόνος επαγωγής στο στάδιο αναισθησίας 5 για τα αντίστοιχα βάρη των ιχθύων σε g (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450) όπως αυτός προκύπτει από την εξίσωση 4.1 του ανωτέρου μοντέλου.

**Πίνακας 4.1.2 Ο αναμενόμενος χρόνος επαγωγής στο στάδιο 5 αναισθησίας (υπολογισμένος βάσει της εξίσωσης 4,1 για ιχθύες με διαφορετικό σωματικό βάρος**

Σωματικό βάρος (g)	Αναμενόμενος χρόνος επαγωγής (sec)	Αναμενόμενος χρόνος επαγωγής (min)
50,0	261,81	4
100,0	309,483	5
150,0	357,157	6
200,0	404,83	7
250,0	452,504	7
300,0	500,177	8
350,0	547,851	9
400,0	595,524	10
450,0	643,197	11

Ως χρόνος επαγωγής για το στάδιο αναισθησίας 3b στην συγκεκριμένη συγκέντρωση AQUIS®, καταγράφηκε το χρονικό διάστημα που έφθασαν στο επιθυμητό στάδιο αναισθησίας α) τα μισά άτομα του πληθυσμού κάθε δεξαμενής (3b(50%)) και β) το σύνολο του πληθυσμού (3b(100%)), όπως δίνεται στο Γράφημα 4.1.2. Στο ίδιο γράφημα παρουσιάζεται ο μέσος χρόνος που χρειάστηκαν για να φθάσουν στο στάδιο της αναισθησίας 5.



**Γράφημα 4.1.2 Ο χρόνος επαγωγής σε διαφορετικά στάδια αναισθησίας**

Στον Πίνακα 4.1.3 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι του σωματικού βάρους των ιχθύων κάθε δεξαμενής και του χρόνου επαγωγής στο στάδιο 5 της αναισθησίας, καθώς και του χρόνου επαγωγής στα στάδια αναισθησίας 3b(50%), 3b(100%) και 5.

**Πίνακας 4.1.3 Ο μέσος όρος του σωματικού βάρους των ιχθύων των δεξαμενών που χρησιμοποιήθηκαν και ο χρόνος επαγωγής στα αντίστοιχα στάδια αναισθησίας**

Δεξαμενή	Μέσος όρος σωματικού βάρους (g)	Χρόνος επαγωγής μέχρι το στάδιο 3b (50%) (sec)	Χρόνος επαγωγής μέχρι το στάδιο 3b (100%) (sec)	Μέσος όρος του χρόνου επαγωγής μέχρι το στάδιο 5 (sec)
1	86,2		116	303
2	101,5	33	57	315
3	137,4	47	150	346
4	126,7		144	
5	167,2	77	83	331
6	183,1	56	90	255
7	175,7	46	97	307
8	200,2	58	79	408
90	198,7	46	102	417
10	215,3	37	74	269
11	212,6	46	57	266
12	222,9	63	78	327
13	226,1	62	99	289
14	233,4	71	147	632
15	252,7	64	118	554
16	92,3			331
17	124,3	75	88	374
18	135,1	83	93	386
19	181,8	51	117	297

20	181,9		64	357
21	169,4	64	170	467
22	207,3	46		521
23	395,5	70	96	
24	301,1	53	79	421
25	352,2	73	95	481
26	367	44	168	
27	429,2	49	94	
28	249,7	51	77	645
29	255,8	57	118	553
30	338,7		87	
31	304,2		76	589
32	273,1	37	74	439
33	272,9	64	156	643
34	280,4	54		462

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση του μέσου σωματικού βάρους ανά δεξαμενή στον χρόνο επαγωγής στο στάδιο 3b χρησιμοποιώντας ανάλυση απλής παλινδρόμησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων : α) για τον μισό πληθυσμό 3b(50%) και β) για τον συνολικό πληθυσμό 3b(100%) δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του μέσου σωματικού βάρους και του χρόνου επαγωγής στο στάδιο αναισθησίας 3b. Αναλυτικά:

- 3b (50%)

Η εξίσωση του μοντέλου έχει ως εξής:

$$\text{Χρόνος επαγωγής 3b(50)} = 56,6388 - 0,0013627 * \text{μέσο όρο του σωματικού βάρους}$$

εξίσωση 4.1.2

n=28,

confidence level < 95,0% (P value>0.05),

Intercept P value<0.001 ,

Slope P value>0.05,

Correlation Coefficient =- 0,00853211

R-squared = 0,0072969.

- 3b (100%)

Η εξίσωση του μοντέλου έχει ως εξής :

$$\text{Χρόνος επαγωγής 3b (100)} = 101,074 + 0,00137422 * \text{μέσο όρο του σωματικού βάρους}$$

εξίσωση 4.1.3

n=31,

επίπεδο σημαντικότητας 95,0% (P value>0.05),

Intercept P value<0.001 ,

Slope P value>0.05,

Correlation Coefficient = 0,00375559

R-squared = 0,00141045.

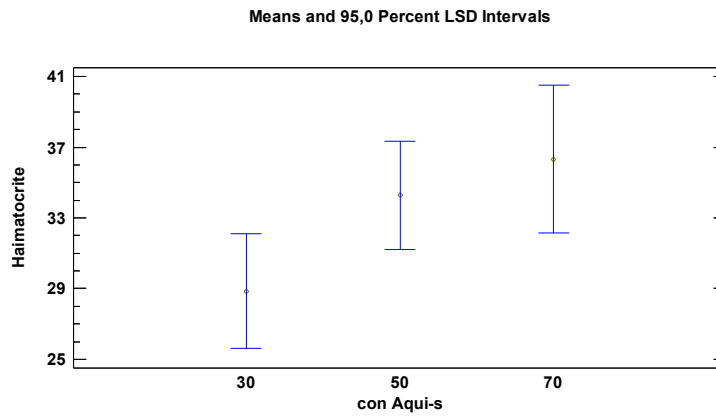
Μετά την ολοκλήρωση των δοκιμών έως το στάδιο αναισθησίας 5, ακολούθησε η διαδικασία επαναφοράς (Recovery). Οι χρόνοι επαναφοράς δεν καταγράφηκαν καθώς ήταν ιδιαίτερος σύντομοι (<2min) .

#### **4.2 Πείραμα Β. Επίδραση της συγκέντρωσης του AQUI-S<sup>®</sup> (30ppm, 50ppm, 70ppm) στις τιμές του αιματοκρίτη και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων σε σχέση με τον χρόνο επαγωγής τουλάχιστον έως το στάδιο 4 της αναισθησίας.**

Κατά το πείραμα Β μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του AQUI-S<sup>®</sup> (30ppm, 50ppm, 70ppm) στις τιμές του αιματοκρίτη και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων σε σχέση με τον χρόνο επαγωγής τουλάχιστον έως το στάδιο 4 της αναισθησίας.

