

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΙΣΟΕΥΓΕΝΟΛΗΣ ΣΤΗΝ
ΑΝΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ/ΘΑΝΑΤΩΣΗ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ
(*Sparus aurata* L.) ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΣΤΑΘΕΡΕΣ
ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (20±1 °C)

ΣΧΟΙΝΑ ΕΙΡΗΝΗ

Επιβλέπων Καθηγητής:

Μήλιου Ε. Αν. Καθηγήτρια

Αθήνα
Σεπτέμβριος 2013

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΦΗΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΥΔΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΙΣΟΕΥΓΕΝΟΛΗΣ ΣΤΗΝ
ΑΝΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ/ΘΑΝΑΤΩΣΗ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ
(*Sparus aurata* L.) ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΣΤΑΘΕΡΕΣ
ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (20±1 °C)**

ΣΧΟΙΝΑ ΕΙΡΗΝΗ

Εξεταστική Επιτροπή:

**Καρακατσούλη Ν. Επ. Καθηγήτρια
Μήλιου Ε. Αν. Καθηγήτρια
Χαρισμιάδου- Μητσάκου Μ. Λέκτορας**

**Αθήνα
Σεπτέμβριος 2013**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της παρούσας μελέτης Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Ελένη Μήλιου, για την καθοδήγησή της, την άπογη συνεργασία αλλά κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλο το διάστημα εκπόνησης της μελέτης.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Ναυσικά Καρακατσούλη για τη βοήθεια και τις συμβουλές της πάνω σε βασικά και πρακτικά ζητήματα που συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της μελέτης.

Ευχαριστίες να εκφράσω και στη Λέκτορα κα. Μαρία Χαρισμιάδου- Μητσάκου για τις εύστοχες παρατηρήσεις και τις διορθώσεις στο κείμενο της μελέτης.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο προσωπικό του εργαστηρίου, τον κ. Γεώργιο Κωνσταντίνου για την άριστη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης. Επίσης, να ευχαριστήσω τον Φούγια Παναγιώτη για τη συνεργασία αλλά και την πολύτιμη βοήθειά του σε όλους τους πειραματικούς χειρισμούς.

Να ευχαριστήσω θερμά το Λέκτορα κ. Ευστράτιο Παπουτσόγλου για τη βοήθειά του στο εργαστήριο, την υποψήφια διδάκτωρ Άλκηστη Μπατζινά για τη βοήθειά της στις εργαστηριακές αναλύσεις και την υποστήριξή της, καθώς επίσης και τους συμφοιτητές μου Μαντώ Κοτσίρη και Γιάννη Παπαδάκη για τη βοήθεια και τις ιδέες που μου έδωσαν ώστε να ολοκληρωθεί αυτή η μελέτη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Γιάννη Δρόσο, Μαριάνθη Καραμπουρνιώτη, Γιώργο Μπίθαρη και Λεωνίδα Φέγγο αλλά και τους υπόλοιπους προπτυχιακούς φοιτητές για τη συμμετοχή τους στους πειραματικούς χειρισμούς και για το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

Επιπλέον, για τη συμμετοχή τους στους πειραματικούς χειρισμούς θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου Βασίλη Δημογέροντα, Κλειώ-Τριανταφυλλιά Δημογέροντα και Θανάση Καραβασίλη.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στους δικούς μου ανθρώπους για την πνευματική υποστήριξή τους αλλά και την έμπρακτη βοήθειά τους, διότι χωρίς εκείνους δε θα μπορούσα να προχωρήσω. Η εμπιστοσύνη τους στις δυνατότητές μου αποτελεί την κινητήρια δύναμη που με ωθεί στο να προοδεύω και να εξελίσσομαι συνέχεια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A/A	Τίτλος	Σελίδα
A	Περίληψη	1
B	Abstract	2
Γ	Θεωρητικό Μέρος	3
1	Εισαγωγή	3
1.1	Η σημασία της τσιπούρας στις υδατοκαλλιέργειες	3
1.2	Στοιχεία βιολογίας και εκτροφής της τσιπούρας (<i>Sparus aurata</i>)	4
1.2.1	Συστηματική κατάταξη- Μορφολογικά χαρακτηριστικά	4
1.2.2	Γεωγραφική κατανομή και ενδιαίτημα	5
1.2.3	Διατροφή	6
1.2.4	Αναπαραγωγή	6
1.3	Φυσιολογία του stress	7
1.4	Ευζωία ιχθύων	8
1.5	Τρόποι θανάτωσης ιχθύων	10
1.5.1	Ευζωία και τρόποι θανάτωσης	10
1.5.2	Ποιότητα σάρκας μετά τη θανάτωση	12
1.5.3	Δείκτες stress μετά τη θανάτωση	12
1.6	Αναισθησία	13
1.7	Σκοπός της εργασίας	18
Δ	Πειραματικό μέρος	19
2	Υλικά και Μέθοδοι	19
2.1	Πειραματικές εγκαταστάσεις	19

2.2	Καθημερινοί χειρισμοί	19
2.2.1	Χορήγηση τροφής	19
2.2.2	Καταγραφή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού	20
2.2.3	Έλεγχοι- Καθαρισμοί	20
2.3	Αναισθητικό μπάνιο	21
2.3.1	Προετοιμασία του stock solution	21
2.3.2	Προετοιμασία της δεξαμενής αναισθητοποίησης	21
2.4	A' Πειραματική περίοδος	21
2.4.1	Διερεύνηση επίδρασης του σωματικού βάρους και της συγκέντρωσης του AQUI-S [®] στο χρόνο επαγωγής (Πείραμα A1)	24
2.4.2	Καθορισμός απαιτούμενου χρόνου έκθεσης για αιμοληψία (Πείραμα A2)	25
2.5	B' Πειραματική περίοδος	25
2.5.1	Προσδιορισμός των επιπέδων γλυκόζης και αιματοκρίτη μετά από αναισθησία στο στάδιο 4 (Πείραμα B1)	25
2.5.1.1	Αιμοληψία	26
2.5.2	Προσδιορισμός των επιπέδων γλυκόζης, αιματοκρίτη και pH του μυός μετά από θανάτωση στο παγόνερο ή αναισθητοποίηση και θανάτωση στο παγόνερο (Πείραμα B2)	27
2.6	Δείκτες stress και ποιότητας	29
2.7	Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του AQUI-S [®] με τη χρήση του αντιδραστηρίου GIBBS	29
2.8	Στατιστική ανάλυση	31
3	Αποτελέσματα	32
3.1	Επίδραση του σωματικού βάρους και της συγκέντρωσης του AQUI-S [®] στο χρόνο επαγωγής στο στάδιο	32

	αναισθησίας 5 (Πείραμα A1)	
3.2	Επίδραση του σωματικού βάρους και της συγκέντρωσης του AQUI-S[®] στο χρόνο επαναφοράς, μετά από αναισθησία στο στάδιο 5	34
3.3	Καθορισμός απαιτούμενου χρόνου έκθεσης στο αναισθητικό για διενέργεια αιμοληψίας (Πείραμα A2)	37
3.4	Προσδιορισμός επιπέδων γλυκόζης και αιματοκρίτη μετά από αναισθησία στο στάδιο 4 (Πείραμα B1)	38
3.4.1	Επίδραση του χρόνου παραμονής στο AQUI-S[®] και της συγκέντρωσης του AQUI-S[®] στη συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος	38
3.4.2	Επίδραση του χρόνου παραμονής και της συγκέντρωσης του AQUI-S[®] στην τιμή του αιματοκρίτη	40
3.5	Προσδιορισμός των επιπέδων γλυκόζης, αιματοκρίτη και pH του μυός μετά από θανάτωση στο παγόνερο ή αναισθητοποίηση και θανάτωση στο παγόνερο (Πείραμα B2)	42
3.5.1	Επίδραση του χρόνου δειγματοληψίας στη συγκέντρωση της γλυκόζης	42
3.5.2	Επίδραση του χρόνου δειγματοληψίας στην τιμή του αιματοκρίτη	44
3.5.3	Τιμή pH φιλέτου	46
3.6	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του AQUI-S[®] στη δεξαμενή αναισθητοποίησης	53
4	Συζήτηση- Συμπεράσματα	54
4.1	Επίδραση του σωματικού βάρους και της συγκέντρωσης του AQUI-S[®] στο χρόνο επαγωγής στο στάδιο αναισθησίας 5 και στο χρόνο επαναφοράς (Πείραμα A1)	54
4.2	Καθορισμός απαιτούμενου χρόνου έκθεσης στο AQUI-S[®] για διενέργεια αιμοληψίας (Πείραμα A2)	56
4.3	Επίδραση της συγκέντρωσης του AQUI-S[®] στα επίπεδα γλυκόζης και αιματοκρίτη μετά από αναισθησία στο στάδιο 4 (Πείραμα B1)	56

4.4	Επίδραση της συγκέντρωσης του AQUI-S[®] στα επίπεδα της γλυκόζης, του αιματοκρίτη και του pH του μυός μετά από θανάτωση στο παρόνερο (Πείραμα B2)	57
4.5	Έλεγχος της συγκέντρωσης του AQUI-S[®] στη δεξαμενή αναισθητοποίησης	59
4.6	Σύγκριση του AQUI-S[®] με τον «ιδανικό αναισθητικό παράγοντα»	59
4.7	Συμπεράσματα	62
5	Βιβλιογραφία	64

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΙΣΟΕΥΓΕΝΟΛΗΣ ΣΤΗΝ
ΑΝΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ/ΘΑΝΑΤΩΣΗ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ (*Sparus
aurata* L.) ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΣΤΑΘΕΡΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΕΣ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ (20±1 °C)**

ΣΧΟΙΝΑ ΕΙΡΗΝΗ

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

Περίληψη

Οι διαδικασίες πριν και κατά τη διάρκεια της θανάτωσης θεωρούνται από τις πιο σημαντικές στη διαχείριση της εκτροφής των ιχθύων σε ότι αφορά την ευζωία και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Η αναισθητοποίηση των ιχθύων πριν τη θανάτωση έχει βρεθεί ότι επιδρά θετικά και στα δύο αυτά ζητήματα. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η ισοευγενόλη ως αναισθητικός παράγοντας στην εκτροφή της τσιπούρας (*Sparus aurata* L.) μέσω της χρήσης του εμπορικού προϊόντος AQUI-S[®].

Αρχικά, διερευνήθηκε η επίδραση του σωματικού βάρους στο χρόνο επαγωγής στο στάδιο 5 της αναισθησίας, μέσα σε ένα εύρος από 105 έως 285 g σε συγκεντρώσεις από 30 έως 110 ppm AQUI-S[®]. Διαπιστώθηκε ότι το σωματικό βάρος δεν παίζει ρόλο στο χρόνο επαγωγής στο στάδιο 5 της αναισθησίας, ο οποίος βρέθηκε να είναι 26 λεπτά στα 30 ppm, 9 λεπτά στα 50 ppm, 6 λεπτά στα 70 ppm, 5 λεπτά στα 90 ppm και 4 λεπτά στα 110 ppm, ενώ ο χρόνος επαναφοράς από το στάδιο αναισθησίας 5 ξεπέρασε τα 5 λεπτά σε όλες τις συγκεντρώσεις.

Στη συνέχεια, καθορίστηκε ο μέσος απαιτούμενος χρόνος έκθεσης σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AQUI-S[®] (30, 50 και 70 ppm) για τη διενέργεια αιμοληψίας και αξιολογήθηκαν τα επίπεδα της γλυκόζης στο πλάσμα και του αιματοκρίτη ως δείκτες stress. Ο αιματοκρίτης βρέθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερος στις συγκεντρώσεις 50 και 70 ppm AQUI-S[®], ενώ η γλυκόζη δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών συγκεντρώσεων.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ της θανάτωσης των ιχθύων με εισαγωγή στο παγόνερο και της θανάτωσης στο παγόνερο όπου προηγήθηκε η αναισθητοποίησή τους για προκαθορισμένο χρόνο σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AQUI-S[®] (30, 50 και 70 ppm). Για τη σύγκριση αυτή προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλυκόζης του πλάσματος και του αιματοκρίτη ως δείκτες stress αλλά και του pH του φιλέτου ως δείκτη ποιότητας. Δεν εμφανίστηκαν διαφοροποιήσεις στον αιματοκρίτη. Αντίθετα, τα επίπεδα της γλυκόζης όταν δεν προηγείτο αναισθησία ήταν σημαντικά χαμηλότερα, ενώ όταν προηγούνταν έκθεση στα 30 ppm AQUI-S[®] η γλυκόζη ήταν σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με την έκθεση στα 50 ή 70 ppm. Το pH του φιλέτου 2 ώρες μετά τη θανάτωση διατηρείται σε υψηλότερα επίπεδα όταν έχει προηγηθεί αναισθητοποίηση, ανεξάρτητα με τη συγκέντρωση της ισοευγενόλης, σε σχέση με την άμεση εισαγωγή στο παγόνερο, εξασφαλίζοντας καλύτερη ποιότητα στο τελικό προϊόν.

Λέξεις κλειδιά: τσιπούρα, *Sparus aurata*, ισοευγενόλη, AQUI-S[®], ευζωία, μέθοδος θανάτωσης

EVALUATION OF ISOEUGENOL IN STUNNING/KILLING GILTHEAD SEA BREAM (*Sparus aurata* L.) UNDER MEDIAN TEMPERATURE (20±1 °C)

SCHOINA EIRINI

Department of Animal Science and Aquaculture, Laboratory of Applied Hydrobiology, Iera Odos 75, Athens, 118 55, email: elenmi@aua.gr

Abstract

Pre-slaughter and killing procedures play a significant role in fish farming management as they affect both welfare and quality of the final product. Anaesthetization of fish before slaughter is considered to improve both aspects. The aim of this study was to evaluate isoeugenol as an anaesthetic in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) by using the commercial product AQUI-S[®].

Firstly, the effect of fish weight on induction time (anaesthesia stage 5) was tested. Fish weighting 105,0 -285,0 g, were exposed to water containing different concentrations of AQUI-S[®] from 30 to 110 ppm. Weight did not affect significantly induction time (stage 5) which was found to be 26 min in 30 ppm, 9 min in 50 ppm, 6 min in 70 ppm, 5 min in 90 ppm and 4 min in 110 ppm. Meanwhile, recovery time exceeded the 5 min margin in all cases.

Secondly, the mean required time to conduct blood sampling (anaesthesia stage 4) was determined in fish exposed to three concentrations of AQUI-S[®] (30, 50 and 70 ppm). Plasma glucose and haematocrit were evaluated as stress indicators. Haematocrit value was significantly higher in fish exposed to 50 and 70 ppm of AQUI-S[®], while plasma glucose was at the same level in all three concentrations.

Finally, the killing method of immersion in ice/water slurry was compared to the method of anaesthetizing fish by exposing them to three concentrations of AQUI-S[®] (30, 50 and 70 ppm) for a predetermined time, before immersion in ice/water slurry. Plasma glucose and haematocrit were evaluated as stress indicators and muscle pH as quality indicator. Haematocrit value was not elevated among any procedure, while plasma glucose in fish directly immersed in ice/water slurry remained at low level, in contrast with anaesthetized fish. Fish exposed to 30 ppm AQUI-S[®] showed the highest glucose levels. Muscle pH two hours post mortem was higher in fish exposed to anaesthesia, regardless of the concentration, than in fish being directly immersed in ice/water slurry, ensuring better quality.

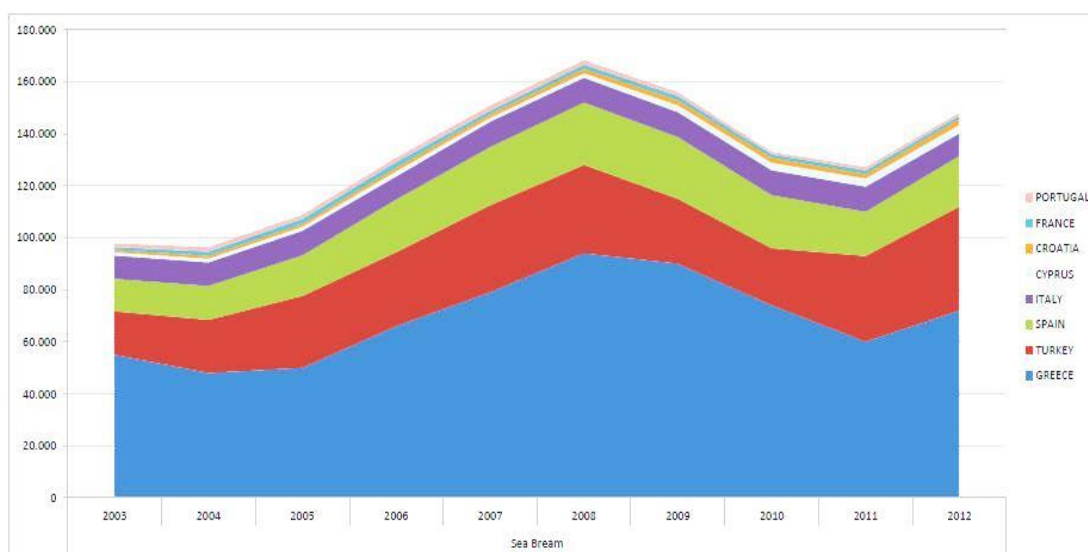
Key words: gilthead sea bream, *Sparus aurata*, isoeugenol, AQUI-S[®], welfare, killing methods

1. Εισαγωγή

1.1 Η σημασία της τσιπούρας στις υδατοκαλλιέργειες

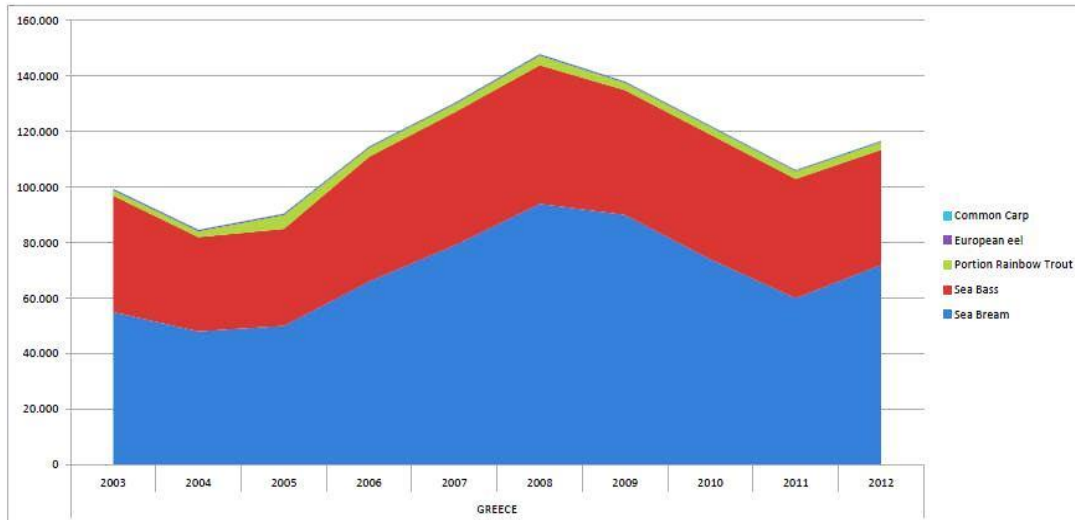
Η τσιπούρα (*Sparus aurata* L.) βρίσκεται στο επίκεντρο της έρευνας από τη δεκαετία του '80 οπότε και άρχισε η εντατική εκτροφή της. Η προσαρμοστικότητά της στις συνθήκες εντατικής εκτροφής και ταυτόχρονα η επίτευξη τεχνητής αναπαραγωγής αποτέλεσαν τους κύριους παράγοντες που έδωσαν ώθηση στην αύξηση της παραγωγής της (FAO, 2005).

Σύμφωνα με την Ομοσπονδία Ευρωπαίων Ιχθυοπαραγωγών τα τελευταία δέκα έτη η Ελλάδα αποτελεί τη χώρα με τη μεγαλύτερη παραγωγή τσιπούρας στην Ευρώπη (FEAP, 2013). Ενδεικτικά, 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 (Εικόνα 1.1). Επιπρόσθετα, σε σχέση με τα υπόλοιπα εντατικώς εκτρεφόμενα είδη ιχθύων στην Ελλάδα (πχ. λαυράκι, πέστροφα, κοινός κυπρίνος), η παραγωγή της τσιπούρας ξεπερνά το 50% της ετήσιας συνολικής παραγωγής κατά τα δέκα τελευταία συναπτά έτη, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.2. Η διάθεση της παραγωγής δεν περιορίζεται μόνο εντός των συνόρων. Τουναντίον, το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής εξάγεται κυρίως προς τις ευρωπαϊκές αγορές.



Η Ελλάδα σημαίνεται με το μπλε χρώμα

Εικόνα 1.1: Παραγωγή εκτρεφόμενης τσιπούρας σε τόνους στην Ευρώπη τα έτη 2003-2012 (FEAP, 2013.)



Με γαλανό χρώμα σημαίνεται ο κοινός κυπρίνος, μωβ το ευρωπαϊκό χέλι, πράσινο η ιριδίζουσα πέστροφα, κόκκινο το λαυράκι και μπλε η τσιπούρα (FEAP,2013).

Εικόνα 1.2: Παραγωγή διαφορετικών ειδών ιχθύων υδατοκαλλιέργειας σε τόνους στην Ελλάδα τα έτη 2003-2012

Συνδυάζοντας λοιπόν όλα τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτή η σημασία της εκτροφής τσιπούρας για την ελληνική υδατοκαλλιέργεια. Κάθε ερευνητική προσπάθεια που σκοπεύει στη βελτίωση των συνθηκών εκτροφής συμβάλλει στη διασφάλιση ταυτόχρονα και στην απόδοση της παραγωγής αλλά και στην ποιότητα, καθιστώντας την ελληνική τσιπούρα ανταγωνιστικό προϊόν στην παγκόσμια αγορά.

1.2 Στοιχεία βιολογίας και εκτροφής της τσιπούρας (*Sparus aurata*)

1.2.1 Συστηματική κατάταξη- Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Sparus aurata (Linnaeus, 1758)

Συνομοταξία	Chordata
Υποσυνομοταξία	Vertebrata
Υπερομοταξία	Gnathostomata
Ομοταξία	Osteichthyes
Υφομοταξία	Actinopterygii
Υπέρταξη	Teleostei
Τάξη	Perciformes
Υπόταξη	Percoidei
Οικογένεια	Sparidae
Γένος	<i>Sparus</i>
Είδος	<i>Sparus aurata</i>



Εικόνα 1.3: Ενήλικο άτομο *S. aurata* (<http://www.fishbase.org>)

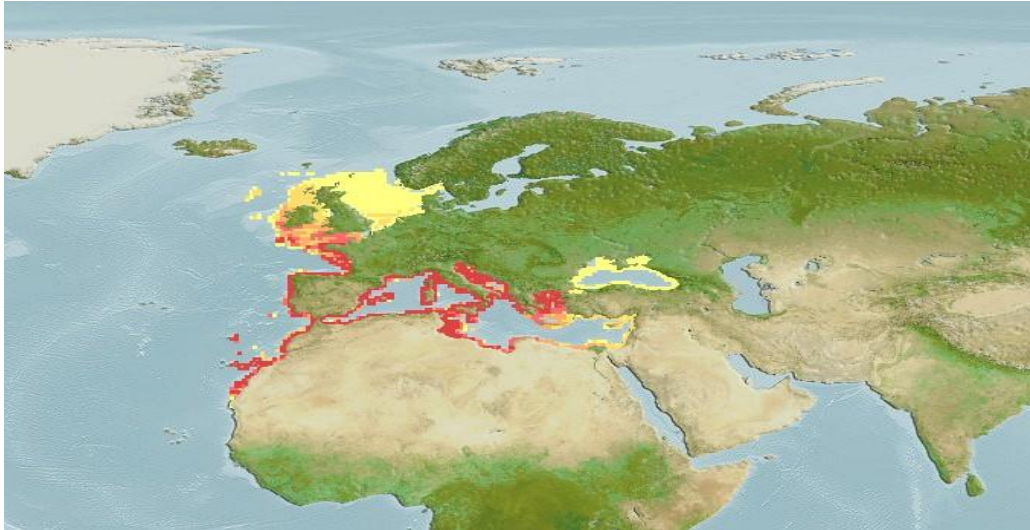
Η τσιπούρα, διαθέτει ωσειδές σχήμα σώματος με το προφίλ της κεφαλής να είναι σχετικά κάθετο στο εμπρόσθιο τμήμα και λεπτό ουραίο μίσχο. Τα μάτια είναι μικρά, το στόμα ελαφρώς προεκτεινόμενο με παχιά χείλη και τα δόντια ανόμοια, προσαρμοσμένα για σαρκοφαγία. Φέρει 4 έως 6 δόντια σχήματος κυνόδοντα σε κάθε γνάθο τα οποία ακολουθούνται από στρογγυλεμένα δόντια διατεταγμένα σε 2 έως 4 συστοιχίες. Η ράχη είναι γκριζα, γκριζογάλανη και τα πλευρά ασημόχρωμα με λεπτές επιμήκειες γκριζες γραμμές, οι οποίες εκτείνονται μέχρι την άκρη της ουράς και πάνω από το μέτωπο όπου σχηματίζουν V (Εικόνα 1.3). Χαρακτηρίζεται από μία χρυσή ζώνη πάνω από τα μάτια η οποία καταλήγει σε σκουρόχρωμες άκρες (Παπουτσόγλου, 1994; fishbase).

1.2.2 Γεωγραφική κατανομή και ενδιαίτημα

Η τσιπούρα είναι ένα είδος ιχθύος κοινό στη Μεσόγειο. Συναντάται επίσης στις ανατολικές ακτές του Ατλαντικού από τα νησιά της Μεγάλης Βρετανίας έως τις ακτές της Σενεγάλης (Εικόνα 1.4), ενώ σπάνια εντοπίζεται στη Μαύρη Θάλασσα (Bauchot and Hureau, 1990).

Είναι ένα μη μεταναστευτικό είδος το οποίο ζει απομονωμένο ή σχηματίζει μικρά κοπάδια. Ζει ως επί το πλείστον κοντά στις ακτές αλλά και στην παράλια ζώνη σε βάθη που κυμαίνονται συνήθως από 1 έως 30 m (Loris, 2005). Συναντάται σε βραχώδη αλλά και αμμώδη υποστρώματα καθώς και σε λιβάδια της *Posidonia oceanica* (Bauchot and Hureau, 1990).

Είναι ευρύθερμο και ευρύαλο είδος. Την άνοιξη εισέρχεται σε ημίκλειστες παράκτιες περιοχές υφάλμυρων νερών, τις οποίες εγκαταλείπει για την ανοικτή θάλασσα το φθινόπωρο. Εκεί αναπτύσσεται ταχύτερα από τα άτομα που παραμένουν στην ανοικτή θάλασσα (Παπουτσόγλου, 2008). Είναι πολύ ευαίσθητο στις χαμηλές θερμοκρασίες όπου και παρατηρείται υψηλή θνησιμότητα στις περιπτώσεις που εμποδίζεται η μετακίνησή του στην ανοικτή θάλασσα. Το ανώτερο όριο αλατότητας στο οποίο επιβιώνει είναι της τάξης του 40‰, ενώ είναι επιτυχής η εκτροφή του και σε υφάλμυρα νερά. Η μέγιστη ανάπτυξη έχει παρατηρηθεί σε νερά με εύρος αλατότητας 28-32‰, κορεσμένα σε οξυγόνο και με τιμή pH από 7,8 έως 8,3 (Παπουτσόγλου, 2008).



Εικόνα 1.4: Γεωγραφική κατανομή του είδους *S. aurata* (<http://www.fishbase.org>)

1.2.3 Διατροφή

Όντας κυρίως σαρκοφάγο είδος, διαθέτει γερά τραπεζοειδή δόντια και ισχυρές σιαγόνες, που της επιτρέπουν να εκμεταλλεύεται μεγάλη ποικιλία τροφής. Επιπλέον το έντερό της, ευθύ και κοντό, είναι ανθεκτικό στα σχισίματα που τυχόν προκαλούνται από τα κελύφη Γαστερόποδων και Διθύρων. Στη φύση τρέφεται με Αμφίποδα, Καρκινοειδή, Πολύχαιτους, Κεφαλόποδα, Γαστερόποδα, Δίθυρα Μαλάκια και άλλα είδη ιχθύων (Παπουτσόγλου, 1994; Pita et al., 2002). Ευκαιριακά μπορεί να τραφεί και με φυτικούς οργανισμούς (Pavlidis and Mylonas, 2011).

1.2.4 Αναπαραγωγή

Η τσιπούρα είναι ένα ερμαφρόδιτο πρωτανδρικό είδος ιχθύος. Όλος ο πληθυσμός μέχρι το τέλος του 2^{ου} έτους λειτουργεί σαν ένα σύνολο αρσενικών ατόμων, κατόπιν συμβαίνει αλλαγή του φύλου και αρχίζουν να εμφανίζονται θηλυκά άτομα (Pavlidis and Mylonas, 2011). Ωστόσο, η σεξουαλική αναστροφή δε φαίνεται να επηρεάζει το σύνολο των ατόμων αφού μερικά από αυτά παραμένουν αρσενικά σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Η αναπαραγωγή στο φυσικό περιβάλλον πραγματοποιείται από τον Οκτώβριο μέχρι το Δεκέμβριο, με συνεχείς ωτοκίες καθ' όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου (Παπουτσόγλου, 2008). Η επώαση των αυγών διαρκεί τουλάχιστον 2 μέρες στους 16-17°C. Τα προνυμφικά στάδια διαρκούν περίπου 50 ημέρες στους 17,5°C ή περίπου 43 ημέρες στους 20°C. Το μέγεθος των αυγών είναι 0.9-1.1 mm και το μήκος της προνύμφης κατά την εκκόλαψη 2.5-3.0 mm (Bauchot et al., 1981).

1.3 Φυσιολογία του stress

Ο όρος stress (καταπόνηση) αφορά σε μία σειρά φυσιολογικών γεγονότων απόκρισης του οργανισμού στην προσπάθεια να αποφύγει το θάνατο, να διατηρήσει την ομοιόστασή του και να επαναφέρει την ισορροπία του (Schreck et al., 2001).

Οι αποκρίσεις των ιχθύων στα διάφορα ερεθίσματα που προκαλούν stress παρουσιάζουν ομοιότητες με αυτές των χερσαίων Σπονδυλωτών (Wendelaar Bonga, 1997) και ακολουθούν ένα γενικό πρότυπο χαρακτηριζόμενο ως Γενικό Σύνδρομο Προσαρμογής (General Adaptation Syndrome) το οποίο περιλαμβάνει 3 αντιδράσεις απόκρισης (Pickering and Pottinger, 1995; Παπουτσόγλου 1998; Pavlidis and Mylonas 2011):

- Πρωτογενής αντίδραση (φάση συναγερμού)
- Δευτερογενής αντίδραση (φάση αντίστασης) και
- Τριτογενής αντίδραση (φάση εξαντλήσεως)

Κατά την πρωτογενή αντίδραση του οργανισμού στο stress απελευθερώνονται άμεσα στην κυκλοφορία του αίματος κατεχολαμίνες (αδρεναλίνη και νοραδρεναλίνη) και κορτικοστεροειδή όπως η κορτιζόλη. Το αρχικό ερέθισμα προκαλεί νευρική ώση, η οποία φτάνει στο κεντρικό νευρικό σύστημα και ενεργοποιεί μία σειρά νευροενδοκρινικών μηχανισμών. Αρχικά παράγονται ορμόνες και εκκρίνονται από τον υποθάλαμο προς δύο άξονες: τον άξονα Συμπαθητικό Νευρικό Σύστημα – Χρωμιόφιλος ιστός και τον άξονα Υποθάλαμος- Υπόφυση.

