

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΧΡΗΣΗ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΟ ΛΑΒΡΑΚΙ  
(*Dicentrarchus labrax* L.), ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΟΥΣ ΣΤΟΝ  
ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΟ  
ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ**

**ΗΛΙΑΣ Δ. ΤΣΑΝΤΗΛΑΣ  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2011**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΧΡΗΣΗ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΟ ΛΑΒΡΑΚΙ**  
**(*Dicentrarchus labrax* L.), ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΟΥΣ ΣΤΟΝ**  
**ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΟ**  
**ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ**

**ΗΛΙΑΣ Δ. ΤΣΑΝΤΗΛΑΣ**  
**ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Απόστολος Δ. Γαλάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής	Επιβλέπων
Φωτεινή Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια	Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής
Νικήτας Ν. Πράσιнос, Επίκουρος Καθηγητής	Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής
Δημήτριος Ραπτόπουλος, Καθηγητής	Μέλος εξεταστικής επιτροπής
Μαρία Παπαναστασοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια	Μέλος εξεταστικής επιτροπής
Ιωάννης Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής	Μέλος εξεταστικής επιτροπής
Παναγιώτης Πανταζής, Λέκτορας	Μέλος εξεταστικής επιτροπής

**ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2011**



Στην οικογένειά μου,  
στο νέο μέλος της και ανιψιό μου  
και στους φίλους Ευρώπη, Νίτσα και Κώστα



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΕΛΙΔΑ
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	1
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	3
<b>ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ</b>	
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ</b>	
<b>I. ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑ ΙΧΘΥΩΝ</b>	7
A. Στάδια αναισθησίας	9
B. Παράγοντες που επηρεάζουν την αναισθησία των ιχθύων	10
B.1. Βιολογικοί παράγοντες	10
B.2. Περιβαλλοντικοί παράγοντες	14
Γ. Αναισθητικές ουσίες	15
Γ.1. Κριτήρια καταλληλότητας αναισθητικών ουσιών	15
Γ.2. Τεχνικές χορήγησης αναισθητικών ουσιών	16
Γ.3. Συνθετικές αναισθητικές ουσίες	17
Γ.3.1. Τρικάϊνη	17
Γ.3.2. Βενζοκαΐνη	19
Γ.3.3. Κιναλδίνη και θειική κιναλδίνη	20
Γ.3.4. Φαινοξυαιθανόλη	22
Γ.3.5. Μετομιδάτη και Ετομιδάτη	23
Γ.3.6. Διοξείδιο του άνθρακα	24
Γ.4. Φυσικές αναισθητικές ουσίες	25
Γ.4.1. Αιθέριο έλαιο γαριφάλου και παράγωγά του	25
Γ.5. Νομοθετικό πλαίσιο χρήσης των αναισθητικών ουσιών	26
Δ. Εναλλακτικές της αναισθησίας μέθοδοι	27
Δ.1. Υποθερμία	27
Δ.2. Ηλεκτροαναισθησία	28
<b>II. ΣΤΡΕΣ</b>	29
A. Το στρες στους ιχθύς	29
B. Αίτια πρόκλησης στρες στους ιχθύς	32
B.1. Ιχθυοκαλλιεργητικοί και κτηνιατρικοί χειρισμοί	32
B.2. Συνθήκες εκτροφής	34
B.3. Διατροφή	34
B.4. Ποιότητα του νερού	36
B.5. Μεταφορά	37
Γ. Μέτρα ελαχιστοποίησης του στρες	37
Δ. Τρόποι εκτίμησης του στρες	38
E. Στρες και ηλεκτρολυτική ισορροπία	45
ΣΤ. Στρες, μεταβολισμός και ανάπτυξη ιχθύων	47
ΣΤ.1. Επίδραση του στρες στην όρεξη και στην κατανάλωση τροφής	47
ΣΤ.2. Επίδραση του στρες στη λειτουργικότητα του πεπτικού σωλήνα	47
ΣΤ.3. Επίδραση του στρες στο μεταβολικό ρυθμό	48

ΣΤ.4. Επίδραση του στρες στους ορμονικούς μηχανισμούς ανάπτυξης	48
Z. Στρες και ανοσοποιητικό σύστημα ιχθύων	50
Z.1. Έμφυτη χυμική και κυτταρική ανοσία	51
Z.2. Επίκτητη χυμική και κυτταρική ανοσία	51
Z.3. Επίδραση του στρες στο ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων	52

<b>ΙΙΙ. ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ</b>	56
A. Παραγωγή λαβρακιού στην Ελλάδα και στην υφήλιο	56
B. Το λαβράκι	57
B.1. Ταξινόμηση και περιγραφή	57
B.2. Βιολογία	58
B.3. Εκτροφή	59
B.3.1. Εκτατική και ημιεντατική εκτροφή	60
B.3.2. Εντατική εκτροφή σε κλωβούς	60
B.3.3. Εντατική εκτροφή σε δεξαμενές	61
B.3.4. Εκκολαπτήρια	65
B.4. Ανάπτυξη και πάχυνση λαβρακιού	67

## **ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ Η ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΕΥΝΑ**

### **I. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ, ΩΣ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ, ΤΗΣ ΤΡΙΚΑΪΝΗΣ, ΤΗΣ ΒΕΝΖΟΚΑΪΝΗΣ, ΤΗΣ ΦΑΙΝΟΞΥΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΓΑΡΙΦΑΛΕΛΑΙΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΔΟΣΗΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟ ΛΑΒΡΑΚΙ**

	73
A. Υλικά και μέθοδοι	73
A.1. Ζωικό υλικό	73
A.2. Δεξαμενές εκτροφής	73
A.3. Συνθήκες εκτροφής	73
A.4. Δεξαμενές αναισθησίας και δεξαμενές ανάνηψης	75
A.5. Αναισθητικές ουσίες και παρασκευή διαλυμάτων τους	76
A.6. Δόσεις αναισθητικών ουσιών	77
A.7. Πειραματικό πρωτόκολλο	77
A.8. Στατιστική ανάλυση	79
B. Αποτελέσματα	79
Γ. Συζήτηση	82

### **ΙΙ. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΤΗΣ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΗΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΔΟΣΗΣ ΤΗΣ ΤΡΙΚΑΪΝΗΣ, ΤΗΣ ΒΕΝΖΟΚΑΪΝΗΣ, ΤΗΣ ΦΑΙΝΟΞΥΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΓΑΡΙΦΑΛΕΛΑΙΟΥ ΣΤΟ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟ ΛΑΒΡΑΚΙ**

	90
A. Υλικά και μέθοδοι	90
A.1. Ζωικό υλικό	90
A.2. Δεξαμενές εκτροφής	90
A.3. Συνθήκες εκτροφής	90
A.4. Δεξαμενές αναισθησίας και δεξαμενές ανάνηψης	90
A.5. Αναισθητικές ουσίες	90
A.6. Πειραματικό πρωτόκολλο	91



A.7. Στατιστική ανάλυση	92
B. Αποτελέσματα	92
Γ. Συζήτηση	94

**ΙΙΙ. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΒΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΜΕ ΤΡΙΚΑΪΝΗ, BENZOΚΑΪΝΗ, ΦΑΙΝΟΞΥΑΙΘΑΝΟΛΗ Η ΓΑΡΙΦΑΛΕΛΑΙΟ, ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΤΗΣ, ΣΤΟΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟΥ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ**

	98
A. Υλικά και μέθοδοι	98
A.1. Ζωικό υλικό	98
A.2. Δεξαμενές εκτροφής	98
A.3. Συνθήκες εκτροφής	98
A.4. Δεξαμενές αναισθησίας και δεξαμενές ανάνηψης	98
A.5. Αναισθητικές ουσίες	99
A.6. Πειραματικό πρωτόκολλο	99
A.7. Προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης, της γλυκόζης, των πρωτεϊνών και των ριζών σουπεροξειδίου	100
A.8. Στατιστική ανάλυση	102
B. Αποτελέσματα	102
Γ. Συζήτηση	107

**ΙV. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΒΟΛΗΣ ΤΗΣ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΜΕ ΤΡΙΚΑΪΝΗ, BENZOΚΑΪΝΗ, ΦΑΙΝΟΞΥΑΙΘΑΝΟΛΗ Η ΓΑΡΙΦΑΛΕΛΑΙΟ ΣΤΟΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟΥ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ**

	121
A. Υλικά και μέθοδοι	121
A.1. Ζωικό υλικό	121
A.2. Δεξαμενές εκτροφής	121
A.3. Συνθήκες εκτροφής	121
A.4. Δεξαμενές αναισθησίας και δεξαμενές ανάνηψης	122
A.5. Αναισθητικές ουσίες	122
A.6. Πειραματικό πρωτόκολλο	123
A.7. Προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης, της γλυκόζης, των πρωτεϊνών και της συγκέντρωσης των ριζών σουπεροξειδίου	125
A.8. Στατιστική ανάλυση	125
B. Αποτελέσματα	125
Γ. Συζήτηση	132

**ΙV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ**

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

**ABSTRACT**

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκαν η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια, ως αναισθητικών ουσιών, της τρικαΐνης, της βενζοκαΐνης, της φαινοξυαιθανόλης και του γαριφαλέλαιου και προσδιορίστηκε η βέλτιστη δόση τους στο εκτρεφόμενο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*). Επίσης, διερευνήθηκε η επίδραση της διάρκειας της αναισθησίας, η οποία επιτεύχθηκε με τη βέλτιστη δόση των παραπάνω αναισθητικών ουσιών, στην αποτελεσματικότητα και στην ασφάλειά τους. Η βέλτιστη δόση των παραπάνω ουσιών χρησιμοποιήθηκε και κατά τα επόμενα στάδια της διατριβής, κατά τα οποία διερευνήθηκαν: α) η συμβολή της αναισθησίας και της διάρκειάς της στον περιορισμό του στρες και η επίδρασή τους στο ανοσοποιητικό σύστημα και β) η συμβολή της επαναλαμβανόμενης αναισθησίας στον περιορισμό του στρες και η επίδρασή της στο ανοσοποιητικό σύστημα και στην ανάπτυξη του εκτρεφόμενου λαβρακιού.

Η διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια ερευνητικής συνεργασίας της Χειρουργικής Κλινικής και του Εργαστηρίου Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Π.Θ.), ενώ οι πειραματισμοί διενεργήθηκαν στον ιχθυογεννητικό σταθμό του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, ο οποίος εδρεύει στην Πωγωνίτσα Πρέβεζας.

Η υπόδειξη του θέματος της διατριβής έγινε από τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Απόστολο Δ. Γαλάτο, Διευθυντή της Χειρουργικής Κλινικής και επιβλέποντα της διατριβής. Του εκφράζω τις θερμότερες ευχαριστίες μου για την εμπιστοσύνη, την οποία εξαρχής μου έδειξε, και για την αμέριστη συμπαράσταση, την αδιάκοπη υποστήριξη και την καθοδήγηση, καθώς και την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής και ιδιαίτερα κατά το τελικό στάδιο της συγγραφής της.

Ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες εκφράζω και στην Καθηγήτρια κ. Φωτεινή Αθανασοπούλου, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, για την πολύτιμη βοήθεια κατά την κατάστροψη του πρωτοκόλλου, τις εποικοδομητικές συζητήσεις, τις σημαντικές υποδείξεις, την ανεύρεση χρηματικών πόρων, μέσω ένταξής μου σε ερευνητικό πρόγραμμα, και την ηθική συμπαράσταση που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της διατριβής.

Επιπλέον, τις θερμές ευχαριστίες μου για τη συμβολή τους στην εκπόνηση της διατριβής εκφράζω προς:

τον κ. Νικήτα Πράσινο, Επίκουρο Καθηγητή, αρχικά στη Χειρουργική Κλινική του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ. και πλέον στην Κλινική Ζώων Συντροφιάς της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Α.Π.Θ.), για τις εποικοδομητικές συζητήσεις και την αμέριστη συμπαράστασή του,

τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Λεωνίδα Λεοντίδη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοστατιστικής, Επιδημιολογίας και Οικονομίας Ζωϊκής Παραγωγής του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., για τις πολύτιμες υποδείξεις του όσον αφορά τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της διατριβής,

τον κ. Ελευθέριο Μπόνο, διδάκτορα της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ., για τη βοήθειά του στη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS,

τον κ. Νικόλαο Μπότσογλου, Καθηγητή στο Εργαστήριο Διατροφής της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ., για την πολύτιμη βοήθεια και τις εποικοδομητικές υποδείξεις του κατά την έναρξη της συγγραφής της διατριβής,

τον κ. Ηλία Γιάννενα, Λέκτορα στο Εργαστήριο Διατροφής και Ζωοτεχνίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις του σε θέματα διατροφής και ανάπτυξης των ιχθύων.