Αρχικά εξετάστηκε η παραλλακτικότητα του σωματικού βάρους μεταξύ των δεξαμενών. Κατά τη σύγκριση (One way-Anpnona) των μέσων όρων του σωματικού βάρους μεταξύ όλων των δεξαμενών δεν καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση της συγκέντρωσης του AQUI-S<sup>®</sup> με συμμεταβλητή τον χρόνο έκθεσης στο AQUI-S<sup>®</sup> και το σωματικό βάρος στην τιμή του αιματοκρίτη μέσω διπαραγοντικής ανάλυσης διακύμανσης (Multifactor ANOVA). Όπως προέκυψε από την ανάλυση αυτή ούτε το σωματικό βάρος ούτε ο χρόνος έκθεσης στο αναισθητικό δεν παρουσιάζε στατιστικά σημαντική (P value > 0,05) επίδραση στην τιμή του αιματοκρίτη. Ακολουθεί το Γράφημα 4.2.1 των μέσων όρων των τιμών του αιματοκρίτη ανά συγκέντρωση AQUI-S<sup>®</sup> και ανεξαρτήτως χρόνου έκθεσης και σωματικού βάρους. Όπως φαίνεται και στο Γράφημα οι τιμές του αιματοκρίτη δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των τριών συγκεντρώσεων AQUI-S<sup>®</sup> (30ppm, 50ppm, 70ppm)



**Γράφημα 4.2.1** Μέσοι όροι των τιμών του αιματοκρίτη σε τρεις συγκεντρώσεις του AQUI-S® ± 95% LSD όρια εμπιστοσύνης.

Επιπλέον κατά το πείραμα αυτό εξετάστηκε μέσω ανάλυσης απλής παλινδρόμησης η επίδραση του χρόνου έκθεσης στο αναισθητικό στην συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων για διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S® (30ppm, 50ppm, 70ppm).  
Αναλυτικά:

- 30ppm

Η εξίσωση του μοντέλου έχει ως εξής:

$$\text{Γλυκόζη(g/l)} = 0,550693 + 0,000817326 * \text{Χρόνος επαγωγής (sec)}$$

εξίσωση 4.2.1

n=14,

confidence level 99,0 % (P value<0.01),

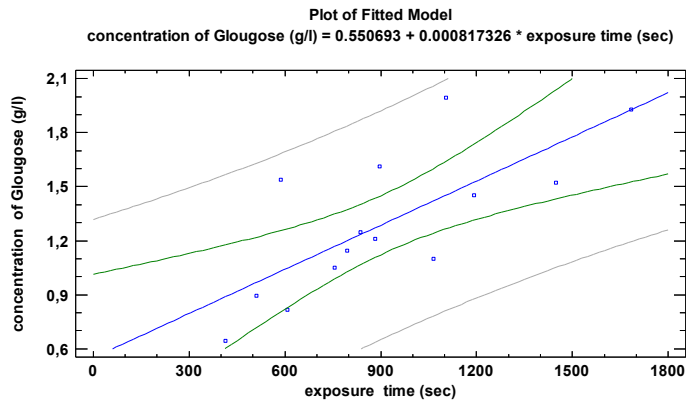
Intercept P value<0.05 ,

Slope P value<0.01,

Correlation Coefficient = 0,735114

R-squared = 54,0392.

Παρατηρείται θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ του χρόνου έκθεσης στο AQUI-S® ( 30ppm) και της συγκέντρωσης της γλυκόζης (Γράφημα 4.2.2.).



Γράφημα 4.2.2 Η σχέση μεταξύ του χρόνου παραμονής στο αναισθητικό σε συγκέντρωση 30ppm AQUI-S® και της συγκέντρωσης της γλυκόζης.

- 50ppm

Η εξίσωση του μοντέλου έχει ως εξής:

$$\text{Γλυκόζη(g/l)} = 0,507425 + 0,00112741 * \text{Χρόνος επαγωγής (sec)}$$

εξίσωση 4.2.2

n=11,

confidence level 99,0% (P value<0.01),

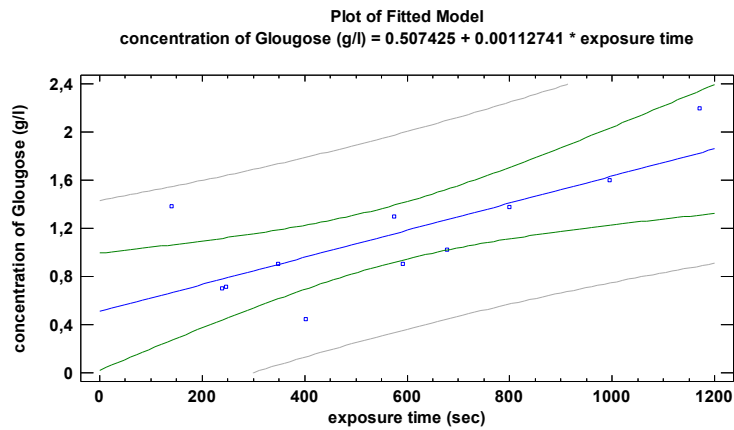
Intercept P value<0.05 ,

Slope P value<0.01,

Correlation Coefficient = 0,747345

R-squared = 55,8525.

Παρατηρείται θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ του χρόνου έκθεσης στο AQUI-S® (50ppm) και της συγκέντρωσης της γλυκόζης (Γράφημα 4.2.3).



Γράφημα 4.2.3 Η σχέση μεταξύ του χρόνου παραμονής στο αναισθητικό σε συγκέντρωση 50ppm AQUI-S<sup>®</sup> και της συγκέντρωσης της γλυκόζης.

- 70ppm

Η εξίσωση του μοντέλου έχει ως εξής:

$$\text{Γλυκόζη(g/l)} = 0,285872 + 0,00200884 * \text{Χρόνος επαγωγής (sec)}$$

εξίσωση 4.2.3

n=203,

confidence level 95,0% (P value<0.05),

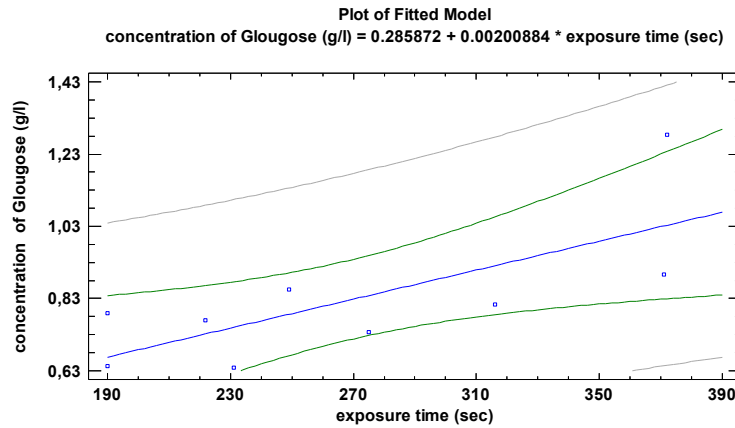
Intercept P value>0.05 ,

Slope P value<0.05,

Correlation Coefficient = 0,734802

R-squared = 53,9934

παρατηρείται θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ του χρόνου έκθεσης στο AQUI-S<sup>®</sup> ( 70ppm) και της συγκέντρωσης της γλυκόζης (Γράφημα 4.2.4).



**Γράφημα 4.2.4** Η σχέση μεταξύ του χρόνου παραμονής στο αναισθητικό σε συγκέντρωση 70ppm AQUI-S<sup>®</sup> και της συγκέντρωσης της γλυκόζης.

Στη συνέχεια για τη διερεύνηση ύπαρξης στατιστικά σημαντικών διαφορών στα επίπεδα γλυκόζης μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων AQUI-S<sup>®</sup> πραγματοποιήθηκε έλεγχος ανάλυσης διακύμανσης και έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων με την μέθοδο ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD) συμπεριλαμβάνοντας ως συμμεταβλητή τον χρόνο έκθεσης στο αναισθητικό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του έλεγχου πολλαπλών συγκρίσεων (Πίνακας 4.2.1) δεν ανιχνεύτηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων AQUI-S<sup>®</sup>. Οι μέσοι όροι της συγκέντρωσης γλυκόζης για κάθε συγκέντρωση AQUI-S<sup>®</sup> σταθμισμένοι (Least squares means) ως προς τον χρόνο έκθεσης παρουσιάζονται στον Πίνακας 4.2.1.