Στον πρώτο άξονα, διεγείρονται νευρώνες στα χρωμιόφιλα κύτταρα στο άνω νεφρικό σύστημα, με αποτέλεσμα την έκλυση κατεχολαμινών, ήτοι αδρεναλίνη και νοραδρεναλίνη και την απελευθέρωσή τους στην αιματική κυκλοφορία. Στο δεύτερο άξονα, εκλύεται από τον υποθάλαμο η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτρόπου ορμόνης (CRH), η οποία ενεργοποιεί τον άξονα Υποθάλαμος – Υπόφυση – Επινεφρίδια. Η CRH αυξάνει με τη σειρά της την κορτικοτρόπο ορμόνη (ACTH) και μέσω αυτής διεγείρει την έκκριση κορτιζόλης από τον μεσονεφρικό ιστό προς την αιματική κυκλοφορία (Flik et al., 2006).

Κατά τη δευτερογενή αντίδραση του ιχθύος στο stress, τα αυξημένα επίπεδα κατεχολαμινών και κορτιζόλης επηρεάζουν τις βιοχημικές και φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού προκαλώντας διαφοροποίηση στους ρυθμούς έκκρισης ορμονών από την υπόφυση και τον θυρεοειδή αδένα και τροποποιήσεις στους ρυθμούς ανανέωσης των νευροδιαβιβαστών. Επίσης, προκαλούν αυξημένη ροή αίματος προς τα βράγχια, καλύτερη οξυγόνωση λόγω αύξησης του καρδιακού παλμού αλλά ταυτόχρονα και κατανάλωση οξυγόνου (Pickering and Pottinger, 1995). Επιπλέον παρατηρούνται βελτιωμένες κολυμβητικές επιδόσεις, ενεργοποίηση του καταβολισμού (αντί του αναβολισμού) και κινητοποίηση ενέργειας λόγω αποδόμησης των αποθεμάτων, αύξηση της γλυκόζης στο αίμα (λόγω έντονης γλυκόλυσης και γλυκονεογένεσης) για ικανοποίηση των αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων (Pickering and Pottinger, 1995; Wendelaar Bonga, 1997). Οι ηθολογικές και φυσιολογικές αποκρίσεις στο stress φαίνεται ότι ελέγχονται από κοινούς μηχανισμούς οι οποίοι ενεργοποιούνται από τη

δράση νευροδιαβιβαστών στον εγκέφαλο, με κύριους νευροδιαβιβαστές τη σεροτονίνη, τη ντοπαμίνη και τη νορεπινεφρίνη (Ashley, 2007).

Όταν η διάρκεια (ένταση) του stress αγγίζει ή υπερβαίνει τα όρια ανοχής των ιχθύων, δυσχεραίνοντας τον εγκλιματισμό τους, τότε μπορεί να παρατηρηθεί μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, διαταραχή της αναπαραγωγικής διαδικασίας καθώς και εξασθένηση του ανοσολογικού συστήματος (τριτογενείς αντιδράσεις) προκαλώντας τελικά εξάντληση και θάνατο (Παπουτσόγλου, 1998).

1.4 Ευζωία ιχθύων

Η παγκόσμια ζήτηση για ψάρι και ιχθυοπροϊόντα υπολογίζεται ότι θα ανέλθει στους 183 εκ. τόνους μέχρι το 2015 αυξημένη κατά 50 εκ. τόνους και μέσα από αυτή την αύξηση αναμένεται ότι το 73% θα προέλθει από τις υδατοκαλλιέργειες, οι οποίες θα αποτελούν το 39% της παγκόσμιας ιχθυοπαραγωγής (FAO, 2004). Η ευζωία των ζώων και η ποιότητα του προϊόντος είναι δύο ζητήματα αλληλένδετα που διαμορφώνουν τη συνολική ποιότητα του ιχθύος (Poli et al., 2005). Λαμβάνοντας υπόψη την αυξημένη ζήτηση, γίνεται αντιληπτός ο λόγος που δίνεται πλέον μεγαλύτερη προσοχή στην ευζωία των εκτρεφόμενων ιχθύων (Ashley, 2007). Το ενδιαφέρον των καταναλωτών συγκεντρώνεται προς την εφαρμογή «ανθρώπινων» πρακτικών κατά τους χειρισμούς των εκτρεφόμενων ιχθύων (Bagni et al., 2007). Έτσι, η ευζωία των ιχθύων αποτελεί σημαντικό ζήτημα για τη βιομηχανία, όχι μόνο για την αποδοχή των προϊόντων από το καταναλωτικό κοινό αλλά και για την απόδοση, την ποιότητα και την ποσότητα της παραγωγής (Broom, 1998; Southgate and Wall, 2001).

Την τελευταία δεκαετία, το πλαίσιο που εφαρμόζεται για την ευζωία των εκτρεφόμενων ιχθύων έχει βασιστεί στις «5 ελευθερίες» που έχουν οριστεί για τα εκτρεφόμενα ζώα από τον οργανισμό «Farm Animal Welfare Council» το 2005. Αυτές περιλαμβάνουν: (1) ελευθερία από πείνα και δίψα, έχοντας άμεση πρόσβαση σε νερό και σιτηρέσιο που εξασφαλίζει την υγεία και το σθένος του ζώου, (2) ελευθερία από δυσφορία, παρέχοντας ένα κατάλληλο περιβάλλον διαβίωσης (3) ελευθερία από πόνο, τραυματισμούς ή ασθένειες, δίνοντας έμφαση στην πρόληψη, τη γρήγορη διάγνωση και θεραπεία του προβλήματος (4) ελευθερία στην έκφραση της φυσιολογικής συμπεριφοράς, παρέχοντας αρκετό χώρο, κατάλληλες εγκαταστάσεις και συντροφιά από άτομα του ίδιου είδους και (5) ελευθερία από φόβο και θλίψη, διασφαλίζοντας ότι οι συνθήκες διαβίωσης και οι ανθρώπινοι χειρισμοί δε θέτουν το ζώο σε κατάσταση ψυχικής οδύνης.

Αυτές οι οδηγίες διαμορφώνουν ένα λογικό πλαίσιο με το οποίο εξετάζονται τα ζητήματα που εφάπτονται της ευζωίας (Ashley, 2007). Κατά συνέπεια, προσαρμόζοντας αυτό το πλαίσιο η ευζωία των ιχθύων μπορεί να οριστεί επαρκώς από τις ακόλουθες τρεις συνθήκες (Huntingford and Kadri, 2008): (1) οι ιχθύες μπορούν να προσαρμοστούν στο περιβάλλον και να διατηρήσουν καλή υγεία, εξασφαλίζοντας πως όλα τα βιολογικά συστήματα λειτουργούν σωστά, (2) οι ιχθύες μπορούν να εκφράσουν ελεύθερα τη συμπεριφορά τους, (3) οι ιχθύες δε βιώνουν αρνητικές εμπειρίες όπως ο

πόνος και η πείνα ενώ έρχονται αντιμέτωποι με θετικές εμπειρίες, όπως η ανάπτυξη κοινωνικών σχέσεων στις περιπτώσεις κοινωνικών ειδών.

Γίνεται λοιπόν κατανοητό πως στο χώρο των ιχθυοεκτροφών, έχει δημιουργηθεί η ανάγκη να αναγνωριστούν παράμετροι τέτοιες που θα μπορούν να εφαρμοστούν στην παρακολούθηση και αξιολόγηση της ευζωίας. Η ευζωία βελτιώνει το ποσοστό επιβίωσης και γενικά την ποιότητα των ιχθύων, μετατρέποντάς την σε ένα συνεχώς αναπτυσσόμενο εμπορικό ζήτημα (Pavlidis and Mylonas, 2011).

Δείκτες εύκολα αναγνωρίσιμοι και μετρήσιμοι για την αξιολόγηση της κατάστασης ευζωίας των ιχθύων έχουν προταθεί και περιλαμβάνουν: στρατηγική αναζήτησης τροφής, χρωματισμό, αναπνευστική δραστηριότητα, κολυμβητική δραστηριότητα του πληθυσμού της δεξαμενής και του ατόμου, μείωση της πρόσληψης τροφής, χαμηλός ρυθμός αύξησης, μορφολογικές ανωμαλίες, τραυματισμοί στο σώμα και τα πτερύγια, ασθένειες, χαμηλή αναπαραγωγικότητα, επιθετικότητα, στερεοτυπικά πρότυπα συμπεριφοράς (Huntingford et al., 2006; Martins et al., 2011). Σε συνδυασμό με αυτούς τους δείκτες υπάρχουν και άλλες παράμετροι που σχετίζονται με το περιβάλλον και τις συνθήκες κατά τη διαχείριση των εκτρεφόμενων ατόμων, όπως η ποιότητα του νερού, η ιχθυοπυκνότητα, οι χειρισμοί κα. Τέλος, η θανάτωση και όλες οι διαδικασίες με τις οποίες συνοδεύεται διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ευζωία των εκτρεφόμενων ιχθύων και την ποιότητα του τελικού προϊόντος (Pavlidis and Mylonas, 2011).

Οι «ανθρώπινες» ή μη βάνουσες (humane) μέθοδοι για τη θανάτωση των ζώων βασίζονται στην αρχή ότι το ζώο θανατώνεται γρήγορα, με ελάχιστο φόβο, πόνο και χωρίς να υποφέρει (FAWC, 1996). Ωστόσο, πολλές μέθοδοι θανάτωσης που εφαρμόζονται στις υδατοκαλλιέργειες έχουν αναπτυχθεί κατά τέτοιο τρόπο ώστε να επιτυγχάνουν τον έλεγχο της ποιότητας του προϊόντος, την αποδοτικότητα και την ασφάλεια του επεξεργαστή χωρίς όμως να δίνουν ιδιαίτερη προσοχή στην ελαχιστοποίηση του stress (Conte, 2004). Πλέον υπάρχει επαγρύπνηση στη βιομηχανία των υδατοκαλλιέργειών ως προς την ανάγκη να διασφαλισθεί ότι η διαδικασία της θανάτωσης είναι «ανθρώπινη», ότι πραγματοποιείται κάτω από «ανθρώπινες» συνθήκες, με τους ιχθύς να αναισθητοποιούνται πριν τη θανάτωση με μια μέθοδο που προκαλεί άμεση απώλεια συνείδησης και διαρκεί μέχρι και το θάνατο του ζώου (FAWC, 1996).

Για να πληρούνται τα παραπάνω σε μια τεχνική θανάτωσης, δύο είναι οι παράγοντες που εξετάζονται: (1) οι μέθοδοι χειρισμού των ιχθύων κατά τη μεταφορά τους στο χώρο που θα γίνει η θανάτωση μέχρι το σημείο της αναισθητοποίησής τους και (2) η αμεσότητα της απώλειας της συνείδησης που προκαλείται από τη μέθοδο της αναισθητοποίησης (Southgate and Wall, 2001; HSA, 2005). Η τεχνική της θανάτωσης θα πρέπει γενικά να είναι γρήγορη και να ακολουθεί την αναισθητοποίηση, ώστε να μη συμβεί επαναφορά συνείδησης στο ζώο.

Οι διαδικασίες πριν και κατά τη θανάτωση θεωρούνται από τις πιο σημαντικές στη διαχείριση της εκτροφής των ιχθύων (Wall, 2001). Κατά το τέλος της ζωής ενός ζώου, αν οι χειρισμοί που θα γίνουν πριν το θάνατό του και η μέθοδος θανάτωσης

πραγματοποιούνται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μην αποφεύγονται καταστάσεις που προκαλούν stress στο ζώο, τότε επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την έκφανση της ποιότητας κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του τελικού προϊόντος (Poli et al., 2005). 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. Αυτό το «rested harvesting» βελτιώνει την ποιότητα της σάρκας (HSA, 2005).

1.5 Τρόποι θανάτωσης ιχθύων

1.5.1 Ευζωία και τρόποι θανάτωσης

Η μέθοδος θανάτωσης πρέπει να επιλέγεται σύμφωνα με το είδος του ιχθύος και να σκοπεύει στην αναισθητοποίηση μέχρι το θάνατο χωρίς να υπεισέρχεται stress καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Οι μέθοδοι που προκαλούν άγχος και stress στα ψάρια θα πρέπει να αποφεύγονται (Poli, 2009) και αυτό διότι ελαχιστοποιώντας το προθανάτιο stress και χρησιμοποιώντας «ανθρώπινες» μεθόδους θανάτωσης βελτιώνεται η ποιότητα του προϊόντος (Robb et al., 2000; Southgate and Wall, 2001; Robb and Kestin 2002; Poli et al., 2005).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αναισθητοποίηση των ιχθύων θα πρέπει να προκαλούν άμεση ή γρήγορη απώλεια συνείδησης, χωρίς να υποφέρουν οι ιχθύες (EFSA, 2009). Βασικό μέλημα είναι η αναγνώριση του σταδίου όπου έχει απολεσθεί η συνείδηση ή έχει επέλθει ο θάνατος. Η αναγνώριση μπορεί να γίνει εργαστηριακά με χρήση εγκεφαλογραφήματος (Kestin et al., 2002), ή πρακτικά όταν έχει απολεσθεί η ισορροπία, έχουν σταματήσει οι αναπνευστικές κινήσεις, οι οφθαλμοί δεν κινούνται και έχει απολεσθεί η αντίδραση σε ερεθίσματα που προκαλούν πόνο (EFSA, 2009).

Οι μέθοδοι αναισθητοποίησης/θανάτωσης των εκτρεφόμενων ιχθύων που εφαρμόζονται είναι:

- Ασφυξία στον αέρα (asphyxia in air)
- Μεταφορά στον πάγο (live chilling)
- Παγόνερο (ice/ water slurry)
- Αναισθητοποίηση με χρήση ηλεκτρικού ρεύματος (electrical stunning)
- Νάρκωση με χρήση CO₂ ή μίγμα άλλων αερίων (gas mixture)
- Αναισθητοποίηση με κρουστικό πλήγμα (percussive stunning)
- Spiking
- Έκθεση σε υπερδοσολογία αναισθητικού (overdose of anesthetic)

Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι η τελευταία μέθοδος είναι εγκεκριμένη μόνο στην περίπτωση της θανάτωσης «έκτακτης ανάγκης» (EFSA, 2009). Η θανάτωση «έκτακτης ανάγκης» εφαρμόζεται μόνο σε έκτακτες περιπτώσεις, όπως ο έλεγχος της εξάπλωσης ασθένειας. Οι ιχθύες που θανατώνονται κατ' αυτόν τον τρόπο δεν προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση.

Οι τρόποι θανάτωσης για την τσιπούρα που χρησιμοποιούνται σήμερα στις υδατοκαλλιέργειες είναι η εισαγωγή στο παγόνερο (υποθερμία- ασφυξία), η ασφυξία στον αέρα, το κρουστικό πλήγμα, η αναισθητοποίηση με ηλεκτρικό ρεύμα στην

περιοχή της κεφαλής (van de Vis et al., 2003), με την εισαγωγή στο παγόνερο να αποτελεί τη μέθοδο που χρησιμοποιείται περισσότερο (Huidobro et al., 2000).

Η ασφυξία στον αέρα χαρακτηρίζεται από μεγάλη χρονική περίοδο κατά την οποία ο ιχθύς υποφέρει μέχρι να πεθάνει. Ο χρόνος αυτός εξαρτάται από την ανθεκτικότητα που έχει κάθε ιχθύς στην υποξία και ποικίλει από είδος σε είδος. Δε θεωρείται «ανθρώπινη» μέθοδος και προκαλεί μεγάλες αλλαγές στην ποιότητα της σάρκας (Poli et al., 2005).

Με την εισαγωγή στο παγόνερο οι ιχθύες πεθαίνουν από υποθερμία και ανοξία. Ο χρόνος που μεσολαβεί μέχρι το θάνατο μπορεί να φτάσει στα 20-40min για την τσιπούρα. Στα είδη της Μεσογείου (κυρίως τσιπούρα και λαβράκι) συγκριτικές μελέτες έδειξαν ότι αυτή η μέθοδος δεν είναι ιδιαίτερα στρεσογόνα αν συγκριθεί με την ασφυξία στον αέρα (Bagni et al., 2002; Zampacavallo et al., 2003).

Βέβαια, σε ό,τι αφορά την ασφυξία στην τσιπούρα, ούτε η μεταφορά των ιχθύων στον αέρα ή στο παγόνερο (0,05°C) από τους 23°C δεν φάνηκε να οδήγησαν σε άμεση διακοπή της λειτουργίας του εγκεφάλου, ενώ απόπειρες διαφυγής ήταν ορατές και για τις δύο μεθόδους (van de Vis et al., 2003). Τα δεδομένα πάνω στην εμφάνιση της νεκρικής ακαμψίας δείχνουν ότι και οι δύο μέθοδοι είναι εξαιρετικά στρεσογόνες διαδικασίες, με την ασφυξία στον αέρα να θεωρείται ως ο πιο στρεσογόνος τρόπος θανάτωσης συγκρινόμενος με το κρουστικό πλήγμα (Erikson et al., 1997; Ottera et al., 2001).

Όσο αφορά το κρουστικό πλήγμα, η διαδικασία επιτυγχάνεται με χρήση ειδικού εργαλείου που χτυπά απ' ευθείας το κεφάλι του ιχθύος παύοντας άμεσα κάθε εγκεφαλική λειτουργία. Συνεπώς, η μέθοδος αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί «ανθρώπινη» (van de Vis et al., 2003).

Σε πειράματα αναισθητοποίησης με ηλεκτρικό ρεύμα στην περιοχή της κεφαλής μόνο το 1/10 των ιχθύων παρουσίασε άμεση διακοπή της εγκεφαλικής λειτουργίας, ενώ για να επιτευχθεί αναισθησία βρέθηκε ότι απαιτείται ένταση ηλεκτρικού ρεύματος πάνω από 200mA (van de Vis et al., 2003).

Συνοψίζοντας, οι μέθοδοι θανάτωσης που εφαρμόζονται σήμερα για τα εκτρεφόμενα είδη ιχθύων στις περισσότερες περιπτώσεις δε συνάδουν με τον όρο «ανθρώπινος» (Robb, 2001). Για την τσιπούρα ούτε η ασφυξία στον αέρα ούτε και η μεταφορά στο παγόνερο δε μπορούν να χαρακτηριστούν ως «ανθρώπινες» μέθοδοι θανάτωσης καθώς δεν προκαλούν άμεση διακοπή των λειτουργιών του εγκεφάλου αλλά επιπρόσθετα παρατηρούνται βίαιες κινήσεις διαφυγής από τους ιχθύς. Αντίθετα, οι μέθοδοι με κρουστικό πλήγμα στο κεφάλι ή χρήση ηλεκτρικού ρεύματος στο κεφάλι συνάδουν με τον όρο «ανθρώπινος», όμως ακόμα δεν έχουν δημιουργηθεί οι κατάλληλες συνθήκες για την εφαρμογή μιας τέτοιας μεθόδου για το σύνολο των ιχθύων με μικρό μέγεθος όπως τα περισσότερα Μεσογειακά είδη. Παρ' όλα αυτά, έχει βρεθεί ότι η ποιότητα του ιχθύος που προέρχεται από θανάτωση με κρουστικό πλήγμα, είναι παρόμοια με αυτή της μεθόδου της εισαγωγής στο παγόνερο (van de Vis et al., 2003). Επιπλέον, ο συνδυασμός της αναισθητοποίησης με γαρυφαλέλαιο που

ακολουθείται από εισαγωγή στο παγόνερο στο λαβράκι φαίνεται ότι βελτιώνει την ποιότητα της σάρκας και συνάδει με το γενικότερο πλαίσιο της ευζωίας (Simitzis et al., 2013).

1.5.2 Ποιότητα σάρκας μετά τη θανάτωση

Για να διασφαλισθεί η βέλτιστη ποιότητα οι ιχθύες πρέπει να αναισθητοποιούνται μέχρι τη στιγμή του θανάτου και να θανατώνονται χωρίς stress, με μεθόδους που βασίζονται σε πρακτικά ζητήματα (Poli et al., 2005). Τα στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η δραστηριότητα κατά τη θανάτωση επηρεάζει την ποιότητα της σάρκας συνεχώς αυξάνονται. Μεγαλύτερη δραστηριότητα λίγο πριν το θάνατο συνεπάγεται σε μια δραστική μείωση του pH των μυών καθώς ο μεταβολισμός των μυών είναι αναερόβιος με αποτέλεσμα την παραγωγή γαλακτικού οξέος (Lowe et al., 1993).

Οι Lowe et al. (1993) έδειξαν ότι τα ψάρια με έντονη δραστηριότητα κατά τη θανάτωσή τους είχαν ταχύτερη μείωση του pH του μυός. Όταν ο μυς επιδειχνει μεγάλη λειτουργία κατά τη θανάτωση τότε οδηγείται σε δραστική μείωση των αποθεμάτων ενέργειας. Αυτό γίνεται με την κατανάλωση του μορίου της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) καθώς και με αύξηση του γαλακτικού οξέος που παράγεται κατά τον αερόβιο μεταβολισμό του μυός, με επακόλουθη μείωση του pH του μυός μετά το θάνατο. Συνεπώς, οι ιχθύες που είναι πολύ δραστήριοι κατά τη θανάτωση εισέρχονται στη φάση της νεκρικής ακαμψίας πιο γρήγορα (Erikson et al., 1997), επηρεάζοντας τελικά την ποιότητα του φιλέτου (Lowe et al., 1993; Robb et al., 2000) ως αποτέλεσμα της αλλοίωσης της υφής του μυός (Robb et al., 2000).

Οι τρόποι θανάτωσης θα έπρεπε να προκαλούν γρήγορη και μη αναστρέψιμη απώλεια συνείδησης. Όταν οι ιχθύες θανατώνονται με έναν τέτοιο τρόπο, το stress μπορεί να μειωθεί βελτιώνοντας ταυτόχρονα την ευζωία και την ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος (Ottera et al., 2001). Χαμηλή δραστηριότητα των μυών επιτυγχάνεται με μεθόδους θανάτωσης που προκαλούν άμεση αναισθησία όπως το striking του εγκεφάλου (Boyd et al., 1984) και το κρουστικό πλήγμα στο κεφάλι (Ottera et al., 2001). Όμως, τέτοιες μέθοδοι δεν είναι εύκολα προσαρμόσιμες σε εμπορικό επίπεδο διότι αυξάνουν το κόστος παραγωγής, καθώς απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και διάθεση πολλαπλάσιου χρόνου για τη διαδικασία της θανάτωσης (Bagni et al., 2007).

1.5.3 Δείκτες stress μετά τη θανάτωση

Συνοπτικά, οι δείκτες που χρησιμοποιούνται στην αξιολόγηση του stress είναι οι εξής (Poli, 2009): δείκτες συμπεριφοράς, δείκτες στο αίμα (κορτιζόλη, γλυκόζη, γαλακτικό οξύ, αιματοκρίτης, ελεύθερα λιπαρά οξέα, ROMs-reactive oxygen metabolites-, AOP, HSP70 και HSP90) και δείκτες στους ιστούς (γαλακτικό οξύ και pH, ATP, ATP/IMP, AEC, K value και φάσεις της νεκρικής ακαμψίας).

Πειράματα που έχουν γίνει στην τσιπούρα φανερώνουν ότι όταν επιδρά ένας παράγοντας που προκαλεί οξύ stress ενεργοποιείται μια άμεση έκκριση κατεχολαμινών

που ακολουθείται από έκκριση κορτιζόλης η οποία παραμένει στην κυκλοφορία 3-4 ώρες πριν επανέλθει η συγκέντρωσή της στα προηγούμενα επίπεδα (Kelly and Woo, 1999). Ωστόσο, οι κατεχολαμίνες του πλάσματος δε χρησιμοποιούνται ως δείκτης stress διότι παρουσιάζουν δυσκολία στην ποσοτικοποίησή τους καθώς απομακρύνονται γρήγορα από την αιματική κυκλοφορία (Wendelaar Bonga, 1997). Αντίθετα, η κορτιζόλη είναι η ορμόνη που χρησιμοποιείται κατ' εξοχήν ως δείκτης stress (Pickering and Pottinger, 1995). Επιπλέον, λόγω της ευκολίας που υπάρχει στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα, αυτή χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης stress (Barry et al., 1993).

Η αύξηση του καρδιακού παλμού και της ανάγκης για οξυγόνο έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση των ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία, συνεπώς και της τιμής του αιματοκρίτη. Αυτή η τιμή χρησιμοποιείται επίσης ως δείκτης stress καθώς είναι απλό να προσδιοριστεί (Poli, 2009).

Η αυξημένη δραστηριότητα των μυών, το stress κατά τη θανάτωση μαζί με την αντίστοιχη ορμονική απάντηση επηρεάζουν τις μεταθανάτιες βιοχημικές διεργασίες, κυρίως την αναερόβια γλυκόλυση και τη διάσπαση του ATP. Αυτές με τη σειρά τους επηρεάζουν την αρχή και το τέλος της νεκρικής ακαμψίας, η οποία καθορίζει τελικά και τη φρεσκάδα του ψαριού (Poli et al., 2005). Δείκτες της λειτουργίας των μυών είναι η αύξηση του γαλακτικού οξέος και η μείωση του pH κατά το πρώτο 24ωρο διότι σχετίζονται με την αναερόβια γλυκόλυση που γίνεται στους μύς πριν το θάνατο (Lowe et al., 1993; Robb and Warriss, 1997).

Τέλος, πρόσφατα έχουν χρησιμοποιηθεί τα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών (ντοπαμίνη, νοραδρεναλίνη, σεροτονίνη και μεταβολίτες αυτών) στον εγκέφαλο των ιχθύων, ως δείκτες stress στο λαβράκι για την αξιολόγηση της επίδρασης διαφορετικών χειρισμών αναισθητοποίησης ή/και θανάτωσης, δίνοντας σημαντικά αποτελέσματα (Miliou et al., 2011; Tsopelakos et al., 2011).

1.6 Αναισθησία

Ως αναισθησία ορίζεται η κατάσταση της ελεγχόμενης και αντιστρέψιμης απώλειας «συνείδησης», κατά την οποία υπάρχει μειωμένη κινητικότητα και αντίληψη (Iwama and Ackerman, 1994). Χρησιμοποιείται στις υδατοκαλλιέργειες με σκοπό τη μείωση του stress και των τραυματισμών κατά τη διάρκεια χειρισμών όπως οι διαλογές, οι μεταφορές, ο εμβολιασμός και η θανάτωση (Iwama and Ackerman, 1994; Coyle et al., 2004; King et al., 2005; Mylonas et al., 2005).

Με τον όρο «χρόνος επαγωγής» (induction time) ορίζεται ο χρόνος, σε λεπτά, που απαιτείται μέχρι να επιτευχθεί κάποιο συγκεκριμένο στάδιο αναισθησίας. Ως «χρόνος έκθεσης» (exposure time) λογίζεται ο συνολικός χρόνος έκθεσης των ιχθύων στον αναισθητικό παράγοντα. Τέλος, ο «χρόνος επαναφοράς» (recovery time) αντιστοιχεί στο χρόνο που απαιτείται για την επανάκτηση πλήρους κολυμβητικής ικανότητας ύστερα από μεταφορά σε καθαρό νερό.

Η αναισθησία επιτυγχάνεται με χρήση αναισθητικών ουσιών, ηλεκτρικού ρεύματος ή πάγου/κρύου νερού (υποθερμία). Οι αναισθητικές ουσίες συνήθως διαλύονται στο νερό εκτροφής και οι ιχθύες εμβαπτίζονται σε αυτό (Bowser, 2001; Ross and Ross, 2008).

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι αυτή της διάλυσης του αναισθητικού παράγοντα σε υδατικό διάλυμα (Ross and Ross, 2008; Sneddon, 2012). Το διάλυμα εισέρχεται στον οργανισμό του ιχθύος κυρίως μέσω των βραγχίων και δευτερευόντως από το δέρμα. Τα μόρια του αναισθητικού διαχέονται γρήγορα στην αιματική κυκλοφορία και συγκεκριμένα στο αρτηριακό αίμα και εισέρχονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όπου καταστέλλουν τη μεταφορά μηνυμάτων από τους νευρώνες. Αφού οι ιχθύες μεταφερθούν σε καθαρό νερό, το αναισθητικό απομακρύνεται από τον οργανισμό κυρίως από τα βράγχια και δευτερευόντως από το δέρμα και τους νεφρούς (Ross and Ross, 2008; Brown, 2011).

Η δράση μιας αναισθητικής ουσίας επηρεάζεται από μια σειρά παράγοντες. Κύριο ρόλο παίζει η συγκέντρωση του αναισθητικού και ο χρόνος έκθεσης σε αυτό. Συνήθως μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αντιστοιχούν σε μικρούς χρόνους επαγωγής και μεγάλους χρόνους επαναφοράς. Άλλοι παράγοντες είναι το είδος του ιχθύος, το μέγεθος, το βιολογικό του στάδιο, ο ρυθμός μεταβολισμού και η φυσιολογική του κατάσταση (stress, ασθένειες) (Brown, 2011). Επίσης, ένας ακόμα παράγοντας είναι η περιεκτικότητα του ιχθύος σε λίπος σε συνδυασμό με τη λιποδιαλυτότητα του αναισθητικού (Coyle et al., 2004; Sneddon, 2012). Ταυτόχρονα, περιβαλλοντικοί παράγοντες, κυρίως τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού μπορούν να επηρεάσουν το ρυθμό μεταβολισμού και τη φαρμακοκινητική της αναισθητικής ουσίας (Ross and Ross, 2008; Brown 2011).

Η αναισθησία μπορεί να χωριστεί σε τρία βασικά στάδια, το στάδιο της επαγωγής (induction), το στάδιο της παραμονής (maintenance) και το στάδιο της επαναφοράς (recovery) (Iwama et al., 1989; Iwama and Ackerman, 1994; Coyle et al., 2004; Ross and Ross, 2008). Όταν η επαγωγή, δηλαδή η χρονική περίοδος από την έκθεση του οργανισμού στον αναισθητικό παράγοντα μέχρι την απώλεια της συνείδησής του, γίνεται με αργό ρυθμό τότε μπορούν να διακριθούν επιμέρους στάδια με βάση τη συμπεριφορά των ιχθύων (Πίνακας 1). Με βάση αυτά τα στάδια αξιολογείται η πορεία της αναισθησίας στους ιχθύς (Schoettger and Julin, 1967; Iversen et al., 2003; Bosworth et al., 2007; Erikson et al., 2012).