Ιδιαίτερα σημαντική θεωρώ, επίσης, τη βοήθεια που μου προσέφεραν η κ. Ευδοκία Καραγκούνη, Ερευνήτρια Β΄ του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, σχετικά με τη μέθοδο εκτίμησης των ριζών σουπεροξειδίου, η κτηνίατρος κ. Δήμητρα Μπιτχαβά, σχετικά με τις βιοχημικές εξετάσεις, και η τεχνολόγος-ιχθυολόγος κ. Στυλιανή Βαγιάνου, σχετικά με την προπαρασκευή των δειγμάτων για μικροβιολογικές, παρασιτολογικές και ιστοπαθολογικές εξετάσεις, τις οποίες και ευχαριστώ.

Ακόμη, ευχαριστώ τον βιολόγο-ιχθυολόγο κ. Άγγελο Τριανταφύλλη, προϊστάμενο του ιχθυογεννητικού σταθμού του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων στην Πωγωνίτσα Πρέβεζας, και το προσωπικό του σταθμού, για τη φιλοξενία κατά τη διενέργεια των πειραματισμών.

Τέλος, ευχαριστώ το Ίδρυμα Ωνάση για την υποτροφία που μου χορήγησε, με την οποία καλύφθηκε μέρος των εξόδων της διατριβής.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες, στη Μεσόγειο και σε πολλές περιοχές της Ευρώπης, έχει αναπτυχθεί εξαιρετικά έντονο ενδιαφέρον για τις ιχθυοκαλλιέργειες κάθε τύπου και μορφής και ιδίως για τις ιχθυοκαλλιέργειες θαλασσινού νερού, η συνολική παραγωγή των οποίων στην Ευρώπη το 2007 ήταν 629.867 τόνοι ιχθύων. Η Ελλάδα, με παραγωγή 90.985 τόνων ιχθύων θαλασσινού νερού, το έτος 2007 ήταν τρίτη, μετά τη Νορβηγία και το Ηνωμένο Βασίλειο, σε παραγωγή ιχθύων θαλασσινού νερού και κυρίως ευρύαλων ειδών, όπως λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) και τσιπούρας (*Sparus aurata*) (Zamproga 2009). Η Ελλάδα διαθέτει περισσότερες από 200 μονάδες εκτροφής των ειδών αυτών, ενώ πολλές ελληνικές μονάδες ασχολούνται πλέον ικανοποιητικά και με την εντατική εκτροφή νέων ειδών, όπως η χιόνα (*Diplodus puntazzo*), το φαγκρί (*Pagrus pagrus*), ο σαργός (*Diplodus sargus*), η συναγρίδα (*Dentex dentex*), το λιθρίνι (*Pagellus erithrinus*) και η γλώσσα (*Solea vulgaris*).

Σήμερα, η εντατική εκτροφή του λαβρακιού πραγματοποιείται τόσο σε χερσαίες εγκαταστάσεις όσο και στην ανοιχτή θάλασσα. Με τις ιχθυοκαλλιέργειες αυτές, οι οποίες απαιτούν κατάλληλους χώρους και νερό άριστης ποιότητας, επιχειρείται η μείωση του ελλείμματος της συλλεκτικής αλιείας, η οποία, μετά τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, αδυνατεί να καλύψει τη ζήτηση, κυρίως λόγω μείωσης των φυσικών αποθεμάτων ιχθύων, η οποία οφείλεται αφενός στην υπεραλίευση και αφετέρου στην υποβάθμιση της ποιότητας του υδάτινου περιβάλλοντος από τις ανθρώπινες δραστηριότητες (Fromm 1980, FAO 2008).

Όμως, η εντατική εκτροφή απαιτεί μεγάλο αριθμό παρεμβάσεων εκ μέρους του εκτροφέα και του κτηνιάτρου, με αποτέλεσμα, πολλές φορές, την πρόκληση στρες στους ιχθύς, το οποίο συνιστά ένα από τα κύρια προβλήματα στις ιχθυοκαλλιέργειες (Ross & Ross 2008). Στρες προκαλείται κυρίως κατά την εφαρμογή των καθημερινών παρεμβάσεων, όπως η διαλογή μεγέθους, ο έλεγχος νηκτικής κύστης, το ζύγισμα, ο καθαρισμός των χώρων εκτροφής, ο εμβολιασμός, η σήμανση, η μεταφορά, η αιμοληψία, η τεχνητή γονιμοποίηση κ.ά. (Jolly et al. 1972, Stoskopf 1993, Coyle et al. 2004, Neiffer 2007, Ross & Ross 2008). Ο όρος στρες υποδηλώνει την ταυτόχρονη ύπαρξη βλαπτικής επίδρασης, εκ μέρους ενός στρεστικού παράγοντα, και αντίδρασης σε αυτή, δηλαδή κινητοποίησης διάφορων μηχανισμών του οργανισμού, με στόχο την αποκατάσταση της ομοιοστασίας του (Παπουτσόγλου 1998). Όταν η δράση του

στρεσικού παράγοντα είναι χρόνια, ο οργανισμός μπορεί να χάσει την προσαρμοστικότητά του και να γίνει δυσλειτουργικός, με τελικό αποτέλεσμα την ανάσχεση της ανάπτυξης, την αδυναμία αναπαραγωγής και τη μειωμένη άμυνα σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Wendelaar Bonga 1997, Ross & Ross 2008).

Η παντελής αποφυγή του στρες κατά τη μαζική παραγωγή των ιχθύων είναι πρακτικά ανέφικτη, αλλά ο περιορισμός του είναι ένας εφικτός στόχος και η χρήση αναισθητικών ουσιών κατά τη διάρκεια των ιχθυοκαλλιεργητικών παρεμβάσεων συνιστά έναν από τους τρόπους περιορισμού του. Η αναισθησία των ιχθύων είναι πλέον μια συνηθισμένη πρακτική στις ιχθυοκαλλιέργειες, αναγκαία όχι μόνο για να αποφευχθεί το στρες και να διευκολυνθούν οι διάφορες παρεμβάσεις, αλλά και για να αποτραπούν οι βίαιες αντιδράσεις και η έντονη κινητική δραστηριότητα των ιχθύων, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε τραυματισμούς ή θάνατο ως αποτέλεσμα αυξημένης κατανάλωσης οξυγόνου και πρόκλησης σοβαρής υποξίας (Jolly et al. 1972, Stoskopf 1993, Coyle et al. 2004, Neiffer 2007, Ross & Ross 2008).

Ωστόσο, αν και η χρήση αναισθητικών ουσιών μειώνει το στρες, ενδέχεται, υπό ορισμένες συνθήκες, τόσο η όλη διαδικασία της αναισθησίας αυτή καθ' εαυτή όσο και μια συγκεκριμένη αναισθητική ουσία, όχι μόνο να μην περιορίζει αλλά και να προκαλεί στρες στους ιχθύς (Iwama et al. 1989, Bressler & Ron 2004, Neiffer 2007, Ross & Ross 2008). Σίγουρα, η όλη διαδικασία της αναισθησίας συνιστά, για κάθε οργανισμό, έναν εξωγενή παράγοντα, ο οποίος επηρεάζει την ομοιοστασία του και προκαλεί ποικίλες μεταβολές της φυσιολογίας του, ανάλογες με αυτές που παρατηρούνται υπό την επίδραση στρεσικών παραγόντων (Ross & Ross 2008).

Αρκετές αναισθητικές ουσίες προσφέρονται για χρήση στους ιχθύς. Ωστόσο, αν και η σχετική έρευνα είναι συνεχής και η διεθνής βιβλιογραφία πλούσια, η γνώση μας για αρκετές από αυτές είναι περιορισμένη και αποσπασματική και, σίγουρα, αφορά ελάχιστα τη χρήση αυτών των αναισθητικών ουσιών σε ευρύαλους ιχθύς, όπως το λαβράκι. Εξάλλου, η σχετική με τη χρήση αναισθητικών ουσιών, την αποτροπή του στρες και την εξασφάλιση ευζωίας στους ιχθύς ελληνική βιβλιογραφία είναι, με ελάχιστες εξαιρέσεις (Γαλάτος & Ραπτόπουλος 1995, Τσαντήλας και συν. 2005 & 2006), ιδιαίτερα φτωχή. Σήμερα, μόνο ένας μικρός αριθμός αναισθητικών ουσιών χρησιμοποιείται στις ιχθυοκαλλιέργειες των ευρύαλων ιχθύων και μάλιστα εμπειρικά, καθώς τα επιστημονικά δεδομένα για την αποτελεσματικότητα, την ασφάλεια και τη συμβολή τους στον περιορισμό του στρες σε αυτούς είναι ελάχιστα. Εξάλλου,

ουσιαστικά παρθένο πεδίο διερεύνησης συνιστά και η επίδραση της χρήσης των αναισθητικών ουσιών αφενός στο ανοσοποιητικό σύστημα και αφετέρου στην ανάπτυξη των ευρύαλων ιχθύων, κάνοντας αναγκαία τη διερεύνηση του θέματος.

Τα παραπάνω ήταν αυτά που αποτέλεσαν το έναυσμα για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής, προκειμένου: α) να διερευνηθούν η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια των πιο διαδεδομένων στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες αναισθητικών ουσιών, δηλαδή της τρικαΐνης, της βενζοκαΐνης, της φαινοξυαιθανόλης και του γαριφαλέλαιου, και να προσδιοριστεί η βέλτιστη δόση τους στο εκτρεφόμενο λαβράκι, β) να διερευνηθεί η επίδραση της διάρκειας της αναισθησίας, η οποία επιτεύχθηκε με τη βέλτιστη δόση των παραπάνω αναισθητικών ουσιών, στην αποτελεσματικότητα και στην ασφάλειά τους, γ) να διερευνηθούν η συμβολή της αναισθησίας με τις παραπάνω ουσίες, καθώς και της διάρκειάς της, στον περιορισμό του στρες και η επίδρασή τους στο ανοσοποιητικό σύστημα του εκτρεφόμενου λαβρακιού και δ) να διερευνηθούν η συμβολή της επαναλαμβανόμενης αναισθησίας με τις ουσίες αυτές στον περιορισμό του στρες και η επίδρασή της στο ανοσοποιητικό σύστημα και στην ανάπτυξη του εκτρεφόμενου λαβρακιού.

Η διατριβή αποτελείται από δύο μέρη. Στο πρώτο γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετική αφενός με την αναισθησία και αφετέρου με το στρες των ιχθύων και παρατίθενται στοιχεία σχετικά με τη βιολογία και την εκτροφή του λαβρακιού. Το δεύτερο μέρος περιλαμβάνει πέντε τμήματα. Στα τέσσερα πρώτα, ένα για κάθε πειραματισμό της παρούσας έρευνας, περιγράφονται αναλυτικά τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στον κάθε ένα από τους πειραματισμούς αυτούς, παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτόν και ακολουθεί η συζήτηση των αποτελεσμάτων σε σύνδεση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Στο πέμπτο τμήμα παρατίθενται συνοπτικά τα συμπεράσματα της παρούσας έρευνας και διατυπώνονται, με βάση αυτά, κάποιες προτάσεις. Στο τέλος της διατριβής παρατίθενται η ελληνική και η αγγλική περίληψη, καθώς και η βιβλιογραφία.





## ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

#### I. ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑ ΙΧΘΥΩΝ

Στα περισσότερα κατοικίδια ζώα η αναισθησία χρησιμοποιείται περισσότερο ως μέσο αναλγησίας και λιγότερο ως μέσο ακινητοποίησης. Ωστόσο, η κύρια δυσκολία με πολλά είδη ζώων, όπως οι ιχθύες, είναι η ηρέμηση, η συγκράτηση και η ακινητοποίησή τους. Επομένως, η αναισθητική αγωγή είναι συχνά απαραίτητη, όχι τόσο για την εξασφάλιση αναλγησίας με σκοπό την εκτέλεση επώδυνων επεμβάσεων, αλλά κυρίως για την ηρέμηση ή ακινητοποίηση των ιχθύων, με σκοπό την κλινική εξέταση ή την εκτέλεση χειρισμών ζωοτεχνικής φύσης. Έτσι, αν και «αναισθησία» σημαίνει στέρηση της αίσθησης, ωστόσο, ως κατάσταση, η αναισθησία χαρακτηρίζεται και από την έλλειψη πόνου, την ακινητοποίηση, τη χαλάρωση, την απώλεια της συνείδησης και την κατάργηση των αντανακλαστικών (Stoskopf 1993), χαρακτηριστικά της τα οποία κυρίως επιζητούνται κατά την εφαρμογή της στους ιχθύς.