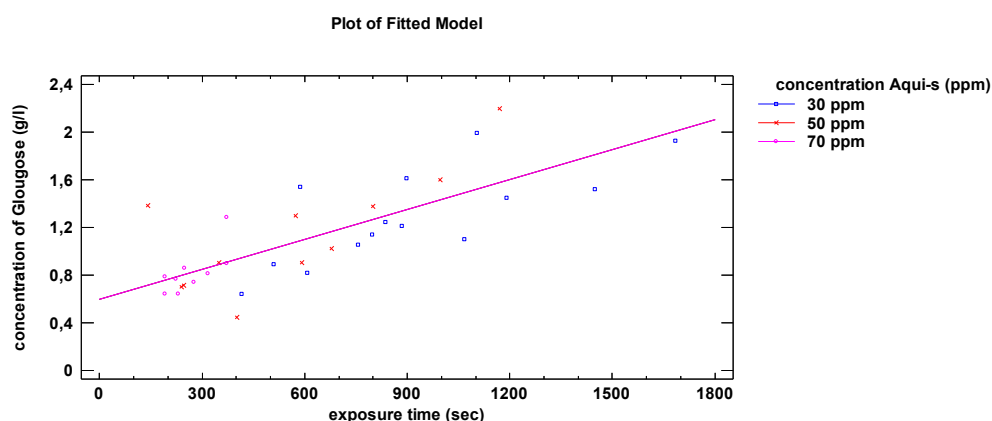
**Πίνακας 4.2.1** Μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων (Least squares means) της συγκέντρωσης της γλυκόζης (g/l) με 95,0% όρια εμπιστοσύνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S<sup>®</sup> (ppm).

Συγκέντρωση AQUI-S <sup>®</sup>	n	LS Μέσος	Τυπικό σφάλμα	Κατώτερο όριο (95%)	Ανώτερο όριο (95%)
30	14	1,0258	0,087331	0,84745	1,20416
50	11	1,20489	0,0838715	1,0336	1,37618
70	9	1,16904	0,10948	0,945453	1,39263

**Γράφημα 4.2.5** Μέσες τιμές συγκέντρωσης της γλυκόζης σε τρεις συγκεντρώσεις AQUI-S<sup>®</sup>.



Τέλος ακολούθησε σύγκριση των ευθειών συσχέτισης (Comparison of regression lines) που προκύπτουν μεταξύ του χρόνου έκθεσης και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος για διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S® (30ppm, 50ppm, 70ppm). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της σύγκρισης αυτής δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ευθειών συσχέτισης στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AQUI-S® διότι οι κλίσεις και τα σημεία τομής των ευθειών δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 95%. Στο Γράφημα 4.2.6 παρουσιάζεται η συσχέτιση του χρόνου έκθεσης με τη συγκέντρωση της γλυκόζης για το σύνολο των συγκεντρώσεων AQUI-S®.



**Γράφημα 4.2.6 Η συσχέτιση μεταξύ του χρόνου έκθεσης και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων για το σύνολο των συγκεντρώσεων AQUI-S®**

Η εξίσωση του μοντέλου έχει ως εξής:

$$\text{Γλυκόζη(g/l)} = 0,594455 + 0,000838356 * \text{Χρόνος έκθεσης (sec)}$$

εξίσωση 4.2.4

n=11,

confidence level 99,9% (P value<0.001),

Intercept P value<0.05 ,

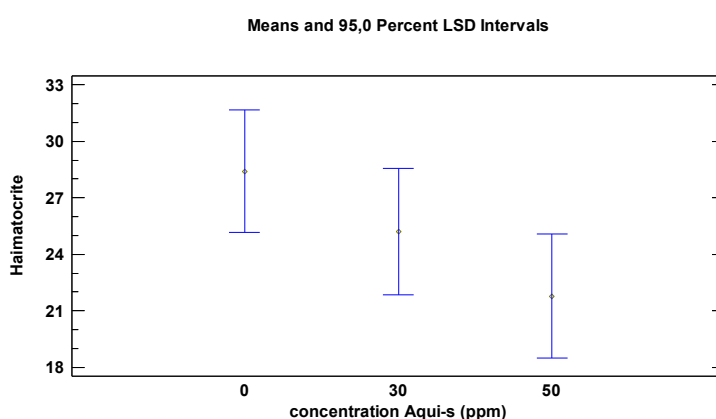
Slope P value<0.05,

Correlation Coefficient = 0,7727

R-squared = 59,7129.

### 4.3. Πείραμα Γ. Επίδραση της συγκέντρωσης του AQUI-S® (0ppm, 30ppm και 50ppm) στις τιμές αιματοκρίτη και της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε σχέση με τον χρόνο δειγματοληψίας (το άθροισμα του προκαθορισμένου χρόνου παραμονής στο AQUI-S®, έως το στάδιο 4 και του χρόνου παραμονής στο παγόνερο έως την θανάτωση των ιχθύων)

Ως χρόνος δειγματοληψίας (sampling time) ορίστηκε ο χρόνος παραμονής στο παγόνερο μετά από προκαθορισμένο χρόνο έκθεσης στο AQUI-S® έως το στάδιο 4. Αρχικά μέσω ανάλυσης διακύμανσης διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές του μέσου σωματικού βάρους μεταξύ των πληθυσμών. Στη συνέχεια, η επίδραση της συγκέντρωσης του AQUI-S® με συμμεταβλητές τον χρόνο δειγματοληψίας και το σωματικό βάρος στην τιμή του αιματοκρίτη εξετάστηκε μέσω ανάλυσης διακύμανσης και ελέγχου πολλαπλών συγκρίσεων. Αποδείχτηκε ότι ούτε ο χρόνος δειγματοληψίας αλλά ούτε το σωματικό βάρος είχαν στατιστικά σημαντική επίδραση στις τιμές του αιματοκρίτη. Όπως φαίνεται και από το Γράφημα 4.3.1 δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών του αιματοκρίτη στις τρεις συγκεντρώσεις του AQUI-S® (0ppm, 30ppm και 50ppm). Ακολουθεί το Γράφημα 4.3.1 των μέσων όρων των τιμών του αιματοκρίτη για κάθε συγκέντρωση AQUI-S® ανεξαρτήτως σωματικού βάρους και χρόνου δειγματοληψίας.



Γράφημα 4.3.1 Οι μέσοι όροι των τιμών του αιματοκρίτη των ιχθύων ανεξαρτήτως σωματικού βάρους και χρόνου δειγματοληψίας των ιχθύων με  $\pm 95\%$  LSD όρια εμπιστοσύνης.

Τέλος, μέσω ανάλυσης απλής παλινδρόμησης εξετάστηκε η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων, για κάθε συγκέντρωση AQUI-S® ξεχωριστά. Αναλυτικά:

- 0 ppm

Η εξίσωση του μοντέλου έχει ως εξής:

$$\text{Γλυκόζη(g/l)} = -1,62758 + 0,00504397 * \text{Χρόνος δειγματοληψίας (sec)}$$

εξίσωση 4.3.1

n=12,

confidence level 99,9% (P value<0.001),

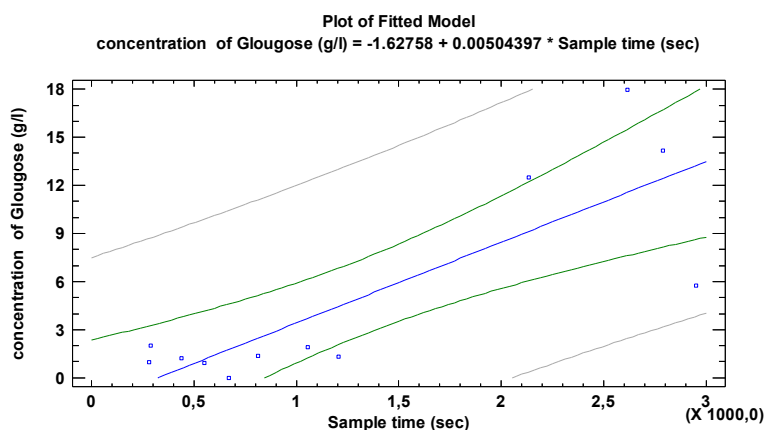
Intercept P value>0.05 ,

Slope P value<0.001,

Correlation Coefficient = 0,825669

R-squared = 68,1729

Παρατηρείται ισχυρή θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων.