Πίνακας 1.1: Τα στάδια της αναισθησίας στους ιχθύς (από 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, μικρή μείωση στις βραγχιακές κινήσεις, φυσιολογική ισορροπία
3 ^α	Μερική απώλεια ισορροπίας	Μερική απώλεια του μυϊκού τόνου, ασταθής κολύμβηση, αυξημένος αναπνευστικός ρυθμός, αντίδραση μόνο σε τακτικά ερεθίσματα δονήσεων
3 ^β	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

Ο ιδανικός αναισθητικός παράγοντας φέρει τα εξής χαρακτηριστικά (Marking and Meyer, 1985; Iwama and Ackerman, 1994; Coyle et al., 2004; Ross and Ross, 2008; Brown, 2011):

- Ο χρόνος επαγωγής είναι σύντομος, (1-3 λεπτά) και συνοδεύεται από εμφάνιση ελάχιστης υπερδραστηριότητας ή stress.
- Η επαναφορά γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα (<5 λεπτά ή <15 λεπτά μετά από έκθεση 10 λεπτών) και δεν περιλαμβάνει ανεπιθύμητες παρενέργειες. Επίσης, δεν προκαλείται θάνατος μετά από παραμονή 15 λεπτών στο αναισθητικό.
- Το αναισθητικό ή η μέθοδος αναισθησίας χορηγείται εύκολα χωρίς πολύπλοκες διαδικασίες. Η αναισθητική ουσία είναι ευδιάλυτη στο νερό ή σε υδατικά διαλύματα.
- Διατηρεί τα ζώα στην επιλεγμένη κατάσταση παρέχοντας ακινητοποίηση και αναλγησία.
- Είναι αποτελεσματικός σε χαμηλές δόσεις και η τοξική δόση απέχει πολύ από τη δραστική δόση παρέχοντας ένα μεγάλο όριο ασφαλείας.
- Είναι ασφαλής για το χρήστη στις δόσεις που χρησιμοποιείται χωρίς να είναι ερεθιστικός ή καρκινογόνος.

- Η προμήθειά του από τη χονδρική αγορά είναι εύκολη και το κόστος είναι χαμηλό.
- Η δραστηκότητά του παραμένει σταθερή στα διαλύματα εργασίας πάνω από 24 ώρες και είναι χημικά σταθερή για ένα εύλογο διάστημα αποθήκευσης.
- Απομακρύνεται γρήγορα από τον οργανισμό χωρίς υπολείμματα σε ιστούς, έχοντας μηδενικό (ή μικρό) χρόνο αναμονής πριν τη διάθεση του προϊόντος για κατανάλωση.

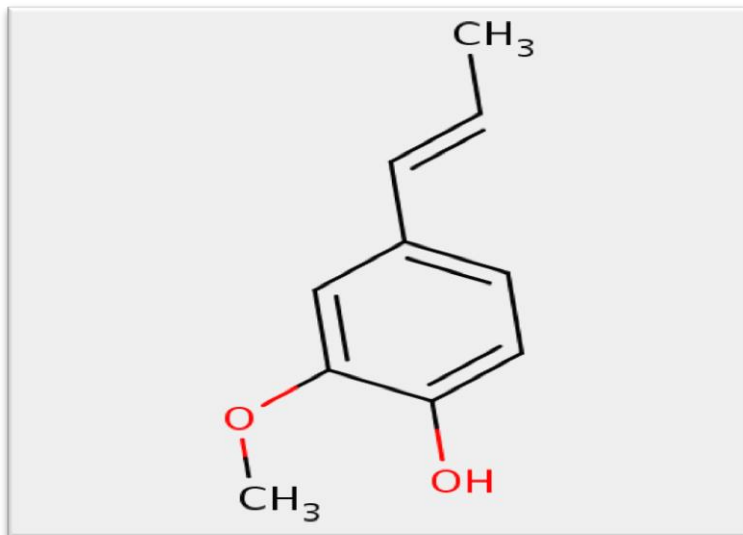
Τα χημικά αναισθητικά που χρησιμοποιούνταν μέχρι πρόσφατα ευρέως στις υδατοκαλλιέργειες είναι το MS-222, η βενζοκαΐνη, το γαρυφαλέλαιο, η 2-phenoxyethanol, η quinaldine και το παράγωγό της quinaldine sulphate, και το metomidate/ etomidate. Κανένα όμως από τα προαναφερθέντα δεν πληρεί όλες τις προϋποθέσεις του «ιδανικού» αναισθητικού. Επιπρόσθετα, από αυτά μόνο το MS-222 χρησιμοποιείται νόμιμα σε παγκόσμια κλίμακα στις υδατοκαλλιέργειες (Ross and Ross, 2008), έχοντας όμως ταυτόχρονα χρόνο αναμονής (withdrawal time) 21 ημερών σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA). Η έλλειψη ενός αναισθητικού παράγοντα με μηδενικό χρόνο αναμονής έστρεψε τις έρευνες προς την αναζήτηση ενός αναισθητικού ιχθύων προοριζομένων για κατανάλωση με μηδενικό χρόνο αναμονής.

Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες έχουν στραφεί προς τη χρήση του γαρυφαλέλαιου ως αναισθητικού παράγοντα. Το γαρυφαλέλαιο εκχυλίζεται από τα άνθη, τους βλαστούς και τα φύλλα του φυτού *Eugenia caryophyllata* και η δραστική του ουσία είναι η ευγενόλη (70–90%). Το έλαιο όμως περιέχει επιπλέον, ακετυλο-ευγενόλη, καθώς και μια πληθώρα τερπενοειδών που προσδίδουν τη χαρακτηριστική μυρωδιά και γεύση. Είναι ευδιάλυτο στο νερό σε υψηλές θερμοκρασίες ύστερα από έντονη ανάδευση, ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες προηγείται η διάλυσή του σε διάλυμα 10% αιθανόλης. Αν και προσδίδει αποτελεσματική αναισθησία σε χαμηλές συγκεντρώσεις, δε συνίσταται η χρήση του στη θανάτωση των ιχθύων που προορίζονται για κατανάλωση λόγω της έντονης οσμής που αποκτά η σάρκα.

Στα πλεονεκτήματά του συγκαταλέγονται ότι είναι αρκετά οικονομικό, είναι εύχρηστο και ταυτόχρονα προκαλεί ελάχιστες παρενέργειες στον άνθρωπο, όταν χρησιμοποιείται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Είναι χαρακτηρισμένο ως GRAS (Generally Regarded as Safe) από FDA για χρήση στην οδοντιατρική και ως ενισχυτικό γεύσης στις τροφές που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο και τα ζώα. Εν τούτοις, η χρήση του ως αναισθητικό για ιχθύς δεν έχει εγκριθεί ακόμα και παραμένει υπό έλεγχο, έχοντας χρόνο αναμονής 21 ημέρες. Σε αυτή την καθυστέρηση έχει συμβάλει η παραλλακτικότητα της χημικής του σύστασης καθώς και τα αποτελέσματα ερευνών που αποδεικνύουν ότι η ευγενόλη και η μεθυλο-ευγενόλη μπορεί να έχουν επίδραση στην καρκινογένεση (Waddell et al., 2004).

Τα πλεονεκτήματα του γαρυφαλέλαιου οδήγησαν στην ανάπτυξη από την εταιρεία AQUI-S New Zealand Ltd, ενός νέου αναισθητικού ιχθύων, του AQUI-S[®], του οποίου η δραστική ουσία είναι η ισοευγενόλη (Εικόνα 1.4). Μέχρι στιγμής το προϊόν έχει αδειοδοτηθεί για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες με μηδενικό χρόνο αναμονής στη

Νέα Ζηλανδία, την Αυστραλία, τη Χιλή, την Ονδούρα, την Κόστα Ρίκα, την Κορέα και τα νησιά Φαρόε (στοιχεία από την εταιρεία). Πρόσφατα (Μάιος 2013) το προϊόν έλαβε άδεια στη Νορβηγία για χρήση στις εκτροφές του σολομού και της ιριδίζουσας πέστροφας.



Εικόνα 1.4 : Δομή της ισοευγενόλης (<http://www.hmdb.ca>)

Η ισοευγενόλη (4-hydroxy-3-methoxy-1-propen-1-yl benzene) είναι μια φαινολική ένωση που παράγεται από την ευγενόλη. Χρησιμοποιείται στα τρόφιμα ως ενισχυτικό γεύσης αλλά και ως έκδοχο σε προϊόντα κοσμετολογίας και καθαριστικά (HERA, 2005). Έχει χαρακτηριστεί από τον FDA ως GRAS (Generally Regarded as Safe), δηλαδή γενικώς ασφαλές, για τη χρήση του στα τρόφιμα ως ενισχυτικό γεύσης. Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων θέσπισε το 2011 ως ανώτατο όριο ημερήσιας πρόσληψης της ισοευγενόλης για τον άνθρωπο τα 4500 μg/άτομο. Ταυτόχρονα, θεσμοθετήθηκε με τον κανονισμό 363/2011 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής το ανώτερο όριο των καταλοίπων της ισοευγενόλης στους ιχθύς. Συγκεκριμένα, στο φιλέτο και το δέρμα των ιχθύων (σε φυσιολογική αναλογία) το ανώτερο επιτρεπτό όριο είναι τα 6000 μg/kg.

Το προϊόν περιέχει ισοευγενόλη σε αναλογία 54% και polysorbate 80 (sorbitan mono-9-octadecanoate poly (oxy-1,2-ethanediyl) derivatives) που δρα ως γαλακτωματοποιητής. Είναι ένα διαυγές υγρό, κίτρινης χροιάς, με μεγάλο ιξώδες. Και οι δύο ουσίες χαρακτηρίζονται από FDA ως GRAS και δεν απαιτούν χρόνο αναμονής. Το AQUI-S[®] έχει υπαχθεί στην κατηγορία INAD (Investigative New Animal Drug) και αναμένεται η απόφαση του οργανισμού για την έγκριση της χρήσης του ως αναισθητικό ιχθύων.

1.7 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι η διερεύνηση της χρήσης της ισοευγενόλης στην αναισθητοποίηση και θανάτωση της τσιπούρας εμπορικού μεγέθους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό προϊόν AQUI-S[®], το οποίο περιέχει κατά 54% ισοευγενόλη.

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά τέσσερα πειράματα, χωρισμένα σε δύο πειραματικές περιόδους. Κατά την πρώτη πειραματική περίοδο, στο πρώτο πείραμα μελετήθηκε η επίδραση του σωματικού βάρους στο χρόνο επαγωγής στο στάδιο 5 της αναισθησίας (σύμφωνα με τον Πίνακα 1.1), σε ένα φάσμα συγκεντρώσεων 30-110 ppm AQUI-S[®]. Ταυτόχρονα μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του AQUI-S[®] στο χρόνο επαγωγής και το χρόνο επαναφοράς. Στο δεύτερο πείραμα καθορίστηκε ο μέσος απαιτούμενος χρόνος έκθεσης (χρόνος επαγωγής στο στάδιο 4 της αναισθησίας) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του AQUI-S[®], για τη διενέργεια αιμοληψίας.

Κατά τη δεύτερη πειραματική περίοδο αξιολογήθηκε το stress που προκαλείται από την έκθεση των ιχθύων σε τρεις συγκεντρώσεις του AQUI-S[®], στο στάδιο αναισθησίας 4 και συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος και του. Στο τέταρτο πείραμα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ της θανάτωσης των ιχθύων με εισαγωγή στο παγόνερο και της θανάτωσης στο παγόνερο όπου προηγήθηκε η αναισθητοποίησή τους για προκαθορισμένο χρόνο σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AQUI-S[®]. Για τη σύγκριση αυτή προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της γλυκόζης του πλάσματος και του αιματοκρίτη ως δείκτες stress αλλά και του pH του φιλέτου ως δείκτη ποιότητας.

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Πειραματικές εγκαταστάσεις

Όλοι οι πειραματικοί χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε δεξαμενές που αποτελούν τμήμα ημίκλειστου κυκλώματος θαλασσινού νερού στο Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το κύκλωμα περιελάμβανε μηχανικό και βιολογικό φίλτρο για τον καθαρισμό του νερού εκτροφής καθώς και σύστημα αποστείρωσης του νερού μέσω λαμπτήρων υπεριώδους ακτινοβολίας για τη μείωση του μικροβιακού φορτίου.

Οι δεξαμενές του κυκλώματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 2 τύπων ανάλογα με τον όγκο τους, οι μικρές διαστάσεων 44cm(M) *45 cm(Π) *40 cm(Y), ήτοι 79,2 L και οι μεγάλες με διαστάσεων 69cm(M) *65 cm(Π) *40 cm(Y), ήτοι 124,2 L.

Κάθε δεξαμενή διέθετε σωλήνα εισροής νερού με ρυθμιζόμενη παροχή, σωλήνα εκροής νερού και σύστημα παροχής ατμοσφαιρικού αέρα. Η παροχή του νερού ρυθμίστηκε έτσι ώστε σε κάθε δεξαμενή να πραγματοποιείται ανανέωση 1,5 φορές ανά ώρα του συνολικού της όγκου και ελέγχονταν τουλάχιστον 2 φορές εβδομαδιαίως. Το σύστημα παροχής αέρα περιελάμβανε ελαστικό σωλήνα μικρής διατομής που κατέληγε σε μια βυθιζόμενη αερόπετρα για τη διάσπαση του αέρα σε μικροσκοπικές φυσαλίδες και την αποτελεσματικότερη διάχυσή του στο νερό.

Ο φωτισμός των δεξαμενών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πολλαπλών λαμπτήρων φωτισμού στην οροφή της αίθουσας εκτροφής, ενώ η φωτοπερίοδος διατηρήθηκε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (12 ώρες φως- 12 ώρες σκοτάδι).

Η αλατότητα του νερού καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος παρέμεινε σταθερή και ήταν ίδια σε όλες τις δεξαμενές (μέσος όρος± τυπική απόκλιση= 31,94±0,70 ‰).

2.2 Καθημερινοί χειρισμοί

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιούνταν σε προκαθορισμένα τακτικά χρονικά διαστήματα και κάτω από τις ίδιες συνθήκες για την ελαχιστοποίηση πρόκλησης stress στους ιχθύες.

2.2.1 Χορήγηση τροφής

Η χορήγηση της τροφής πραγματοποιούνταν με το χέρι σε ένα γεύμα ανά ημέρα ακολουθώντας σταθερή ώρα σίτισης. Η τροφή που χορηγήθηκε ήταν η Style B (IRIDA S.A.) σε μορφή συμπύκτων διαμέτρου 4,5. Κατά την πρώτη πειραματική περίοδο η χορήγηση της τροφής περιορίστηκε στις 3 φορές εβδομαδιαίως. Στους πληθυσμούς της δοκιμασίας της αιμοληψίας αλλά και της τελικής δειγματοληψίας η χορήγηση της τροφής γίνονταν καθημερινά. Σε κάθε περίπτωση η ποσότητα της τροφής ήταν στα επίπεδα του κορεσμού.

Πριν από κάθε χειρισμό (αναισθητοποίηση, ζύγιση, μεταφορά, αιμοληψία) προηγούνταν ασιτία 48h. Η εφαρμογή της ασιτίας πριν από κάποιο χειρισμό εξυπηρετεί ώστε να εκκενωθεί ο πεπτικός σωλήνας, να μειωθεί ο μεταβολισμός και η ανάγκη για κατανάλωση οξυγόνου καθώς και να μειωθεί η παραγωγή αποβλήτων. Πέρα από τη συνεισφορά της στην ευζωία, αυτή η μείωση του μεταβολισμού επιδρά στην ποιότητα της σάρκας (Gines et al., 2002; Alvarez et al., 2008).

2.2.2 Καταγραφή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού

Πριν από τη χορήγηση της τροφής, λαμβάνονταν μετρήσεις των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού (pH, αλατότητα, θερμοκρασία, δεσμευμένο οξυγόνο στο νερό) σε κάθε δεξαμενή ξεχωριστά. Το δεσμευμένο οξυγόνο (DO, ppm και % κορεσμού) καθώς και η θερμοκρασία (σε °C) προσδιορίζονταν με τη χρήση φορητού οξυγονόμετρου με ενσωματωμένο ψηφιακό θερμόμετρο (Oxyguard Handy Gamma). Η μέτρηση του pH γινόταν με χρήση φορητού μετρητή (Oxyguard Handy pH) και της αλατότητας με χρήση διαθλασίμετρου.

Επίσης, ανά δύο ημέρες λαμβάνονταν δείγματα νερού από κάθε πειραματική δεξαμενή. Τα δείγματα νερού φιλτράρονταν σε διηθητικό χαρτί για την απομάκρυνση αιωρούμενων σωματιδίων, ομαδοποιούνταν ανά δεξαμενή και ανά εβδομάδα και φυλάσσονταν σε πλαστικές φιάλες στην κατάψυξη στους -20 °C. Ύστερα από απόψυξη χρησιμοποιούνταν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων (NO₂⁻, ppm) και της ολικής αμμωνίας (NH₃/NH₄⁺, ppm). Ο προσδιορισμός τους πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτομετρικές μεθόδους (Greenberg et al., 1992b, 1992c).

Η συγκέντρωση της τοξικής αμμωνίας στο θαλασσίνο νερό υπολογίστηκε από το μαθηματικό τύπο (Bower and Bidwell, 1978):

$$\text{Τοξική NH}_3 = [\text{ολική αμμωνία}] \times \frac{1}{1 + \text{anti log}[pK_a S(T) - pH]} \text{ ppm}$$

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

$pK_a S(T) = pK_a S(T=298 \text{ }^\circ\text{K}) + 0.0324 (298-T \text{ }^\circ\text{K})$

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

T = θερμοκρασία σε °K

2.2.3 Έλεγχοι- Καθαρισμοί

Κάθε πρωί γινόταν έλεγχος σε όλες τις δεξαμενές για νεκρούς ιχθύς και τραυματισμούς. Ταυτόχρονα, σε κάθε δεξαμενή ελέγχονταν η σωστή λειτουργία της αερόπετρας, η παροχή του νερού και τυχόν διαρροές που εμφανίζονταν στο κύκλωμα.

Ύστερα από διάστημα αναμονής μισής ώρας από τη χορήγηση του σιτηρεσίου, απομακρύνονταν τα υπολείμματα της τροφής με σιφωνισμό. Κατόπιν, καθαρίζονταν τα μηχανικά φίλτρα του συστήματος καθαρισμού όλου του κυκλώματος, καθώς και τα μικρά ινώδη πλέγματα από υαλοβάμβακα που ήταν τοποθετημένα κάτω από την παροχή του νερού των δεξαμενών, με σκοπό τη μείωση του οργανικού φορτίου και των αιωρούμενων σωματιδίων.

Επιπλέον, μία φορά την εβδομάδα πραγματοποιούνταν καθαρισμός των δεξαμενών με χρήση σπόγγου στα εσωτερικά τοιχώματα της δεξαμενής ώστε να απομακρυνθούν τα οργανικά κατάλοιπα από τις επιφάνειες. Ταυτόχρονα, απορρίπτονταν το 40% όγκου νερού των δεξαμενών. Η αναπλήρωση του απορριπτόμενου όγκου νερού και του όγκου νερού που εξατμίζονταν, πραγματοποιούνταν με καθαρό νερό που προερχόταν από εφεδρική δεξαμενή.

2.3 Αναισθητικό μπάνιο

2.3.1 Προετοιμασία του stock solution

Λόγω της χαμηλής διαλυτότητας που έχει το προϊόν στο νερό πρέπει να προηγηθεί η δημιουργία ενός stock solution, σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρίας. Το stock solution θα περιέχει την απαιτούμενη ποσότητα του AQUI-S[®] διαλυμένο σε νερό και θα είναι έτοιμο προς ανάμιξη με το νερό της δεξαμενής αναισθητοποίησης.

Αρχικά καθορίζεται η επιθυμητή συγκέντρωση του AQUI-S[®] και λαμβάνοντας υπόψη τον όγκο της δεξαμενής που θα γίνει η αναισθητοποίηση, υπολογίζεται το βάρος του απαιτούμενου συμπυκνωμένου προϊόντος. Σε ζυγό ακριβείας τοποθετείται μια γυάλινη φιάλη (χωρίς το πάμα) και ακολουθεί μηδενισμός του οργάνου. Εισάγεται προσεκτικά η ακριβής ποσότητα του προϊόντος και στη συνέχεια προστίθεται δεκαπλάσια ποσότητα απεσταγμένου νερού, σύμφωνα πάντα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Τέλος, η φιάλη πωματίζεται και αναδεύεται έντονα μέχρι το διάλυμα να αποκτήσει έντονη γαλακτώδη εμφάνιση.

2.3.2 Προετοιμασία της δεξαμενής αναισθητοποίησης

Στη δεξαμενή αναισθητοποίησης εισάγεται νερό από το κύκλωμα των δεξαμενών εκτροφής, ώστε να διατηρεί τα ίδια χαρακτηριστικά του νερού. Επίσης, προστίθεται σύστημα παροχής αέρα για την ανάδευση και οξυγόνωση του νερού. Η χορήγηση του διαλύματος του αναισθητικού πραγματοποιείται πάνω από την αερόπετρα, ώστε να υπάρχει αποτελεσματική διάχυση σε όλο τον όγκο του νερού. Η φιάλη του αναισθητικού ξεπλένεται επανειλημμένως ώστε όλη η ποσότητα του AQUI-S[®] να μεταφερθεί στη δεξαμενή.

2.4 Α' Πειραματική περίοδος

Από τους υφιστάμενους ιχθυοπληθυσμούς τσιπούρας του Εργαστηρίου Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, επιλέχθηκαν 159 ιχθύες οι οποίοι χωρίστηκαν σε 18 δεξαμενές (3 μικρές και 15 μεγάλες) με βάση την κλάση μεγέθους. Ο αριθμός των ιχθύων ανά δεξαμενή ήταν τέτοιος ώστε η ιχθυοπυκνότητα σε όλες τις δεξαμενές να είναι $11,1 \pm 1,5 \text{ kg/m}^3$. Οι ιχθύες εγκλιματίστηκαν για 6 εβδομάδες (09/01/2013-17/02/2013), χωρίς να μεσολαβήσει ζύγιση τους ώστε να μην εκτεθούν σε άλλο αναισθητικό παράγοντα. Κατά την περίοδο

του εγκλιματισμού το pH ήταν $7,05 \pm 0,17$, το δεσμευμένο οξυγόνο $94,9 \pm 2,1$ ppm, η θερμοκρασία κυμάνθηκε από $15,9$ έως $19,7$ °C, με μία μέση τιμή $18,3 \pm 0,9$, η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων $0,141 \pm 0,035$ ppm, και της τοξικής αμμωνίας $0,001 \pm 0,000$ ppm (Πίνακας 2.1). Μεταξύ των δεξαμενών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ($P > 0,05$) εκτός από το pH ($P < 0,01$).

Πίνακας 2.1: Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού κάθε δεξαμενής κατά την περίοδο του εγκλιματισμού

Δεξαμενή	Θερμοκρασία (°C)	DO (ppm)	DO (%)	pH	[NO ₂ ⁻]	[NH ₄ ⁺ /NH ₃]	[NH ₃]
A2	18,3±0,9	7,5±0,2	96,2±1,3	7,04±0,17 ^a	0,136±0,020	0,320±0,078	0,001±0,000
A3	18,3±0,9	7,2±0,3	94,8±3,0	6,93±0,18 ^{ab}	0,144±0,049	0,336±0,062	0,001±0,000
A4	18,3±0,9	7,1±0,3	94,1±2,9	6,91±0,17 ^{abc}	0,128±0,036	0,303±0,073	0,001±0,000
B1	18,4±1,0	7,5±0,2	96,6±1,9	7,04±0,17 ^{bc}	0,137±0,042	0,250±0,073	0,001±0,000
B2	18,4±0,9	7,4±0,2	95,7±1,7	7,03±0,17 ^{abc}	0,138±0,021	0,225±0,048	0,001±0,000
B4	18,3±0,9	7,4±0,2	95,1±1,9	7,05±0,16 ^{abc}	0,146±0,033	0,266±0,039	0,001±0,000
B5	18,3±0,9	7,3±0,3	93,3±3,1	7,02±0,15 ^{bc}	0,142±0,021	0,296±0,087	0,001±0,000
B6	18,3±0,9	7,3±0,2	94,4±1,8	7,05±0,15 ^{bc}	0,137±0,030	0,280±0,084	0,001±0,000
B7	18,3±0,9	7,4±0,2	95,1±1,2	7,06±0,17 ^{bc}	0,142±0,024	0,286±0,062	0,001±0,000
B8	18,3±0,9	7,3±0,2 0,2	94,4±1,0	7,06±0,15 ^{bc}	0,151±0,043	0,313±0,120	0,001±0,000
H1	18,2±0,9	7,4±0,2	95,1±1,0	7,06±0,17 ^{bc}	0,142±0,044	0,325±0,144	0,001±0,001
H2	18,2±0,9	7,4±0,3	95,3±2,4	7,08±0,16 ^{bc}	0,154±0,045	0,348±0,136	0,001±0,001
H3	18,2±0,9	7,4±0,2	95,9±1,3	7,12±0,14 ^{bc}	0,154±0,029	0,317±0,082	0,001±0,000
H4	18,2±0,9	7,4±0,2	95,7±1,5	7,11±0,15 ^{bc}	0,147±0,034	0,302±0,110	0,001±0,000
H5	18,2±0,9	7,4±0,2	95,4±1,9	7,09±0,16 ^{bc}	0,135±0,057	0,286±0,105	0,001±0,000
H6	18,3±0,9	7,4±0,2	94,5±1,6	7,03±0,17 ^{bc}	0,133±0,042	0,286±0,110	0,001±0,000
H7	18,2±0,9	7,4±0,2	95,6±1,1	7,14±0,16 ^{bc}	0,128±0,022	0,254±0,093	0,001±0,000
H8	18,3±0,9	7,4±0,2	95,2±1,0	7,07±0,15 ^c	0,142±0,042	0,287±0,102	0,001±0,000
Μέσος όρος	18,3±0,9	7,4±0,2	94,9±2,1	7,05±0,17	0,141±0,035	0,293±0,091	0,001±0,000
P	MΣ	MΣ		**	MΣ	MΣ	MΣ

P: Επίπεδο σημαντικότητας, MΣ: Μη στατιστικά σημαντικό, ** $P < 0,01$

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με κοινό γράμμα εκθέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά

Αναφέρονται οι μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση

Για τα πειράματα της Α' πειραματικής περιόδου χρησιμοποιήθηκαν 8 πληθυσμοί οι οποίοι ανήκαν στις δεξαμενές Α3, Α4, Β5, Β6, Η1, Η2, Η3 και Η4 (Πίνακας 2.2). Μεταξύ των ίδιων κλάσεων δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στο μέσο βάρος ($P>0,05$).

Πίνακας 2.2: Ιχθυοπληθυσμοί που σχηματίστηκαν ανά κλάση βάρους 20g (τα βάρη είναι σε g)

Δεξαμενή	Κλάση βάρους	Σύνολο ατόμων	Λίτρα δεξαμενής	Ιχθυοπυκνότητα (kg/m ³)	Μέσος όρος βάρους± τυπικό σφάλμα
A3	[80, 100)	11	79,2	12,0	86,7±1,53
A4	[80, 100)	12	79,2	13,8	91,4±1,46
B5	[100, 120)	12	124,2	10,6	110,0±1,9
B6	[100, 120)	11	124,2	9,6	108,1±2,0
H1	[120, 140)	12	124,2	12,5	129,4±1,8
H2	[120, 140)	11	124,2	11,8	133,1±1,9
H3	[140, 160)	8	124,2	9,5	147,9±2,0
H4	[140, 160)	8	124,2	9,8	151,9±2,0

$P>0,05$ (επίπεδο σημαντικότητας 95,0%)

Κατά την Α' πειραματική περίοδο (18/02/2013-20/03/2013) το pH ήταν 7,14, το δεσμευμένο οξυγόνο 96,4 ppm, η θερμοκρασία κυμάνθηκε από 17,1 έως 20,1 °C, με μία μέση τιμή 18,6, η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων 0,188 ppm, και της τοξικής αμμωνίας 0,001 ppm (Πίνακας 2.3). Μεταξύ των δεξαμενών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ($P>0,05$) εκτός από το ποσοστό κορεσμού του δεσμευμένου οξυγόνου ($P<0,01$).

Πίνακας 2.3: Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού κάθε δεξαμενής κατά την Α' πειραματική περίοδο

Δεξαμενή	Θερμοκρασία (°C)	DO (ppm)	DO (%)	pH	[NO ₂ ⁻]	[NH ₄ ⁺ /NH ₃]	[NH ₃]
A3	18,6±0,3	7,4±0,1	95,5±0,3 ^a	7,08±0,04	0,120±0,026	0,228±0,031	0,001±0,00
A4	18,6±0,3	7,4±0,1	96,1±0,3 ^{ab}	7,10±0,04	0,117±0,026	0,226±0,031	0,001±0,000
B5	18,6±0,3	7,5±0,1	97,5±0,3 ^c	7,18±0,04	0,111±0,026	0,179±0,031	0,001±0,000
B6	18,6±0,3	7,5±0,1	96,8±0,3 ^{bc}	7,11±0,04	0,108±0,026	0,150±0,031	0,001±0,000
H1	18,6±0,3	7,4±0,1	96,2±0,3 ^{ab}	7,13±0,04	0,118±0,026	0,224±0,031	0,001±0,000
H2	18,6±0,3	7,4±0,1	96,3±0,3 ^{ab}	7,14±0,04	0,117±0,026	0,205±0,031	0,001±0,000
H3	18,6±0,3	7,5±0,1	96,6±0,3 ^{bc}	7,18±0,04	0,121±0,026	0,194±0,031	0,001±0,000
H4	18,6±0,3	7,5±0,1	96,3±0,3 ^{ab}	7,17±0,04	0,133±0,026	0,224±0,031	0,001±0,000
Μέσος όρος	18,6	7,5	96,4	7,14	0,118	0,204	0,001
P	ΜΣ	ΜΣ	**	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

P: Επίπεδο σημαντικότητας, ΜΣ: Μη στατιστικά σημαντικό, ** $P<0,01$

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με κοινό γράμμα εκθέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά

Αναφέρονται οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα

2.4.1 Διερεύνηση επίδρασης του σωματικού βάρους και της συγκέντρωσης AQUI-S® στο χρόνο επαγωγής (Πείραμα A1)

Πραγματοποιήθηκαν 4 πειραματικοί χειρισμοί για τον έλεγχο της υπόθεσης ότι τα άτομα διαφορετικού βάρους παρουσιάζουν διαφορετικούς χρόνους επαγωγής και επαναφοράς. Οι συγκεντρώσεις του AQUI-S® που εξετάστηκαν ήταν 30 ppm, 50 ppm, 70 ppm, 90 ppm και 110 ppm. Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας (Πίνακας 2.4) των στοιχείων των 4 χειρισμών.

Πίνακας 2.4: Βασικά στοιχεία των 4 χειρισμών του πειράματος A1.