Η αναισθησία των ιχθύων είναι μια συνηθισμένη πρακτική, ιδιαίτερα στις ιχθυοκαλλιέργειες, όπου καθίσταται αναγκαία προκειμένου να διευκολυνθούν διάφοροι χειρισμοί ικανοί να προκαλέσουν στρες, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε ανοσοκαταστολή ή ακόμη και θάνατο των ιχθύων. Τέτοιοι χειρισμοί είναι η διαλογή μεγέθους, ο έλεγχος νηκτικής κύστης, ο εμβολιασμός, η σήμανση, η μεταφορά, η αιμοληψία και η τεχνητή γονιμοποίηση (Jolly et al. 1972, Stoskopf 1993, Coyle et al. 2004, Neiffer 2007, Ross & Ross 2008). Επιπλέον, με την αναισθησία είναι δυνατό να ελεγχθούν οι βίαιες αντιδράσεις και η έντονη κινητική δραστηριότητα των ιχθύων, καταστάσεις οι οποίες μπορούν εύκολα να οδηγήσουν στον τραυματισμό ή και στον θάνατό τους, ως αποτέλεσμα αυξημένης κατανάλωσης οξυγόνου και πρόκλησης σοβαρής υποξίας (Jolly et al. 1972, Green 1979, Stoskopf 1993). Ακόμη, η αναισθησία είναι αναγκαία κατά την εκτέλεση κλινικών και ιδίως περίπλοκων εργαστηριακών διαγνωστικών τεχνικών και απολύτως απαραίτητη κατά την εκτέλεση χειρουργικών επεμβάσεων (Le Bras 1982, Kreiberg & Powell 1991, Stoskopf 1993, Gerwick et al. 1999, Raidal et al. 2006, Weber et al. 2009a).

Η ανταπόκριση των ιχθύων στις αναισθητικές ουσίες και, συνεπώς, η επιτυχία και η ασφάλεια της αναισθησίας επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες στους οποίους περιλαμβάνονται το είδος του ιχθύος, το μέγεθος και το σωματικό βάρος του, η

αναλογία μεταξύ του σωματικού βάρους και της επιφάνειας των βραγχίων του, η περιεκτικότητα του σώματός του σε λίπος, το φύλο του, η σεξουαλική ωριμότητά του, η φυσική κατάστασή του καθώς και το αν βρίσκεται ή όχι σε κατάσταση στρες, ενώ άλλοι, εξίσου σημαντικοί, παράγοντες είναι η θερμοκρασία, το pH και η περιεκτικότητα του νερού στο οποίο διαβιεί σε άλατα, μέταλλα και οξυγόνο (Jolly et al. 1972, Sylvester & Holland 1982, Weyl et al. 1996, Ross & Ross 2008, Park et al. 2009, Weber et al. 2009b, Zahl et al. 2010).

Η επιτυχία και η ασφάλεια της αναισθησίας προϋποθέτουν την τήρηση κάποιων βασικών κανόνων. Απαραίτητη είναι η εφαρμογή νηστείας διάρκειας 12-48 ωρών πριν από την αναισθησία (Green 1979, Heard & Stetter 2007, Ross & Ross 2008). Έτσι αποφεύγονται ο έμετος και η εξαιτίας αυτού εναπόθεση εμέσματος στα βράγχια, η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει μειωμένη πρόσληψη οξυγόνου αλλά και αναισθητικού, με αποτέλεσμα τον κίνδυνο υποξίας ή και ασφυξίας ή την ανεπιτυχή αναισθητοποίηση (Green 1979, Heard & Stetter 2007). Εάν προβλέπεται αναισθησία μεγάλης χρονικής διάρκειας, όπως π.χ. κατά την μεταφορά των ιχθύων σε μακρινές αποστάσεις, θα πρέπει επιπλέον να εφαρμόζεται νηστεία 24-48 ωρών μετά το τέλος της αναισθησίας (Green 1979). Η ανάνηψη από την αναισθησία πρέπει να γίνεται με τοποθέτηση των ιχθύων σε νερό που δεν περιέχει αναισθητική ουσία (Jolly et al. 1972, Green 1979, Ross & Ross 2008). Τέλος, το νερό μέσα στο οποίο διενεργείται η αναισθησία των ιχθύων πρέπει να έχει την ιδανική θερμοκρασία για κάθε είδος, ενώ, ταυτόχρονα, πρέπει να ρυθμίζεται και η περιεκτικότητά του σε οξυγόνο (Stoskopf 1993) κάτι το οποίο μπορεί να γίνει με ποικίλους τρόπους, μεταξύ των οποίων και η χρήση αερόλιθων (Heard & Stetter 2007).

Ο κίνδυνος υπερδοσίας είναι πάντα υπαρκτός στους ιχθύς, καθώς η μετάβαση από το ένα στάδιο αναισθησίας στο άλλο μπορεί να συμβεί γρήγορα και να μη γίνει άμεσα αντιληπτή. Σε περίπτωση υπερδοσίας, οπότε προκαλείται έντονη βραδυκαρδία που ακολουθείται, αρχικά, από παύση των ρυθμικών κινήσεων των βραγχοκαλυμμάτων και, στη συνέχεια, από εμφάνιση σπασμωδικών κινήσεων τους που σταδιακά ελαττώνονται σε ένταση, απαιτείται άμεση αναζωογόνηση και ανάνηψη από την αναισθησία, καθώς σε 60-90 sec ακολουθεί καρδιακή ανακοπή (Green 1979). Υπερδοσία μπορεί να προκληθεί ακόμη και σε περίπτωση χορήγησης της κανονικής δόσης της αναισθητικής ουσίας, εφόσον παραταθεί ο χρόνος έκθεσης των ιχθύων σε αυτή, επειδή ο χρόνος έκθεσης και η δόση χορήγησης επηρεάζουν αθροιστικά το βάθος της αναισθησίας, αφού είναι δυνατόν, σε περίπτωση παρατεταμένης έκθεσης, η αναισθητική ουσία να συνεχίζει

να αθροίζεται στον εγκέφαλο και στο μυϊκό ιστό ακόμη και όταν το επίπεδό της στο αίμα έχει φθάσει σε ισορροπία με εκείνο του αναισθητικού διαλύματος (Neiffer 2007, Ross & Ross 2008). Στην παραπάνω περίπτωση, η διατήρηση του βάθους της αναισθησίας στον επιθυμητό βαθμό επιβάλλει μείωση της αρχικής δόσης (Coyle et al. 2004).

#### **A. Στάδια αναισθησίας**

Οι αναισθητικές ουσίες δρουν καταστέλλοντας διάφορα τμήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η καταστολή αυτή επηρεάζει διαδοχικά: α) το φλοιό του εγκεφάλου, προκαλώντας αναλγησία και κάποιο βαθμό ηρέμησης, β) τα βασικά γάγγλια και την παρεγκεφαλίδα, προκαλώντας διέγερση, γ) τη σπονδυλική στήλη, προκαλώντας χειρουργική αναισθησία, και 4) τον προμήκη μυελό, προκαλώντας αγγειοκινητική παράλυση και θάνατο (Treves-Brown 2000).

Η χρήση αναισθητικών ουσιών έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση αναισθησίας ποικίλου βάθους. Η συνεχής εκτίμηση του βάθους της αναισθησίας και η παρακολούθηση των ζωτικών λειτουργιών των ιχθύων κατά τη διάρκειά της, αλλά και κατά την ανάνηψη, είναι απαραίτητες για την εξασφάλιση αναλγησίας και ακίνδυνης αναισθησίας. Ωστόσο, η εκτίμηση του βάθους της αναισθησίας ή του επιπέδου της ηρέμησης και, κατ' επέκταση, του βαθμού καταστολής του νευρικού συστήματος, δεν είναι εύκολη στους ιχθύς. Κατά βάση, στηρίζεται στη διαπίστωση ορισμένων σημείων και μεταβολών της συμπεριφοράς των ιχθύων, τα οποία χαρακτηρίζουν το κάθε στάδιο ηρέμησης ή αναισθησίας (Jolly et al. 1972, Summerfelt & Smith 1990, Stoskopf 1993, Keene et al. 1998, Ackerman et al. 2001, Bowser 2001, Small 2003, Coyle et al. 2004, Heard & Stetter 2007, Ross & Ross 2008). Ωστόσο, μπορεί να παρατηρηθούν διαφορές, κυρίως όσον αφορά την ταχύτητα και τη σειρά εμφάνισης των σταδίων, ανάλογα με το είδος των ιχθύων και τη χρησιμοποιούμενη αναισθητική ουσία (Summerfelt & Smith 1990, Stoskopf 1993, Keene et al. 1998, Small 2003, Ross & Ross 2008). Έτσι, πολλές φορές είναι δυνατόν η χορήγηση μιας αναισθητικής ουσίας να προκαλέσει υπερδραστηριότητα των ιχθύων για λίγα δευτερόλεπτα. Γενικά όμως, τα στάδια αναισθησίας καθορίζονται από τη δόση της αναισθητικής ουσίας καθώς και τη διάρκεια έκθεσης των ιχθύων σε αυτή. Τόσο τα κριτήρια κατάταξης στο ένα ή στο άλλο στάδιο, όσο και ο αριθμός των σταδίων αυτών έχουν περιγραφεί και τροποποιηθεί επανειλημμένα (Jolly et al. 1972, Summerfelt & Smith 1990, Stoskopf 1993, Keene et

al. 1998, Ackerman et al. 2001, Bowser 2001, Small 2003, Coyle et al. 2004, Heard & Stetter 2007, Ross & Ross 2008). Επί του παρόντος, ένα σύστημα κατάταξης σε 6 στάδια (Πίνακας 1) φαίνεται να είναι το πιο αναλυτικό, ακριβές και ασφαλές τόσο για κλινικούς όσο και για ερευνητικούς σκοπούς.

Το στάδιο της ελαφράς αναισθησίας είναι εκείνο που επιζητείται τις περισσότερες φορές στις ιχθυοκαλλιέργειες, ενώ τα στάδια της ελαφράς και της βαθιάς ηρέμησης είναι εκείνα τα οποία κυρίως χρησιμοποιούνται για τη μείωση του στρες κατά τη μεταφορά των ιχθύων ακόμη και όταν αυτή έχει διάρκεια μερικών ωρών. Αν και για την εξασφάλιση των συγκεκριμένων σταδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες αναισθητικές ουσίες, συχνά στις ιχθυοκαλλιέργειες προτιμάται η εφαρμογή άλλων τεχνικών, όπως η ηλεκτροαναισθησία και η υποθερμία, οι οποίες χρησιμοποιούνται εναλλακτικά της αναισθησίας (Treves-Brown 2000).

## **B. Παράγοντες που επηρεάζουν την αναισθησία των ιχθύων**

Οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα των αναισθητικών ουσιών στους ιχθύς διακρίνονται σε βιολογικούς και περιβαλλοντικούς.

### **B.1. Βιολογικοί παράγοντες**

Η φαρμακοκινητική μιας ουσίας στον οργανισμό των ιχθύων διέπεται από διαφορετικούς κανόνες από εκείνους που ισχύουν στα θηλαστικά, λόγω των μεταξύ τους διαφορών ως προς την ανατομία και τη φυσιολογία. Γενικά, η φαρμακοκινητική μιας ουσίας στους ιχθύς επηρεάζεται από τα ανατομικά χαρακτηριστικά των βραγχίων, από ορισμένα χαρακτηριστικά του αίματος, από τη λειτουργία του κυκλοφορικού συστήματος, του ήπατος, των νεφρών και του πεπτικού συστήματος και από άλλους παράγοντες (Botsoglou & Fletouris 2001).

Τα βράγχια παίζουν σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση και στην απέκκριση μιας φαρμακευτικής ουσίας. Η απέκκριση μιας ουσίας μέσω αυτών εξαρτάται από την πολικότητα και το φορτίο της, με αποτέλεσμα μια λιπόφιλη και με ουδέτερο φορτίο ουσία να απομακρύνεται ευκολότερα από τα βράγχια σε σχέση με μια υδρόφιλη ουσία (Botsoglou & Fletouris 2001). Επίσης, την αποτελεσματικότητα των αναισθητικών ουσιών επηρεάζει ο λόγος της επιφάνειας των βραγχίων προς το σωματικό βάρος του ιχθύος. Αυξημένη τιμή του λόγου αυτού, η οποία μπορεί να παρουσιάζει μεγάλες

διακυμάνσεις μεταξύ των διαφόρων ειδών ιχθύων, συνεπάγεται μεγαλύτερη απορρόφηση των αναισθητικών ουσιών (Coyle et al. 2004).