Γράφημα 4.3.1 Η συσχέτιση μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων όταν πριν την τοποθέτησή τους στο παγόνερο δεν είχε προηγηθεί αναισθησία.

- 30ppm

Η εξίσωση του μοντέλου έχει ως εξής:

$$\text{Γλυκόζη(g/l)} = 0,710652 + 0,00146534 * \text{Χρόνος δειγματοληψίας (sec)}$$

εξίσωση 4.3.2

n=11,

confidence level 95,0% (P value>0.05),

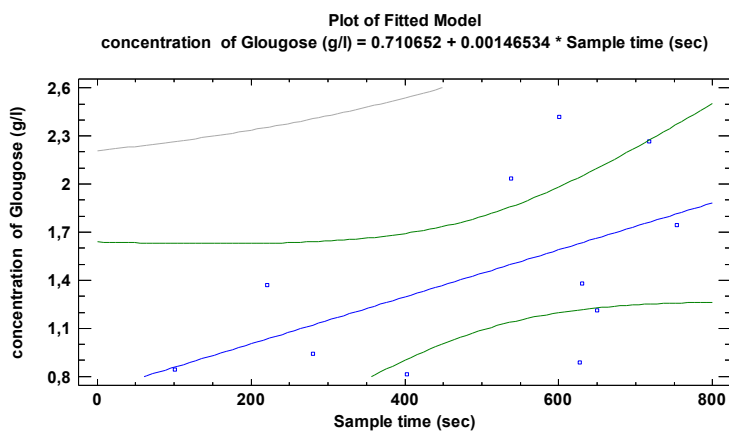
Intercept P value<0.05 ,

Slope P value>0.05,

Correlation Coefficient = 0,54309

R-squared = 29,4947

Δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας και της συγκέντρωσης της γλυκόζης.



Γράφημα 4.3.2 Η συσχέτιση μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων μετά από αναισθητοποίηση 12 min σε 30 ppm AQUI-S®.

- 50ppm

Η εξίσωση του μοντέλου έχει ως εξής:

$$\text{Γλυκόζη(g/l)} = 0,917368 + 0,000440548 * \text{Χρόνος δειγματοληψίας (sec)}$$

εξίσωση 4.3.3

n=12,

confidence level 95,0% (P value>0.05),

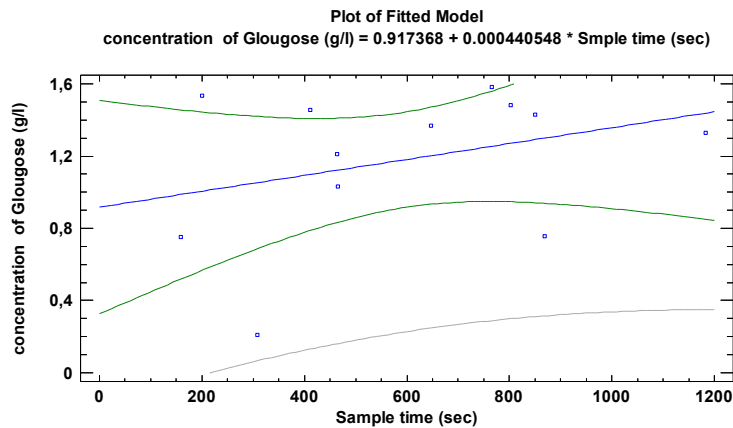
Intercept P value<0.05 ,

Slope P value>0.05,

Correlation Coefficient = 0,328701

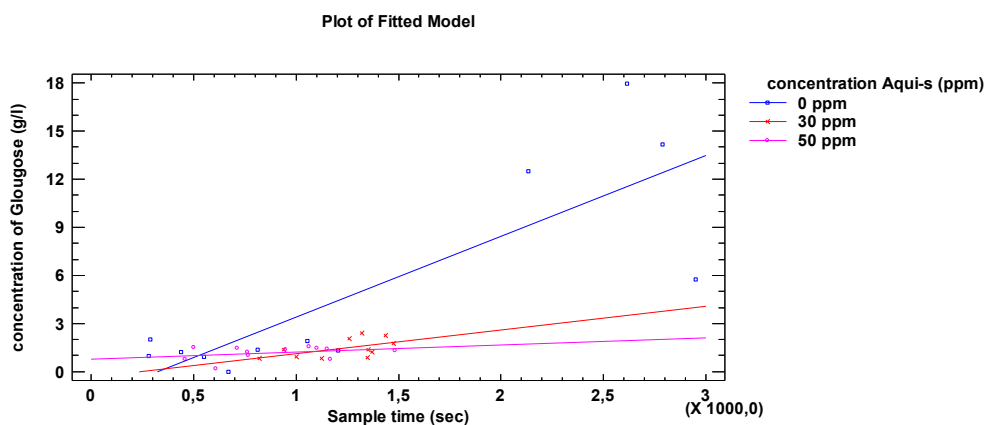
R-squared = 10,8044

Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική γραμμική συσχέτιση μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας και της συγκέντρωσης της γλυκόζης.



Γράφημα 4.3.3 Η συσχέτιση μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων μετά από αναισθητοποίηση για 5 min σε 50 ppm AQUI-S®.

Τέλος, ακολούθησε σύγκριση των ευθειών συσχέτισης του χρόνου δειγματοληψίας με τη συγκέντρωση της γλυκόζης για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S® (0 ppm, 30 ppm, και 50 ppm). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της σύγκρισης αυτής δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά των ευθειών συσχέτισης μεταξύ των δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων του AQUI-S® διότι τα σημεία τομής και οι κλίσεις μεταξύ των ευθειών δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 95%. Στο Γράφημα 4.3.3. παρουσιάζεται η συσχέτιση του χρόνου δειγματοληψίας με τη συγκέντρωση της γλυκόζης για κάθε συγκέντρωση AQUI-S® ξεχωριστά.



Γράφημα 4.3.4 Η συσχέτιση μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων απουσία ή παρουσία 30 και 50 ppm AQUI-S®.



## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### 5.1. Πείραμα Α

Κατά το πείραμα Α διερευνήθηκε η επίδραση του σωματικού βάρους στο χρόνο επαγωγής στο στάδιο της αναισθησίας 5, σε σταθερή συγκέντρωση AQUI-S<sup>®</sup> 50ppm, σε υψηλές θερμοκρασίες. Το εύρος βαρών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 55,6g – 443,2g. Παρατηρήθηκε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του σωματικού βάρους και του χρόνου επαγωγής. Σύμφωνα με τους Stehly and Gingerich (1999) τα μικρότερα ψάρια του ίδιου είδους έχουν μεγαλύτερη βραγχιακή επιφάνεια από τα μεγαλύτερα ψάρια και κατά συνέπεια εισχωρεί μεγαλύτερη ποσότητα αναισθητικού ανά μονάδα όγκου-μεγέθους του σώματος έναντι των μεγαλύτερων ψαριών. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Bowker et al. (2014), οι οποίοι επισημαίνουν ότι το σωματικό βάρος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τον θεωρητικό υπολογισμό του χρόνου επαγωγής. Στον Πίνακα 5.1.1 συνοψίζονται προηγούμενες μελέτες σχετικά με την επίδραση του αναισθητικού AQUI-S<sup>®</sup> σε διαφορετικά είδη ιχθύων και σε διαφορετικές θερμοκρασίες, όσον αφορά τον χρόνο επαγωγής στο στάδιο αναισθησίας 5. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεταπτυχιακής μελέτης της Σχοινιάς Ειρήνης (2013), η οποία μελέτησε την επίδραση του σωματικού βάρους ατόμων τσιπούρας με εύρος σωματικού βάρους 105g – 285g, σε διάφορες συγκεντρώσεις AQUI-S<sup>®</sup> (30ppm, 50ppm, 70ppm, 90ppm, 110ppm) και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του σωματικού βάρους και του χρόνου επαγωγής. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να οφείλονται στο μικρότερο εύρος σωματικού βάρους του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή.

Παράλληλα με την καταγραφή του χρόνου επαγωγής στο στάδιο 5 πραγματοποιήθηκε και η καταγραφή του χρόνου επαγωγής για το στάδιο αναισθησίας 3b στη συγκεκριμένη συγκέντρωση AQUI-S<sup>®</sup> για α) τα μισά άτομα του πληθυσμού κάθε δεξαμενής (3b(50%)) και β) το σύνολο του πληθυσμού (3b(100%)), μελετώντας την επίδραση του μέσου σωματικού βάρους ανά δεξαμενή στον χρόνο επαγωγής στο στάδιο 3b. Για την (α) περίπτωση ο καταγεγραμμένος χρόνος επαγωγής ήταν 50 sec (<1min), ενώ για την β περίπτωση ήταν 100 sec. Στα αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του μέσου σωματικού βάρους και του χρόνου επαγωγής στο στάδιο αναισθησίας 3b. Σύμφωνα με τους Iversen et al. (2003) σε συγκέντρωση 50 ppm, άτομα ενός έτους (μέσου σωματικού βάρους 44.7 g ± 12.8) Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) παρουσίασαν χρόνο επαγωγής

περίπου 150sec στο στάδιο 3a και 180sec στο στάδιο 3b, δείχνοντας μία καθυστέρηση του είδους αυτού σε σχέση με το λαβράκι στους χρόνους επαγωγής στα αντίστοιχα στάδια αναισθησίας, που ίσως να οφείλεται στις χαμηλότερες θερμοκρασίες εκτροφής και χειρισμού του σολομού.

Ένα ακόμα σημαντικό αποτέλεσμα του πειράματος A, το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τις μελέτες των Bosworth et al. (2007) και Iversen et al. (2003), είναι οι χρόνοι επαναφοράς, οι οποίοι ήταν ιδιαίτερος σύντομοι (<2min) (Πίνακας 5.1.1.)

Στον Πίνακα 5.1.1 παρουσιάζονται οι χρόνοι επαγωγής και επαναφοράς, το είδος του οργανισμού και η θερμοκρασία που εφαρμόστηκε η αναισθησία με AQUI-S®, όπως αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία.

**Πίνακας 5.1.1 Συνοπτική παρουσίαση των χρόνων επαγωγής και επαναφοράς, το είδος του οργανισμού και η θερμοκρασία που εφαρμόστηκε η αναισθησία με AQUI-S®, όπως αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία**

Συγκέντρωση AQUI-S®	Χρόνος επαγωγής (min)	Χρόνος επαναφοράς (min)	Θερμοκρασία	Είδος ιχθύος	Εργασία
20 ppm 40 ppm 60 ppm	5,5-6,1 1,6-4,9 1,4-2,6	2,5-2,6 3,0-7,6 3,3-6,7	18°C	<i>Largemouth bass</i>	Bowker et al. 2006
68 ppm	7-9	-	-	<i>Atlantic cod</i>	Erikson et al. 2012
10.9μL.L <sup>-1</sup>	435,29±146,86 sec	266,00±196,30 sec	19,34±1,44°C	European cuttlefish ( <i>Sepia officinalis</i> )	Gonglaves et al 2012
100 ppm	12		5,4 ±0.2°C	Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> L.)	Iversen et. al., 2003
100 200 400 800	65,1 ±3,4 31,3 ±1,3 28,1 ±1,3 21,8 ±1,6	7,6 ±1,0 17,6 ±2,1 27,3 ±0,8 55,5 ±2,7	30 °C	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Saydmohammed and Pal, 2009



50 ppm	7,39	6,51	20 ±1°C	<i>Sparus aurata</i>	Σχοινά Ειρήνη
70 ppm	5,55	13,37			2013
90 ppm	4,85	11,30			

## 5.2 Πείραμα Β

Στο πείραμα αυτό μελετήθηκε η πιθανή επίδραση του χρόνου έκθεσης στο AQUI-S® σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (30ppm,50ppm,70ppm) στην τιμή του αιματοκρίτη και στη συγκέντρωση της γλυκόζης.

### 5.2.1 Αιματοκρίτης

Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι ο χρόνος έκθεσης στο AQUI-S® και οι διαφορετικές συγκεντρώσεις (30ppm, 50ppm, 70ppm) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική επίδραση στην τιμή του αιματοκρίτη, (Γράφημα 3.3). Οι Rothwell et al. (2005) μελέτησαν την επίδραση του χρόνου έκθεσης στο AQUI-S®, στο είδος chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) σε συγκεντρώσεις 60ppm και 120ppm και του χρόνου επαναφοράς, στην τιμή του αιματοκρίτη, συμπεραίνοντας ότι αυτή αυξήθηκε κατά τα στάδια της προ-αναισθησίας και κατά το στάδιο της ολικής αναισθησίας στα 60ppm και στα στα 120ppm.

### 5.2.2 Συγκέντρωση γλυκόζης

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρατηρήθηκε ισχυρή γραμμική συσχέτιση μεταξύ του χρόνου έκθεσης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S® (30ppm, 50ppm, 70ppm) και της συγκέντρωσης της γλυκόζης. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μεταπτυχιακής μελέτης της Σχοινάς Ειρήνης (2013), σύμφωνα με τα οποία η τιμή της συγκέντρωσης της γλυκόζης φάνηκε ότι είχε θετική συσχέτιση σε σχέση με τον χρόνο έκθεσης στην συγκέντρωση AQUI-S® 70ppm. Φαίνεται λοιπόν ότι ο χρόνος έκθεσης στο AQUI-S® επηρεάζει σημαντικά την συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων, υποδηλώνοντας την πιθανή εκδήλωση στρεστικής αντίδρασης. Παρεμφερή επίπεδα γλυκόζης έχουν βρεθεί στο λαβράκι με clove oil 100mg/l (EFSA, 2009) ενώ έφτασαν τα 24mg/l στα 20min.