Ημερομηνία χειρισμού	Θερμοκρασία νερού °C	Συγκέντρωση AQUI-S®	Αριθμός ιχθύων
20/2/2013	17,5	30 ppm	12
27/2/2013	19,3	50 ppm	18
	19,3	70 ppm	13
11/3/2013	19,6 - 19,8	90 ppm	18
	19,9	110 ppm	6
19/3/2013	18,3	50 ppm	6
	18,3	70 ppm	12
	18,4	90 ppm	4

Συλλέγονταν 3 ιχθύες από κάθε δεξαμενή της ίδιας κλάσης, δηλαδή 6 ιχθύες συνολικά ανά επανάληψη και εισάγονταν ταυτόχρονα στη δεξαμενή αναισθησίας. Γινόταν καταγραφή του χρόνου όπου α) το 50% των ιχθύων παρουσίαζε απώλεια ισορροπίας, β) το 100% των ιχθύων απώλεσαν την ισορροπία τους καθώς και γ) του χρόνου που μεσολάβησε για να εισέλθει κάθε ιχθύς ξεχωριστά στο στάδιο 5 της αναισθησίας. Η αναγνώριση του σταδίου έγινε με την παύση των βραγχιακών κινήσεων και την παύση της κίνησης του οφθαλμού.

Έπειτα, κάθε ιχθύς ζυγίζόταν και εισαγόταν σε ξέχωρη δεξαμενή επαναφοράς, όπου καταγράφονταν ο χρόνος επαναφοράς. Ο χρόνος επαναφοράς ορίστηκε ως ο χρόνος που χρειάζεται ο ιχθύς για να επανακτήσει πλήρη κολυμβητική ικανότητα από τη στιγμή της εισαγωγής του στο καθαρό νερό.

Ταυτόχρονα, πραγματοποιούταν καταγραφή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού της δεξαμενής αναισθητοποίησης πριν την εισαγωγή της βάδας ιχθύων και μετά την εξαγωγή του τελευταίου ιχθύος. Η ανανέωση του αναισθητικού γίνονταν μετά από 3 επαναλήψεις ώστε να διασφαλιστεί η συγκέντρωση του AQUI-S® παραμένει σταθερή.

Επισημαίνεται ότι πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη καταγραφή video της δεξαμενής αναισθητοποίησης και των δεξαμενών επαναφοράς.

2.4.2 Καθορισμός απαιτούμενου χρόνου έκθεσης για αιμοληψία (Πείραμα A2)

Πραγματοποιήθηκε ένας πειραματικός χειρισμός (03/04/2013), όπου εξετάστηκαν τρεις συγκεντρώσεις AQUI-S® 30 ppm, 50 ppm και 70 ppm ώστε να καθοριστεί ένας μέσος χρόνος επαγωγής των ιχθύων στο στάδιο 4 της αναισθησίας, (ind 4) στο οποίο μπορεί να γίνει αιμοληψία.

Για κάθε συγκέντρωση AQUI-S® εξετάστηκαν 6 ιχθύες από 3 διαφορετικές δεξαμενές (H1, H2 και H3), όπου οι ιχθύες εξάγονταν εκ περιτροπής. Η αναισθητοποίηση διενεργήθηκε ατομικά για κάθε ιχθύ. Ο έλεγχος της απώλειας αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με εισαγωγή αποστειρωμένης βελόνας στο σώμα του ιχθύος, ενώ ολόκληρη η διαδικασία έχει βιντεοσκοπηθεί.

2.5 Β' Πειραματική περίοδος

Στη δεύτερη πειραματική περίοδο (12/04/2013-29/04/2013) πραγματοποιήθηκαν δύο πειραματικοί χειρισμοί. Ο πρώτος περιελάμβανε αναισθητοποίηση των ιχθύων και διενέργεια αιμοληψίας, ενώ ο δεύτερος θανάτωση των ιχθύων με μεταφορά στο παγόνερο, ύστερα από έκθεσή τους στο AQUI-S®.

2.5.1 Προσδιορισμός των επιπέδων γλυκόζης και αιματοκρίτη μετά από αναισθησία στο στάδιο 4 (Πείραμα B1)

Για το πείραμα B1 (24/04/2013) σχηματίστηκαν 9 ομοιογενείς πληθυσμοί των 5 ιχθύων (Πίνακας). Το αρχικό μέσο βάρος δε διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ιχθυοπληθυσμών ($P > 0,05$). Οι πληθυσμοί εγκλιματίστηκαν για 10 ημέρες σε αντίστοιχο αριθμό μικρών δεξαμενών (79,2 L). Λάμβαναν μία φορά ημερησίως τροφή σε κορεσμό και γίνονταν καθημερινές μετρήσεις των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού.

Πίνακας 2.5: Αρχικό σωματικό βάρος των ιχθυοπληθυσμών του πειράματος B1

Δεξαμενή	Αριθμός ατόμων	Μέσος όρος ±τυπικό σφάλμα	Συντελεστής παραλλακτικότητας	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Εύρος
A1	5	217,4±13,7	10,91%	180,8	245	64,2
A2	5	227,8±13,7	9,93%	199,4	252,2	52,8
A3	5	211,6±13,7	17,91%	158,2	259,2	101
A4	5	205,6±13,7	14,25%	174,6	244,2	69,6
A5	5	211,3±13,7	16,74%	171,2	255,6	84,4
A6	5	207,9±13,7	17,13%	167,4	255	87,6
Z1	5	223,9±13,7	10,42%	194	246,6	52,6
Z2	5	213,0±13,7	12,07%	176	243,2	67,2
Z3	5	222,2±13,7	16,33%	170,6	250,2	79,6
Σύνολο	45	215,6	13,26%	158,2	259,2	101

$P > 0,05$ (επίπεδο σημαντικότητας 95,0%)

Κατά τον εγκλιματισμό των πληθυσμών του Πειράματος B1 το pH ήταν 7,05, το δεσμευμένο οξυγόνο 92,9 ppm, η θερμοκρασία κυμάνθηκε από 19,2 έως 20,4 °C, με μία μέση τιμή 19,9 (Πίνακας 2.6). Μεταξύ των δεξαμενών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ($P>0,05$).

Πίνακας 2.6: Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού κάθε δεξαμενής κατά τον εγκλιματισμό των πληθυσμών του Πειράματος B1.

Δεξαμενή	Θερμοκρασία (°C)	DO (ppm)	DO (%)	pH
A1	19,8±0,2	7,0±0,1	93,0±0,9	7,01±0,5
A2	19,9±0,2	7,0±0,1	94,0±0,9	7,16±0,05
A3	19,9±0,2	6,9±0,1	92,5±0,9	7,04±0,05
A4	20,0±0,2	7,0±0,1	93,2±0,9	7,01±0,05
A5	20,0±0,2	6,9±0,1	91,8±0,9	7,01±0,05
A6	20,0±0,2	7,0±0,1	93,8±0,9	7,09±0,05
Z1	19,8±0,2	6,9±0,1	92,5±0,9	7,04±0,05
Z2	19,9±0,2	7,0±0,1	93,0±0,9	7,04±0,05
Z3	19,9±0,2	6,9±0,1	92,0±0,9	7,07±0,05
Μέσος όρος	19,9	7,0	92,9	7,05
P	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

*P: Επίπεδο σημαντικότητας, ΜΣ: Μη στατιστικά σημαντικό
Αναφέρονται οι μέσοι όροι± τυπικό σφάλμα*

Τα άτομα κάθε δεξαμενής εισαγόταν ταυτόχρονα στη δεξαμενή αναισθησίας, όπου υπήρχε ταυτόχρονη καταγραφή σε video. Κάθε άτομο, τη στιγμή που έφθανε στο στάδιο 4 της αναισθησίας, εξαγόταν, ζυγίζοταν, ακολουθούσε αιμοληψία και τελικά επέστρεφε στην αρχική δεξαμενή. Κάθε επανάληψη αποτελείτο από 5 ιχθύες προελεύσεως από την ίδια δεξαμενή. Μετά το τέλος του πειράματος, έγινε παρακολούθηση των ιχθύων για τις επόμενες 48 ώρες.

2.5.1.1 Αιμοληψία

Η αιμοληψία των ιχθύων πραγματοποιήθηκε από την περιοχή της έδρας (caudal vein), με χρήση σύριγγας του 1 mL. Το αίμα από τη σύριγγα μεταγγίστηκε σε πλαστικά σωληνάκια με πώμα (Eppendorf safe-lock[®]) συνολικού όγκου 1,5mL. Μικρή ποσότητα αίματος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αιματοκρίτη, ενώ το υπόλοιπο φυγοκεντρήθηκε στις 10000rpm για 10 λεπτά (Hettich Microliter centrifuge) με σκοπό το διαχωρισμό και λήψη του πλάσματος, το οποίο φυλάχθηκε σε eppendorf[®] στην κατάψυξη (-20 °C)

Για την αποφυγή της πήξης του αίματος, όλες οι σύριγγες και τα eppendorf[®] στα οποία μεταγγίστηκε το αίμα είχαν επικαλυφθεί στα εσωτερικά τους τοιχώματά με άλας ηπαρίνης (Heparin Lithium salt, Fluka), ποσότητας 80UI.

2.5.2 Προσδιορισμός των επιπέδων γλυκόζης, αιματοκρίτη και pH του μυός μετά από θανάτωση στο παγόνερο ή αναισθητοποίηση και θανάτωση στο παγόνερο (Πείραμα B2)

Για το πείραμα B2 (29/04/2013) σχηματίστηκαν 12 ομοιογενείς πληθυσμοί των 5 ιχθύων (Πίνακας 2.7) Το αρχικό μέσο βάρος δε διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ιχθυοπληθυσμών ($P>0,05$). Οι πληθυσμοί εγκλιματίστηκαν για 10 ημέρες σε αντίστοιχο αριθμό μεγάλων δεξαμενών (124,2 L). Λάμβαναν μία φορά ημερησίως τροφή σε κορεσμό. Γίνονταν καθημερινές μετρήσεις των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού με ταυτόχρονη λήψη δείγματος νερού για ανάλυση αμμωνίας και νιτρωδών ιόντων.

Πίνακας 2.7: Αρχικό σωματικό βάρος των ιχθυοπληθυσμών του πειράματος B2

Δεξαμενή	Αριθμός ατόμων	Μέσος όρος βάρους± τυπικό σφάλμα (g)	Συντελεστής παραλλακτικότητας	Ελαχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Εύρος
B1	5	325,0±21,2	18,91%	240,2	412,8	172,6
B2	5	309,0±21,2	16,59%	265,2	387,8	122,6
B4	5	344,9±21,2	8,78%	313,2	390	76,8
B5	5	336,4±21,2	17,28%	275,2	409,8	134,6
B6	5	345,7±21,2	14,24%	282,6	396,2	113,6
H1	5	363,1 ±21,2	16,13%	295,4	424,4	129
H2	5	348,1±21,2	11,30%	290,4	385,4	95
H3	5	349,7±21,2	12,25%	288	381	93
H4	5	324,1±21,2	14,38%	281	400	119
H5	5	313,6±21,2	12,92%	267,2	376,2	109
H6	5	303,5±21,2	8,95%	266,4	334,6	68,2
H7	5	345,4±21,2	14,66%	270	390,4	120,4

$P>0,05$, επίπεδο σημαντικότητας 95,0%

Κατά την B πειραματική περίοδο το pH ήταν 7,06, το δεσμευμένο οξυγόνο 94,4 ppm, η θερμοκρασία κυμάνθηκε από 19,2 έως 21,8 °C, με μία μέση τιμή 20,4 °C, η συγκέντρωση των νιτρωδών ιόντων 0,099 ppm, και της τοξικής αμμωνίας 0,002 ppm (Πίνακας 2.8). Μεταξύ των δεξαμενών δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ($P>0,05$).

Πίνακας 2.8: Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού κάθε δεξαμενής κατά τον εγκλιματισμό των πληθυσμών του Πειράματος B2.

Δεξαμενή	Θερμοκρασία (°C)	DO (ppm)	DO (%)	pH	[NO ₂ ⁻]	[NH ₄ ⁺ /NH ₃]	[NH ₃]
B1	20,4±0,3	7,0±0,1	95,0±0,7	7,08±0,05	0,091	0,451	0,002
B2	20,4±0,3	7,0±0,1	94,2±0,7	7,07±0,05	0,093	0,425	0,002
B4	20,4±0,3	7,0±0,1	94,5±0,7	7,08±0,05	0,100	0,401	0,002
B5	20,4±0,3	6,9±0,1	92,5±0,7	6,96±0,05	0,095	0,370	0,001

B6	20,4±0,3	6,9±0,1	93,2±0,7	7,05±0,05	0,093	0,380	0,001
H1	20,4±0,3	7,1±0,1	95,5±0,7	7,07±0,05	0,097	0,433	0,002
H2	20,4±0,3	7,0±0,1	94,5±0,7	7,05±0,05	0,113	0,471	0,002
H3	20,4±0,3	7,1±0,1	95,0±0,7	7,09±0,05	0,101	0,459	0,002
H4	20,4±0,3	7,1±0,1	95,3±0,7	7,06±0,05	0,089	0,407	0,001
H5	20,4±0,3	7,0±0,1	94,5±0,7	7,06±0,05	0,129	0,481	0,002
H6	20,4±0,3	7,0±0,1	93,5±0,7	7,01±0,05	0,096	0,424	0,001
H7	20,4±0,3	7,0±0,1	94,7±0,7	7,13±0,05	0,093	0,407	0,002
Μέσος όρος	20,4	7,0	94,4	7,06	0,099	0,426	0,002
P	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ	ΜΣ

P: Επίπεδο σημαντικότητας, ΜΣ: Μη στατιστικά σημαντικό

Αναφέρονται οι μέσοι όροι± τυπικό σφάλμα

Συνοπτικά η πειραματική πορεία είναι η εξής:

- ❖ Δεξαμενές μάρτυρες
 - Εισαγωγή των ιχθύων στο παγόνερο
 - Λήψη κάθε ιχθύος που παρατηρείται παύση αναπνευστικών κινήσεων
 - Ζύγιση ιχθύος
 - Αιμοληψία
 - Λήψη εγκεφάλου
 - Λήψη ήπατος
 - Αφαίρεση λεπιών και φιλετοποίηση
- ❖ Πειραματικές δεξαμενές
 - Εισαγωγή των ιχθύων στη δεξαμενή αναισθητικού για προκαθορισμένο χρόνο
 - Εισαγωγή των ιχθύων στο παγόνερο
 - Λήψη κάθε ιχθύος που παρατηρείται παύση αναπνευστικών κινήσεων
 - Ζύγιση ιχθύος
 - Αιμοληψία
 - Λήψη εγκεφάλου
 - Λήψη ήπατος
 - Αφαίρεση λεπιών και φιλετοποίηση

Αναλυτικά, κάθε 5άδα ιχθύων, που αποτελούν μία επανάληψη, αφού εισαχθεί στη δεξαμενή αναισθητοποίησης για προκαθορισμένο χρόνο (αν πρόκειται για πειραματική δεξαμενή), μεταφέρεται στη δεξαμενή που περιέχει παγόνερο (2 °C). Οι ιχθύες εκτίθενται στα 30 ppm για 12 λεπτά, στα 50 ppm για 5 λεπτά και στα 70 ppm 3 λεπτά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πειράματος A2 σε συνδυασμό με παρατηρήσεις από το Πείραμα A1. Κατόπιν, εξάγεται ένας προς ένας ιχθύς, ζυγίζεται και γίνεται αιμοληψία με στόχο να ληφθεί ποσότητα αίματος τουλάχιστον 1,5mL.

Ακολουθεί αφαίρεση των λεπιών, λήψη του αριστερού και του δεξιού φιλέτου συμπεριλαμβανομένου και του δέρματος πάνω από την πλευρική γραμμή και τεμαχισμός αυτών σε 3 οριζόντια τμήματα (άνω-μέσο-κάτω) ανάλογα με τη θέση τους ως προς το ραχιαίο τμήμα του σώματος.

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

2.6 Δείκτες stress και ποιότητας

- Προσδιορισμός του αιματοκρίτη

Μικρή ποσότητα αίματος εισάγεται σε σωλήνα ειδικό για τον προσδιορισμό του αιματοκρίτη (Micro Haematocrit tubes, VITREX Medical A/S) και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 4 λεπτά σε φυγόκεντρο (Micro haematocrit Centrifuge, Hawsley & Sons Ltd.).

- Προσδιορισμός της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος

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

- Μέτρηση του pH του μύος

Σε κάθε υπο-φιλέτο πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του pH χρησιμοποιώντας το pHM210 Meterlab pH System (Copenhagen, Denmark), αφού πρώτα ρυθμίστηκε με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων pH 4.0 και 7.0 (Merck, Darmstadt, Germany) σε θερμοκρασία δωματίου

2.7 Μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του AQUI-S[®] με τη χρήση του αντιδραστηρίου GIBBS

Ένας επιπλέον στόχος της πειραματικής μελέτης ήταν η σύγκριση της συγκέντρωσης του AQUI-S[®] στη δεξαμενή αναισθητοποίησης με τη συγκέντρωση που έχει υπολογιστεί και τη σταθερότητά της ακόμα και μετά την εισαγωγή τριών επαναλήψεων. Για το σκοπό αυτό στους δύο τελικούς πειραματικούς χειρισμούς (Πείραμα B1 και B2) λήφθηκαν δείγματα νερού από τη δεξαμενή αναισθητοποίησης, τα οποία αποθηκεύθηκαν στο ψυγείο μέσα σε γυάλινους σωλήνες με αεροστεγές πώμα. Για κάθε συγκέντρωση AQUI-S[®], λαμβάνονταν δείγματα πριν την εισαγωγή των ιχθύων και μετά από κάθε επανάληψη, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.9).

Πίνακας 2.9: Πρωτόκολλο λήψης δειγμάτων νερού από τη δεξαμενή αναισθητοποίησης

Πείραμα B1	Υπολογιζόμενη θεωρητικά συγκέντρωση (mg/L)	Πείραμα B2	Υπολογιζόμενη θεωρητικά συγκέντρωση (mg/L)
30A	30	30A	30
30A1		B1	
30A4		H2	
30T		30T	
50A	50	50A	50

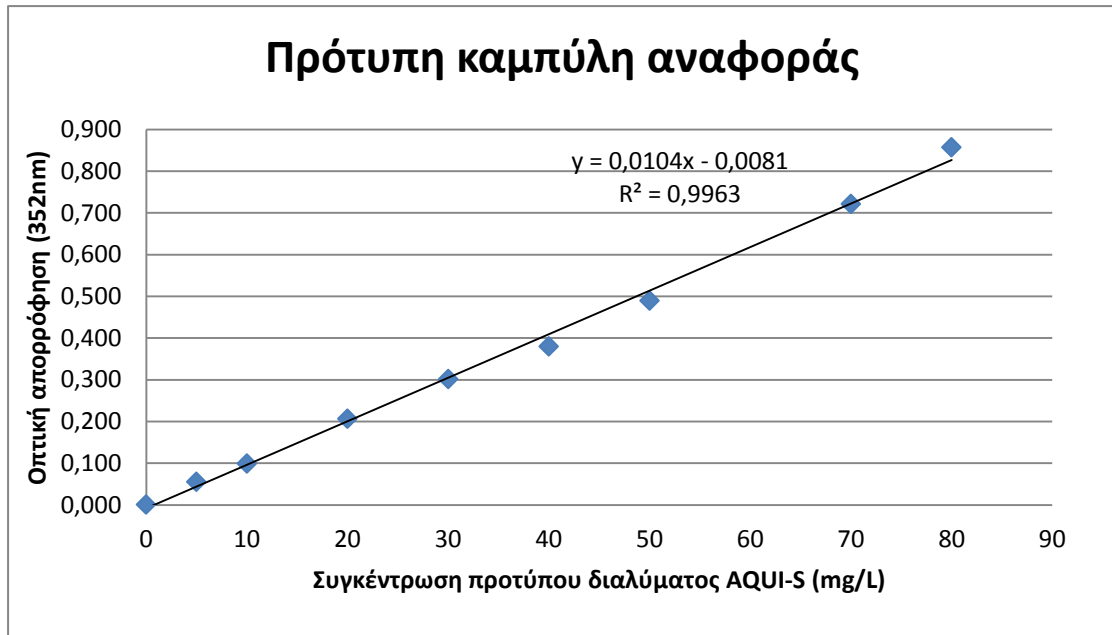
50A2		B4	
50A5		H1	
50T		50T	
70A	70	70A	70
70A3		H4	
70A6		H5	
70T		70T	

Η συγκέντρωση του AQUI-S[®] στα δείγματα προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά. Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70 και 80 mg/L) από stock solution συγκέντρωσης 1,000-mg/L, το οποίο είχε παρασκευαστεί με θαλασσινό νερό από το κύκλωμα εκτροφής, για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς (Εικόνα 2.1). Τα πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα προετοιμάστηκαν για ανάλυση με μέθοδο HEPES/Gibbs και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 352 nm (τροποποιημένη μέθοδος από τους Bowker et al., 2006).

Το αντιδραστήριο Gibbs (2,6-Dichloroquinone-4-Chlorimide) αντιδρά με τις φαινόλες σχηματίζοντας μία ινδοφαινόλη, η οποία παρουσιάζει οπτική απορρόφηση στο ορατό φάσμα, στην περιοχή του κυανού (Gibbs, 1927; Dacre, 1971). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε αλκαλικό περιβάλλον, το οποίο εξασφαλίζεται με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος HEPES (n[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]), αφού πραγματοποιηθεί διόρθωση με χρήση NaOH (s). Το pH που θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση καθορίζει και το χρόνο επώασης (Gibbs, 1927).

Ύστερα από μία σειρά εργαστηριακών δοκιμών όπου εξετάστηκε ο ρόλος του pH στο χρόνο επώασης, επιλέχθηκε το pH 7,5 , καθώς ενώ ο χρόνος που μεσολαβεί μέχρι να γίνει η αντίδραση είναι αυξημένος σε σχέση με μία πιο αλκαλική τιμή, αυτό μας επιτρέπει την ταυτόχρονη προετοιμασία μια σειράς προτύπων και μία σειράς δειγμάτων. Ο χρόνος επώασης καθορίστηκε στα 30 λεπτά, με την οπτική απορρόφηση να παραμένει σταθερή μέχρι τα 60 λεπτά. Πραγματοποιήθηκαν επίσης δοκιμές για τη διερεύνηση της επίδρασης του φωτός και της θερμοκρασίας κατά το χρόνο επώασης. Τελικά, επιλέχθηκε η επώαση να γίνεται υπό συνθήκες κανονικού φωτισμού σε θερμοκρασία δωματίου.

Η ισοευγενόλη σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ανιχνεύεται φασματοφωτομετρικά και στο υπεριώδες φάσμα, στα 280nm (Bhuiya and Liu, 2009) και στα 352nm (Bowker et al., 2006). Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στο φάσμα 342 nm-700nm, όπου και ήταν τεχνικά δυνατό, ώστε να καθοριστεί το μήκος κύματος που δίνει καλύτερη απορρόφηση. Παρόλο που τα αποτελέσματα στο φάσμα του κυανού ήταν ικανοποιητικά (το R² της καμπύλης αναφοράς ήταν >99%), αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί το μήκος κύματος 352nm, ακολουθώντας το πρωτόκολλο που χρησιμοποιούν οι Bowker et al. (2006), με κωδικό πρωτοκόλλου SOP No. MISC 219.6. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται εκτενώς από την Υπηρεσία Ιχθύων και Άγριας Ζωής των Η.Π.Α. (U.S. Fish & Wildlife Service) για τον ποσοτικό προσδιορισμό του AQUI-S[®] σε υδατικά διαλύματα.



Εικόνα 2.1: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης AQUI-S® (mg/L)-απορρόφησης στα 352nm.

2.8 Στατιστική ανάλυση

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις διεξήχθησαν με τη χρήση του στατιστικού λογισμικού STATGRAPHICS Version 16.1.11.

Για τη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ σωματικού βάρους και χρόνου επαγωγής ή χρόνου επαναφοράς εφαρμόστηκε ανάλυση γραμμική συσχέτισης με επίπεδο σημαντικότητας 95%. Σε κάθε περίπτωση ελέγχονταν αν υπάρχει συσχέτιση εφαρμόζοντας διαφορετικό μοντέλο.

Εφαρμόστηκε ανάλυση διακύμανσης, μονοπαραγοντικής (One-Way ANOVA) ή πολυπαραγοντικής (Multifactor ANOVA), αφού προηγήθηκε έλεγχος διακύμανσης με το κριτήριο του Cochran. Με το Duncan test εξετάστηκε το κατά πόσο διαφέρουν οι μέσοι όροι μεταξύ των χειρισμών. Όπου δεν πληρούνταν τα κριτήρια του ελέγχου διακύμανσης ($P < 0,05$), εφαρμόστηκε μη παραμετρική μέθοδος (Kruskal-Wallis) σύγκρισης των διάμεσων τιμών, χρησιμοποιώντας το Box and Whisker Plot.

Όπου μεταξύ των επαναλήψεων δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά, σε επίπεδο σημαντικότητας 95%, για κάθε μεταβλητή, έγινε ομαδοποίηση των δεδομένων.

3. Αποτελέσματα

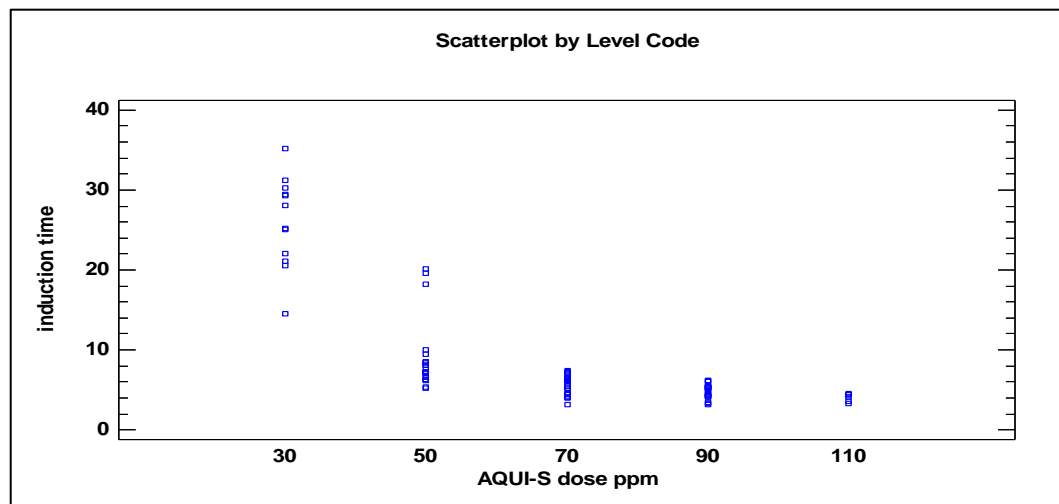
3.1 Επίδραση του σωματικού βάρους και της συγκέντρωσης του AQUI-S® στο χρόνο επαγωγής στο στάδιο αναισθησίας 5 (Πείραμα A1)

Διενεργήθηκε ένας αριθμός επαναλήψεων για κάθε συγκέντρωση (Πίνακας 3.1). Καταγράφηκε ο χρόνος επαγωγής στο στάδιο 5 (ind5) ατομικά ανά ιχθύ.

Πίνακας 3.1: Αριθμός επαναλήψεων, αριθμός ατόμων, μέσο σωματικό βάρος αυτών και ποσοστό θνησιμότητας για κάθε συγκέντρωση του Πειράματος A1

Συγκέντρωση AQUI-S® (ppm)	Αριθμός επαναλήψεων	Αριθμός ατόμων	Μέσο σωματικό βάρος \pm τυπικό σφάλμα (g)	Αριθμός νεκρών ατόμων	Ποσοστό θνησιμότητας
30	2	12	133,4 \pm 12,0	1	8%
50	4	24	170,5 \pm 8,5	1	4%
70	4	25	179,5 \pm 8,3	2	8%
90	4	22	174,2 \pm 8,9	2	9%
110	1	6	122,8 \pm 17,0	3	50%

Όπως φαίνεται από την Εικόνα 3.1, στη συγκέντρωση 30 ppm η διασπορά των τιμών του χρόνου επαγωγής 5 είναι πολύ μεγάλη και κατά μέσο όρο ξεπερνάει τα 20 λεπτά. Γι' αυτό το λόγο δε θεωρήθηκε σκόπιμο να γίνουν περαιτέρω επαναλήψεις. Επίσης, στα 110 ppm η θνησιμότητα που παρατηρήθηκε θεωρήθηκε πολύ σημαντική (50%) γι' αυτό αποφασίστηκε να μη συνεχιστούν άλλες επαναλήψεις σε αυτή τη συγκέντρωση.



Εικόνα 3.1: Γραφική απεικόνιση του χρόνου επαγωγής στο στάδιο 5 της αναισθησίας (min) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S® (ppm)

Διερευνήθηκε η σχέση του βάρους σώματος με το χρόνο επαγωγής 5 χρησιμοποιώντας απλή γραμμική συσχέτιση για κάθε συγκέντρωση ξεχωριστά. Ακολουθούν οι εξισώσεις που προέκυψαν και τα επίπεδα σημαντικότητάς τους.

- **30 ppm**

$$\text{ind5} = 10,5263 + 0,115968 * \text{weight}$$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: $n=12$, model P value $>0,05$, intercept P $>0,05$, slope P $>0,05$, correlation coefficient = 0,298 και $R^2 = 8,89\%$.

Άρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του βάρους και του χρόνου επαγωγής στη συγκέντρωση 30 ppm.

- **50 ppm**

$$\text{ind5} = 6,20549 + 0,00693202 * \text{weight}$$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: $n=21$, model P value $>0,05$, intercept P $<0,05$, slope P $>0,05$, correlation coefficient = 0,258 και $R^2 = 6,70\%$.

Άρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του βάρους και του χρόνου επαγωγής στη συγκέντρωση 50 ppm.

Επισημαίνεται ότι 3 τιμές αφαιρέθηκαν λόγω μεγάλης διασποράς όπως φαίνεται και από την Εικόνα 3.1.

- **70 ppm**

$$\text{ind5} = 4,3775 + 0,00690932 * \text{weight}$$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: $n=25$, model P value $>0,05$, intercept P $>0,05$, slope P $>0,05$, correlation coefficient = 0,302 και $R^2 = 9,17\%$.

Άρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του βάρους και του χρόνου επαγωγής στη συγκέντρωση 70 ppm.

- **90 ppm**

$$\text{induction time 90} = 3,98689 + 0,00475368 * \text{weight90}$$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: $n=22$, model P value $>0,05$, intercept P $<0,05$, slope P $>0,05$, correlation coefficient = 0,201 και $R^2 = 4,04\%$.

Άρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του βάρους και του χρόνου επαγωγής στη συγκέντρωση 90 ppm.

- **110 ppm**

$$\text{induction time 110} = 5,17874 - 0,0089721 * \text{weight110}$$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: $n=6$, model P value $>0,05$, intercept P $>0,05$, slope P $>0,05$, correlation coefficient = -0,336 και $R^2 = 11,33\%$.

Άρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του βάρους και του χρόνου επαγωγής στη συγκέντρωση 110 ppm.

Πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης με εξαρτημένη μεταβλητή το χρόνο επαγωγής, κύριο παράγοντα τη συγκέντρωση του AQUI-S[®] και συμμεταβλητές τη θερμοκρασία και το βάρος του σώματος. Λαμβάνοντας υπόψη το P-value κάθε παράγοντα, όπως, θερμοκρασία (P $>0,05$), βάρος σώματος (P $>0,05$) και συγκέντρωση AQUI-S[®] (P $<0,001$) φαίνεται ότι μόνο η συγκέντρωση του αναισθητικού επιδρά στατιστικά σημαντικά στο χρόνο επαγωγής 5, στις δεδομένες θερμοκρασιακές

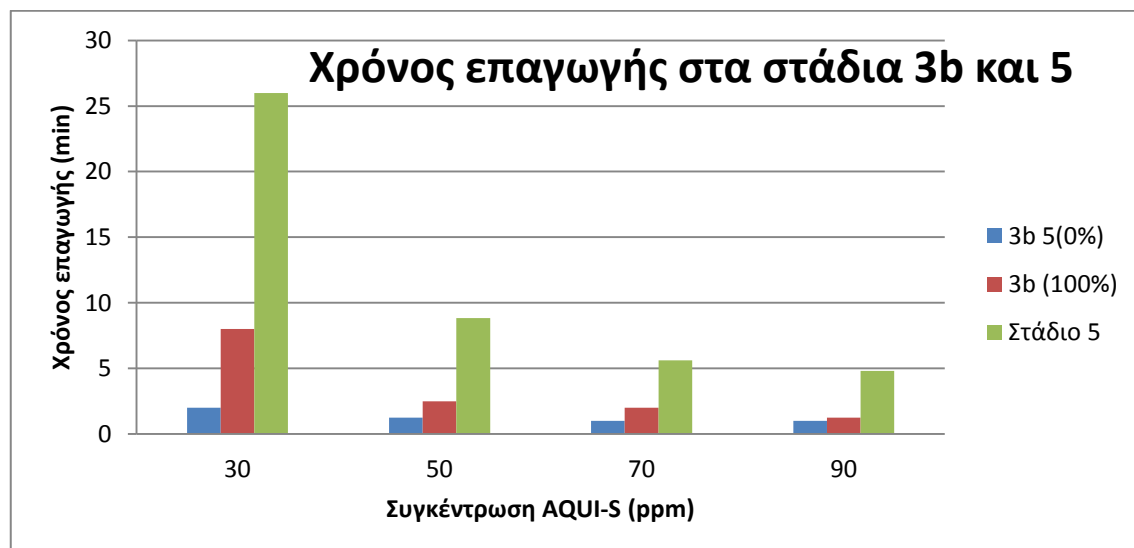
συνθήκες. Οι χρόνοι επαγωγής στις διαφορετικές συγκεντρώσεις διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ($P < 0,001$), όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.2. Τα δεδομένα από τις συγκεντρώσεις 30 και 110 ppm δε λήφθηκαν υπόψη λόγω μεγάλης διασποράς και μικρού αριθμού δειγμάτων αντίστοιχα.

Πίνακας 3.2: Μέσος χρόνος επαγωγής στο στάδιο 5 της αναισθησίας.

Συγκέντρωση AQUI-S® (ppm)	n	Μέσος όρος	Τυπικό σφάλμα	Κατώτερο όριο (95%)	Ανώτερο όριο (95%)
50	21	7,39 ^a	0,238354	6,92	7,87
70	25	5,55 ^b	0,239052	5,07	6,03
90	22	4,85 ^c	0,271624	4,31	5,39

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με διαφορετικό γράμμα εκθέτη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά

Ταυτόχρονα με την ατομική καταγραφή του χρόνου επαγωγής στο στάδιο 5 της αναισθησίας, πραγματοποιούνταν καταγραφή του χρόνου όπου α) το 50% έφθανε στο στάδιο 3b και β) το 100% έφθανε στο στάδιο 3b. Επειδή ο αριθμός των χρόνων που καταγράφηκε ήταν μικρός, δεν ακολούθησε στατιστική επεξεργασία, παρά μόνο σύγκριση με το μέσο χρόνο επαγωγής στο στάδιο 5 της αναισθησίας (Εικόνα 3.2)



Εικόνα 3.2: Σύγκριση των μέσων χρόνων επαγωγής για τα στάδια 3b και 5 της αναισθησίας, ανά συγκέντρωση του AQUI-S®.

3.2 Επίδραση του σωματικού βάρους και της συγκέντρωσης του AQUI-S® στο χρόνο επαναφοράς, μετά από αναισθησία στο στάδιο 5.

Διερευνήθηκε η σχέση του σωματικού βάρους με το χρόνο επαναφοράς (recovery) χρησιμοποιώντας απλή γραμμική συσχέτιση για κάθε συγκέντρωση ξεχωριστά. Ακολουθούν οι εξισώσεις που προέκυψαν και τα επίπεδα σημαντικότητάς τους.

- **30 ppm**

$$\text{recovery}_{30} = 5,48567 + 0,00790823 * \text{weight}_{30}$$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: $n=11$, model P value >0.05 , intercept P >0.05 , slope P >0.05 , correlation coefficient = 0.048 και $R^2 = 0,23$.

Άρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του σωματικού βάρους και του χρόνου επαναφοράς στη συγκέντρωση 30 ppm.

- **50 ppm**

$$\text{recovery}_{50} = 2,18519 + 0,0285558 * \text{weight}_{50}$$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: $n=23$, model P value $>0,05$, intercept P $>0,05$, slope P $>0,05$, correlation coefficient = 0,371 και $R^2 = 13,82$.

Άρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του σωματικού βάρους και του χρόνου επαναφοράς στη συγκέντρωση 50 ppm.

- **70 ppm**

$$\text{recovery}_{70} = 11,3691 + 0,0115371 * \text{weight}_{70}$$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: $n=21$, model P value $>0,05$, intercept P $<0,05$, slope P $>0,05$, correlation coefficient = 0,098 και $R^2 = 0,96$.

Άρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του σωματικού βάρους και του χρόνου επαναφοράς στη συγκέντρωση 70 ppm.

- **90 ppm**

$$\text{recovery}_{90} = 26,4779 - 0,0563631 * \text{weight}_{90}$$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: $n=19$, model P value $>0,05$, intercept P $>0,05$, slope P $>0,05$, correlation coefficient = -0,089 και $R^2 = 0,79$.

Άρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του σωματικού βάρους και του χρόνου επαναφοράς στη συγκέντρωση 90 ppm.

- **110 ppm**

$$\text{recovery}_{110} = 16,8165 - 0,0219958 * \text{weight}_{110}$$

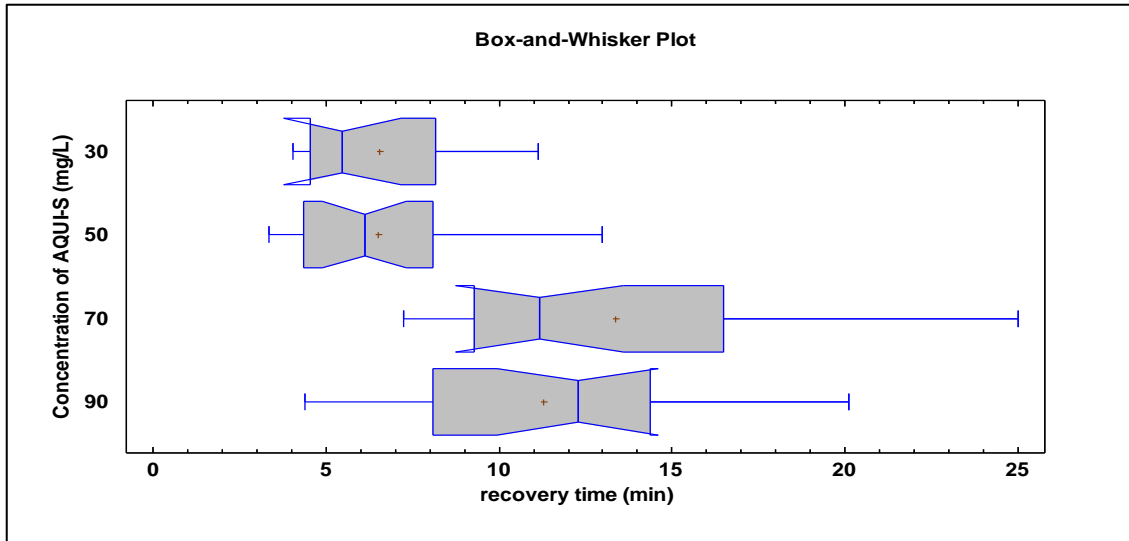
Για το μοντέλο ισχύει ότι: $n=3$, model P value $>0,05$, intercept P $>0,05$, slope P $>0,05$, correlation coefficient = -0,061 και $R^2 = 2,59$.

Άρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του σωματικού βάρους και του χρόνου επαναφοράς στη συγκέντρωση 110 ppm.

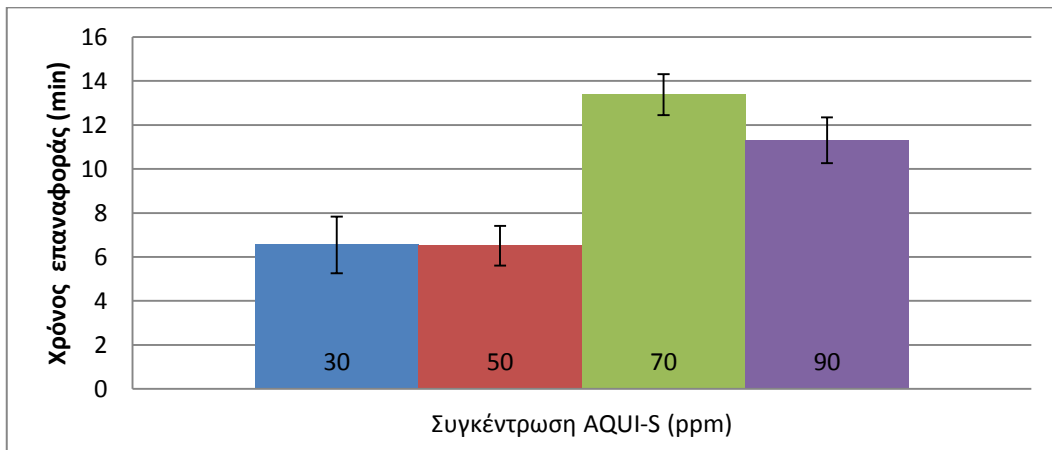
Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μη παραμετρική μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης του χρόνου επαναφοράς με παράγοντα τη συγκέντρωση του αναισθητικού. Το σωματικό βάρος δε λήφθηκε υπόψη ως συμμεταβλητή καθώς σε καμία συγκέντρωση δε φάνηκε να σχετίζεται με το χρόνο επαναφοράς. Οι διάμεσες τιμές του χρόνου επαναφοράς για κάθε συγκέντρωση διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους σχηματίζοντας δύο ομάδες, αυτή των 30 και 50 ppm και αυτή των 70 και 90 ppm, όπως φαίνονται και στα διαγράμματα (Εικόνα 3.2 και 3.3). Τα δεδομένα από τη συγκέντρωση των 110ppm εξαιρέθηκαν από την ανάλυση λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων ($n=3$). Η συγκέντρωση του AQUI-S[®] αποτελεί σημαντικό παράγοντα ($P<0,001$) που καθορίζει το χρόνο επαναφοράς. Οι μέσοι χρόνοι επαναφοράς ανά συγκέντρωση αναφέρονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3: Μέσος χρόνος επαναφοράς ύστερα από αναισθητοποίηση στο στάδιο 5.

Συγκέντρωση AQUI-S® (ppm)	n	Μέσος όρος	Τυπικό σφάλμα	Κατώτερο όριο (95%)	Ανώτερο όριο (95%)
30	11	6,55	1,29	4,73	8,37
50	22	6,51	0,91	5,22	7,80
70	21	13,37	0,93	12,05	14,69
90	17	11,30	1,04	9,84	12,77
Σύνολο	71				



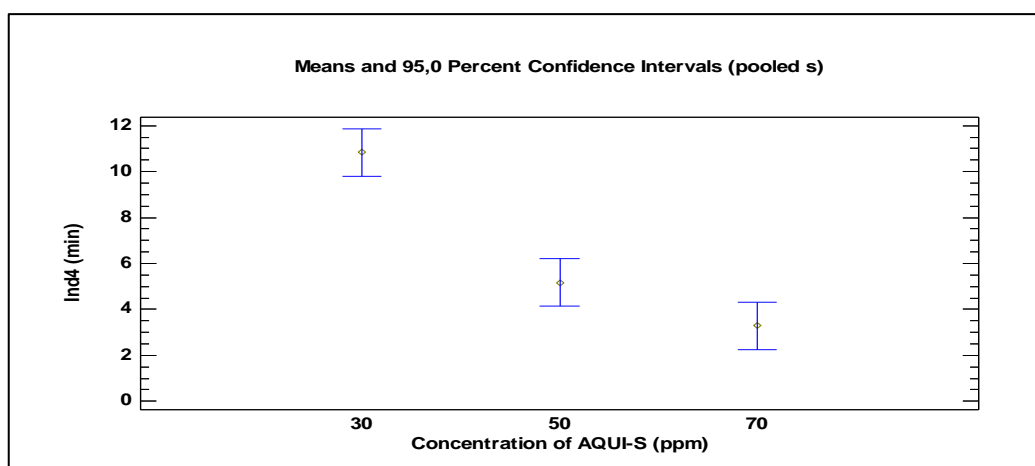
Εικόνα 3.3: Box and Whisker plot του χρόνου επαναφοράς από το στάδιο αναισθησίας 5 ανά συγκέντρωση του AQUI-S®.



Εικόνα 3.4: Ιστόγραμμα του μέσου χρόνου επαναφοράς μετά από αναισθησία σταδίου 5 ανά συγκέντρωση AQUI-S®.

3.3 Καθορισμός απαιτούμενου χρόνου έκθεσης στο AQUI-S[®] για διενέργεια αιμοληψίας (Πείραμα A2)

Διερευνήθηκε ο απαιτούμενος χρόνος έκθεσης στο AQUI-S[®] ώστε οι ιχθύες να φθάσουν στο στάδιο αναισθησίας 4. Δοκιμάστηκαν 3 συγκεντρώσεις, 30, 50 και 70 ppm. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης του χρόνου επαγωγής 4 (ind4) με παράγοντα τη συγκέντρωση του AQUI-S[®].



Εικόνα 3.5: Μέσος χρόνος επαγωγής στο στάδιο αναισθησίας 4, σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S[®], με τα όρια εμπιστοσύνης (95%).

Πίνακας 3.4: Αποτελέσματα Πειράματος A2

Συγκέντρωση AQUI-S [®] (ppm)	n	Μέσο βάρος±τυπικό σφάλμα (g)	Μέσος χρόνος επαγωγής 4 ±τυπικό σφάλμα(min)	Ελάχιστος χρόνος επαγωγής 4	Μέγιστος χρόνος επαγωγής 4
30 ppm	6	245,5±12,4	10,8±0,5 ^a	8	12
50ppm	6	237,3±37,1	5,2±0,5 ^b	4	6
70ppm	6	219,4±25,9	3,3±0,5 ^c	2	4
P			***		

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με κοινό γράμμα εκθέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά

P: Επίπεδο σημαντικότητας, *** P<0,001

Η ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι η συγκέντρωση του AQUI-S[®] αποτελεί σημαντικό παράγοντα επίδρασης στο χρόνο επαγωγής 4 (P<0.001). Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτό το πείραμα (Πίνακας 3.4 και Εικόνα 3.5) καθώς και τις παρατηρήσεις από το Πείραμα A1, διαμορφώθηκαν οι προκαθορισμένοι χρόνοι παραμονής στη δεξαμενή αναισθητοποίησης στο τελευταίο πείραμα (Πείραμα B2), δηλαδή, 12, 5 και 3 λεπτά αντίστοιχα με τις συγκεντρώσεις AQUI-S[®] 30, 50 και 70 ppm.

3. 4 Προσδιορισμός επιπέδων γλυκόζης και αιματοκρίτη μετά από αναισθησία στο στάδιο 4 (Πείραμα B1)

3.4.1 Επίδραση του χρόνου παραμονής στο AQUI-S® και της συγκέντρωσης του AQUI-S® στη συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος.

Εξετάζεται με απλή ανάλυση συσχέτισης αν υπάρχει σχέση μεταξύ του χρόνου παραμονής στη δεξαμενή αναισθητοποίησης και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων, για κάθε συγκέντρωση αναισθητικού ξεχωριστά. Ακολουθούν οι εξισώσεις που προέκυψαν μετά από εφαρμογή απλής γραμμικής συσχέτισης.

- **30 ppm**

$$\text{glucose}_{30} = 0,919924 + 0,00376317 * \text{induction}_{30}$$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: n=14, model P value >0,05, intercept P<0,05, slope P>0,05, correlation coefficient= 0,065 και R²= 0,43.

Άρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του χρόνου παραμονής και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στη συγκέντρωση 30 ppm.

- **50 ppm**

$$\text{glucose}_{50} = 0,523409 + 0,0781957 * \text{induction}_{50}$$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: n=23, model P value >0,05, intercept P>0,05, slope P>0,05, correlation coefficient= 0,371 και R²= 13,82.

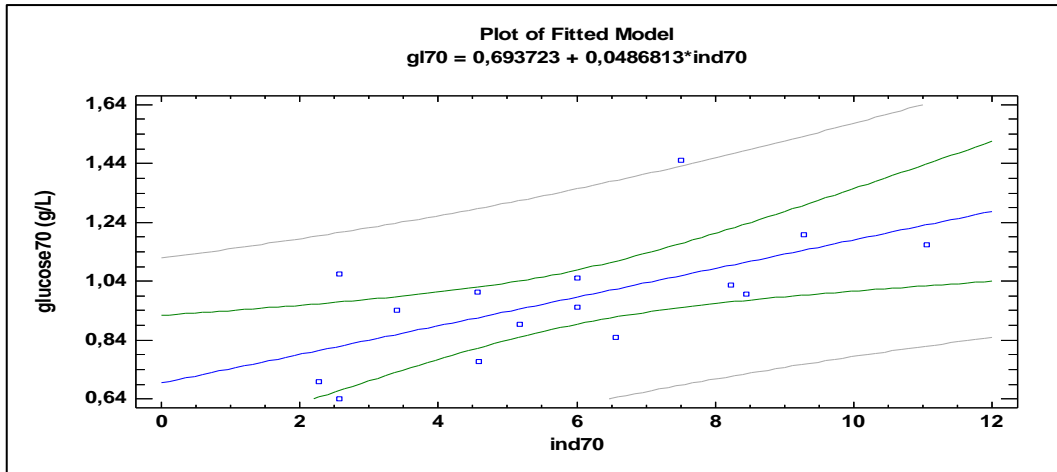
Άρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του σωματικού βάρους και του χρόνου παραμονής στη συγκέντρωση 50 ppm.

- **70 ppm**

$$\text{glucose}_{70} = 0,693723 + 0,0486813 * \text{induction}_{70}$$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: n=15, model P value <0,05, intercept P<0,05, slope P,<0,05, correlation coefficient= 0,630 και R²= 39,75.

Άρα υπάρχει γραμμική συσχέτιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης και του χρόνου παραμονής στη συγκέντρωση 70 ppm (Εικόνα 3.6).



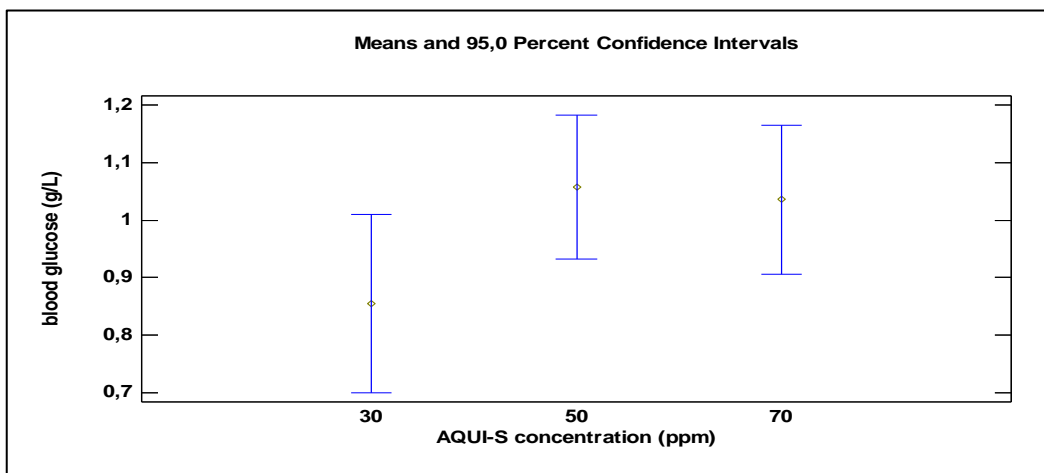
Εικόνα 3.6: Γραμμική συσχέτιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος (g/L) σε σχέση με το χρόνο έκθεσης στο AQUI-S® στη συγκέντρωση 70 ppm.

Με την εφαρμογή πολυπαραγοντικής ανάλυσης διακύμανσης της συγκέντρωσης της γλυκόζης με παράγοντα τη συγκέντρωση του αναισθητικού και συμμεταβλητή το χρόνο παραμονής στο AQUI-S®, βρέθηκε ότι μόνο ο χρόνος έκθεσης στο AQUI-S® επιδρά στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$). Μεταξύ των μέσων όρων ανά συγκέντρωση AQUI-S® δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά (Πίνακας 3.5 και Εικόνα 3.7).

Πίνακας 3.5: Μέσοι όροι συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) με 95,0% όρια εμπιστοσύνης.

Συγκέντρωση AQUI-S® (ppm)	n	Μέσος όρος	Τυπικό σφάλμα	Κατώτερο όριο (95%)	Ανώτερο όριο (95%)
30	14	0,855	0,078	0,698	1,013
50	15	1,056	0,063	0,929	1,184
70	15	1,036	0,065	0,905	1,167
P-value		ΜΣ			

P: Επίπεδο σημαντικότητας, ΜΣ: Μη στατιστικά σημαντικό



Εικόνα 3.7: Μέση τιμή της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S®, με όρια εμπιστοσύνης 95%.

3.4.2 Επίδραση του χρόνου παραμονής και της συγκέντρωσης του AQUI-S® στην τιμή του αιματοκρίτη

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης του χρόνου έκθεσης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AQUI-S® στην τιμή του αιματοκρίτη. Εξετάστηκε με απλή ανάλυση συσχέτισης αν υπάρχει σχέση μεταξύ του χρόνου παραμονής στη δεξαμενή αναισθητοποίησης και της τιμής του αιματοκρίτη για κάθε συγκέντρωση AQUI-S® ξεχωριστά. Ακολουθούν οι εξισώσεις που προέκυψαν ύστερα από απλή γραμμική συσχέτιση.

- **30 ppm**

$$\text{hematocrit30} = 26,0207 + 0,116598 * \text{induction30}$$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: n=14, model P value >0.05, intercept P<0.05, slope P>0.05, correlation coefficient= 0,055 και R²= 0,30.

Άρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του χρόνου παραμονής και του αιματοκρίτη στη συγκέντρωση 30 ppm.

- **50 ppm**

$$\text{hematocrit50} = 30,4885 + 0,992591 * \text{induction 50}$$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: n=15, model P value >0,05, intercept P<0,05, slope P>0,05, correlation coefficient= 0,242 και R²= 5,90.

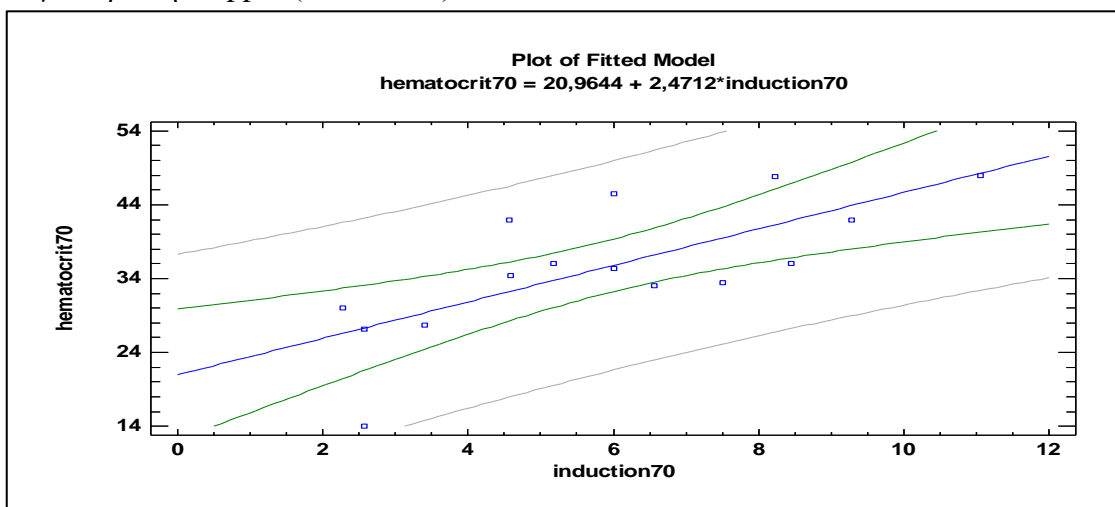
Άρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του χρόνου παραμονής και του αιματοκρίτη στη συγκέντρωση 50 ppm.

- **70 ppm**

$$\text{hematocrit70} = 20,9644 + 2,4712 * \text{induction70}$$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: n=15, model P value <0,05, intercept P<0,05, slope P,<0,05, correlation coefficient= 0,730 και R²= 53,41.

Άρα υπάρχει γραμμική συσχέτιση του χρόνου παραμονής και του αιματοκρίτη στη συγκέντρωση 70 ppm (Εικόνα 3.8).



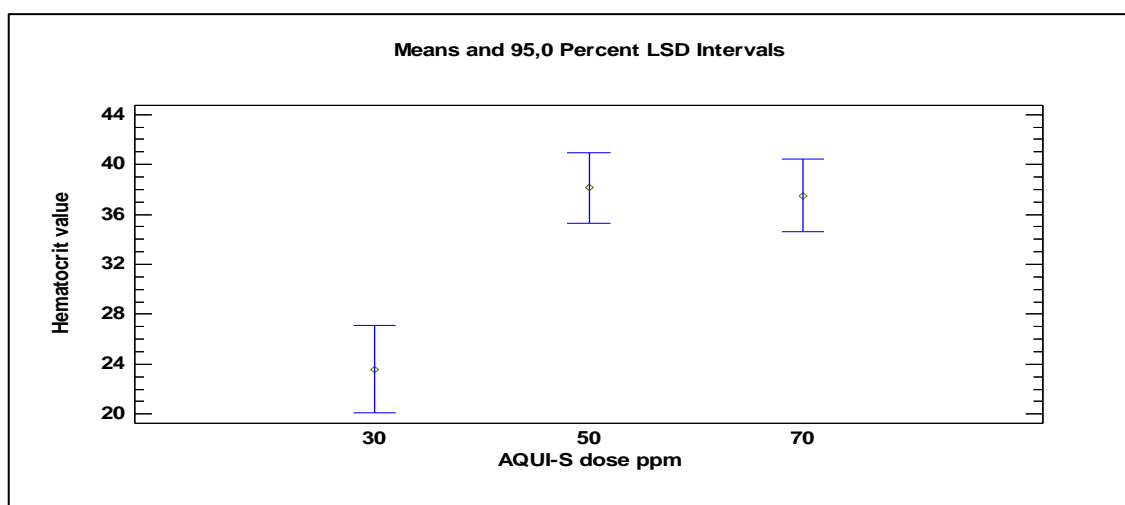
Εικόνα 3.8: Γραμμική συσχέτιση του αιματοκρίτη(%) σε σχέση με το χρόνο έκθεσης στο AQUI-S® στη συγκέντρωση 70 ppm.

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης της τιμής του αιματοκρίτη με παράγοντα τη συγκέντρωση του AQUI-S[®] και συμπράγοντες το βάρος σώματος και το χρόνο παραμονής στο AQUI-S[®], όπου βρέθηκε ότι κύρια δράση ασκεί η συγκέντρωση του AQUI-S[®] (P<0,001) και δευτερευόντως ο χρόνος έκθεσης σε αυτό (P<0,05) (Πίνακας 3.6 και Εικόνα 3.9).

Πίνακας 3.6: Μέσοι όροι αιματοκρίτη στις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S[®] με όρια εμπιστοσύνης 95,0% .

Συγκέντρωση AQUI-S [®] (ppm)	n	Μέσος όρος%	Τυπικό σφάλμα	Κατώτερο όριο (95%)	Ανώτερο όριο (95%)
30	14	23,6 ^a	2,4	18,7	28,5
50	15	38,2 ^b	2,0	34,1	42,2
70	15	37,5 ^b	2,0	33,4	41,6

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με κοινό γράμμα εκθέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά



Εικόνα 3.9: Μέση τιμή του αιματοκρίτη (%) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S[®], με όρια εμπιστοσύνης 95%.

3.5 Προσδιορισμός των επιπέδων γλυκόζης, αιματοκρίτη και pH του μυός μετά από θανάτωση στο παγόνερο ή αναισθητοποίηση και θανάτωση στο παγόνερο (Πείραμα B2)

3.5.1 Επίδραση του χρόνου δειγματοληψίας στη συγκέντρωση της γλυκόζης

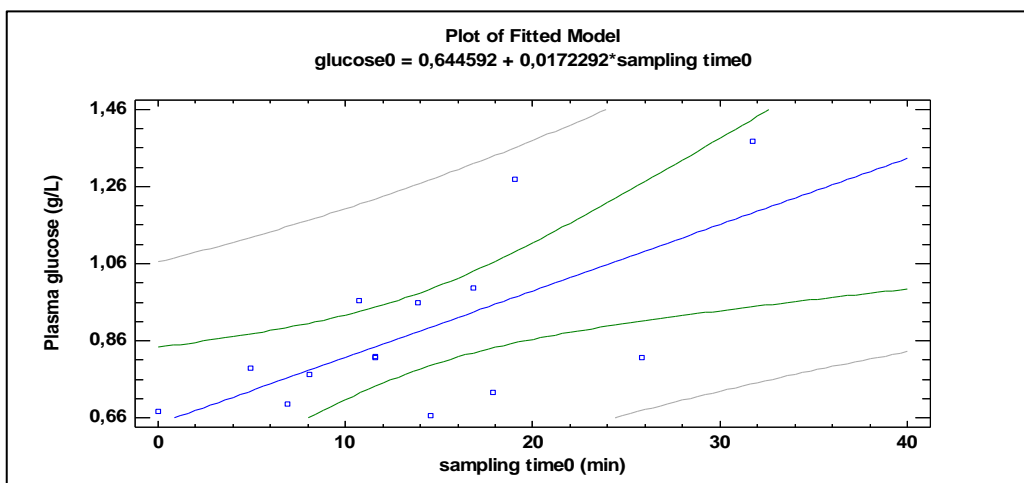
Ως χρόνος δειγματοληψίας (sampling time) ορίζεται το άθροισμα του προκαθορισμένου χρόνου παραμονής στο AQUI-S[®] και του χρόνου μέσα στο παγόνερο μέχρι την εξαγωγή του από αυτό μείον τον ελάχιστο χρόνο που μεσολάβησε μέχρι τη θανάτωση του πρώτου ιχθύος σε κάθε χειρισμό. Εξετάζεται με απλή ανάλυση συσχέτισης αν υπάρχει σχέση μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος των ιχθύων, για κάθε συγκέντρωση AQUI-S[®] ξεχωριστά

- **0 ppm**

Plasma glucose₀ (g/L) = 0,644592 + 0,0172292*sampling time₀ (min)

Για το μοντέλο ισχύει ότι: n=14, model P value <0,05, intercept P<0,05, slope P,<0,05, correlation coefficient= 0,658 και R²= 43,26.