**Πίνακας 1.** Στάδια αναισθησίας των ιχθύων

<b>Στάδιο</b>	<b>Κατάσταση</b>	<b>Χαρακτηριστικά</b>
0	Εγρήγορση	Φυσιολογική ανταπόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα Φυσιολογικός ρυθμός κίνησης βραγχοκαλυμμάτων Φυσιολογικός μυϊκός τόνος Φυσιολογική κολύμβηση, διατήρηση ισορροπίας
1	Ελαφρά ηρέμηση	Μειωμένη ανταπόκριση σε απτικά και οπτικά ερεθίσματα Μειωμένος ρυθμός κίνησης βραγχοκαλυμμάτων Φυσιολογικός μυϊκός τόνος Ικανότητα κολύμβησης και διατήρησης ισορροπίας
2	Βαθιά ηρέμηση	Ανταπόκριση μόνο σε ισχυρή πίεση Ελαφρά αυξημένος ρυθμός κίνησης βραγχοκαλυμμάτων Φυσιολογικός μυϊκός τόνος Ικανότητα κολύμβησης και διατήρησης ισορροπίας
3	Μερική απώλεια ισορροπίας	Ανταπόκριση μόνο σε ισχυρά ερεθίσματα αφής και δόνησης Αυξημένος ρυθμός κίνησης βραγχοκαλυμμάτων Ελάττωση μυϊκού τόνου Ασταθής κολύμβηση και μερική απώλεια ισορροπίας
4	Ελαφρά αναισθησία ή πλήρης απώλεια ισορροπίας	Ανταπόκριση σε πολύ ισχυρή πίεση Γρήγορες ή αργές και ρυθμικές κινήσεις βραγχοκαλυμμάτων Απουσία μυϊκού τόνου Κατάργηση νωτιαίων αντανακλαστικών Ακινητοποίηση και πλήρης απώλεια ισορροπίας
5	Χειρουργική αναισθησία ή απώλεια των αντανακλαστικών	Απουσία ανταπόκρισης σε κάθε εξωτερικό ερέθισμα Αργές, άρρυθμες και ίσως μικρού εύρους κινήσεις βραγχοκαλυμμάτων Βραδυκαρδία, η οποία συχνά είναι έντονη Κατάργηση όλων των αντανακλαστικών
6	Προμηκική παράλυση	Άπνοια με απουσία κινήσεων βραγχοκαλυμμάτων Άπνοια με περιστασιακές σπασμωδικές κινήσεις βραγχοκαλυμμάτων Καρδιακή ανακοπή Θάνατος

(Jolly et al. 1972, Summerfelt & Smith 1990, Stoskopf 1993, Keene et al. 1998, Bowser 2001, Heard & Stetter 2007, Ross & Ross 2008) (τροποποιημένος)

Σημαντικό ρόλο στη φαρμακοκινητική μιας ουσίας στους ιχθύς παίζει επίσης το pH του αίματος, επειδή μπορεί να επηρεάσει τον ιονισμό της φαρμακευτικής ουσίας και, επομένως, τη φαρμακοκινητική συμπεριφορά της (Botsoglou & Fletouris 2001). Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι στην ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) το pH του αίματος, το οποίο είναι περίπου 8, μπορεί να μειωθεί στο 7,5 εάν, για περίπου 30 sec, εφαρμοστούν διάφοροι χειρισμοί που προκαλούν στρες (Heming 1989). Η μείωση αυτή μπορεί να επηρεάσει τον ιονισμό των χορηγούμενων φαρμάκων και, επομένως, την απορρόφηση, την κατανομή και την απέκκρισή τους (Botsoglou & Fletouris 2001). Επίσης, στη φαρμακοκινητική μια ουσίας, ρόλο παίζουν και οι ολικές πρωτεΐνες του πλάσματος των ιχθύων, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορές από εκείνες των θηλαστικών. Οι συγκεντρώσεις των ολικών πρωτεϊνών του πλάσματος των ιχθύων είναι μικρότερες από εκείνες των θηλαστικών, ενώ, για πολλές φαρμακευτικές ουσίες, η δυνατότητα σύζευξής τους με τις πρωτεΐνες είναι σημαντικά χαμηλότερη στους ιχθύς από ό,τι στα θηλαστικά (Squibb et al. 1988, Droy et al. 1990, Botsoglou & Fletouris 2001).

Το κυκλοφορικό σύστημα των ιχθύων μπορεί επίσης να επηρεάσει τη φαρμακοκινητική μιας ουσίας. Η μεμβρανώδης φύση των αγγείων τους έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός συστήματος με εύθραυστη ισορροπία, ενώ η χαμηλή αιματική ροή παρατείνει σε ένα βαθμό τον χρόνο κατανομής πολλών φαρμάκων. Εξάλλου, ο καρδιακός ρυθμός και ο όγκος παλμού που επηρεάζουν την κατανομή μιας ουσίας, επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και το στρες (Botsoglou & Fletouris 2001).

Η λειτουργία του ήπατος παίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο, επειδή το βάρος και η περιεκτικότητά του, κυρίως σε γλυκογόνο και λιπίδια, μπορεί να αλλάξουν δραματικά. Αυτές οι αλλαγές επηρεάζονται και από την εποχιακή ωρίμανση των γονάδων, το χρόνο που μεσολάβησε από το τελευταίο γεύμα και το στρες (Botsoglou & Fletouris 2001). Επίσης, η αιμάτωση του ήπατος είναι κατά περίπου 25-50% λιγότερο έντονη από εκείνη των θηλαστικών. Τέλος, η παραγωγή χολής είναι σχεδόν 50 φορές πιο βραδεία από ό,τι στα θηλαστικά. Τα χαρακτηριστικά αυτά έχουν ως αποτέλεσμα ο μεταβολισμός των φαρμακευτικών ουσιών στους ιχθύς να είναι πιο βραδύς από ό,τι στα θηλαστικά (Botsoglou & Fletouris 2001).

Στους περισσότερους ιχθύς, οι νεφροί είναι υπεύθυνοι κυρίως για την αιμοποίηση και την οσμωρύθμιση. Ωστόσο, ικανή ποσότητα των φαρμακευτικών ουσιών απεκκρίνεται μέσω των νεφρών είτε ως έχουν είτε ως μεταβολίτες τους. Οι ιχθύες του

γλυκού νερού, οι οποίοι είναι υπέρτονοι σε σχέση με το νερό, παράγουν μεγάλη ποσότητα ούρων για να ισοσταθμίσουν τη συνεχή πρόσληψη νερού. Αντίθετα, οι ιχθύες του θαλασσινού νερού, οι οποίοι είναι υπότονοι σε σχέση με το περιβάλλον τους, παράγουν πολύ μικρότερες ποσότητες ούρων για να ισοσταθμίσουν τη συνεχή απώλεια των σωματικών υγρών (Botsoglou & Fletouris 2001). Τα χαρακτηριστικά αυτά επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την απέκκριση των φαρμακευτικών ουσιών.

Αντίθετα από τους ιχθύς του γλυκού νερού, οι ιχθύες του θαλασσινού νερού πίνουν μεγάλες ποσότητες νερού για να διατηρήσουν την ενυδάτωσή τους και, επομένως, προσλαμβάνουν μέσω αυτού μεγαλύτερες ποσότητες φαρμακευτικών ουσιών. Ωστόσο, η πρόσληψη επηρεάζεται και από το pH του πεπτικού σωλήνα, το οποίο διαφέρει και κατά μήκος του, αλλά και μεταξύ των διάφορων ειδών ιχθύων (Botsoglou & Fletouris 2001).

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τη φαρμακοκινητική μιας ουσίας είναι ο μεταβολικός ρυθμός. Ο μεταβολικός ρυθμός των υδρόβιων γενικά οργανισμών, παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις από είδος σε είδος, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την ταχύτητα με την οποία απορροφούνται και απεκκρίνονται οι αναισθητικές ουσίες. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο οι υδρόβιοι οργανισμοί του ψυχρού νερού ανταποκρίνονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις αναισθητικών ουσιών καλύτερα από ό,τι οι υδρόβιοι οργανισμοί του θερμού νερού (Coyle et al. 2004).

Άλλος παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την αναισθησία, είναι το μέγεθος των ιχθύων. Γενικά, τα μεγαλόσωμα άτομα ενός είδους χρειάζονται μεγαλύτερες δόσεις (Oikawa et al. 1994) ή εμφανίζουν μεγαλύτερο χρόνο εγκατάστασης της αναισθησίας από τα μικρόσωμα (Hseu et al. 1994, Small 2003, Tsantilas et al. 2006). Ωστόσο, συχνά οι μεγαλύτεροι ιχθύες μέσα σε μια ομάδα αναισθητοποιούνται γρηγορότερα από ό,τι οι μικρότεροι (Ross & Ross 2008), ενώ άλλες φορές δεν υπάρχουν διαφορές (Walsh & Pease 2002). Εξάλλου, ο χρόνος ανάνηψης από την αναισθησία μπορεί να είναι μεγαλύτερος στα μεγαλόσωμα ή στα μικρόσωμα άτομα (Small 2003, Tsantilas et al. 2006) ή και να μην επηρεάζεται από το σωματικό μέγεθος (Hseu et al. 1994, Weyl et al. 1996, Stehly & Gingerich 1999, Kamiński et al. 2001, Tsantilas et al. 2006).

Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας είναι τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αναισθητικών ουσιών και συγκεκριμένα η λιποδιαλυτότητά τους. Η χορήγηση αναισθητικών ουσιών, όπως η τρικαΐνη και η βενζοκαΐνη, οι οποίες έχουν έντονη τάση εναπόθεσης στο λίπος, σε ιχθύς με αυξημένα επίπεδα λίπους, όπως είναι τα θηλυκά

κατά την ωοπαραγωγή, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την παράταση της αναισθησίας και την επιβράδυνση της ανάνηψης εξαιτίας του βραδύτερου ρυθμού αποβολής τους από το λιπώδη ιστό του σώματος σε σύγκριση με άλλες αναισθητικές ουσίες (Coyle et al. 2004, Ross & Ross 2008).

Τέλος, σημαντικά φαίνεται να επηρεάζει την αναισθησία και η κατάσταση της υγείας των ιχθύων (Josa et al. 1992). Ιχθύες με κακή κατάσταση υγείας χρειάζονται πολύ μικρότερες δόσεις αναισθητικού προκειμένου να αναισθητοποιηθούν αποτελεσματικά και με ασφάλεια (Stoskopf 1993), ενώ είναι αναμενόμενο ότι, όπως συμβαίνει και σε άλλα ζωικά είδη, όσο χειρότερη είναι η κατάσταση της υγείας τους, τόσο μεγαλύτερος είναι ο κίνδυνος που διατρέχουν κατά την αναισθησία. Εξάλλου, η πρόκληση στρες πριν από την αναισθησία συνδυάζεται με επιτάχυνση της εγκατάστασης, παράταση της ανάνηψης, αύξηση του βάθους της αναισθησίας και υψηλή θνησιμότητα (Zahl et al. 2010).

## **B.2. Περιβαλλοντικοί παράγοντες**

Από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα των αναισθητικών ουσιών, ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο παίζει η θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Συνήθως, οι χαμηλότερες θερμοκρασίες συνδυάζονται με αύξηση του χρόνου εγκατάστασης και ανάνηψης, ενώ το αντίστροφο παρατηρείται σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Mylonas et al. 2005). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες νερού να απαιτούνται υψηλότερες δόσεις ή μεγαλύτερος χρόνος έκθεσης στις αναισθητικές ουσίες (Coyle et al. 2004), ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες, αν δεν χρησιμοποιηθούν χαμηλότερες δόσεις, η εγκατάσταση επιταχύνεται (Neiffer 2007). Πάντως, συχνά σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση και στην ένταση του φαινομένου παίζει και η ίδια η αναισθητική ουσία (Ross & Ross 2008).