## 5.3 Πείραμα Γ

Κατά ο πείραμα Γ μελετήθηκε η Επίδραση της συγκέντρωσης του AQUI-S® (0ppm, 30ppm και 50ppm) στις τιμές αιματοκρίτη και της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε σχέση με τον χρόνο δειγματοληψίας (το άθροισμα του προκαθορισμένου χρόνου παραμονής στο AQUI-S®, έως το στάδιο 4 και του χρόνου παραμονής στο παγόνερο έως την θανάτωση των ιχθύων):

### 5.3.2 Αιματοκρίτης

Η επίδραση του χρόνου παραμονής στο παγόνερο διαπιστώθηκε ότι δεν ασκεί στατιστικά σημαντική επίδραση στην τιμή του αιματοκρίτη σε υψηλές θερμοκρασίες. Η ίδια εικόνα εμφανίζεται και στα αποτελέσματα της μεταπτυχιακής μελέτης της Σχοινάς Ειρήνης (2013), καθώς δεν φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση με τον χρόνο δειγματοληψίας σε καμιά από τις συγκεντρώσεις του AQUI-S® (30ppm, 50ppm, 70ppm) και σε χαμηλές θερμοκρασίες.

### 5.3.1 Συγκέντρωση γλυκόζης

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι ο χρόνος παραμονής στο παγόνερο χωρίς να προηγηθεί αναισθησία ασκεί θετική επίδραση στην συγκέντρωση της γλυκόζης. Ωστόσο, ο χρόνος παραμονής στο παγόνερο δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη συγκέντρωση της γλυκόζης και στις δύο συγκεντρώσεις AQUI-S® 30 ppm και 50 ppm) κατά την αναισθησία πριν την εμφάνιση στο παγόνερο. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο, δεδομένου ότι η αναισθησία χρησιμοποιείται προκειμένου να αποφευχθούν τραυματισμοί και το έντονο stress. Από προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε χαμηλές θερμοκρασίας (Σχοινά, 2013) παρουσιάστηκε επίσης συσχέτιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης με τον χρόνο παραμονής της τσιπούρας στο παγόνερο στην περίπτωση που δεν είχε προηγηθεί αναισθησία. Στην ίδια μελέτη δεν παρουσιάστηκε συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της γλυκόζης και του χρόνου παραμονής στο παγόνερο όταν είχε προηγηθεί αναισθησία με AQUI-S® 30 ppm ή 50ppm.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**Acerete, L., Balasch, J.C., Espinosa, E., Josa, A., Tort, L.,** 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*. L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture* 237, 167–178.

**Ackerman P. A., Morgan J. D. Iwama G.K.** 2005. Anesthetics. *CCAC guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing*.

**Almaza'n-Rueda P, Schrama JW, Verreth JAJ** (2004) Behavioural responses under different feeding methods and light regimes of the African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. *Aquaculture* 231:347–359

**Almazan Rueda, P., Verreth, J.A.J., Schrama, J.W.,** 2004. Stocking density is not a proper parameter to define husbandry conditions in studies on welfare in *Clarias gariepinus*. In: Almazan Rueda, P. (Eds.), *Towards assessment of welfare in African catfish, Clarias gariepinus: the first step*. PhD thesis, Fish Culture and Fisheries Group, Wageningen Institute of Animal sciences. Wageningen University, The Netherlands, pp.103–121.

**Amend D.F., Goven B.A. & Elliot D.G.** (1982) Etomidate: effective dosages for a new fish anesthetic. *Transactions of the American Fisheries Society* 111:337-341.

**Anderson W.G., McKinley R.S. & Colavecchia M.** (1997) The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *North American Journal of Fisheries Management* 17(2):301-307.

**Appleby, M.C., Hughes, B.O.,** 1997. Introduction. In: Appleby, M.C., Hughes, B.O. (Eds.), *Animal Welfare*. CABI, Oxfordshire, pp. xi–xiii.

**AQUI-S® New Zealand Ltd.** (2004) Electronic document, <http://www.aqui-s.com> Barton B.A. & Helfrich H. (1981) Time-dose responses of juvenile rainbow trout to 2-phenoxyethanol. *Progressive Fish-Culturist* 43(4):223-231.

**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. *J. Endocrinol.* 163, 149–157.

**Ashley P.J.** 2006. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science* 104: 199-235.

**Bagni, M., Priori, A., Finoia, M.G., Bossu` , T. and Marino, G.** 2002. Evaluation of preslaughter and killing procedures in sea bream (*Sparus aurata*). In: Proceedings of the “Aquaculture Europe 2002: Sea Farming Today and Tomorrow”. Special Publication n. 32, pp. 135–136.

**Bagni, M., Priori, A., Finoia, M.G., Bossu` , T. and Marino, G.** 2002. Evaluation of preslaughter and killing procedures in sea bream (*Sparus aurata*). In: Proceedings of the “Aquaculture Europe 2002: Sea Farming Today and Tomorrow”. Special Publication n. 32, pp. 135–136.

**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 Disease* 1, 3–26.

- Barton, B.A., Peter, R.E., Paulencu, C.R.,** 1980. Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport, and stocking. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37, 805–811.
- Bell G.** (1987) An outline of anesthetic and anesthesia for salmonids, a guide for fish culturists in British Columbia. 16pp. Canadian Technical Report of Fisheries Aquatic Sciences No. 1534.
- Bell G.** (1987) An outline of anesthetic and anesthesia for salmonids, a guide for fish culturists in British Columbia. 16pp. Canadian Technical Report of Fisheries Aquatic Sciences No. 1534.
- Bell G.** (1987) An outline of anesthetic and anesthesia for salmonids, a guide for fish culturists in British Columbia. 16pp. Canadian Technical Report of Fisheries Aquatic Sciences No. 1534.
- Bosworth B.G., Small Brian C., Gregory D, Kim J, Black S, Jerrett A, (2007).** Effects of rested-harvest using the anesthetic AQUI-S™ on channel catfish, *Ictalurus punctatus*, physiology and fillet quality. *Aquaculture* 262: 302–318.
- Bowker J. D., Carty D., Bowman M. P.** (2006) The Efficacy of AQUI-S® as an Anesthetic for Use on Juvenile and Adult Largemouth Bass *Micropterus salmoides*. Drug Research Report U.S. Fish & Wildlife Service.
- Bowker J D. Trushenski J T. Glover D C. Carty DG. Wandelaar N.** (2014). Sedative options for fish research: a brief review with new data on sedation of warm-, cool-, and coldwater fishes and recommendations for the drug approval process. *Rev Fish Biol Fisheries*, DOI 10.1007/s11160-014-9374-6
- Braithwaite V.A.,** Huntingford, F.A., 2004. Fish and welfare: do fish have the capacity for pain perception and suffering? *Animal Welfare* 13, 87–92.
- Broom, D.M.,** 1997. Welfare evaluation. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 54, 21–23.
- Broom, D.M.,** 1998. Fish welfare and the public perception on farmed fish. In: Report Aquavision 98. The second Nutreco aquaculture Business conference. Stanvagner forum, Norway. 13–15 May. Colin E.C., and Julien, V. ed. pp. 89–91.
- Carrasco S., Sumano H. & Navohro-Fierro R.** (1984) The use of lidocaine-sodium bicarbonate as an anesthetic in fish. *Aquaculture* 41:161-163.
- Chandroo, K.P., Duncan, I.J.H., Moccia, R.D.,** 2004. Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Applied Animal Behaviour Science* 86, 225–250
- Clearwater, J.S., Pankhurst, W.N.,** 1996. The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroid and vitellogenic oocytes in the marine teleosts, red gurnard. *Journal of Fish Biology* 50, 429–441.
- Cowx I.G. & Lamarque P. (ed.)** (1990) Fishing with electricity - applications in freshwater fisheries management. 248pp. Oxford: Fishing News Books.
- Davis, K.B., Parker, N.C.,** 1986. Plasma corticosteroid stress response of fourteen species of warmwater fish to transportation. *Transactions of the American Fisheries Society* 115, 495–499.