Άρα υπάρχει γραμμική συσχέτιση του χρόνου δειγματοληψίας και της συγκέντρωσης της γλυκόζης, στη συγκέντρωση 0 ppm (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10: Γραμμική συσχέτιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος σε σχέση με το χρόνο δειγματοληψίας στους μάρτυρες.

- **30 ppm**

Plasma glucose₃₀ (g/L) = 1,26381 - 0,00339066*sampling time₃₀ (min)

Για το μοντέλο ισχύει ότι: n=14, model P value >0,05, intercept P<0,05, slope P>0,05, correlation coefficient= -0,087 και R²= 0,75.

Άρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του χρόνου δειγματοληψίας και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στη συγκέντρωση 30 ppm.

- **50 ppm**

Plasma glucose₅₀ (g/L) = 0,955744 + 0,00745424*sampling time₅₀ (min)

Για το μοντέλο ισχύει ότι: n=15, model P value >0,05, intercept P<0,05, slope P>0,05, correlation coefficient= 0,220 και R²= 4,85.

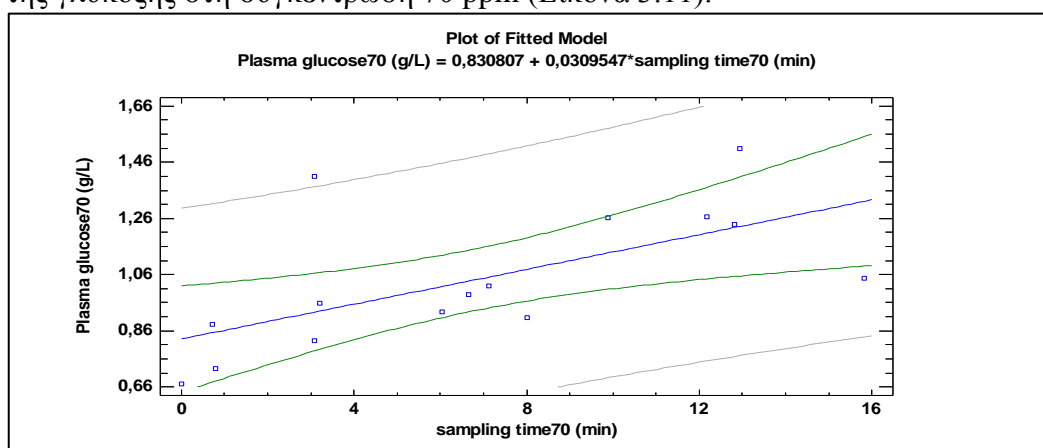
Άρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του χρόνου δειγματοληψίας και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στη συγκέντρωση 50 ppm.

- **70 ppm**

Plasma glucose₇₀ (g/L) = 0,830807 + 0,0309547*sampling time₇₀ (min)

Για το μοντέλο ισχύει ότι: n=15, model P value <0,05, intercept P<0,05, slope P<0,05, correlation coefficient= 0,636 και R²= 40,39.

Άρα υπάρχει γραμμική συσχέτιση του χρόνου δειγματοληψίας και της συγκέντρωσης της γλυκόζης στη συγκέντρωση 70 ppm (Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11: Γραμμική συσχέτιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος σε σχέση με το χρόνο δειγματοληψίας στο χειρισμό των 70 ppm.

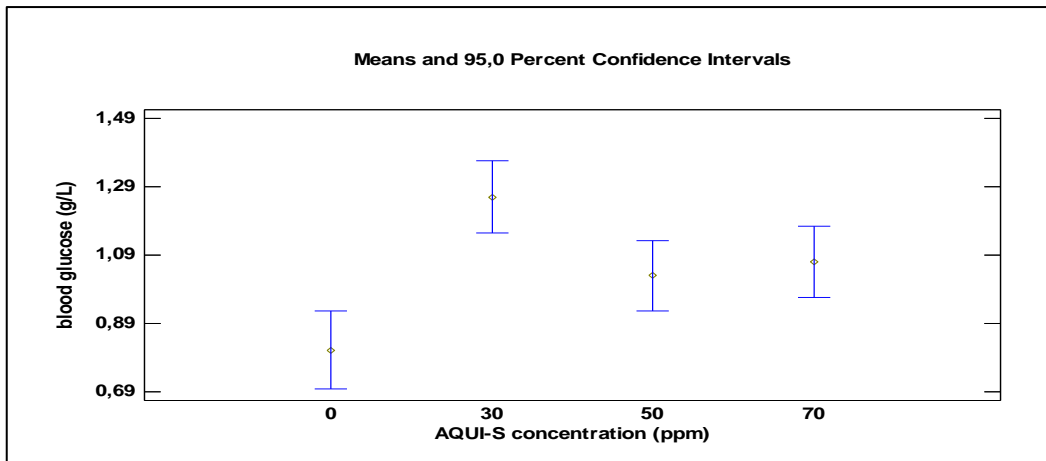
Πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης της συγκέντρωσης της γλυκόζης με παράγοντα τη συγκέντρωση του AQUI-S[®] (P<0,001) και συμμεταβλητή το χρόνο δειγματοληψίας (P<0,01) (Πίνακας 3.7 και Εικόνα 3.12):

Πίνακας 3.7: Μέσος όρος συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος (g/L) με 95% όρια εμπιστοσύνης.

Συγκέντρωση AQUI-S [®] (ppm)	n	Μέσος όρος Τυπικό σφάλμα	Κατώτερο όριο (95%)	Ανώτερο όριο (95%)
0	14	0,813±0,057 ^a	0,699	0,927
30	14	1,260±0,053 ^c	1,154	1,366
50	15	1,030±0,051 ^b	0,928	1,132
70	15	1,071±0,051 ^b	0,967	1,174
P-value		***		

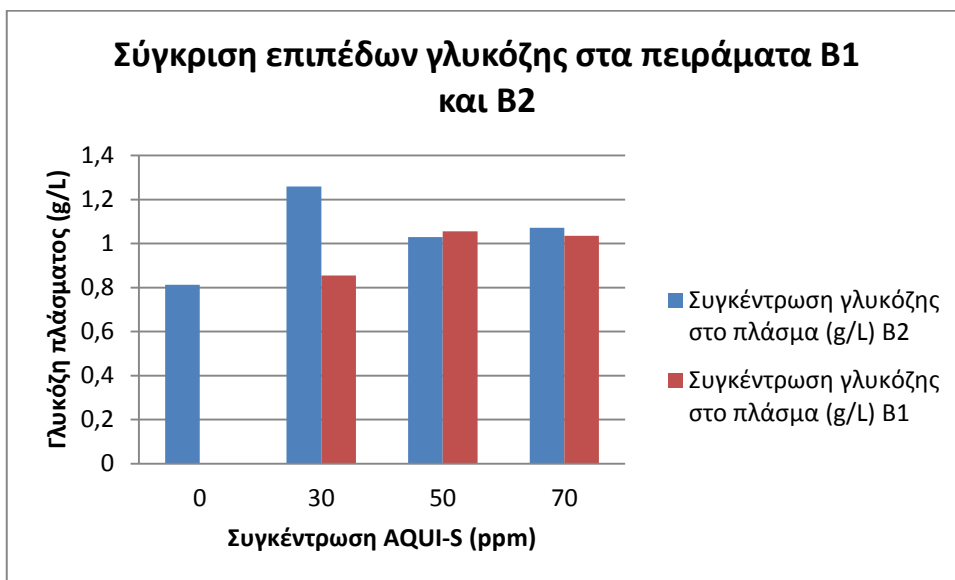
P: Επίπεδο σημαντικότητας, ***P<0,001

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με κοινό γράμμα εκθέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά



Εικόνα 3.12: Μέση συγκέντρωση της συγκέντρωσης γλυκόζης (g/L) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S[®], με όρια εμπιστοσύνης 95%.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης της γλυκόζης του Πειράματος B1 προκύπτει το εξής διάγραμμα (Εικόνα 3.13):



Εικόνα 3.13: Σύγκριση της μέσης τιμής της γλυκόζης μετά από αναισθησία στο στάδιο 4 (Πείραμα B1) και μετά από αναισθησία στο στάδιο 4 και θανάτωση στο παγόνερο (Πείραμα B2).

3.5.2 Επίδραση του χρόνου δειγματοληψίας στην τιμή του αιματοκρίτη

Εξετάζεται με απλή ανάλυση συσχέτισης αν υπάρχει σχέση μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας και της τιμής του αιματοκρίτη, για κάθε συγκέντρωση αναισθητικού ξεχωριστά. Ακολουθούν οι εξισώσεις που προέκυψαν ύστερα από απλή γραμμική συσχέτιση.

- **0 ppm**

$$Htc_0 \% = 28,3233 + 0,286612 * \text{sampling time}_0 (\text{min})$$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: $n=14$, model P value $>0,05$, intercept P $<0,05$, slope P, $>0,05$, correlation coefficient= 0,270 και $R^2= 7,28$.

Αρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του χρόνου δειγματοληψίας και του αιματοκρίτη, στη συγκέντρωση 0 ppm.

- **30 ppm**

$Htc_{30} \% = 30,8227 + 0,218168 * \text{sampling time}_{30} \text{ (min)}$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: $n=14$, model P value $>0,05$, intercept P $<0,05$, slope P $>0,05$, correlation coefficient= 0,219 και $R^2= 4,79$.

Αρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του χρόνου δειγματοληψίας και του αιματοκρίτη στη συγκέντρωση 30 ppm.

- **50 ppm**

$Htc_{50} \% = 36,9356 - 0,14889 * \text{sampling time}_{50} \text{ (min)}$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: $n=15$, model P value $>0,05$, intercept P $<0,05$, slope P $>0,05$, correlation coefficient= -0,134 και $R^2= 1,79$.

Αρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του χρόνου δειγματοληψίας και του αιματοκρίτη στη συγκέντρωση 50 ppm.

- **70 ppm**

$Htc_{70} \% = 39,3533 - 0,452381 * \text{sampling time}_{70} \text{ (min)}$

Για το μοντέλο ισχύει ότι: $n=15$, model P value $>0,05$, intercept P $<0,05$, slope P $>0,05$, correlation coefficient= -0,323 και $R^2= 10,46$.

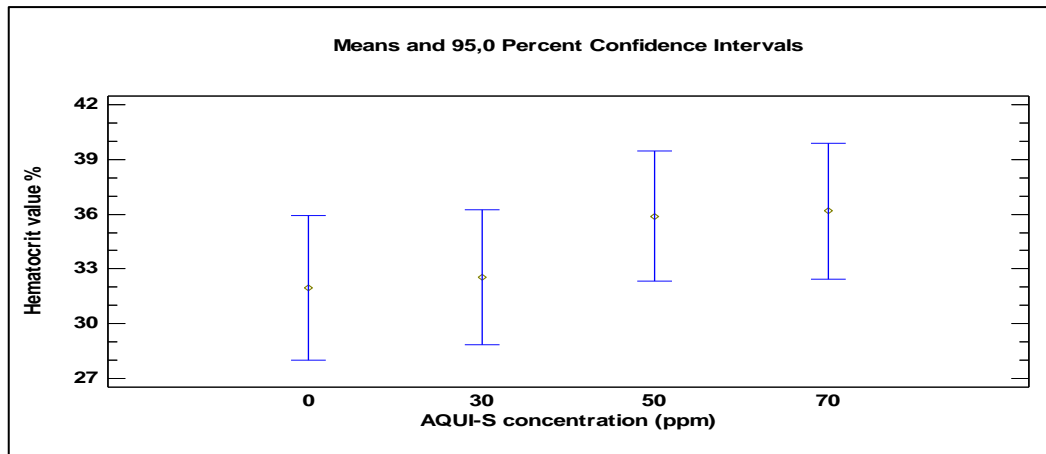
Αρα δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση του χρόνου δειγματοληψίας και του αιματοκρίτη στη συγκέντρωση 70 ppm.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης της τιμής του αιματοκρίτη με παράγοντα τη συγκέντρωση του AQUI-S® (P $>0,05$). Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων όρων (Πίνακας 3.8 και Εικόνα 3.14).

Πίνακας 3.8: Μέσες τιμές αιματοκρίτη με 95% όρια εμπιστοσύνης.

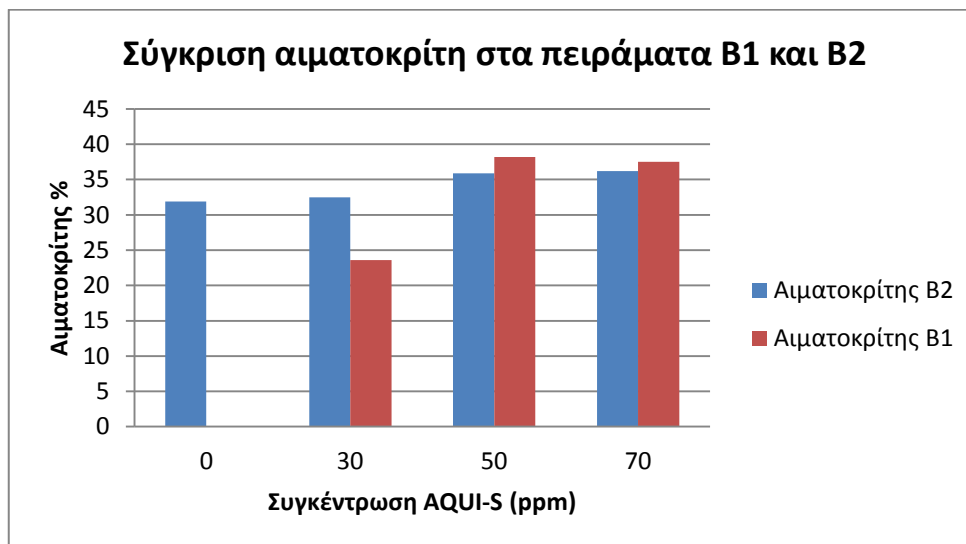
Συγκέντρωση AQUI-S® (ppm)	n	Αιματοκρίτης%	Κατώτερο όριο (95%)	Ανώτερο όριο (95%)
0	14	31,9±2,0	28,0	35,9
30	14	32,5±1,8	28,8	36,2
50	15	35,9±1,8	32,3	39,5
70	14	36,2±1,8	32,5	39,9

Αναφέρονται οι μέσοι όροι± τυπική απόκλιση



Εικόνα 3.14: Μέση τιμή του αιματοκρίτη (%) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S[®], με όρια εμπιστοσύνης 95%.

Τέλος, συγκρίθηκαν οι μέσοι όροι της τιμής του αιματοκρίτη με αυτούς του Πειράματος B1(Εικόνα 3.15).



Εικόνα 3.15: Σύγκριση της μέσης τιμής του αιματοκρίτη μετά από αναισθησία στο στάδιο 4 (Πείραμα B1) και μετά από αναισθησία στο στάδιο 4 και θανάτωση στο παγόνερο (Πείραμα B2).

3.5.3 Τιμή pH φιλέτου

Πραγματοποιήθηκε μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης της τιμής του pH του φιλέτου με παράγοντα τη συγκέντρωση του AQUI-S[®], για κάθε ομάδα των τμημάτων των φιλέτων ξεχωριστά. Σε όλες τις ομάδες των τμημάτων των φιλέτων εξετάστηκαν οι 4 συγκεντρώσεις του AQUI-S[®] (0, 30, 50 και 70 ppm), ενώ ο αριθμός των δειγμάτων ήταν σταθερός (n=60) σε όλες τις περιπτώσεις.

- **Αριστερό άνω τμήμα του φιλέτου**

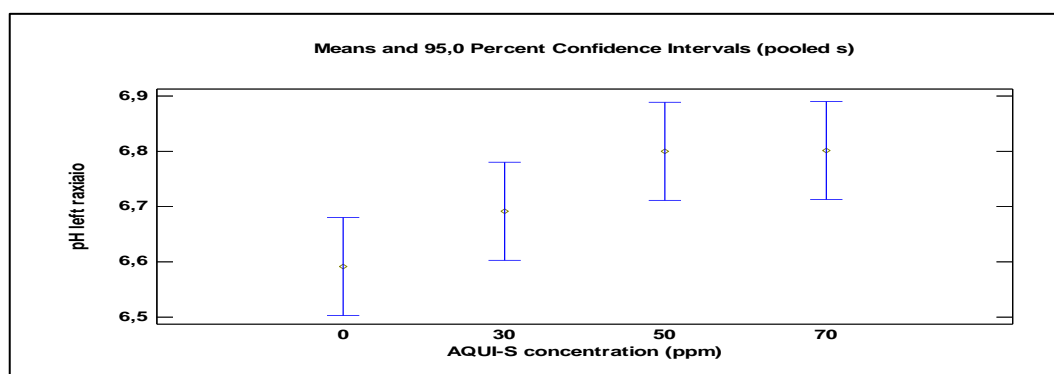
Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων του pH στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AQUI-S® (P<0,01), όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.9. Ακολουθεί η απεικόνιση του μέσου pH για κάθε συγκέντρωση AQUI-S®, με όρια εμπιστοσύνης 95% (Εικόνα 3.16).

Πίνακας 3.9: Περιληπτικά στατιστικά του pH του αριστερού άνω τμήματος του φιλέτου

Συγκέντρωση AQUI-S® (ppm)	n	Μέσος όρος pH	Τυπικό σφάλμα	Συντελεστής παραλλακτικότητας	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
0	15	6,59 ^a	0.04	1,49%	6,44	6,74
30	15	6,69 ^{ab}	0.04	2,85%	6,37	7,06
50	15	6,80 ^b	0.04	2,73%	6,59	7,18
70	15	6,80 ^b	0.04	2,85%	6,44	7,21
Σύνολο	60					
P- value		**				

P: Επίπεδο σημαντικότητας, **P<0,01

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με κοινό γράμμα εκθέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά



Εικόνα 3.16: Μέσο pH του αριστερού άνω τμήματος του φιλέτου στις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S®, με όρια εμπιστοσύνης 95%.

- **Αριστερό μέσο τμήμα του φιλέτου**

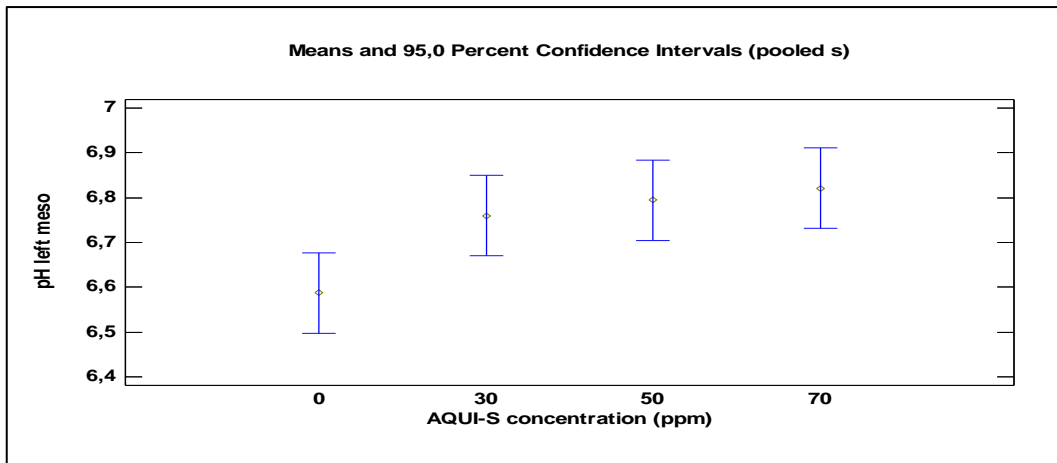
Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων του pH στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AQUI-S® (P<0.01), όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.10. Ακολουθεί η απεικόνιση του μέσου pH για κάθε συγκέντρωση AQUI-S® (Εικόνα 3.17).

Πίνακας 3.10: Περιληπτικά στατιστικά του pH του αριστερού μέσου τμήματος του φιλέτου

Συγκέντρωση AQUI-S® (ppm)	n	Μέσος όρος pH	Τυπικό σφάλμα	Συντελεστής παραλλακτικότητας	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
0	15	6,59 ^a	0.04	1,26%	6,46	6,74
30	15	6,76 ^b	0.04	3,45%	6,38	7,18
50	15	6,79 ^b	0.04	2,59%	6,6	7,2
70	15	6,82 ^b	0.04	2,47	6,52	7,1
Σύνολο	60					
P-value		**				

P: Επίπεδο σημαντικότητας, **P<0,01

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με κοινό γράμμα εκθέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά



Εικόνα 3.17: Μέσο pH του αριστερού μέσου τμήματος του φιλέτου στις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S[®], με όρια εμπιστοσύνης 95%.

- **Αριστερό κοιλιακό τμήμα του φιλέτου**

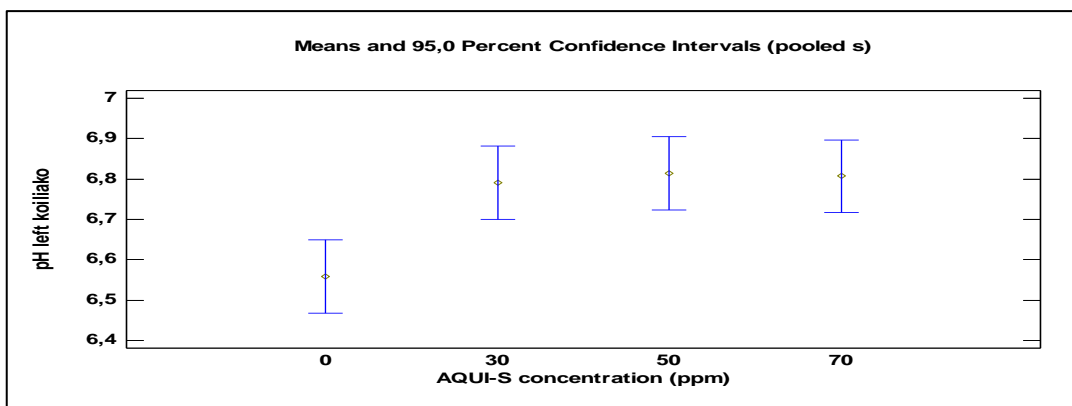
Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων του pH στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AQUI-S[®] ($P < 0.001$), όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.11. Ακολουθεί η απεικόνιση του μέσου pH για κάθε συγκέντρωση AQUI-S[®], με όρια εμπιστοσύνης 95% (Εικόνα 3.18).

Πίνακας 3.11: Περιληπτικά στατιστικά του pH του αριστερού κοιλιακού τμήματος του φιλέτου

Συγκέντρωση AQUI-S [®] (ppm)	n	Μέσος όρος pH	Τυπικό σφάλμα	Συντελεστής παραλλακτικότητας	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
0	15	6,56 ^a	0.05	1,03%	6,44	6,7
30	15	6,79 ^b	0.05	3,28%	6,49	7,25
50	15	6,81 ^b	0.05	2,48%	6,62	7,22
70	15	6,81 ^b	0.05	2,91%	6,5	7,18
Σύνολο	60					
P-value		***				

P: Επίπεδο σημαντικότητας, *** $P < 0,001$

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με κοινό γράμμα εκθέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά



Εικόνα 3.18: Μέσο pH του αριστερού κάτω τμήματος του φιλέτου στις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S[®], με όρια εμπιστοσύνης 95%.

- **Δεξί άνω τμήμα του φιλέτου**

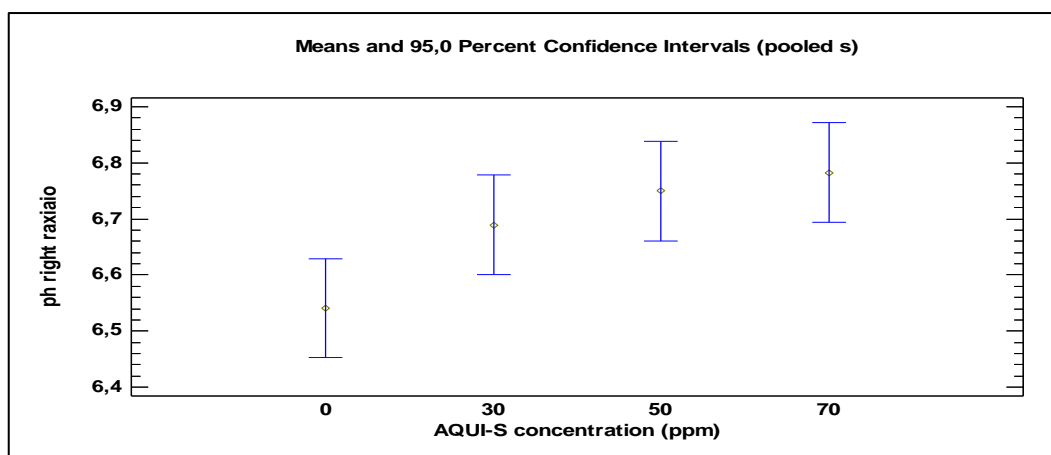
Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων του pH στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AQUI-S® ($P < 0.01$), όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.12. Ακολουθεί η απεικόνιση του μέσου pH για κάθε συγκέντρωση AQUI-S® (Εικόνα 3.19).

Πίνακας 3.12: Περιληπτικά στατιστικά του pH του δεξιού άνω τμήματος του φιλέτου

Συγκέντρωση AQUI-S® (ppm)	n	Μέσος όρος pH	Τυπικό σφάλμα	Συντελεστής παραλλακτικότητας	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
0	15	6,54 ^a	0.04	1,43%	6,38	6,68
30	15	6,69 ^b	0.04	3,25%	6,36	7,17
50	15	6,75 ^b	0.04	2,27%	6,51	7,1
70	15	6,782 ^b	0.04	2,85%	6,49	7,21
Σύνολο	60					
P-value		**				

P: Επίπεδο σημαντικότητας, ** $P < 0,01$

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με κοινό γράμμα εκθέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά



Εικόνα 3.19: Μέσο pH του δεξιού άνω τμήματος του φιλέτου στις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S®, με όρια εμπιστοσύνης 95%.

- **Δεξί μέσο τμήμα του φιλέτου**

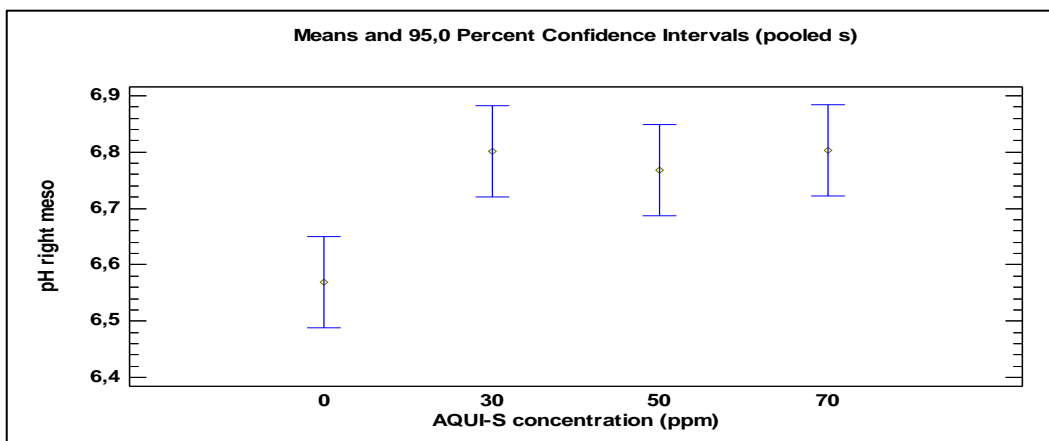
Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων του pH στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AQUI-S® ($P < 0.001$), όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.13. Ακολουθεί η απεικόνιση του μέσου pH για κάθε συγκέντρωση AQUI-S® (Εικόνα 3.20).

Πίνακας 3.13: Περιληπτικά στατιστικά του pH του δεξιού μέσου τμήματος του φιλέτου

Συγκέντρωση AQUI-S® (ppm)	n	Μέσος όρος pH	Τυπικό σφάλμα	Συντελεστής παραλλακτικότητας	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
0	15	6,57 ^a	0.04	1,61%	6,38	6,77
30	15	6,80 ^b	0.04	2,50%	6,57	7,1
50	15	6,77 ^b	0.04	2,38%	6,55	7,18
70	15	6,80 ^b	0.04	2,64%	6,54	7,17
Σύνολο	60					
P-value		***				

P: Επίπεδο σημαντικότητας, *** $P < 0,01$

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με κοινό γράμμα εκθέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά



Εικόνα 3.20: Μέσο pH του δεξιού μέσου τμήματος του φιλέτου στις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S[®], με όρια εμπιστοσύνης 95%.

- **Δεξί κάτω τμήμα του φιλέτου**

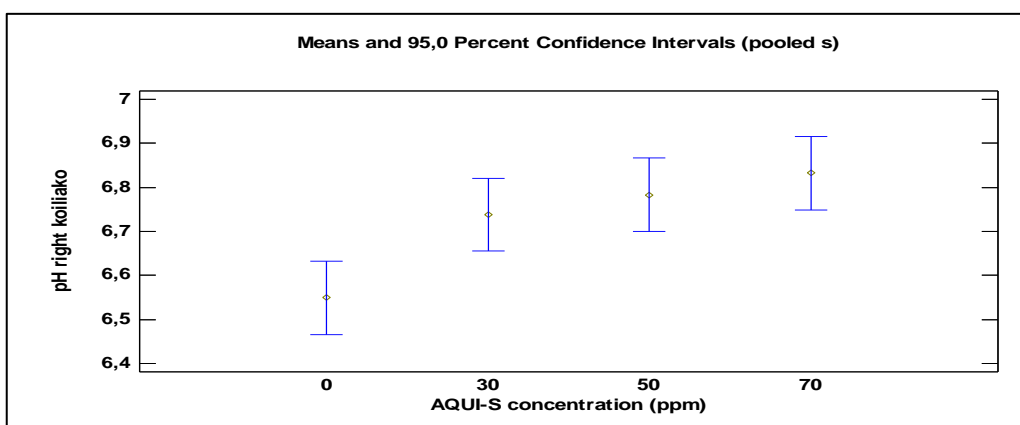
Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων του pH στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AQUI-S[®] ($P < 0.001$), όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.14. Ακολουθεί η απεικόνιση του μέσου pH για κάθε συγκέντρωση AQUI-S[®] (Εικόνα 3.21).