Άλλος περιβαλλοντικός παράγοντας, ο οποίος μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα των αναισθητικών ουσιών είναι η τιμή του pH του νερού μέσα στο οποίο γίνεται η αναισθησία. Αυτό συμβαίνει επειδή μπορεί να επηρεαστεί η σχέση μεταξύ ιονισμένων και αδιάστατων μορίων της αναισθητικής ουσίας και, επομένως, ο βαθμός απορρόφησης της. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η κιναλδίνη, η οποία χάνει την αποτελεσματικότητά της όταν προστεθεί σε νερό με χαμηλό pH (Ross & Ross 2008).



## **Γ. Αναισθητικές ουσίες**

### **Γ.1. Κριτήρια καταλληλότητας αναισθητικών ουσιών**

Στις αρχές του 1970 διατυπώθηκαν για πρώτη φορά τα κριτήρια καταλληλότητας των αναισθητικών ουσιών για ιχθύς. Σύμφωνα με αυτά, μια αναισθητική ουσία κατάλληλη για ιχθύς θα έπρεπε: α) να προκαλεί ελαφρά αναισθησία μέσα σε 3 min, β) να είναι ασφαλής για τους ιχθύς όταν χρησιμοποιείται για 30 min και γ) να επιτρέπει ανάνηψη μέσα σε 20 min (Treves-Brown 2000). Τα παραπάνω κριτήρια θεωρούνται ακόμη και σήμερα κατάλληλα για την επιλογή μιας αναισθητικής ουσίας, αλλά εξυπηρετούν απαιτήσεις κυρίως χειρουργικών επεμβάσεων παρά ανάγκες ιχθυοκαλλιέργειών (Treves-Brown 2000). Ωστόσο, οι Gilderhus & Marking (1987) διατύπωσαν την άποψη ότι το πρώτο από τα κριτήρια αυτά, δηλαδή η πρόκληση ελαφράς αναισθησίας μέσα σε 3 min, πρέπει να ισχύει και κατά την εκτέλεση χειρισμών στις ιχθυοκαλλιέργειες, όπως είναι οι εμβολιασμοί, η διαλογή γεννητόρων, οι μετρήσεις σωματικών παραμέτρων και η επισήμανση ιχθύων, επειδή οι χειρισμοί αυτοί απαιτούν ακινητοποίηση των ιχθύων σε μια επιφάνεια, για σύντομο χρονικό διάστημα, χωρίς βίαιες κινήσεις. Όσον αφορά το δεύτερο κριτήριο, οι Gilderhus & Marking (1987) πρότειναν τη μείωση του χρόνου από 30 σε 15 min με βάση το σκεπτικό ότι οι χειρουργικές επεμβάσεις δεν είναι συνήθεις στους ιχθύς, εκτός και αν εκτελούνται για πειραματικούς σκοπούς, και, επομένως, δεν υφίσταται συνήθως στις ιχθυοκαλλιέργειες ανάγκη αναισθητοποίησης των ιχθύων για 30 min. Σχετικά με το τρίτο κριτήριο, υποστηρίχτηκε από τους Gilderhus & Marking (1987) ότι ο χρόνος ανάνηψης έπρεπε να μειωθεί τουλάχιστον στα 10 min.

Με βάση τα νέα αυτά κριτήρια, οι Gilderhus & Marking (1987) διερεύνησαν την καταλληλότητα 16 αναισθητικών ουσιών, διαπιστώνοντας ότι μόνο η τρικαΐνη, η βενζοκαΐνη, η φαινοξυαιθανόλη και η θειική κιναλδίνη πληρούσαν τα κριτήρια καταλληλότητας. Από τις άλλες, η νικοτίνη και το άλας της δεν ήταν αποτελεσματικές, η αλοθάνιο, η μετοφάνη και το νατριούχο άλας της τριαμυλάλης προκαλούσαν θνησιμότητα στις αποτελεσματικές συγκεντρώσεις τους ή και με χαμηλότερες από αυτές, ενώ η μεθυλπεντυνόλη και η χλωροβουτανόλη ήταν τοξικές για τους μικρού μεγέθους ιχθύς. Εξάλλου, η ετομιδάτη, η μετομιδάτη, η προπανιδίνη, η πισκαΐνη και το διοξείδιο του άνθρακα είχαν χρόνους ανάνηψης μεγαλύτερους από 10 min. Πάντως, η ετομιδάτη και η μετομιδάτη έχουν εγκριθεί για χρήση ως ηρεμιστικές ουσίες σε ιχθύς

στη Βόρεια Αμερική και η πισκαΐνη στην Ιαπωνία. Άλλες αναισθητικές ουσίες οι οποίες δεν περιλαμβάνονταν σε αυτή τη διερεύνηση αλλά χρησιμοποιούνται στους ιχθύς, είναι η γλωράλη, ο διαιθυλαιθέρας, η ουρεθάνη και η προποξάτη (Treves-Brown 2000). Πέραν των παραπάνω, από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 στη Νέα Ζηλανδία χρησιμοποιήθηκε το Aquí-S για την αναισθησία ιχθύων που προορίζονται για κατανάλωση (Treves-Brown 2000). Η δραστική ουσία του είναι η ισοευγενόλη, η οποία προέρχεται από το αιθέριο έλαιο γαριφάλου.

Συμπερασματικά, η ιδανική αναισθητική ουσία πρέπει να εξασφαλίζει ταχεία εγκατάσταση της αναισθησίας με ελάχιστη αύξηση της δραστηριότητας ή πρόκληση στρες στους ιχθύς, καθώς και ταχεία ανάνηψη από την αναισθησία, να είναι εύκολη στη χορήγησή της και αποτελεσματική για τη διατήρηση των ιχθύων στο επιθυμητό στάδιο αναισθησίας με χρήση χαμηλών δόσεων, ενώ η τοξική δόση της πρέπει να είναι πολύ μεγαλύτερη από την αποτελεσματική, έτσι ώστε το μεταξύ αυτών περιθώριο ασφάλειας να είναι μεγάλο (Coyle et al. 2004). Η ιδανική αναισθητική ουσία πρέπει, επιπλέον, να μην είναι τοξική για τους ιχθύς ή το χρήστη, να είναι βιοδιασπώμενη και να απεκκρίνεται γρήγορα μη αφήνοντας υπολείμματα στους ιστούς. Πρέπει, ακόμη, να μην επηρεάζει τη φυσιολογία των ιχθύων ή το ανοσοποιητικό σύστημά τους, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να μειώσει τις πιθανότητες επιβίωσής τους. Τέλος, πρέπει να είναι χαμηλού κόστους και εύκολα διαθέσιμη (Marking & Meyer 1985, Gilderhus & Marking 1987, Summerfelt & Smith 1990, Stoskopf 1993, Ackerman et al. 2001, Ross & Ross 2008).

## **Γ.2. Τεχνικές χορήγησης αναισθητικών ουσιών**

Οι αναισθητικές ουσίες συνήθως χορηγούνται στους ιχθύς έτσι ώστε να προσληφθούν μέσω των βραγχίων τους, οπότε εισέρχονται ταχύτατα στην κυκλοφορία του αίματος. Οι τεχνικές χορήγησης ποικίλλουν. Η πιο διαδεδομένη είναι η εμβάπτιση, δηλαδή η τοποθέτηση των ιχθύων σε νερό στο οποίο έχει ήδη διαλυθεί η αναισθητική ουσία σε κατάλληλη συγκέντρωση. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάζεται η απαιτούμενη συγκέντρωση αναισθητικής ουσίας σε μια αεριζόμενη δεξαμενή νερού και, στη συνέχεια, οι ιχθύες μεταφέρονται γρήγορα αλλά προσεκτικά στη δεξαμενή, όπου παραμένουν για προκαθορισμένο χρονικό διάστημα. Για ορισμένες αναισθητικές ουσίες απαιτείται αρχική διάλυσή τους σε έναν οργανικό διαλύτη και, στη συνέχεια, η προσθήκη τους στο νερό της δεξαμενής. Τόσο η δεξαμενή αναισθησίας όσο και η

δεξαμενή ανάνηψης, πρέπει να περιέχουν νερό ίδιας θερμοκρασία και παραπλήσιας χημικής σύνθεσης με το νερό από το οποίο συλλέγονται οι ιχθύες. Η ποιότητα του νερού πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά, ιδιαίτερα όταν αναισθητοποιείται μεγάλος αριθμός ιχθύων και οι δεξαμενές επαναχρησιμοποιούνται. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να καταβάλλεται ιδιαίτερη φροντίδα για τη διατήρηση της κατάλληλης θερμοκρασίας, της επάρκειας σε οξυγόνου, της χαμηλής συγκέντρωσης αμμωνίας και της ελαχιστοποιημένης παρουσίας κοπράνων (Coyle et al. 2004, Heard & Stetter 2007, Ross & Ross 2008). Όταν απαιτείται ιδιαίτερα παρατεταμένη ηρέμηση ή αναισθησία, γίνεται συνεχής χορήγηση νερού με αναισθητικό στα βράγχια ή στο στόμα, καθώς και εναλλασσόμενη χορήγηση καθαρού νερού και νερού με αναισθητικό στα βράγχια με τη βοήθεια αντλίας (Bowser 2001, Raidal et al. 2006, Heard & Stetter 2007, Ross & Ross 2008, Weber et al. 2009a). Όταν η εμβάπτιση δεν ενδείκνυται για πρακτικούς λόγους ή οι ιχθύες είναι μεγάλου μεγέθους, μπορεί να γίνει ψεκασμός της αναισθητικής ουσίας επάνω στα βράγχια (Coyle et al. 2004).

Οι αναισθητικές ουσίες μπορούν να χορηγηθούν και με ενδοπεριτοναϊκή, ενδοφλέβια ή ενδομυϊκή έγχυση. Ωστόσο αυτές οι οδοί χορήγησης σπάνια χρησιμοποιούνται σε επίπεδο ιχθυοκαλλιέργειας (Jolly et al. 1972, Gilderhus & Marking 1987, Summerfelt & Smith 1990, Stoskopf 1993, Stehly & Gingerich 1999, Ross & Ross 2008), αλλά βρίσκουν κυρίως εφαρμογή σε περίπτωση χειρουργικών επεμβάσεων ή παρατεταμένων ενεργειών, συνδυαζόμενες ενδεχομένως και με πρόσληψη μέσω των βραγχίων (Ross & Ross 2008, Weber et al. 2009a)

### **Γ.3. Συνθετικές αναισθητικές ουσίες**

#### **Γ.3.1. Τρικαΐνη**

Η τρικαΐνη, η οποία κυκλοφορεί κυρίως με την ονομασία MS-222 (3-αμινοβενζοϊκός μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας), είναι μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες αναισθητικές ουσίες στους ιχθύς (Marking & Meyer 1985, Coyle et al. 2004, Ross & Ross 2008).

Αν και ουσιαστικά η τρικαΐνη είναι μια ασθενής βάση, τα διαλύματά της είναι όξινα εξαιτίας του μεθανοσουλφονικού οξέος. Έτσι, μειώνει το pH του νερού όταν διαλύεται σε αυτό, με συνέπεια την πρόκληση ερεθισμού στους ιχθύς. Στη δόση των 75 mg/l μπορεί να μειώσει το pH του νερού στο 4. Για το λόγο αυτό, στο αρχικό διάλυμά της, ιδιαίτερα πριν από τη χρήση του σε ιχθύς γλυκού νερού, πρέπει να προστίθενται

ρυθμιστικά διαλύματα, όπως διαλύματα μονόξινου φωσφορικού νατρίου, διττανθρακικού νατρίου ή υδροξειδίου του νατρίου, έτσι ώστε η τιμή του pH να είναι περίπου 7 (Sylvester 1975, Ohr 1976, Smit & Hattingh 1979, Smit et al. 1979, Stoskopf 1993, Ackerman et al. 2001, Coyle et al. 2004, Ross & Ross 2008). Αυτό δεν είναι απαραίτητο όταν αναισθητοποιούνται ιχθύες θαλασσινού νερού, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας του θαλασσινού νερού σε άλατα, τα οποία δρουν ως ρυθμιστικά διαλύματα παρεμποδίζοντας τη μεταβολή του pH (Ohr 1976, Malmstrom et al. 1993, Oikawa et al. 1994, Hseu et al. 1998). Η τρικαΐνη είναι ευαίσθητη στην ηλιακή ακτινοβολία με αποτέλεσμα, μετά από παρατεταμένη έκθεση στον ήλιο, σταδιακά να χάνει τη δραστηριότητά της και να αναπτύσσει τοξική δράση (Jolly et al. 1972, Stoskopf 1993, Barker et al. 2002, Ross & Ross 2008).