- Dibattista, J., Levesque, H., Moon, T., Gilmour, K.,** 2005a. An investigation of factors that contribute to the low growth rates of subordinate rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: Proceedings of the 44th Annual Meeting of the Canadian Society of Zoologists.
- DiBattista, J.D., Anisman, H., Whitehead, M., Gilmour, K.M.,** 2005b. The effects of cortisol administration on social status and brain monoaminergic activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 208, 2707–2718.
- Duncan, I.J.H., Fraser, D.,** 1997. Understanding Animal Welfare. In: Appelby, M.C., Hughes, B.O. (Eds.), *Animal Welfare*. CABI, Oxfordshire, pp. 19–31.
- EFSA Journal** (2009) Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed seabass and seabream. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. 1010, 1-52,
- Erikson U., Lambooi B., Digre H., Reimert H.G.M., Bondø M., van der Vis H.** (2012) Conditions for instant electrical stunning of farmed Atlantic cod after de-watering, maintenance of unconsciousness, effects of stress, and fillet quality —A comparison with AQUI-S™. *aquaculture* 324-325: 135–144
- FAWC, 1996. Farmed Animal Welfare Council.** Report on the welfare of farmed fish. London, Great Britain Lymbery, P., 2002. In too deep—The welfare of intensively farmed fish: compassion in world farming report. Petersfield, Hampshire, England.
- Fevolden, S.E., Roed, K.H., Fjalestad, K.T., Stien, J.,** 1999. Poststress levels of lysozyme and cortisol in adult rainbow trout: heritabilities and genetic correlations. *J. Fish Biol.* 54, 900–910.
- Flos, R., Reig, L., Torres, P., Tort, L.,** 1988. Primary and secondary stress responses to grading and hauling in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 71, 99–106.
- Frisch, A.J., Anderson, T.A.,** 2000. The response of coral trout (*Plectropomus leopardus*) to capture, handling and transport and shallow water stress. *Fish Physiology and Biochemistry* 23, 23–34.
- Gilderhus P.A. & Marking L.L.** (1987) Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals in rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management* 7:288-292.
- Gilderhus P.A.** (1989) Efficacy of benzocaine as an anesthetic for salmonid fishes. *North American Journal of Fisheries Management* 9:150-153
- Gonçalves R. A., Aragão C., Frias P. A., Sykes A. V.** (2012) The use of different anaesthetics as welfare promoters during short-term human manipulation of European cuttlefish (*Sepia officinalis*) juveniles. *Aquaculture* 370–371: 130–135
- Grutter, A.S., Pankhurst, N.W.,** 2000. The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*. *Journal of Fish Biology* 57, 391–401.
- Grutter, A.S., Pankhurst, N.W.,** 2000. The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*. *Journal of Fish Biology* 57, 391–401.
- Huntingford FA, Adams C, Braithwaite VA, Kadri S, Pottinger TG, Sandoe P, Turnbull JF** (2006) Current issues in fish welfare. *J Fish Biol* 68:332–372

- Huntingford, F.A., Adams, C., Braithwaite, V.A., Kadri, S., Pottinger, T.G., Sandøe, P., Turnbull, J.F.,** 2006. Review paper: current issues in fish welfare. *J. Fish Biol.* 68, 332–372.
- Iversen M., Finstad B., McKinley R. S., Eliassen R. A.** (2003) The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-S™ and Benzoak as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar*L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture* 221: 549 – 566
- Iversena Martin, Finstada Bengt, McKinleyc Robert S., Eliassenb Robert A.,**2003. The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-S® and BenzoakR as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity
- Keeling, L., Jensen, P.,** 2002. Behavioural disturbances, stress and welfare. In: *The Ethology of domestic animals*. P. Jensen (ed.) pp. 79–98. CABI Publishing, Reading, UK.
- Keene J.L., Noakes D.L.G., Moccia R.D. & Soto C.G.** (1998) The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research* 29(2):89-101
- Kestin, S.C., Wootton, S.B. and Adams, S.** 1995. The effect of CO<sub>2</sub>, concussion or electrical stunning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on fish welfare. In: *Proceedings of the “Quality in aquaculture”*, Special Publication n. 23, pp. 380–381.
- Kestin, S.C., Wootton, S.B. and Gregory, N.G.** 1991. Effect of slaughter by removal from water on visual evoked activity in the brain and reflex movement of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Veterinary Record* 128: 443–446.
- Leatherland, J.F.,** 1993. Stocking density and cohort sampling effects on endocrine interactions in rainbow trout. *Aquaculture International* 1, 137–156.
- Marking L.L. & Meyer F.P.** (1985) Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries* 10(6):2-5.
- Martins C. I. M., Galhardo L, Noble C, Damsga°rd B, Spedicato M T., Zupa W, Beauchaud M, Kulczykowska E, Massabuau J-C, Carter T, Planellas S R, Kristiansen T.** 2012. Behavioural indicators of welfare in farmed fish *Fish Physiol Biochem* 38: 17–41.
- Marx, H., Brunner, B., Weinzierl, W., Hoffman, R. and Stolle, A.** 1997. Methods of stunning freshwater fish: impact on meat quality and aspects of animal welfare. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 204: 282–286.
- Massee K.C., Rust M.B., Hardy R.W. & Stickney R.R.** (1995) The effectiveness of tricaine, quinaldine sulfate and metomidate as anesthetics for larval fish. *Aquaculture* 134(3-4):351- 359.
- Mattson N.S. & Ripple T.H.** (1989) Metomidate, a better anesthetic for cod (*Gadus Morhua*) in comparison with benzocaine, MS-222, chlorobutanol, and phenoxyethanol. *Aquaculture* 83(1-2):89-94.
- McErlean A.J. & Kennedy V.S.** (1968) Comparison of some anesthetic properties of benzocaine and MS222. *Transactions of the American Fisheries Society* 97:496-498.
- McFarland W.N. & Klontz G.W.** (1969) Anesthesia in fishes. pp. 1535-1540. *Federal Proceedings*.
- Merck and Company** (1989) *The Merck Index*, 11th ed. 1606pp. Rahway, New Jersey: Merck and Company.

- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W.,** 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 9, 211–268.
- Montero, D., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., Izquierdo, M.S.,** 2001. Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 473–490.
- Munday P.L. & Wilson S.K.** (1997) Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *Journal of Fish Biology* 51(5):931-938.
- Olsen Y.A., Einarsdottir I.E. & Nilssen K.J.** (1995) Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. *Aquaculture* 134(1-2):155-168.
- Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J.,** 2002a. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 12, 1–12.
- Overli, O., Winberg, S., Pottinger, T.G.,** 2005. Behavioral and neuroendocrine correlates of selection for stressresponsiveness in rainbow trout—a review. *Integr. Comp. Biol.* 45, 463–474.
- Parisi, G., Mecatti, M., Lupi, P., Scappini, F. and Poli, B.M.** 2002. Comparison of five slaughter methods for European sea bass. Changes of isometric contraction force and pH during the first 24 hours post mortem. In: Proceedings of the “Aquaculture Europe 2002: Sea Farming Today and Tomorrow”. Special Publication n. 32, pp. 417–418.
- Poli BM, Parisi G, Scappini F, Zampacavallo G.** 2005. Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International* 13: 29–49
- Poli, B.M., Parisi, G., Zampacavallo, G., Scappini, P., de Francesco, M.** 2003. The effect of slaughter methods on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) behaviour, rigor onset, plasmatic and tissue stress indexes and quality. In: Proceedings of the “First Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference (TAFT)”, 33rd and 48th Atlantic Fisheries Technology Conference, 11–14 June 2003, Reykjavik, Iceland.
- Poli, B.M., Zampacavallo, G., Iurzan, F., de Francesco, M., Parisi, G. and Mosconi, G.** 2002. Biochemical stress indicators changes in sea bass as influenced by the slaughter method. In: Proceeding of the “Aquaculture Europe 2002: Sea Farming Today and Tomorrow”. Special Publication n. 32, pp. 429–430.
- Ribas, L., Planas, J.V., Barton, B., Monetti, C., Bernadini, G., Saroglia, A., Tort, L., MacKenzie, S.,** 2004. A differentially expressed enolase gene isolated from the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under high-density conditions is upregulated in brain after in vivo lipopolysaccharide challenge. *Aquaculture* 241, 195–206.
- Rose, J.D.,** 2002. The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. *Reviews in Fisheries Science* 10, 1–38.
- Ross, L.G., Ross, B.,** 1999. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals* (2nd ed.) Blackwell Science, Oxford, UK.
- Ruane, N. M., Nolan, D. T., Rotllant, J., Costelloe, J., Bonga S. E. W.,** 2000. Experimental exposure of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to the infective stages of the sea

louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) influences the physiological response to an acute stressor. *Fish & Shellfish Immunology* 10, 451–463.

**Saydmohammed M., Pal A. K.** (2009) Anesthetic effect of eugenol and menthol on handling stress in *Macrobrachium rosenbergii* *Aquaculture* 298 :162–167

**Schoettger R.A. & Julin A.M.** (1968) Efficacy of quinaldine as an anesthetic for seven species of fish. Report no.22, 9pp. U.S. Fisheries and Wildlife Services.

**Schreck C.B., Whaley R.A., Maughan O.E. & Solazzi M.** (1976) Physiological responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to electroshock. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33:76-84.

**Schreck CB** (1981) Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. In: PickeringAD (ed) *Stress and fish*. Academic Press, New York, pp 294–321

**Sebastio, P., Ambroggi, F. and Baldrati, G.** 1996. Influenza del sistema di sacrificio su trote iridee di allevamento. *I Considerazioni biochimiche. Industria Conserve* 71: 37–49.

**Segner H, Sundh H, Buchmann K, Douxfils J, Snuttan Sundell K, Mathieu C, Ruane N, Jutfelt F, Toften H, Vaughan L .** 2012. Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish Physiol. Biochem.* 38: 85–105.

**Selye, H.,** 1973. The evolution of the stress concept. *American Scientists* 61, 692–699.

**Sneddon, L.U.,** 2002. Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. *Neurosci. Lett.* 319, 167–171.

**Sneddon, L.U., Braithwaite, V.A., Gentle, M.J.,** 2003. Do fish have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proceedings of the Royal Society London B* 270, 1115–1121. Socorro, S., Martins, R.S

**Stehly, G. R., and W. H. Gingerich.**1999. Evaluation of AQUI-S® (efficacy and minimum toxic concentration) as a fish anesthetic/sedative for public aquaculture in the United States. *Aquaculture Research* 30:365-372.

**Stoskopf M.K.** 1993. *Fish Medicine*. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

**Stoskopf, K. M.** (1993): *Fish Medicine*. W. B. Saunders Compony, Harcourt Brace Jovanovich, Inc.

**Summerfelt R.C. & Smith L.S.** (1990) Anaesthesia, surgery and related techniques. In: *Methods for Fish Biology*. (eds. C.B. Schreck & P.B. Moyle), pp. 213-272. Bethesda MD: American Fisheries Society

**Thienpont D. & Niemegeers C.J.E.** (1965) Propoxate (R7467): a new potent agent in cold blooded vertebrates. *Nature* 25:1018-1019.

**Thomas, P., Robertson, L.,** 1991. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS–222, quinaldine sulfate and metomidate. *Aquaculture* 96, 69–86.

**Tobiassen, T. and Sørensen, N.K.** 1999. Influence of killing methods on time of death of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as measured by



behavioural indices of sensibility and reflexes. In: Proceedings of the “Aquaculture Europe 1999”, EAS Special Publication n. 27, p. 244.

**Van der Vis, H., Kestin, S., Robb, D., Oehlenschlager, J., Lambooi, B., Munkner, W., Kuhlmann, H., Kloosterboer, K., Tejada, M., Huidobro, A., Ottera, H., Roth, B., Sørensen, N.K., Akse, L., Byrne, H. and Nesvadba, P.** 2003. Is humane slaughter of fish possible for industry? *Aquaculture Research* 34: 211–220.

**Van der Vis, H., Oehlenschlager, J., Kuhlmann, H., Munkner, W., Robb, D.H.F. and Schelvis-Smit, A.A.M.** 2001. Effect of the commercial and experimental slaughter of eels (*Anguilla anguilla* L.) on Quality and Welfare. In: Kestin, S.C. and Warriss, P.D. (eds.), *Farmed Fish Quality*. Fishing News Books, Oxford, pp. 234–248.

**Wedemeyer C.A.** 1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Chapman and Hall, NY.

**Wedemeyer, G.A.,** 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Soc. Exp. Biol. Semin. Ser. 62. Cambridge University Press, UK, pp.35–71.

**Wendelaar Bonga SE** (1997) The stress response in fish. *Physiol Rev* 77:591–625

**Zampacavallo, G., Scappini, F., Mecatti, M., Iurzan, F., Mosconi, G. and Poli, B.M.** 2003. Study on methods to decrease the stress at slaughter in farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Italian Journal of Animal Science*, 2 (Suppl. 1): 616–618.

**Δημητρίου, Ε.** 2007. Συμβολή στη μελέτη της αύξησης και της ηθολογίας της τσιπούρας (*Sparus aurata*, L.) στο σύμπλεγμα των λιμνοθαλασσών Μεσολογίου-Αιτωλικού. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών

**ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟ** (Μάρτιος 2007), Γενική Διεύθυνση Εσωτερικών Πολιτικών της Ένωσης, Θεματικό τμήμα - Διαρθρωτικών πολιτικών και πολιτική συνοχής, **ΑΛΙΕΙΑ Η ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΤΟΛΙΚΗ ΜΕΣΟΓΕΙΟ: ΕΛΛΑΔΑ, ΤΟΥΡΚΙΑ ΚΑΙ ΚΥΠΡΟΣ**  
([http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/etudes/join/2007/379220/IPOL-PECH\\_ET\(2007\)379220\\_EL.pdf](http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/etudes/join/2007/379220/IPOL-PECH_ET(2007)379220_EL.pdf))

**Παπουτσόγλου Σ.Σ.** 2008. Διατροφή ιχθύων. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα.

**Σχοινά Ε. (2013).** Διερεύνηση της χρήσης ισοευγενόλης στην αναισθητοποίηση/θανάτωση της τσιπούρας (*Sparus Aurata* L.) κάτω από σταθερές θερμοκρασιακές συνθήκες (20 ±1°C). Μεταπτυχιακή μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Φανουράκη Ε. 2010.** Μελέτη της καταπόνησης και ανάπτυξη μη-επεμβατικής μεθόδου προσδιορισμού της ελεύθερης κορτιζόλης στο θαλασσινό νερό σε μεσογειακά είδη ιχθύων, με έμφαση στο λαβράκι, *Dicentrarchus labrax*. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Φεβρουάριος 2010

**Χώτος, Γ. & Ρογδάκης, Ι.,** 1992. Υδατοκαλλιέργειες ευρύαλων ψαριών. Λαβράκι και τσιπούρα. Τεχνικές της αναπαραγωγής και πάχυνσης. Εκδόσεις ΙΩΝ Περιστέρι Αθήνα ISBN 960-405-364-7.