Πίνακας 3.14: Περιληπτικά στατιστικά του pH του δεξιού κάτω τμήματος του φιλέτου

Συγκέντρωση AQUI-S [®] (ppm)	n	Μέσος όρος pH	Τυπικό σφάλμα	Συντελεστής παραλλακτικότητας	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
0	15	6,55 ^a	0,04	1,37%	6,35	6,69
30	15	6,74 ^b	0,04	2,62%	6,5	7,14
50	15	6,78 ^b	0,04	2,32%	6,57	7,21
70	15	6,83 ^b	0,04	2,91%	6,53	7,28
Σύνολο	60					
P-value		***				

P: Επίπεδο σημαντικότητας, *** $P < 0,01$

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με κοινό γράμμα εκθέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά



Εικόνα 3.21: Μέσο pH του δεξιού κάτω τμήματος του φιλέτου στις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S[®], με όρια εμπιστοσύνης 95%.

- **Μέσος όρος αριστερού φιλέτου**

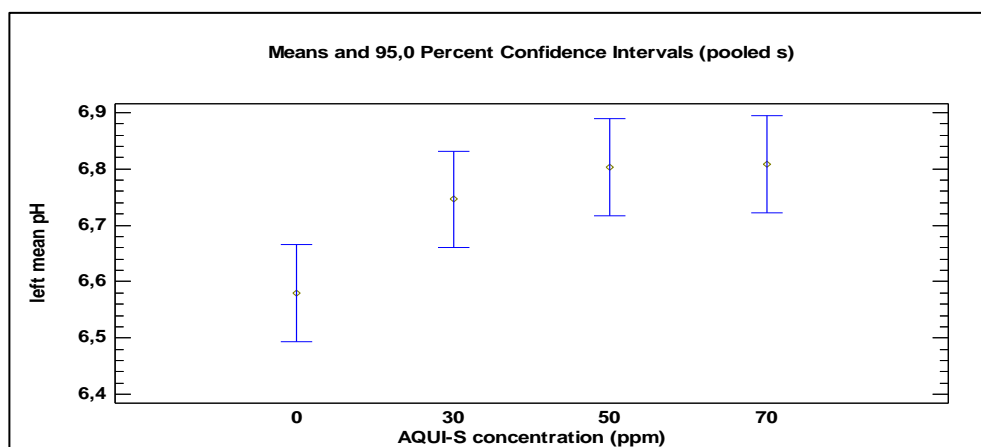
Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων του pH στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AQUI-S® ($P < 0.001$), όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.15. Ακολουθεί η απεικόνιση του μέσου pH του αριστερού φιλέτου για κάθε συγκέντρωση AQUI-S® (Εικόνα 3.22).

Πίνακας 3.15: Περιληπτικά στατιστικά του pH του αριστερού φιλέτου

Συγκέντρωση AQUI-S® (ppm)	n	Μέσος όρος pH	Τυπικό σφάλμα	Συντελεστής παραλλακτικότητας	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
0	15	6,58 ^a	0,04	1,11%	6,45	6,68
30	15	6,74 ^b	0,04	3,04%	6,44	7,08
50	15	6,80 ^b	0,04	2,52%	6,64	7,2
70	15	6,81 ^b	0,04	2,66%	6,49	7,16
Σύνολο	60				6,44	7,2
P- value		***				

P: Επίπεδο σημαντικότητας, *** $P < 0,001$

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με κοινό γράμμα εκθέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά



Εικόνα 3.22: Μέσο pH του αριστερού φιλέτου στις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S®, με όρια εμπιστοσύνης 95%.

- **Μέσος όρος δεξιού φιλέτου**

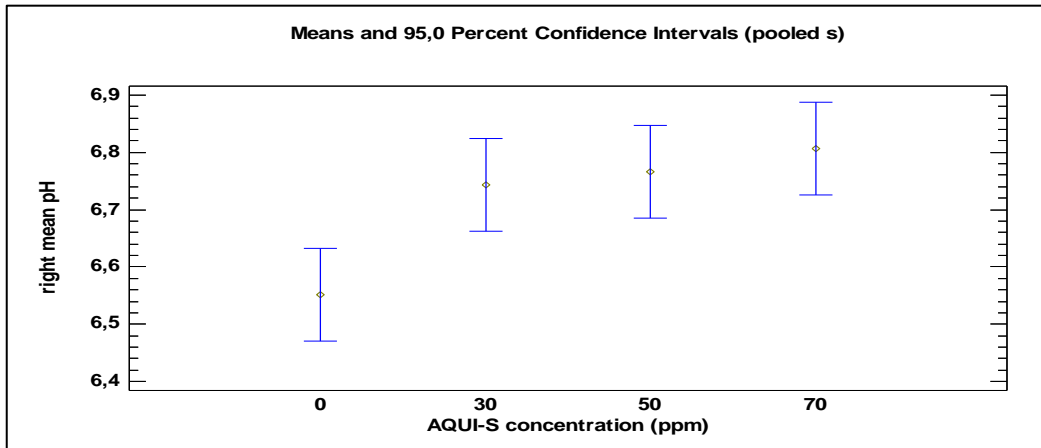
Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων του pH του δεξιού φιλέτου στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AQUI-S® ($P < 0.001$), όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.16. Ακολουθεί η απεικόνιση του μέσου pH για κάθε συγκέντρωση AQUI-S® (Εικόνα 3.23).

Πίνακας 3.16: Περιληπτικά στατιστικά του pH του δεξιού φιλέτου

Συγκέντρωση AQUI-S® (ppm)	n	Μέσος όρος pH	Τυπικό σφάλμα	Συντελεστής παραλλακτικότητας	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
0	15	6,55 ^a	0,04	1,39%	6,37	6,67
30	15	6,74 ^b	0,04	2,67%	6,5	7,10
50	15	6,77 ^b	0,04	2,24%	6,54	7,16
70	15	6,81 ^b	0,04	2,73%	6,53	7,22
Σύνολο	60					
P- value		***				

P: Επίπεδο σημαντικότητας, *** $P < 0,01$

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με κοινό γράμμα εκθέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά



Εικόνα 3.23: Μέσο pH του δεξιού φιλέτου στις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S[®], με όρια εμπιστοσύνης 95%.

- **Μέσος όρος φιλέτων**

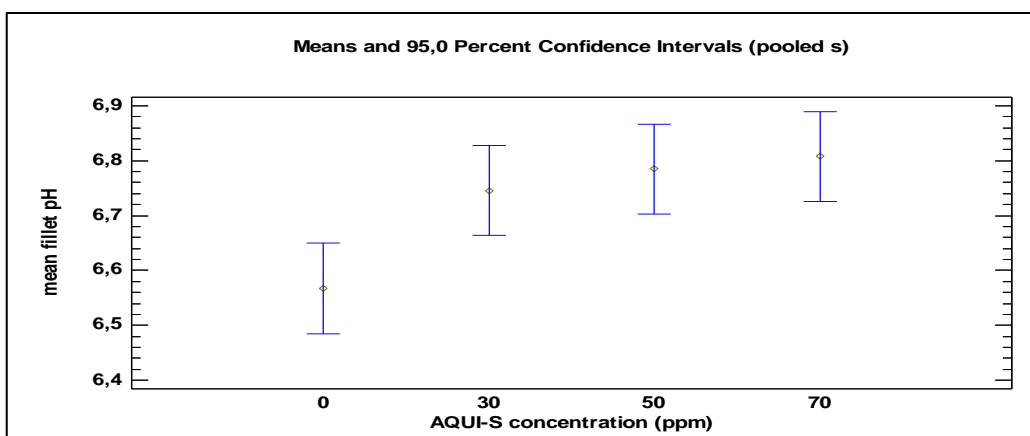
Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων του pH στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του AQUI-S[®] ($P < 0.001$), όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.17. Ακολουθεί το ιστόγραμμα του μέσου pH για κάθε συγκέντρωση AQUI-S[®] (Εικόνα 3.24).

Πίνακας 3.17: Περιληπτικά στατιστικά του μέσου pH του συνόλου των τμημάτων των φιλέτων.

Συγκέντρωση AQUI-S [®] (ppm)	n	Μέσος όρος pH	Τυπικό σφάλμα	Συντελεστής παραλλακτικότητας	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
0	15	6,58 ^a	0,04	1,21%	6,42	6,68
30	15	6,75 ^b	0,04	2,79%	6,47	7,08
50	15	6,78 ^b	0,04	2,33%	6,6	7,18
70	15	6,81 ^b	0,04	2,68%	6,51	7,19
Σύνολο	60					
P-value		***				

P: Επίπεδο σημαντικότητας, *** $P < 0,001$

Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με κοινό γράμμα εκθέτη δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά



Εικόνα 3.24: Μέσο pH του συνόλου των τμημάτων των φιλέτων στις διαφορετικές συγκεντρώσεις AQUI-S[®], με όρια εμπιστοσύνης 95%.

3. 6 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του AQUI-S® στη δεξαμενή αναισθητοποίησης

Με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς και την εξίσωση της γραμμής τάσης $y = 0,0104x - 0,0081$ ($R^2 = 99,63\%$) υπολογίστηκε η συγκέντρωση του AQUI-S® στη δεξαμενή αναισθητοποίησης. Τα αποτελέσματα αναφέρονται στον Πίνακα 3.18 για το Πείραμα B1 και στον Πίνακα 3.19 για το Πείραμα B2.

Πίνακας 3.18: Αποτελέσματα προσδιορισμού της συγκέντρωσης του AQUI-S® των δεξαμενών αναισθητοποίησης στο πείραμα B1.

Δείγμα νερού	Οπτική απορρόφηση (352 nm)	AQUI-S (mg/L)	Επιθυμητή συγκέντρωση AQUI-S® (mg/L)	Διαφορά από την επιθυμητή συγκέντρωση (%)
30A	0,261	25,88	30	-13,8
30A1	0,257	25,49	30	-15,0
30A4	0,258	25,54	30	-14,9
30T	0,270	26,74	30	-10,9
50A	0,512	49,96	50	-0,1
50A2	0,453	44,29	50	-11,4
50A5	0,421	41,21	50	-17,6
50T	0,399	39,10	50	-21,8
70A	0,639	62,17	70	-11,2
70A3	0,668	64,96	70	-7,2
70A6	0,673	65,44	70	-6,5
70T	0,618	60,15	70	-14,1

Πίνακας 3.19: Αποτελέσματα προσδιορισμού της συγκέντρωσης του AQUI-S® των δεξαμενών αναισθητοποίησης πείραμα B2

Δείγμα νερού	Οπτική απορρόφηση (352 nm)	AQUI-S® (mg/L)	Επιθυμητή συγκέντρωση AQUI-S® (mg/L)	% Διαφορά από την επιθυμητή συγκέντρωση
30A	0,247	24,53	30	-18,2
B1	0,257	25,44	30	-15,2
H2	0,249	24,72	30	-17,6
30T	0,250	24,82	30	-17,3
50A	0,481	47,03	50	-5,9
B4	0,451	44,10	50	-11,8
H1	0,478	46,69	50	-6,6
50T	0,476	46,50	50	-7,0
70A	0,730	70,97	70	+1,4
H4	0,690	67,08	70	-4,2
H5	0,730	70,92	70	+1,3
70T	0,689	67,03	70	-4,2

4. Συζήτηση- Συμπεράσματα

4.1 Επίδραση του σωματικού βάρους και της συγκέντρωσης του AQUI-S® στο χρόνο επαγωγής στο στάδιο αναισθησίας 5 και στο χρόνο επαναφοράς (Πείραμα A1)

Αρχικά έπρεπε να διαπιστωθεί αν το σωματικό βάρος παίζει ρόλο στην απόδοση του AQUI-S®, και αν θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στον καθορισμό της δραστικής συγκέντρωσης κατά περίπτωση. Ο έλεγχος της υπόθεσης ότι το σωματικό βάρος επιδρά στο χρόνο επαγωγής και επαναφοράς έγινε σε ένα εύρος σωματικού βάρους από 105,0 έως 285,0 g.

Σε γενικές γραμμές σε καμία από τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν δε φάνηκε να υπάρχει γραμμική ή οποιαδήποτε άλλη συσχέτιση του σωματικού βάρους και του χρόνου επαγωγής στο στάδιο 5 της αναισθησίας. Ταυτόχρονα, το σωματικό βάρος δε βρέθηκε να σχετίζεται με το χρόνο επαναφοράς, ενώ διαπιστώθηκε ότι στο εύρος του σωματικού βάρους των ιχθύων που πραγματοποιήθηκε το πείραμα A1, ο μόνος παράγοντας που επιδρά στατιστικά σημαντικά στο χρόνο επαγωγής και το χρόνο επαναφοράς είναι η συγκέντρωση του AQUI-S®.

Τα ευρήματα αυτά ενισχύονται και από τα αποτελέσματα των Bosworth et al. (2007), οι οποίοι επισημαίνουν ότι το ίδιο εύρος συγκέντρωσης AQUI-S® (25-35 ppm) προκαλεί τα ίδια αποτελέσματα σε ιχθύδια (73,2 g) αλλά και ενήλικα άτομα (430 g) του είδους *Ictalurus punctatus*, σε ότι αφορά τη δραστικότητα στην αναισθητοποίησή τους. Αντίθετα, τα ιχθύδια του είδους *Micropterus salmoides* είχαν μικρότερους χρόνους επαγωγής και επαναφοράς σε σχέση με ενήλικα άτομα, διπλάσιου μεγέθους κατά την έκθεσή τους στις ίδιες συγκεντρώσεις (Bowker et al., 2006).

Ταυτόχρονα με την καταγραφή του χρόνου επαγωγής στο στάδιο 5, καταγράφονταν και ο χρόνος επαγωγής του 50% και του 100% των ιχθύων στο στάδιο 3b. Για τα 30 ppm αυτός ήταν 2 και 8 λεπτά αντίστοιχα, για τα 50 ppm 1 και 2 λεπτά αντίστοιχα, για τα 70 ppm 1 και 2 λεπτά ενώ για τα 90 ppm δεν υπήρχε μεγάλη διαφορά μεταξύ των δύο χρόνων και ήταν κατά μέσο όρο 1 λεπτό.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Iversen et al., (2003), όπου βρέθηκε ότι σε ιχθύδια σολομού (*Salmo salar*) των 45g σε θερμοκρασία 5,4 °C ο χρόνος επαγωγής για το στάδιο 3b ήταν μεγαλύτερος από 5 λεπτά στα 30 ppm, μικρότερος από 5 λεπτά στα 50 ppm ενώ ήταν μικρότερος από 3 λεπτά στα 100 ppm. Βέβαια, οι χρόνοι επαγωγής της παρούσας εργασίας εμφανίζονται μικρότεροι πιθανώς λόγω της μεγάλης διαφοράς στη θερμοκρασία διεξαγωγής των πειραμάτων.

Αναλυτικά, στα 30 ppm ο μέσος χρόνος επαγωγής στο στάδιο 5 της αναισθησίας ήταν 26 λεπτά, παρουσιάζοντας ένα εύρος από 15 έως 35 λεπτά. Αυτός ο χρόνος απέχει κατά πολύ από τα κριτήρια του «αδανικού αναισθητικού», όπως έχουν αναφερθεί στο Κεφάλαιο 1.6 της Εισαγωγής. Επιπλέον, στα 30 ppm ο χρόνος επαναφοράς κυμάνθηκε από 4 έως 11 λεπτά, με μέσο χρόνο τα 7 λεπτά.

Στα 50 ppm ο μέσος χρόνος επαγωγής στο στάδιο 5 της αναισθησίας ήταν 9 λεπτά, παρουσιάζοντας ένα εύρος από 5 έως 20 λεπτά. Ο χρόνος επαναφοράς κυμάνθηκε από 3 έως 18 λεπτά με μέσο όρο τα 7 λεπτά.

Στα 70 ppm ο μέσος χρόνος επαγωγής στο στάδιο 5 της αναισθησίας ήταν 6 λεπτά, με εύρος τιμών από 3 έως 7 λεπτά. Ο χρόνος επαναφοράς ήταν μεγαλύτερος από τον ιδανικό χρόνο των 5 λεπτών με μέσο όρο τα 13 λεπτά. Παράλληλα, οι Erikson et al.,(2012) παρατήρησαν ότι ο χρόνος επαγωγής στο στάδιο 4-5 της αναισθησίας επιτυγχάνονταν σε 7-9 λεπτά ή σε 4-6 λεπτά εάν επρόκειτο για ιχθύς σε κατάσταση stress με τη χρήση συγκέντρωσης 68 mg/L AQUI-S[®], ερχόμενοι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Στα 90 ppm ο μέσος χρόνος επαγωγής στο στάδιο 5 της αναισθησίας ήταν 5 λεπτά, παρουσιάζοντας μικρό εύρος τιμών, δηλαδή από 3 έως 6 λεπτά. Ο χρόνος επαναφοράς όμως ήταν κατά μέσο όρο στα 17 λεπτά, με ελάχιστη τιμή τα 11 λεπτά. Επίσης, στα 110 ppm αν και ο χρόνος επαγωγής ήταν αρκετά μικρός με μέσο όρο τα 4 λεπτά, κατά την επαναφορά παρατηρήθηκε 50% θνησιμότητα από την πρώτη επανάληψη.

Συγκριτικά με άλλα αναισθητικά, η δραστική συγκέντρωση του γαρυφαλέλαιου για την επαγωγή στο στάδιο 4 της αναισθησίας σε χρόνο μικρότερο των 3 λεπτών και την επαναφορά σε χρόνο μικρότερο των 10 λεπτών, σε ιχθύδια τσιπούρας, κυμαίνεται από τα 40 mg/L έως τα 55 mg/L, ενώ για τη 2-phenoxyethanol από τα 300 mg/L έως τα 450 mg/L, καθώς μειώνεται η θερμοκρασία από τους 25 στους 15 °C (Mylonas et al., 2005).

Η θερμοκρασία αποτελεί παράγοντα που παίζει ρόλο στη δράση ενός αναισθητικού καθώς επηρεάζει το ρυθμό μεταβολισμού των ιχθύων (Ross and Ross, 2008; Brown, 2011). Κατά τη διάρκεια του Πειράματος A1, αν και κυμάνθηκε από 17,5 έως 19,9 °C, η διακύμανση αυτή δε φαίνεται να επηρέασε το χρόνο επαγωγής (P>0,05). Αυτή η διαπίστωση έρχεται σε συνάρτηση με τα αποτελέσματα των Bosworth et al. (2007), οι οποίοι εξέτασαν την ίδια συγκέντρωση AQUI-S[®] σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες (10, 20 και 30 °C) και απέδειξαν ότι μόνο στους 30 °C ο χρόνος επαγωγής στο στάδιο αναισθησίας 3b και επαναφοράς μειώθηκε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα αποτελέσματα των 10 και 20 °C, τα οποία δε διέφεραν μεταξύ τους.

Τα αποτελέσματά μας ενισχύονται και από τους Kildea et al. (2004), οι οποίοι δεν παρατήρησαν διαφορές στο χρόνο αναισθητοποίησης σε ενήλικα άτομα του είδους *Bidyanus bidyanus*, με μέσο σωματικό βάρος τα 457±16 g, συγκρίνοντας τους χρόνους επαγωγής δύο θερμοκρασιακών συνθηκών, στους 13,2 και τους 25,1 °C .

Επίσης, στο είδος *Gadus morhua* (Erikson et al., 2012) η αναισθητοποίηση ιχθύων με μέσο βάρος 1660± 314 g, σε θερμοκρασία 6,7-7,9 °C με τη χρήση συγκέντρωσης 68 mg/L είχε παρόμοια αποτελέσματα στο χρόνο επαγωγής με την παρούσα εργασία, όπου η θερμοκρασία ξεπέρασε τους 17 °C. Αντίθετα, οι Bowker et al. (2006) παρατήρησαν ότι ο χρόνος επαγωγής και επαναφοράς στα άτομα του είδους *M.*

salmoides αυξήθηκε κατά τους χειρισμούς στους 12,5 °C σε σχέση με τους χειρισμούς που διεξήχθησαν στους 18 °C.

Συμπερασματικά, δε φαίνεται να υπάρχει «αποτελεσματική» συγκέντρωση του AQUI-S[®], η οποία να είναι διαφορετική για κάθε είδος ιχθύος, να εξαρτάται από το βάρος των ιχθύων και να επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία. Αντίθετα, υπάρχει ένα εύρος συγκεντρώσεων από 25-70 ppm, το οποίο φαίνεται ότι παρέχει καλά αποτελέσματα αναισθητοποίησης σε διαφορετικά είδη ιχθύων, διαφορετικού βάρους και θερμοκρασιακών συνθηκών (Iversen et al., 2003; Hill and Forster, 2004; Kildea et al., 2004; Bowker et al., 2006; Bosworth et al., 2007; Erikson et al., 2012, Wilkinson et al., 2008).

4.2 Καθορισμός απαιτούμενου χρόνου έκθεσης στο AQUI-S[®] για διενέργεια αιμοληψίας (Πείραμα A2)

Καθορίστηκε ο μέσος χρόνος που απαιτείται για να φτάσει ο ιχθύς στο στάδιο 4 της αναισθησίας. Όπως ήταν αναμενόμενο ο χρόνος επαγωγής 4 ήταν αρκετά μικρότερος από το χρόνο επαγωγής στο στάδιο 5. Ταυτόχρονα, απείχε κατά πολύ περισσότερο από το χρόνο που απαιτείται για την πλήρη απώλεια της ισορροπίας και της κολυμβητικής ικανότητας (στάδιο 3b).

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτό το πείραμα αλλά και από το σύνολο των παρατηρήσεων στους χειρισμούς του Πειράματος A1 και του Πειράματος B1, διαμορφώθηκαν οι προκαθορισμένοι χρόνοι παραμονής στη δεξαμενή αναισθητοποίησης στο τελευταίο πείραμα (Πείραμα B2), δηλαδή, 12, 5 και 3 λεπτά αντίστοιχα με τις συγκεντρώσεις AQUI-S[®] 30, 50 και 70 ppm.

4.3 Επίδραση της συγκέντρωσης του AQUI-S[®] στα επίπεδα γλυκόζης και αιματοκρίτη μετά από αναισθησία στο στάδιο 4 (Πείραμα B1)

Συγκέντρωση γλυκόζης

Σε ό,τι αφορά τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος, δε φαίνεται να έχει επίδραση η συγκέντρωση του AQUI-S[®] στην οποία εκτέθηκαν οι ιχθύες αλλά ο χρόνος έκθεσης σε αυτό. Βέβαια, ενώ δε βρέθηκε γραμμική ή άλλη συσχέτιση των επιπέδων γλυκόζης και του χρόνου έκθεσης στο AQUI-S[®] στις συγκεντρώσεις 30 και 50 ppm, στα 70 ppm φάνηκε ότι υπάρχει μέτρια συσχέτιση. Τελικά, ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει τα επίπεδα της γλυκόζης φάνηκε να είναι μόνο ο χρόνος έκθεσης στο AQUI-S[®] ($P < 0,05$).

Αιματοκρίτης

Σε ό,τι αφορά τον αιματοκρίτη δε φάνηκε να υπάρχει γραμμική ή όποια άλλη συσχέτιση μεταξύ της τιμής του και του χρόνου έκθεσης στο AQUI-S[®] στα 30 και τα 50 ppm, ενώ στη συγκέντρωση των 70 ppm φαίνεται ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση ($r = 0,730$). Κατόπιν, κατά την εφαρμογή πολυπαραγοντικής ανάλυσης διακύμανσης

φάνηκε ότι η συγκέντρωση του AQUI-S[®] ($P < 0,001$) και ο χρόνος έκθεσης σε αυτό ($P < 0,05$) επιδρούν ταυτόχρονα στον καθορισμό της τιμής του αιματοκρίτη. Ο μέσος όρος στα 30 ppm ήταν αρκετά χαμηλότερος και διέφερε στατιστικά σημαντικά από το μέσο όρο των 50 ppm και των 70 ppm, οι οποίοι δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Παρόμοια αποτελέσματα στον αιματοκρίτη παρατηρούνται και με τη χρήση γαρυφαλέλαιου. Η αναισθητοποίηση ατόμων τσιπούρας μικρότερου σωματικού βάρους ($90,1 \pm 19,6$ g) με τη χρήση γαρυφαλέλαιου συγκέντρωσης 0,2 mL/L, 0,1 mL/L και 0,05 mL/L, ύστερα από έκθεση 10 λεπτών, έδωσε τιμές αιματοκρίτη $25,32 \pm 1,36\%$, $24,48 \pm 1,14\%$ και $18,74 \pm 2,76\%$ αντιστοίχως. Αντιθέτως, η έκθεση για 10 λεπτά σε 2-phenoxyethanol συγκέντρωσης 0,05 mL/L έδωσε τιμές αιματοκρίτη $16,96 \pm 1,16\%$ με στατιστικά σημαντική διαφορά από το μάρτυρα (χωρίς χρήση αναισθητικού), όπου η τιμή του αιματοκρίτη ήταν $21,34 \pm 1,42\%$ και από τους χειρισμούς με το γαρυφαλέλαιο (Tort et al., 2002). Αν και μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην τιμή του αιματοκρίτη, διαφαίνεται η τάση αύξησής του καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του γαρυφαλέλαιου.

Συνοψίζοντας, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του AQUI-S[®], ο κύριος παράγοντας που καθορίζει τους δύο δείκτες stress που εξετάστηκαν, είναι ο χρόνος έκθεσης στο AQUI-S[®]. Βέβαια, παρόλο που ο χρόνος έκθεσης στο AQUI-S[®] στη συγκέντρωση των 30 ppm ήταν αρκετά μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν στα 50 ή 70 ppm, αναμέναμε ότι αυτή η παρατεταμένη έκθεση θα είχε μεγαλύτερη επίδραση στους δείκτες stress. Εντούτοις, η παρατεταμένη έκθεση δεν οδήγησε σε αύξηση του αιματοκρίτη, ταυτόχρονα όμως, αν και τα επίπεδα της γλυκόζης τείνουν να είναι χαμηλότερα, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Παράλληλα, διακρίνεται η τάση που υπάρχει στη συγκέντρωση των 70 ppm για αύξηση των επιπέδων των δύο αυτών δεικτών, ενισχύοντας την υπόθεση ότι η έκθεση σε αυξημένη συγκέντρωση αναισθητικού προκαλεί επιπλέον stress, κατ' αντιστοιχία με τα ευρήματα των Tort et al. (2002).

4.4 Επίδραση της συγκέντρωσης του AQUI-S[®] στα επίπεδα της γλυκόζης, του αιματοκρίτη και του pH του μυός μετά από θανάτωση στο παγόνερο (Πείραμα B2)

Συγκέντρωση γλυκόζης

Ο χρόνος παραμονής στο παγόνερο χωρίς να προηγηθεί αναισθησία φαίνεται ότι έχει μέτρια συσχέτιση με τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος. Επιπλέον, ο χρόνος δειγματοληψίας (δηλαδή το άθροισμα του προκαθορισμένου χρόνου έκθεσης στο AQUI-S[®] και του χρόνου παραμονής στο παγόνερο) δε φάνηκε να έχει συσχέτιση με τη γλυκόζη στα 30 και τα 50 ppm. Αντίθετα, σε συνάρτηση με τα αποτελέσματα του Πειράματος B1, στα 70 ppm φάνηκε ότι υπάρχει μέτρια συσχέτιση μεταξύ του χρόνου δειγματοληψίας (που σε αυτή την περίπτωση ο χρόνος έκθεσης στο AQUI-S[®] είναι 3 λεπτά ενώ στο παγόνερο δεν ξεπέρασε τα 16 λεπτά) και της συγκέντρωσης της γλυκόζης.

Συνολικά στη συγκέντρωση της γλυκόζης φάνηκε να επιδρούν δύο παράγοντες, με πιο σημαντικό παράγοντα τη συγκέντρωση του AQUI-S[®] ($P < 0,001$), ενώ έπεται ο συνολικός χρόνος δειγματοληψίας ($P < 0,01$). Φάνηκε ότι η γλυκόζη παραμένει σε χαμηλότερα επίπεδα στους μάρτυρες, όπου δεν προηγήθηκε εμβάπτιση στο AQUI-S[®], παρόλο που ο χρόνος στο παγόνερο ήταν σημαντικά μεγαλύτερος. Τα επίπεδα της γλυκόζης όταν οι ιχθύες εκτίθενται σε 30 ppm AQUI-S[®] χωρίς μετέπειτα εισαγωγή σε παγόνερο σε σύγκριση με τα επίπεδα της γλυκόζης όταν υπάρχει άμεση εισαγωγή στο παγόνερο δε διαφοροποιούνται, όπως έχουν ήδη αναφέρει οι Ribas et al. (2007), οι οποίοι χρησιμοποίησαν την υποθερμία και το γαρυφαλέλαιο για την αναισθητοποίηση ατόμων του είδους *Solea senegalensis*. Επίσης, ο παρατεταμένος χρόνος έκθεσης στη συγκέντρωση 30 ppm σε συνδυασμό με τον αυξημένο χρόνο παραμονής στο παγόνερο, αυξάνουν σημαντικά τα επίπεδα της γλυκόζης σε σύγκριση με τις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις όπου ο συνολικός χρόνος μέχρι τη θανάτωση είναι αρκετά μικρότερος.

Αιματοκρίτης

Για τον αιματοκρίτη δε φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση με το χρόνο δειγματοληψίας σε καμία από τις συγκεντρώσεις του AQUI-S[®]. Ταυτόχρονα, ούτε η συγκέντρωση του AQUI-S[®] φάνηκε να επιδρά στην τιμή του αιματοκρίτη. Εντούτοις, στα 50 και 70 ppm ο αιματοκρίτης παρουσιάζει την τάση για μεγαλύτερο μέσο όρο σε σχέση με το μάρτυρα και τα 30 ppm, αν και αυτή η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Η ίδια τάση για αύξηση της τιμής του αιματοκρίτη ύστερα από συνδυασμό υποθερμίας (εισαγωγή σε παγωμένο νερό) και νάρκωσης με CO₂ σε σύγκριση με την άμεση εισαγωγή σε παγωμένο νερό, έχει παρατηρηθεί και στο είδος *Salvelinus alpinus* (Seth et al., 2013).

pH φιλέτου

Όσο αφορά το pH του φιλέτου, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν κατά μέσο όρο 2 ώρες μετά τη θανάτωση. Είναι φανερό ότι όταν δεν προηγείται αναισθητοποίηση (μάρτυρας), το pH είναι σημαντικά χαμηλότερο σε σχέση με τις υπόλοιπες επεμβάσεις στις οποίες προηγείται αναισθησία. Αυτό πιθανά να οφείλεται στην παρατεταμένη περίοδο όπου οι ιχθύες βιώνουν stress μέσα στο παγόνερο (Simitzis et al., 2013). Μεταξύ όμως των επεμβάσεων, όπου προηγήθηκε αναισθητοποίηση, δεν παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τιμή του pH.