Η χορήγηση της τρικαΐνης γίνεται με εμβάπτιση όταν πρόκειται για ιχθύς μικρού μεγέθους αλλά με ψεκάσμο στα βράγχια όταν πρόκειται για μεγαλύτερους. Η συνιστώμενη δόση σχετίζεται με το είδος, το μέγεθος και την πυκνότητα εκτροφής των ιχθύων και, ανάλογα με τις ανάγκες, συνήθως κυμαίνεται από 20 έως 350 mg/l και είναι συγκριτικά μικρότερη στα νεαρά άτομα και όταν χρησιμοποιείται σε θερμά νερά με χαμηλή σκληρότητα (Jolly et al. 1972, Sylvester 1975, Reinitz & Rix 1977, Smit & Hattingh 1979, Gilderhus & Marking 1987, Mattson & Ripley 1989, Malmstrøm et al. 1993, Stoskopf 1993, Oikawa et al. 1994, Masseur et al. 1995, Munday & Wilson 1997, Hseu et al. 1998, Smith et al. 1999, Cho & Heath 2000, Ortuño et al. 2002 a, Wagner et al. 2002, Wagner et al. 2003, Coyle et al. 2004, Ross & Ross 2008, Weber et al. 2009b, Zahl et al. 2010).

Η τρικαΐνη απορροφάται γρήγορα από τα βράγχια με αποτέλεσμα η εγκατάσταση της αναισθησίας να επέρχεται σε 1-2 min ή και λιγότερο και η ανάνηψη το αργότερο σε 5-10 min (Jolly et al. 1972, Stoskopf 1993, Munday & Wilson 1997, Hseu et al. 1998, Wagner et al. 2002, Coyle et al. 2004, Ross & Ross 2008, Weber et al. 2009b, Zahl et al. 2010). Οι παραπάνω χρόνοι μπορεί να επηρεάζονται από την πυκνότητα του διαλύματος και τη διάρκεια της έκθεσης των ιχθύων σε αυτό (Stoskopf 1993, Weber et al. 2009b). Επιπλέον, λόγω της λιποδιαλυτότητας της τρικαΐνης, ο χρόνος ανάνηψης μπορεί να είναι μεγαλύτερος σε μεγαλύτερο σωμα και πλούσια σε λίπος ή εγκυμονούντα άτομα, λόγω της αργής απομάκρυνσής της από το λιπώδη ιστό (Coyle et al. 2004).

Μεταξύ των ποικίλων παρενεργειών της τρικαΐνης (Ross & Ross 2008), πιο χαρακτηριστική είναι η βραδυκαρδία (Barker et al. 2002). Υψηλές δόσεις προκαλούν

υποξία, γεγονός που διαπιστώνεται από την υψηλή συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στο αίμα που υποδηλώνει ενεργοποίηση του αναερόβιου μεταβολισμού. Για το λόγο αυτό, όταν χρησιμοποιείται τρικαΐνη, πρέπει να γίνεται έντονη οξυγόνωση του νερού στις δεξαμενές αναισθησίας (Green 1979, Stoskopf 1993).

Η τρικαΐνη είναι το μόνο αναισθητικό η χρήση του οποίου επιτρέπεται σε ιχθυοκαλλιέργειες στις ΗΠΑ και την Ευρωπαϊκή Ένωση, έχει δε χρόνο αναμονής 21 ημέρες, σε θερμοκρασία νερού πάνω από 10°C, αν και μόλις 24 ώρες μετά τη χρήση της ελάχιστα κατάλοιπα ανευρίσκονται στους ιστούς (Marking & Meyer 1985, Summerfelt & Smith 1990, Cho & Heath 2000, Treves-Brown 2000, Coyle et al. 2004, Ross & Ross 2008). Στο Ηνωμένο Βασίλειο ο χρόνος αναμονής είναι μόνο 10 ημέρες, ανεξαρτήτως του είδους των ιχθύων και της θερμοκρασίας του νερού (Treves-Brown 2000).

### **Γ.3.2. Βενζοκαΐνη**

Η βενζοκαΐνη (4-αμινοβενζοϊκός αιθυλεστέρας) διαφέρει από την τρικαΐνη ως προς τη θέση της αμινομάδας στο βενζοϊκό δακτύλιο. Η ελεύθερη βάση είναι ελάχιστα διαλυτή στο νερό και για το λόγο αυτό η βενζοκαΐνη, πριν από τη χρησιμοποίησή της, διαλύεται πάντα σε οργανικούς διαλύτες, όπως η αιθανόλη ή η ακετόνη, οι οποίες όμως είναι ερεθιστικές για τους ιχθύς. Τα διαλύματα αυτά της ελεύθερης βάσης παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι παρέχουν κατά την τελική αραίωσή τους με νερό ουδέτερα διαλύματα, τα οποία δεν απαιτούν ρύθμιση του pH (Ross & Ross 2008). Σε αντίθεση με την ελεύθερη βάση, το υδροχλωρικό άλας της βενζοκαΐνης είναι διαλυτό στο νερό. Τα διαλύματα όμως αυτά είναι όξινα και προκαλούν ερεθισμό στους ιχθύς. Για το λόγο αυτό, σε περίπτωση προσθήκης τους σε γλυκό νερό, συνιστάται η ρύθμιση του pH τους με διττανθρακικό νάτριο. Ανάλογη ρύθμιση του pH δεν απαιτείται κατά την προσθήκη τους στο θαλασσινό νερό, εξαιτίας της περιεκτικότητάς του σε διάφορα άλατα, τα οποία δρουν ρυθμιστικά (Summerfelt & Smith 1990, Stoskopf 1993, Coyle et al. 2004). Τα διαλύματα τόσο της ελεύθερης βάσης όσο και του υδροχλωρικού άλατος είναι φωτοευαίσθητα και γι' αυτό πρέπει να προστατεύονται από το ηλιακό φως (Stoskopf 1993, Coyle et al. 2004, Ross & Ross 2008).

Η βενζοκαΐνη έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό ειδών ιχθύων σε δόσεις οι οποίες, ανάλογα με τις ανάγκες, συνήθως κυμαίνονται από 25 έως 200 mg/l (Barham et al. 1979, Ferreira et al. 1984, Mattson & Ripley 1989, Gilderhus 1990, Gilderhus et al.

1991, Stoskopf 1993, Munday & Wilson 1997, Hseu et al. 1998, Gomes et al. 2001, Ortuño et al. 2002 a, Walsh & Pease 2002, Iversen et al. 2003, Ross & Ross 2008, Zahl et al. 2010).

Η αναισθητική δράση της βενζοκαΐνης είναι μάλλον ισχυρότερη από ό,τι της τρικαΐνης, με αποτέλεσμα να εκδηλώνεται ταχύτερα η δράση της, παρά το ότι και οι δύο ουσίες απορροφούνται γρήγορα από τα βράγχια (Summerfelt & Smith 1990, Stoskopf 1993, Hseu et al. 1998). Η βενζοκαΐνη εξασφαλίζει εγκατάσταση αναισθησίας σε 1-4 min και ανάνηψη το αργότερο σε 5-15 min (Stoskopf 1993, Munday & Wilson 1997, Hseu et al. 1998, Iversen et al. 2003, Zahl et al. 2010). Η δραστηριότητά της δεν επηρεάζεται από το pH ή τη σκληρότητα του νερού, επηρεάζεται όμως σημαντικά από τη θερμοκρασία του, εξαιτίας του ταχύτερου μεταβολισμού της (ακετυλίωση) με αποτέλεσμα να απαιτούνται υψηλότερες δόσεις της σε θερμά νερά (Treves-Brown 2000). Τα μειονεκτήματα της βενζοκαΐνης είναι ανάλογα με εκείνα της τρικαΐνης. Επειδή υδρολύεται σε 4-αμινοβενζοϊκό οξύ, η χρήση της δεν συνιστάται σε ιχθύς στους οποίους έχουν χορηγηθεί σουλφοναμίδες (Stoskopf 1993). Επιπλέον, δεν συνιστάται σε περιπτώσεις χειρουργικής επέμβασης επειδή μπορεί να διατηρηθεί η κινητικότητα σε όλα τα στάδια της αναισθησίας, με συνέπεια την παρεμπόδιση λεπτών χειρισμών (Ackerman et al. 2001). Εξάλλου, έχει αναφερθεί ότι ενδεχομένως να μην είναι ασφαλής για αναισθησία μεγαλύτερη των 15 min (Coyle et al. 2004). Μπορεί ακόμα να προκαλέσει ερεθισμό στο αναπνευστικό σύστημα του χρήστη και για το λόγο αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιείται με ιδιαίτερη προσοχή (Ackerman et al. 2001). Τέλος, η χρήση της δεν επιτρέπεται από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των ΗΠΑ σε ιχθύς που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση (Coyle et al. 2004).

### **Γ.3.3. Κιναλδίνη και θειική κιναλδίνη**

Η κιναλδίνη (2-μεθυλοκινολίνη), μια τριτοταγής αμίνη, είναι ένα άχρωμο ελαιώδες υγρό με δυσάρεστη οσμή (Treves-Brown 2000, Coyle et al. 2004). Είναι ελάχιστα διαλυτή στο νερό και για το λόγο αυτό διαλύεται πάντα, πριν από τη χρησιμοποίησή της, σε οργανικούς διαλύτες, όπως η αιθανόλη ή η ακετόνη. Τα διαλύματα αυτά παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι κατά την τελική αραίωσή τους με νερό παρέχουν ουδέτερα διαλύματα, τα οποία δεν απαιτούν ρύθμιση του pH. Σε αντίθεση με την κιναλδίνη, το θειικό άλας της είναι πολύ διαλυτό στο νερό. Τα διαλύματα όμως του θειικού άλατος είναι όξινα και προκαλούν ερεθισμό στους ιχθύς.

Για το λόγο αυτό, πριν από τη χρήση του άλατος αυτού σε ιχθύς γλυκού νερού, συνιστάται ρύθμιση των διαλυμάτων με προσθήκη διττανθρακικού νατρίου. Ανάλογη ρύθμιση δεν απαιτείται κατά τη χρήση του σε ιχθύς θαλασσινού νερού (Treves-Brown 2000, Ross & Ross 2008). Ένας επιπρόσθετος λόγος για τον οποίο τα διαλύματα της θεικής κιναλδίνης πρέπει να ρυθμίζονται είναι ότι σε όξινα διαλύματά της δεν βρίσκεται σε αδιάστατη αλλά σε ιονισμένη μορφή, με αποτέλεσμα να απορροφάται σε μικρό βαθμό από τους ιχθύς. Σε pH 5 μόνο το 27,5% της θεικής κιναλδίνης βρίσκεται σε αδιάστατη μορφή, ενώ σε pH 7 το ποσοστό αυτό αυξάνεται σε 97,4% (Treves-Brown 2000).

Η κιναλδίνη παρουσιάζει τη μέγιστη αποτελεσματικότητά της σε θερμό και σκληρό νερό (Stoskopf 1993, Coyle et al. 2004). Εξασφαλίζει εγκατάσταση της αναισθησίας σε 1-3 min και ανάνηψη σε 5-20 min (Green 1979), δεν προκαλεί όμως χειρουργική αναισθησία, καθώς δεν καταργούνται πάντα όλα τα αντανακλαστικά (Stoskopf 1993, Masee et al. 1995, Coyle et al. 2004). Λόγω του χαμηλού κόστους της χρησιμοποιείται ευρέως στους ιχθύς των ενυδρείων (Coyle et al. 2004). Πάντως, στους χρήστες μπορεί να προκληθούν κυρίως ερεθισμός του επιπεφυκότα, του κερατοειδούς και του βλεννογόνου του αναπνευστικού συστήματος, καθώς και άλλα αναπνευστικά προβλήματα, ιδίως όταν ο εξαερισμός στο χώρο εφαρμογής δεν είναι επαρκής, ενώ η χρήση της ενδέχεται να συνδέεται και με διαταραχές της λειτουργίας του θυρεοειδούς αδένου (Blasiola 1977, Summerfelt & Smith 1990, Munday & Wilson 1997, Ross & Ross 2008).