Τα αποτελέσματα αυτά ήταν αναμενόμενα καθώς συνάδουν με τα αποτελέσματα των Matos et al. (2010) οι οποίοι προσδιόρισαν ότι το pH του φιλέτου τσιπούρας εμπορικού μεγέθους (536±96 g), ήταν στο χρόνο 0 6,49, όταν οι ιχθύες μεταφέρονταν απ' ευθείας στο παγόνερο, ενώ ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στο 6,67, όταν προηγείτο αναισθησία με χρήση AQUI-S[®] συγκέντρωσης 60μL/L. Οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι δύο ώρες μετά τη θανάτωση δεν υπήρχαν διαφορές στις τιμές του pH, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα δικά μας ευρήματα.

Επίσης, οι Ayala et al. (2010) παρατήρησαν ότι κατά τη θανάτωση ατόμων τσιπούρας εμπορικού μεγέθους (400 g) με εισαγωγή στο παγόνερο, το pH στο αριστερό φιλέτο στις τρεις πρώτες ώρες μετά τη θανάτωση ήταν $6,51 \pm 0,05$, κατ' αντιστοιχία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Οι Bagni et al. (2007) βρήκαν ότι 2 ώρες μετά τη θανάτωση με εισαγωγή στο παγόνερο ατόμων τσιπούρας εμπορικού μεγέθους (400 g) το pH ήταν $6,95 \pm 0,05$ ενώ ήταν σημαντικά χαμηλότερο, στο $6,79 \pm 0,07$ όταν προηγούνταν χειρισμός πρόκλησης stress με την αύξηση της ιχθυοπυκνότητας (crowding).

Στις εμπορικές συνθήκες το pH του φιλέτου τσιπούρας κατά την πρώτη ημέρα μετά τη θανάτωση φαίνεται να εξαρτάται και από τις θερμοκρασιακές συνθήκες, ώστε στους $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ να παίρνει μέση τιμή $6,15 \pm 0,03$ ενώ στους $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ να είναι αυξημένο με μια μέση τιμή $6,40 \pm 0,05$ (Grigorakis et al., 2003).

4.5 Έλεγχος της συγκέντρωσης του AQUI-S[®] στη δεξαμενή αναισθητοποίησης

Σύμφωνα με τον FDA η συγκέντρωση του αναισθητικού θεωρείται σταθερή αν δεν ξεπερνά το $\pm 25\%$ της θεωρητικά υπολογιζόμενης συγκέντρωσης. Από την εμπειρία στο εργαστήριο με τη χρήση της 2-rhenoxyethanol κατά τη διάρκεια ζυγισμάτων, είναι συνήθης πρακτική η προσθήκη επιπλέον ποσότητας αναισθητικού για τη διατήρηση της δραστηριότητάς του. Ακολούθησε έλεγχος για το αν αυτή η πρακτική θα πρέπει να ακολουθείται όταν γίνεται χρήση του AQUI-S[®] στη δεξαμενή αναισθητοποίησης όπου εμβαπτίζεται μεγάλος αριθμός ιχθύων.

Στο πείραμα B1 η συγκέντρωση που προσδιορίστηκε σε κάθε δείγμα δεν ξεπέρασε το $\pm 25\%$. Δεν παρατηρήθηκε τάση μείωσης της συγκέντρωσης κατά τη διενέργεια των επαναλήψεων εκτός από τη δεξαμενή συγκέντρωσης 50 ppm όπου παρατηρήθηκε μια σταδιακή μείωση. Στο Πείραμα B2 η συγκέντρωση που προσδιορίστηκε σε κάθε δείγμα δεν ξεπέρασε το $\pm 25\%$, ενώ δεν παρατηρήθηκε τάση μείωσης της συγκέντρωσης κατά τη διάρκεια των επαναλήψεων.

Οι μικρές αποκλίσεις που βρέθηκαν πιθανώς να έχουν προκληθεί λόγω προσθήκης περισσότερου όγκου νερού σε σχέση με τον αρχικώς υπολογιζόμενο στη δεξαμενή αναισθητοποίησης ή λόγω μη κανονικής διάχυσης στο σύνολο του όγκου του νερού. Βασιζόμενοι σε αυτά τα ευρήματα, είναι δυνατή η χρήση της ίδιας δεξαμενής χωρίς ανανέωση του AQUI-S[®] για τουλάχιστον 3 επαναλήψεις.

4.6 Σύγκριση του AQUI-S[®] με τον «ιδανικό αναισθητικό παράγοντα»

Όπως αυτός ορίζεται από τους: Marking and Meyer, (1985); Iwama and Ackerman, (1994); Coyle et al., (2004); Ross and Ross, (2008) και Brown, (2011):

• Ο χρόνος επαγωγής είναι σύντομος, (1-3 λεπτά) και συνοδεύεται από εμφάνιση ελάχιστης υπερδραστηριότητας ή stress.

Ο χρόνος επαγωγής στο στάδιο της πλήρους απώλειας ισορροπίας και κολυμβητικής ικανότητας (στάδιο 3b) για το σύνολο των ιχθύων βρέθηκε ότι είναι

μικρότερος από 3 λεπτά σε συγκεντρώσεις άνω των 50 ppm. Όμως το 50% των ιχθύων φθάνει στο στάδιο 3b σε χρόνο μικρότερο των 3 λεπτών και στη συγκέντρωση των 30 ppm. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν βίαιες κινήσεις ή απόπειρες διαφυγής στα 30, 50 ή τα 70 ppm.

• Η επαναφορά γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα (<5 λεπτά ή <15 λεπτά μετά από έκθεση 10 λεπτών) και δεν περιλαμβάνει ανεπιθύμητες παρενέργειες. Επίσης, δεν προκαλείται θάνατος μετά από παραμονή 15 λεπτών στο αναισθητικό.

Ύστερα από έκθεση 26 λεπτών, κατά μέσο όρο, στα 30 ppm ο χρόνος επαναφοράς ήταν μικρότερος από 10 λεπτά. Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ο χρόνος επαναφοράς ξεπέρασε το όριο των 5 λεπτών για έκθεση σε αυτό μικρότερη των 10 λεπτών. Δεν παρατηρήθηκε πρόκληση θανάτου στις μικρότερες συγκεντρώσεις εκτός από τη συγκέντρωση των 110 ppm.

• Το αναισθητικό ή η μέθοδος αναισθησίας χορηγείται εύκολα χωρίς πολύπλοκες διαδικασίες. Η αναισθητική ουσία είναι ευδιάλυτη στο νερό ή σε υδατικά διαλύματα.

Η δημιουργία του stock solution είναι μια απλή διαδικασία και ο υπολογισμός της επιλεγμένης συγκέντρωσης για δεξαμενή συγκεκριμένου όγκου, μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας ένα ζυγό ακριβείας δύο δεκαδικών ψηφίων, εφαρμόζοντας έναν απλό μαθηματικό τύπο. Η ανάμιξη του AQUI-S[®] γίνεται απ' ευθείας με γλυκό νερό, στο οποίο διαλύεται με έντονη ανακίνηση.

• Διατηρεί τα ζώα στην επιλεγμένη κατάσταση παρέχοντας ακινητοποίηση και αναλγησία.

Οι ιχθύες παρέμεναν στην ίδια κατάσταση χωρίς να παρατηρηθεί επαναφορά.

• Είναι αποτελεσματικός σε χαμηλές δόσεις και η τοξική δόση απέχει πολύ από τη δραστική δόση παρέχοντας ένα μεγάλο όριο ασφαλείας.

Η συγκέντρωση όπου παρατηρήθηκε σημαντικό ποσοστό θνησιμότητας (110 ppm) συνάδει με αυτή της βιβλιογραφίας (100 ppm) (Bosworth et al., 2007). Η προτεινόμενη συγκέντρωση που δίνει η εταιρεία (20 ppm για τη συλλογή των ιχθύων) απέχει 5 φορές από την τοξική συγκέντρωση, ενώ η συγκέντρωση που προτείνεται για εργαστηριακή χρήση με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, είναι τα 50 ppm, υποδιπλάσια της τοξικής συγκέντρωσης. Επισημαίνεται ότι η συγκέντρωση της ισοευγενόλης αντιστοιχεί στο 54% της συγκέντρωσης του AQUI-S[®].

• Είναι ασφαλής για το χρήστη στις δόσεις που χρησιμοποιείται χωρίς να είναι ερεθιστικός ή καρκινογόνος.

Μπορεί δυναμικά να προκαλέσει ευαισθητοποίηση στο ανθρώπινο δέρμα (Melles et al., 2013).

• Η προμήθειά του από τη χονδρική αγορά είναι εύκολη και το κόστος είναι χαμηλό.

Θεωρείται ως οικονομικό αναισθητικό (Ross and Ross, 2008), αν και στην Ευρώπη είναι εμπορικά διαθέσιμο μόνο από τη Νορβηγία.

- Η δραστηριότητά του παραμένει σταθερή στα διαλύματα εργασίας πάνω από 24 ώρες και είναι χημικά σταθερή για ένα εύλογο διάστημα αποθήκευσης.

Τα stock solution που παρασκευάστηκαν 24 ώρες πριν τη χρήση τους δε φάνηκε να προκαλούν διαφορές στους χρόνους επαγωγής σε σχέση με διαλύματα που παρασκευάστηκαν λίγο πριν τη χρήση τους. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των προτύπων διαλυμάτων που είχαν παρασκευαστεί για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τη μέθοδο HEPES/GIBBS, έδινε τα ίδια αποτελέσματα ακόμα και ένα μήνα μετά την παρασκευή τους.

- Απομακρύνεται γρήγορα από τον οργανισμό χωρίς υπολείμματα σε ιστούς, έχοντας μηδενικό (ή μικρό) χρόνο αναμονής πριν τη διάθεση του προϊόντος για κατανάλωση.

Η ισοευγενόλη είναι βιοδιασπώμενη ένωση. Έχει βρεθεί ότι η ισοευγενόλη μεταβολίζεται και αποβάλλεται, σχεδόν στο σύνολό της, στους αρουραίους μέσα σε 72 ώρες κυρίως μέσω των ούρων (Badger et al., 2002). Στους ιχθύς του είδους *B. bidyanus*, ύστερα από έκθεση διάρκειας μίας ώρας σε 15 ppm AQUI-S[®], σε θερμοκρασία 25 °C ή 13 °C και επαναφορά σε καθαρό νερό, φάνηκε ότι τα επίπεδα της ισοευγενόλης στο σώμα των ζώων είχαν μειωθεί σημαντικά και στις δύο θερμοκρασίες στις 12 ώρες ενώ στις 24 ώρες τα επίπεδα της ισοευγενόλης δεν ήταν πλέον ανιχνεύσιμα. Μεταξύ των δύο θερμοκρασιακών συνθηκών, βρέθηκε ότι η συσσώρευση της ισοευγενόλης στη χαμηλή θερμοκρασία ήταν μεγαλύτερη (Kildea et al., 2004).

Η έκθεση ενήλικων ατόμων *Pargus auratus* για 30 λεπτά σε 20 ppm AQUI-S[®] οδήγησε στην κατακράτηση της ισοευγενόλης στο σώμα σε γραμμική συσχέτιση με το χρόνο έκθεσης. Η απομάκρυνση από τον οργανισμό φαίνεται να πραγματοποιείται κυρίως από τα βράγχια. Τα επίπεδα της ισοευγενόλης στο σώμα μετά από 7 ώρες από την έκθεση, παρουσιάζουν σημαντική μείωση. Η αποθήκευση φιλέτων για 5 ημέρες σε συνθήκες ψύξης (4 °C) οδήγησε στη μείωση των επιπέδων της ισοευγενόλης στο 70% της αρχικής της συγκέντρωσης (Tuckey and Forgan, 2012).

Περαιτέρω έρευνες πρέπει να πραγματοποιηθούν πάνω σε αυτό το ζήτημα με έμφαση στη διάσπαση, το ρυθμό διάσπασης και τα παράγωγα της ισοευγενόλης σε σχέση με το χρόνο αποθήκευσης των φιλέτων σε συνθήκες κατάψυξης, προσομοιάζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τις εμπορικές πρακτικές.

Παρόλο που το AQUI-S[®] δεν έχει χρόνο αναμονής στις χώρες που χρησιμοποιείται, δεν υπάρχει ικανοποιητικός αριθμός εργασιών που να υποστηρίζουν ότι η ισοευγενόλη βιοδιασπάται στο σώμα του ιχθύος μετά το θάνατό του στις συνθήκες αποθήκευσης σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ακριβώς επειδή το αναισθητικό αυτό προωθείται για χρήση στις ιχθυοκαλλιεργητικές μονάδες στον τομέα της θανάτωσης των ιχθύων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, οφείλουμε να είμαστε πολύ προσεκτικοί πριν χαρακτηρίσουμε ότι αυτοί οι ιχθύες είναι ασφαλείς για άμεση κατανάλωση.

4.7 Συμπεράσματα

- Το σωματικό βάρος της ενήλικης τσιπούρας δεν επηρεάζει το χρόνο επαγωγής και επαναφοράς κατά την αναισθητοποίηση με ισοευγενόλη, στο θερμοκρασιακό εύρος 17,5 -22,3 °C
- 30 ppm AQUI-S®: Οι χρόνοι επαγωγής και επαναφοράς είναι μεγάλοι και ξεπερνούν τα όρια του «ιδανικού».
- 50 ppm AQUI-S®: Αν και ο χρόνος επαγωγής 3b είναι μέσα στα όρια του «ιδανικού», υπάρχει μεγάλος χρόνος επαναφοράς από το στάδιο 5 της αναισθησίας.
- 70 ppm AQUI-S®: Ο χρόνος επαγωγής 3b είναι μέσα στα όρια του «ιδανικού», ενώ ο χρόνος επαναφοράς από το στάδιο 5 της αναισθησίας είναι αρκετά μεγάλος.
- 90 ppm AQUI-S®: Έχει παρόμοια αποτελέσματα με τη συγκέντρωση 70 ppm.
- 110 ppm AQUI-S®: Παρατηρείται σημαντική θνησιμότητα ύστερα από έκθεση 4 λεπτών. Αποτελεί όμως κατάλληλη συγκέντρωση για θανάτωση «έκτακτης ανάγκης».
- Ο χρόνος έκθεσης στην ισοευγενόλη επηρεάζει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα και την τιμή του αιματοκρίτη ιδιαίτερα σε συγκεντρώσεις >37,8 ppm (70 ppm AQUI-S®)
- Ο συνδυασμός της αναισθητοποίησης με ισοευγενόλη και θανάτωσης με μεταφορά στο παγόνερο δρα συνεργιστικά στην αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης, ενώ η ίδια τάση διαφαίνεται και για την τιμή του αιματοκρίτη.
- Το pH του φιλέτου 2 ώρες μετά τη θανάτωση διατηρείται σε υψηλότερα επίπεδα όταν έχει προηγηθεί αναισθητοποίηση, ανεξάρτητα με τη συγκέντρωση της ισοευγενόλης, σε σχέση με την άμεση εισαγωγή στο παγόνερο.
- Η συγκέντρωση του AQUI-S® παραμένει σταθερή στη δεξαμενή αναισθητοποίησης για τη διενέργεια τουλάχιστον τριών επαναλήψεων.
- Η χρήση της στο εργαστήριο είναι εύκολη, χωρίς να έχουν παρατηρηθεί παρενέργειες στους χρήστες.
- Για τη διενέργεια αιμοληψίας ή γρήγορης επέμβασης (μετρήσεις σωματικών χαρακτηριστικών, εμβολιασμός) προτείνεται η χρήση ισοευγενόλης συγκέντρωσης 27 ppm (50 ppm AQUI-S®), καθώς προσφέρει γρήγορη απώλεια αισθήσεων χωρίς την εμφανή αύξηση των επιπέδων του stress.
- Συνεκτιμώντας όλα τα δεδομένα, προτείνεται η χρήση της ισοευγενόλης συγκέντρωσης 16,2 ppm (30 ppm AQUI-S®) για αναισθητοποίηση πριν τη θανάτωση στο παγόνερο, όταν οι χρόνοι παραμονής στο αναισθητικό δε δύναται να ελεγχθούν με ακρίβεια. Αντίθετα, αν ο χρόνος παραμονής στο αναισθητικό μπορεί να ελέγχεται συνεχώς τότε προτείνεται η χρήση της ισοευγενόλης

συγκέντρωσης 27 ppm (50 ppm AQUI-S[®]) καθώς ο χρόνος έκθεσης σε αυτή τη συγκέντρωση δεν επιδρά σημαντικά στους δείκτες stress, ενώ ο χρόνος που απαιτείται για τη θανάτωση στο παρόνερο μειώνεται σημαντικά και η ποιότητα του φιλέτου είναι αυξημένη (αυξημένο pH φιλέτου). Ταυτόχρονα, ο αιματοκρίτης δεν αυξάνεται σημαντικά ενώ τα επίπεδα γλυκόζης παρουσιάζουν μικρότερη αύξηση σε σχέση με τη χρήση των 30 ppm AQUI-S[®].

5. Βιβλιογραφία

- Álvarez, A. García García, B. Garrido, M.D. Hernández, M.D., (2008). The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture* 284: 106-114
- Ashley P.J., (2007). Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science* 104: 199–235
- Ayala M.D., Abdel I., Santaella, M., Martínez C. Periago M.J. Gil F., Blanco A., Albors O.L.,(2010). Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during post-mortem storage. *LWT - Food Science and Technology* 43:465-475
- Badger D.A., Smith R.L., Bao J., Kuester R.K., Sipes I.G., (2002). Disposition and metabolism of isoeugenol in the male Fischer 344 rat. *Food and Chemical Toxicology* 40: 1757-1765
- Bagni, M., Civitareale, C., Priori, A., Ballerini, A., Finoia, M., Brambilla, G., Marino, G., (2007). Preslaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 263:52-60
- Bagni M., Priori A., Finoia M.G., Bossu` , T., 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.
- Barry, T.P., Lapp, A.F., Kayes, T.B. and Malison, J.A. (1993). Validation of a microtitre plate ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquaculture* 117: 351–363
- Bauchot, M.-L., Hureau J.C, Miguel J.C., (1981). Sparidae. In W. Fischer, G. Bianchi and W.B. Scott (eds.) FAO species identification sheets for fishery purposes. Eastern Central Atlantic. (Fishing Areas 34, 47 (in part)). volume 4. FAO, Rome
- Bauchot, M.-L. and Hureau J.C., (1990). Sparidae. p. 790-812. In J.C. Quéro, J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post and L. Saldanha (eds.) Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. Vol. 2
- Bosworth, B.G., Small, B.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
- Bower C.F., Bidwell J.P., (1978). Ionisation of ammonia in sea water: effects of temperature, pH and salinity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 35:1012-1016

- 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. DRR-R6001-2006
- Bowser P.R.,(2001). Anesthetic Options for Fish, in In: Recent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia: Companion Animals, R. D. Gleed and J. W. Ludders (Eds.), International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA
- Boyd, N.S., Wilson, N.D., Jerret, A.R., Hall, B.I., 1984. Effects of brain destruction on post-harvest muscle metabolism in the fish kahawai (*Arripis trutta*). J. Food Sci. 49: 177–179
- Broom, D., (1998). Fish welfare and the public perception of farmed fish. In: Nash, C., Julien, V. (Eds.), Report Aquavision '98. The Second Nutreco Aquaculture Business Conference Stavanger Forum, vol. 1998, Norway, 13–15 May, pp. 89–91
- Brown L., (2011). Anaesthesia for fish. VIETFISH Vol 8, (2):68-70
- Bhuiya M.W., Liu C.J., (2009). A cost effective colorimetric assay for phenolic O-methyltransferases and characterization of caffeate 3-O-methyltransferases from *Populus trichocarpa*. Analytical Biochemistry 384:151-158
- Conte F. S., (2004). Stress and the welfare of cultured fish. Applied Animal Behaviour Science 86: 205–223
- Coyle S.D., Durborow R.M., Tidwell J. H., (2004). Anesthetics in Aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center. SRAC Publication No. 3900.
- Dacre J.C., (1971). Nonspecificity of the Gibbs Reaction. Analytical Chemistry 43:589-591.
- EFSA (2009) Food safety considerations concerning the species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed fish. The EFSA Journal 1190: 1–16.
- Erikson, U., Lambooi, B., Digre, H., Reimert, H.G.M., Bondø, M., der Vis, H.v., (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-STM. Aquaculture. 324-325: 135-144.
- Erikson, U., Sigholt, T., Seland, A., (1997). Handling stress and water quality during live transportation and slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 149: 243–252
- European Commission (2011) Commission regulation (EU) no 363/2011 of 13 April 2011 amending the annex to regulation (EU) No 37/2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, as regards the substance isoeugenol. Official Journal of the European Union L100: 28–29.

- FAO (Food and agriculture organisation), (2004). The State of World Fisheries and Aquaculture 2004. FAO, Rome.
- FAO (2005). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Sparus aurata*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Colloca, F.; Cerasi, S. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 8 February 2005. [Cited 6 September 2013].
- FAWC, (1996). Report on the Welfare of Farmed Fish. Farm Animal Welfare Council, UK.
- Flik G., Klaren P.H.M., Van den Burg .E.H., Metz J.R., Huising M.O.,(2006). CRF and stress in fish, *General and Comparative Endocrinology*, 146 (1): 36-44
- Gibbs H.D., (1927). Phenol Tests. III The Indophenol Test. From the Division of Chemistry, Hygienic Laboratory, United States Public Health Service, Washington. 649-663.
- Gines, R., Palicio, M., Zamorano, M.J., Arguello, A., Lopez, J.L., Afonso, J.M., (2002). Starvation before slaughtering as a tool to keep freshness attributes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquacult. Int.* 10: 379–389.
- Greenberg A.E., Clesceri L.S., Eaton A.D.,(Editors.), (1992b). Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, p. 4-84, 4500-NH3 – H.
- Greenberg A.E., Clesceri L.S., Eaton A.D.,(Editors.), (1992c). Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, p. 4-85, 4500-NO2-B.
- Grigorakis, K., Taylor, K. D. A., Alexis, M. N., (2003). Seasonal patterns of spoilage of ice-stored cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry* 81:263-268.
- HERA (2005). Risk Assessment of Isoeugenol
- Hill J.V., Forster M.E., (2004). Cardiovascular responses of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during rapid anaesthetic induction and recovery. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 137: 167–177
- HSA, (2005). Humane Harvesting of Salmon and Trout. Humane Slaughter Association, Wheathampstead.
- Huidobro A., Pastor A., Tejada M., 2000. Quality index method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Food Science* 65, 1202-1205.
- Huntingford F. A., Adams C., Braithwaite V. A., Kadri S., Pottinger T. G., SandØe P., Turnbull J. F., (2006). Current issues in fish welfare *Journal of Fish Biology* 68: 332–372

- Huntingford, F.A. & Kadri, S. (2008) Welfare and fish. In: Fish Welfare (ed. E.J. Branson), pp. 19–31. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
- 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
- Iwama, G.K., Ackerman P.A., (1994). Chapter 1 - Anaesthetics, In: P.W. Hochachka and T.P. Mommsen, Editor(s), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Elsevier, Volume 3: 1-15
- Iwama, G.K., McGeer, J.C., Pawluk, M.P., (1989). The effects of five fish anaesthetics on acid base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Can. J. Zool.* 67: 2065–2073
- Kelly, S.P. & Woo, N.Y.S. (1999) The response of sea bream following abrupt hyposmotic exposure. *Journal of Fish Biology* 55: 732–750
- Kestin, S.C., van de Vis, J.W., Robb, D.H.F., (2002). Protocol for assessing brain function in fish and the effectiveness of methods used to stun and kill them. *Veterinary Record* 150: 302–307
- Kildea, M.A., Allan, G.L., Kearney, R.E., (2004). Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUIS (™) from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture* 232: 265–277
- King, W., Hooper, B., Hillsgrave, S., Benton, C. and Berlinsky, D.L., (2005). The use of clove oil, metomidate, tricainemethanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.), *Aquaculture Research* 36: 1442–1449
- Lloris, D., (2005). A world overview of species of interest to fisheries. Chapter: *Sparus aurata*. Retrieved on 08 July 2005, from www.fao.org/figis/servlet/species?fid=2384. 3p. FIGIS Species Fact Sheets. Species Identification and Data Programme-SIDP, FAO-FIGIS
- Lowe, T.E., Ryder, J.M., Carragher, J.F., Wells, R.M.G., (1993). Flesh quality in snapper, *Pagrus auratus*, affected by capture stress. *J. Food Sci.* 58: 770–796
- Marking, L.L. and Meyer, F.P., (1985). Are better anaesthetics needed in fisheries? *Fisheries* 10: 2–5
- Martins C. I. M., Galhardo L., Noble C., Damsgard B., Zupa M. T. S. W., Beauchaud M., Kulczykowska E., Massabuau J., Carter T., Planellas S. R., Kristiansen T., (2011). Behavioural indicators of welfare in farmed fish. *Fish Physiol Biochem*
- Matos, E., Gonçalves, A., Nunes, M.L., Dinis, M.T., Dias, J. (2010). Effect of harvesting stress and slaughter conditions on selected flesh quality criteria of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 305: 66–72

- Melles, D., Vielhaber, T., Baumann, A., Zazzeroni, R., Karst, U., (2013). In chemico evaluation of skin metabolism: Investigation of eugenol and isoeugenol by electrochemistry coupled to liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 913-914: 106-112
- Miliou, H., Tsopelakos, A., Dalla, C. & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2011). Effects of pre-slaughter and slaughter methods to the brain monoaminergic activities and plasma glucose levels in sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Official Congress of European Aquaculture Society 2011, October, Rhodos, Abstracts, 711-712
- Mylonas C.C., Cardinaletti G., Sigelaki I. & Polzonetti- Magni A. (2005). Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture* 246: 467–481
- Ottera, H., Roth, B., Torrissen, O.J., (2001). Do killing methods affect the quality of Atlantic Salmon? In: Kestin, S.C., Warriss, P.D. (Eds.), *Farmed Fish Quality*. Blackwell Science Ltd, Oxford, pp. 398–399
- Pavlidis M.A., Mylonas C.C.,(Editors) (2011). *Sparidae: Biology and Aquaculture of Gilthead Sea Bream and Other Species*. Blackwell Publishing Ltd.
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., (1995). Biochemical effects of stress. In: P.W. Hochachka and T.P. Mommsen (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Environmental and Ecological Biochemistry. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, pp 349-379
- Pita, C., S. Gamito and K. Erzini, 2002. Feeding habits of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) from the Ria Formosa (southern Portugal) as compared to the black seabream (*Spondyliosoma cantharus*) and the annular seabream (*Diplodus annularis*). *J. Appl. Ichthyol.* 18:81-86
- Poli, B.M., Parisi, G., Scappini, F., Zampacavallo, G., (2005). Fish welfare and quality as affected by preslaughter and slaughter management. *Aquacult. Int.* 13:29-49
- Poli, B. M. (2009). Farmed fish welfare-suffering assessment and impact on product quality. *Italian Journal of Animal Science* 8: 139–160
- Ribas L., Flos R., Reig L., MacKenzie S., Barton B.A., Tort L., (2007). Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. *Aquaculture* 269: 250-258
- Robb, D.H.F., Kestin, S.C., Warriss, P.D., (2000). Muscle activity at slaughter: I. Changes in flesh colour and gaping in rainbow trout. *Aquaculture* 182: 261–269
- Robb, D.H.F., Kestin, S.C., (2002). Methods used to kill fish: field observations and literature reviewed. *Anim.Welfare* 11: 269–282
- Robb, D.H.F., Warriss, S.P.D., (1997). How killing methods affect salmonid quality. *Fish Farmer* 6:48-49

- Robb, D.H.F. (2001). The relationship between killing methods and quality. In: Kestin, S.C. and Warriss, P.D. (eds.), *Farmed Fish Quality*. Fishing News Books, Oxford, pp. 220–233
- Ross L.G., Ross B.,(Editors) (2008). *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. Blackwell Publishing Ltd
- Schoettger, R.A., Julin, M., (1967). Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids. *Invest. Fish Contr. U.S. Dept. Int.*, 13, pp. 1–15
- Schreck, C.B., Contreras-Sanchez, W., Fitzpatrick, M.S., (2001). Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture* 197: 3–24
- Seth H., Axelsson M., Sundh H., Sundell K., Kiessling A., Sandblom E., (2013). Physiological responses and welfare implications of rapid hypothermia and immobilisation with high levels of CO₂ at two temperatures in Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture* 402-403: 146-151
- Sneddon L.U., (2012) Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish, *Journal of Exotic Pet Medicine* 21,(1): 32-43
- Simitzis P.E., Tsopekokos A., Charismiadou M.A., Batzina A., Deligeorgis S.G., Miliou H., (2013). Comparison of the effects of six stunning/killing procedures on flesh quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) and evaluation of clove oil anaesthesia followed by chilling on ice/water slurry for potential implementation in aquaculture. *Aquaculture Research* 2013: 1-12
- Southgate, P., Wall, T., (2001). Welfare of farmed fish at slaughter. *In Practice* 23, 277.
- Tort L., Puigcerver M., Crespo S., Padros F., (2002). Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. *Aquaculture Research* 33:907-910
- Tsopekokos, A., Miliou, H., Dalla, C., Papadopoulou-Daifoti, Z., (2011). Effect of different stunning or/and killing treatments on the neurotransmitters of the central nervous system in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. 4th International Symposium “Hydrobiology – Fisheries”, June, Volos, Book of Abstracts, 106-110
- Tuckey, N.P.L., Forgan, L.G., (2012). A rapid and simple fluorometric method for quantifying isoeugenol in seawater and in plasma and white muscle from Australasian snapper (*Pagrus auratus*). *Food Chemistry* 133: 1664-1670
- van de Vis, H., Kestin, S., Robb, D., Oehlenschlager, J., Lambooj, B., Munkner, W., Kuhlmann, H., Kloosterboer, K., Tejada, M., Huidobro, A., Ottera, H., Roth, B., Sorensen, N.K., Akse, L., Byrne, H., Nesvadba, P., (2003). Is humane slaughter of fish possible for industry? *Aquaculture Research*. 34: 211–220

- Waddell, W.J., Crooks, N.H., Carmichael, P.L., (2004). Correlation of tumors with DNA adducts from methyl eugenol and tamoxifen in rats. *Toxicological Sciences* 79 (1): 38-40
- Wall, A.J., (2001). Ethical considerations in the handling and slaughter of farmed fish. In: Kestin, S.C., Warriss, P.D. (Eds.), *Farmed Fish Quality*. Blackwell Science Ltd., Oxford, pp. 108–115
- Wendelaar Bonga, S.E., (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77:591-625
- Wilkinson, R. J., Paton, N., & Porter, M.J.R. (2008). The effects of pre-harvest stress and harvest method on the stress response, rigor onset, muscle pH and drip loss in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 282: 26–32
- 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.
- Παπουτσόγλου Σ.Ε. (1994) Μαθήματα Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας. Ειδικό μέρος: Εκτροφές υδρόβιων οργανισμών. Γεωργικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα
- Παπουτσόγλου Σ.Ε. (1998) Ενδοκρινολογία Ιχθύων. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα
- Παπουτσόγλου Σ.Ε. (2008). Εισαγωγή στις υδατοκαλλιέργειες. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα
- <http://www.aquamedia.org> (FEAP, Production Report by Country, 2003-2012, July 2013)
- <http://www.fishbase.org>
- <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/fisheries/data/database>
- http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en