Σε αντίθεση με την κιναλδίνη, η θεική κιναλδίνη (θεική 2-μεθυλοκινολίνη) παρουσιάζει τοξικότητα σε θερμά ή και με μεγάλη σκληρότητα νερά (Stoskopf 1993), η οποία εκδηλώνεται με υπεργλυκαιμία, ερεθισμό των βραγχίων και βλάβες του κερατοειδούς χιτώνα των ιχθύων (Munday & Wilson 1997, Bowser 2001, Ortuño et al. 2002 a, Ross & Ross 2008). Η δόση της κιναλδίνης και της θεικής κιναλδίνης ποικίλει ανάλογα με το είδος και το μέγεθος του ιχθύος και συνήθως κυμαίνεται από 5 έως 70 mg/l (Stoskopf 1993, Masee et al. 1995, Munday & Wilson 1997, Hseu et al. 1998, Kumlu & Yanar 1999, Ortuño et al. 2002 a, Small 2003, Coyle et al. 2004, Ross & Ross 2008). Ο χρόνος εγκατάστασης της αναισθησίας είναι 1-4 min και ο χρόνος ανάνηψης 1-13 min (Brandenburger Brown et al. 1972, Stoskopf 1993, Munday & Wilson 1997, Hseu et al. 1998, Kumlu & Yanar 1999, Coyle et al. 2004). Ο χρόνος εγκατάστασης μπορεί να μειωθεί σημαντικά αν η θεική κιναλδίνη συνδυαστεί με τρικαΐνη (Stoskopf

1993). Ο συνδυασμός αυτός θεωρείται ιδιαίτερα ελκυστικός για ιχθύς που πρόκειται να υποβληθούν σε επώδυνες χειρουργικές επεμβάσεις (Milton & Dixon 1980, Gilderhus & Marking 1987).

Η χρήση της κινολιδίνης και των παραγώγων της δεν επιτρέπεται από τον FDA των ΗΠΑ σε ιχθύς που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση (Bowser 2001).

#### **Γ.3.4. Φαινοξυαιθανόλη**

Η φαινοξυαιθανόλη (2-φαινοξυ-αιθανόλη) είναι ελαιώδες άχρωμο υγρό, μέτρια διαλυτό στο νερό και διαλυτό στην αιθανόλη. Έχει χαμηλό κόστος και τα διαλύματά της παραμένουν δραστικά για τουλάχιστον 3 ημέρες (Jolly et al. 1972, Coyle et al. 2004), ενώ, επιπλέον, έχουν αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση (Jolly et al. 1972, Green 1979, Coyle et al. 2004).

Η φαινοξυαιθανόλη έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό ειδών ιχθύων σε δόσεις οι οποίες, ανάλογα με τις ανάγκες, συνήθως κυμαίνονται από 100 έως 600 mg/l (Gilderhus & Marking 1987, Mattson & Riple 1989, Josa et al. 1992, Hseu et al. 1994, Weyl et al. 1996, Hseu et al. 1997, Munday & Wilson 1997, Hseu et al. 1998, Kamiński et al. 2001, Ortuño et al. 2002 a, Tort et al. 2002, Myszkowski et al. 2003, Tsantilas et al. 2006, Weber et al. 2009b, Zahl et al. 2010). Παρουσιάζει μεγάλα περιθώρια ασφάλειας, αφού σε δόση 100 mg/l προκαλεί ελαφρά ηρέμηση, ενώ σε δόση 600 mg/l χειρουργική αναισθησία. Δόσεις 300-400 mg/l είναι χρήσιμες για σύντομες επεμβάσεις, ενώ δόσεις 100-200 mg/l θεωρούνται ασφαλείς για παρατεταμένη ηρέμηση, όπως στις περιπτώσεις μεταφοράς των ιχθύων (Kamiński et al. 2001, Tort et al. 2002, Myszkowski et al. 2003, Coyle et al. 2004). Εξασφαλίζει εγκατάσταση αναισθησίας και ανάνηψη σε 1-6 min (Weyl et al. 1996, Munday & Wilson 1997, Hseu et al. 1998, Tsantilas et al. 2006, Weber et al. 2009b, Zahl et al. 2010), αν και στο σολομό του είδους *Oncorhynchus nerka* παρατηρούνται χρόνοι 10-30 min και 5-15 min, αντίστοιχα (Green 1979).

Στις παρενέργειές της περιλαμβάνονται η υποξία, η υπερκαπνία, η υπεργλυκαιμία και η αύξηση του γαλακτικού οξέος και του αιματοκρίτη, καθώς και διαταραχές της οξεοβασικής ισορροπίας (Iwama et al. 1989, Ackerman et al. 2001, Ortuño et al. 2002 c), ενώ δεν παρουσιάζει πάντα ασφάλεια για το χρήστη, προκαλώντας ερεθισμό στο δέρμα και στα μάτια ή και νευρολογικές διαταραχές (Bell 1987, Morton 1990, Ross & Ross 2008).



Η χρήση της δεν επιτρέπεται από τον FDA των ΗΠΑ σε ιχθύς που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση (Coyle et al. 2004).

### **Γ.3.5. Μετομιδάτη και Ετομιδάτη**

Η μετομιδάτη [1-(1-φαινυλοαιθυλο)-1H-ιμιδαζολο-5-καρβοξυλικός μεθυλεστέρας] σχετίζεται, από χημικής απόψεως, με την ετομιδάτη [1-(1-φαινυλοαιθυλο)-1H-ιμιδαζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας]. Οι δύο ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί σε ιχθύς, σε πτηνά, στο χοίρο, στο άλογο και στον άνθρωπο (Stoskopf 1993, Small 2003, Coyle et al. 2004, Ross & Ross 2008). Τόσο η μετομιδάτη όσο και η ετομιδάτη εξασφαλίζουν εγκατάσταση αναισθησίας σε λιγότερο από 5 min, αλλά η ανάνηψη είναι ιδιαίτερα παρατεταμένη, φτάνοντας τα 40 min (Plumb et al. 1983, Gilderhus & Marking 1987, Mattson & Ripple 1989). Η ετομιδάτη, αν και δεν έχει ευρεία εφαρμογή στην αναισθησία των ιχθύων, έχει χρησιμοποιηθεί σε δόσεις, οι οποίες συνήθως κυμαίνονται από 0,4 έως 3 mg/l, αν και αναφέρονται δόσεις έως 20 mg/l (Ross & Ross 2008). Η μετομιδάτη είναι αποτελεσματική τόσο σε γλυκό όσο και σε θαλασσινό νερό και έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό ειδών ιχθύων σε δόσεις, οι οποίες, ανάλογα με τις ανάγκες, συνήθως κυμαίνονται από 1 έως 60 mg/l (Stoskopf 1993, Iversen et al. 2003, Small 2003, Ross & Ross 2008, Weber et al. 2009b, Zahl et al. 2010). Ως παρενέργειά της αναφέρεται η υψηλή θνησιμότητα των προνυμφών (Massee et al. 1995), η οποία μάλιστα συνοδεύεται και από ανεπαρκή αναισθησία (Coyle et al. 2004). Χρησιμοποιείται περισσότερο για ηρέμηση παρά για χειρουργικές επεμβάσεις (Treves-Brown 2000). Συνήθως είναι διαθέσιμη σε διάλυμα 1% και έχει υψηλό κόστος (Bell 1987, Treves-Brown 2000). Η δραστηριότητά της εξαρτάται από το pH του νερού και είναι μεγαλύτερη σε αλκαλικό νερό (Amend et al. 1982). Η θερμοκρασία επηρεάζει σημαντικά την τοξικότητά της, αφού υψηλές θερμοκρασίες την καθιστούν λιγότερο τοξική (Limsuwan et al. 1983).

Κατά την αναισθησία με μετομιδάτη δεν παρατηρείται αύξηση της κορτιζόλης στο αίμα, η οποία είναι ενδεικτική στρες (Stoskopf 1993, Sandodden et al. 2001, Iversen et al. 2003, Small 2003), αν και προκαλείται αύξηση του γαλακτικού οξέος και του αιματοκρίτη (Olsen et al. 1995). Ωστόσο, φαίνεται ότι η μη αύξηση της κορτιζόλης οφείλεται σε παρεμπόδιση της σύνθεσής της, κάτι το οποίο δεν είναι επιθυμητό, και όχι σε μη πρόκληση στρες (Stoskopf 1993, Neiffer 2007, Ross & Ross 2008). Με την καταστολή της παραγωγής κορτιζόλης, η οποία επηρεάζει τη λειτουργία των

μελανοκυττάρων, πιθανώς να συνδέεται και ο σκούρος χρωματισμός, ο οποίος παρατηρείται κατά την αναισθησία με μετομιδάτη σε ορισμένα είδη ιχθύων, καθώς και σε μεμονωμένα άτομα διάφορων ειδών ιχθύων (Stoskopf 1993). Η ετομιδάτη και η μετομιδάτη έχουν εγκριθεί για χρήση ως ηρεμιστικές ουσίες σε ιχθύς στη Βόρεια Αμερική, όχι όμως και σε ιχθύς που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση (Coyle et al. 2004).

### **Γ.3.6. Διοξείδιο του άνθρακα**

Το διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ) χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια ως ηρεμιστικό των ιχθύων, ιδιαίτερα κατά τη μεταφορά τους (Coyle et al. 2004). Είναι άχρωμο, άοσμο και άφλεκτο αέριο με μεγάλη διαλυτότητα στο νερό. Αν και είναι γενικά ασφαλές, σε συγκέντρωση μεγαλύτερη του 10% στο χώρο όπου χρησιμοποιείται μπορεί να προκαλέσει στο χρήστη αναισθησία ή ακόμη και θάνατο, εφόσον δεν υπάρχει επαρκής εξαερισμός (Bell 1987).

Εξαιτίας της μεγάλης υδατοδιαλυτότητάς του μπορεί να χορηγηθεί με απευθείας διοχέτευσή του μέσα στο νερό. Άλλη τεχνική χορήγησής του είναι η προσθήκη στο νερό όξινου ανθρακικού νατρίου ( $\text{NaHCO}_3$ ), οπότε προκαλείται βραδεία απελευθέρωση  $\text{CO}_2$ . Μάλιστα, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η προσθήκη στο νερό όξινου ανθρακικού νατρίου σε δόση 640 mg/l και pH 6,5 αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό τρόπο παραγωγής  $\text{CO}_2$  (Bowser 2001). Η παραγωγή όμως του  $\text{CO}_2$  επιταχύνεται σημαντικά σε χαμηλό pH (Coyle et al. 2004, Bowser 2001). Προσθήκη 80 g  $\text{NaHCO}_3$  και 80 ml οξικού οξέος σε 30 l  $\text{H}_2\text{O}$  εξασφαλίζει πιο αποτελεσματική αναισθησία σε ιχθύς ψυχρού νερού από ό,τι η προσθήκη 40 g  $\text{NaHCO}_3$  και 15 ml οξικού οξέος σε 30 l  $\text{H}_2\text{O}$  (Peake 1998). Σε περίπτωση άμεσης διοχέτευσης του  $\text{CO}_2$  στο νερό, οι συνιστώμενες δόσεις για αναισθησία ιχθύων είναι 120-250 mg/l (Coyle et al. 2004), ενώ σε περίπτωση προσθήκης στο νερό όξινου ανθρακικού νατρίου είναι 120-640 mg/l με χρόνο εγκατάστασης περίπου 5 min (Coyle et al. 2004). Πάντως, οι παραπάνω τρόποι χορήγησης, γενικά, παρουσιάζουν προβλήματα, επειδή τόσο ο έλεγχος όσο και η ρύθμιση της τελικής συγκέντρωσης του  $\text{CO}_2$  είναι σχετικά χρονοβόρες διαδικασίες (Coyle et al. 2004). Η δυσκολία ρύθμισης του νερού στο κατάλληλο pH με προσθήκη ρυθμιστικών διαλυμάτων είναι ένα επιπλέον πρόβλημα (Coyle et al. 2004). Εξάλλου, η έκθεση των ιχθύων σε νερό με αυξημένη συγκέντρωση  $\text{CO}_2$  μπορεί να προκαλέσει διαταραχές στην αναπνοή τους και πιθανότατα στρες εξαιτίας της προκαλούμενης

μείωσης του pH του αίματος (Ackerman et al. 2001). Γενικά, οι ιχθύες δεν πρέπει να βρίσκονται σε επαφή με το CO<sub>2</sub> για περισσότερο από 5 min (Green 1979). Πάντως, το CO<sub>2</sub> εξακολουθεί να αποτελεί τη μόνη αναισθητική ουσία που χρησιμοποιείται κατά την τελική εξαλίευση των ιχθύων στις ιχθυοκαλλιέργειες ή τη μεταφορά τους στην αγορά, αφού τόσο αυτό όσο και το όξινο ανθρακικό νάτριο δεν υπόκεινται σε έλεγχο από τον FDA των ΗΠΑ και, επομένως, επιτρέπεται η χρήση τους (Coyle et al. 2004).

#### **Γ.4. Φυσικές αναισθητικές ουσίες**

##### **Γ.4.1. Αιθέριο έλαιο γαριφάλου και παράγωγά του**

Το αιθέριο έλαιο του γαριφάλου ή γαριφαλέλαιο είναι ελαιώδες υγρό, το οποίο παράγεται υποβάλλοντας τα άνθη, τα φύλλα και τους μίσχους του φυτού *Eugenia caryophyllata* σε απόσταξη με υδρατμούς (Cho & Heath 2000, Ackerman et al. 2001, Iversen et al. 2003). Περιλαμβάνει διάφορα δραστικά συστατικά από τα οποία πιο σημαντικά είναι η ευγενόλη και η ισοευγενόλη. Η ευγενόλη (4-αλλυλο-2-μεθοξυφαινόλη) συνιστά το 70-90% του γαριφαλέλαιου, παρουσιάζει όμως μικρότερη αναισθητική δράση από την ισοευγενόλη (4-προπενυλο-2-μεθοξυφαινόλη) (Soto & Burhanuddin 1995, Ackerman et al. 2001, Tort et al. 2002, Iversen et al. 2003, Coyle et al. 2004, Ross & Ross 2008). Το γαριφαλέλαιο χρησιμοποιείται επί αρκετά χρόνια ως προσθετικό των τροφίμων και αναγνωρίζεται από τον FDA των ΗΠΑ ως ουσία GRAS (Generally Regarding As Safe) για χρήση σε ανθρώπους (Ackerman et al. 2001). Η αναισθητική δράση του αποτέλεσε αντικείμενο αρκετών πρόσφατων μελετών σε διάφορα είδη ιχθύων (Chanseau et al. 2002, Ross & Ross 2008).

Το γαριφαλέλαιο είναι μερικώς διαλυτό στο νερό, αλλά συχνά προ της χρήσης του διαλύεται σε αιθανόλη ή ακετόνη σε αναλογία 1:10 (Ross & Ross 2008). Τις τελευταίες δεκαετίες έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μεγάλο αριθμό ειδών ιχθύων σε δόσεις οι οποίες, ανάλογα με τις ανάγκες, συνήθως κυμαίνονται από 25 έως 200 mg/l (Soto & Burhanuddin 1995, Anderson et al. 1997, Munday & Wilson 1997, Keene et al. 1998, Peake 1998, Waterstrat 1999, Cho & Heath 2000, Prince & Powell 2000, Tort et al. 2002, Walsh & Pease 2002, Iversen et al. 2003, Small 2003, Wagner et al. 2003, Hoskonen & Pirhonen 2004, Ross & Ross 2008, Park et al. 2009, Weber et al. 2009b). Εξασφαλίζει εγκατάσταση αναισθησίας συνήθως σε 3-6 min, αλλά η ανάνηψη είναι δύο έως δέκα φορές πιο αργή από ό,τι με άλλα αναισθητικά (Anderson et al. 1997, Munday

& Wilson 1997, Keene et al. 1998, Prince & Powell 2000, Sladky et al. 2001, Wagner et al. 2002, Walsh & Pease 2002, Iversen et al. 2003, Park et al. 2009, Weber et al. 2009b).

Το γαριφαλέλαιο έχει χαμηλό κόστος, είναι ασφαλές τόσο για τους ιχθύς όσο και για το χρήστη και, επειδή είναι φυσικό προϊόν, πιστεύεται ότι δεν είναι αναγκαίο να επιβάλλεται χρόνος αναμονής μετά τη χρήση του (Keene et al. 1998, Walsh & Pease 2002). Όμως, επί του παρόντος, είναι υπό διερεύνηση ως αναισθητικό για χρήση σε ιχθύς εκτροφής, οπότε απαιτείται χρόνος αναμονής 21 ημερών (Ross & Ross 2008).

Από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 στη Νέα Ζηλανδία χρησιμοποιήθηκε το Aqui-S για την αναισθητοποίηση ιχθύων που προορίζονται για κατανάλωση (Treves-Brown 2000). Η δραστική ουσία του είναι η ισοευγενόλη, είναι υδατοδιαλυτή και μπορεί να προστεθεί απευθείας στο νερό (Ackerman et al. 2001, Bowser 2001, Ross & Ross 2008). Η χρήση της ενδείκνυται για αναισθησία ιχθύων γλυκού νερού, ιδιαίτερα των χελιών που παρουσιάζουν χαμηλότερη ευαισθησία σε άλλα αναισθητικά (Barker et al. 2002). Χρησιμοποιείται σε δόσεις 5-10 ml / 1000 ml νερού για ελαφρά ηρέμηση ή 17-20 ml / 1000 ml νερού για βαθιά αναισθησία (Bowser 2001) και δεν φαίνεται να προκαλεί στρες, αφού δεν παρατηρείται αύξηση της κορτιζόλης στο αίμα (Iversen et al. 2003). Η χρήση του επιτρέπεται στη Χιλή, στην Αυστραλία και στη Νέα Ζηλανδία χωρίς χρόνο αναμονής, ενώ στις ΗΠΑ, αν και δεν έχει ακόμη άδεια κυκλοφορίας, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέσα στα πλαίσια του προγράμματος Investigational New Animal Drug (INAD) (Bowser 2001, Ross & Ross 2008).

### **Γ.5. Νομοθετικό πλαίσιο χρήσης των αναισθητικών ουσιών**

Όταν οι ιχθύες εκτίθενται σε κάποια αναισθητική ουσία, τα κατάλοιπα αυτής ή των μεταβολιτών της παραμένουν για κάποιο χρονικό διάστημα στους ιστούς τους μέχρι να μεταβολιστούν ή απεκκριθούν. Επειδή κάποια από τα κατάλοιπα αυτά μπορεί να εγκυμονούν κινδύνους για την υγεία του καταναλωτή, απαιτείται, για κάθε μία από τις αναισθητικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες, καθορισμός του απαιτούμενου, προ της κατανάλωσης των ιχθύων, χρόνου αναμονής. Έτσι, η χρήση τους επιτρέπεται μόνο μετά την πραγματοποίηση ειδικών μελετών (Coyle et al. 2004). Ωστόσο, οι μελέτες αυτές είναι εξαιρετικά χρονοβόρες και δαπανηρές και βαρύνουν αποκλειστικά τις φαρμακευτικές εταιρείες, οι οποίες αιτούνται έγκριση εμπορίας των αναισθητικών ουσιών (Botsoglou & Fletouris 2001). Συχνά είναι εξαιρετικά δύσκολο για τις φαρμακευτικές εταιρείες να αναλάβουν το κόστος της διαδικασίας έγκρισης μιας

αναισθητικής ουσίας για χρήση σε ιχθυοκαλλιέργειες, όπου η κατανάλωση των αναισθητικών ουσιών είναι σχετικά περιορισμένη και το προσδοκώμενο κέρδος μικρό. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο χημικές ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν για αναισθητοποίηση των ιχθύων, χωρίς να έχουν άδεια, χρησιμοποιούνται σήμερα ελάχιστα ή έχουν απορριφθεί (Coyle et al. 2004).

Σήμερα, ο αριθμός των εγκεκριμένων από το FDA των ΗΠΑ αναισθητικών ουσιών περιορίζεται σε μια μόνο χημική ουσία, την τρικαΐνη (Bowser 2001, Ross & Ross 2008). Δύο ακόμη χημικές ουσίες, το CO<sub>2</sub> και το όξινο ανθρακικό νάτριο περιλαμβάνονται στους καταλόγους της FDA ως “low regulatory priority compounds”, δηλαδή ως ουσίες οι οποίες, αν και δεν είναι εγκεκριμένες, μπορούν να χρησιμοποιούνται χωρίς χρόνο αναμονής (Bowser 2001). Η τρικαΐνη είναι επίσης το μόνο αναισθητικό του οποίου η χρήση επιτρέπεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ross & Ross 2008). Αυτή και η μετομιδάτη έχουν εγκριθεί επίσης στον Καναδά. Ο περιορισμένος αριθμός των εγκεκριμένων αναισθητικών ουσιών σε συνδυασμό με τις συνεχώς αυξανόμενες πιέσεις των καταναλωτών για χρήση φυσικών και όχι χημικών ουσιών στις ιχθυοκαλλιέργειες, έχει στρέψει παγκοσμίως το ερευνητικό ενδιαφέρον στην ανεύρεση εναλλακτικών φυσικών αναισθητικών ουσιών, όπως το γαριφαλέλαιο, και στην περαιτέρω βελτίωση τεχνικών, οι οποίες χρησιμοποιούνται εναλλακτικά της αναισθησίας, όπως η ηλεκτροαναισθησία και η υποθερμία (Ackerman et al. 2001).

#### **Δ. Εναλλακτικές της αναισθησίας μέθοδοι**

Ακινητοποίηση των ιχθύων μπορεί να επιτευχθεί και με άλλες μεθόδους πέραν της χρήσης συνθετικών ή φυσικών αναισθητικών ουσιών. Στις μεθόδους αυτές περιλαμβάνονται η υποθερμία και η ηλεκτροαναισθησία, οι οποίες, ωστόσο, παρά την άποψη που είχε επικρατήσει κατά το παρελθόν, δεν εξασφαλίζουν αληθή αναισθησία (Ross & Ross 2008). Μάλιστα, υπάρχει πλέον η τάση ο όρος «ηλεκτροαναισθησία», καθότι μη ακριβής και παραπλανητικός, να αντικατασταθεί από τον όρο «ηλεκτροακινητοποίηση» (Coyle et al. 2004, Ross & Ross 2008).

##### **Δ.1. Υποθερμία**

Η υποθερμία δεν εξασφαλίζει αναισθησία, χρησιμοποιείται δε κυρίως για τη μεταφορά των ιχθύων, ιδίως όταν οι αναισθητικές ουσίες δεν είναι διαθέσιμες ή επιθυμητές, και όχι για επώδυνες ενέργειες (Ackerman et al. 2001). Κατά την

υποθερμία, η μυϊκή δραστηριότητα των ιχθύων μειώνεται σταδιακά μέχρι πλήρους ακινητοποίησής τους, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται απώλεια των αντανακλαστικών τους (Stoskopf 1993).

Η υποθερμία επιτυγχάνεται με μείωση της θερμοκρασίας του νερού, χρησιμοποιώντας πάγο ή κρύο νερό. Όταν γίνεται χρήση ξηρού πάγου, μπορεί να προκληθεί αύξηση του CO<sub>2</sub> και μείωση του pH του νερού με δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία των ιχθύων (Ackerman et al. 2001). Κατά την υποθερμία τα περιθώρια ασφαλείας είναι πολύ μικρά, αφού η θνησιμότητα μπορεί να αυξηθεί σημαντικά όταν η θερμοκρασία μειωθεί απότομα ή σε μεγάλο βαθμό και, επομένως, πρέπει να ελέγχονται προσεκτικά τόσο η τελική θερμοκρασία όσο και η ταχύτητα ψύξης, η οποία πρέπει να γίνεται με ρυθμό μικρότερο του 1 °C ανά 15 min για να αποφευχθεί η καταπληξία (Coyle et al. 2004).

Η ακινητοποίηση των ιχθύων συνήθως επιτυγχάνεται σε 10-15 min και η ανάνηψη γίνεται με επαναφορά του νερού στη φυσιολογική θερμοκρασία (Stoskopf 1993, Iwama & Ackerman 1994). Η μέθοδος είναι πιο αποτελεσματική για ιχθύς που εκτρέφονται σε νερό θερμοκρασίας άνω των 10 °C, ενώ σε ιχθύς που εκτρέφονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες δεν προκαλεί ούτε καν ηρέμηση (Ackerman et al. 2001). Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι το χαμηλό κόστος της και το ότι δεν απαιτείται χρόνος αναμονής (Stoskopf 1993).

## **Δ.2. Ηλεκτροαναισθησία**

Η ηλεκτροαναισθησία εφαρμόζεται κυρίως για την ακινητοποίηση ενήλικων ιχθύων με σκοπό τη σήμανση ή τη γονιμοποίησή τους (Cowx & Lamarque 1990, Ackerman et al. 2001). Μπορεί να επιτευχθεί με εναλλασσόμενο ηλεκτρικό ρεύμα, συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα, καθώς και παλλόμενο συνεχές ή εναλλασσόμενο ρεύμα (Ackerman et al. 2001). Κατά το παρελθόν χρησιμοποιήθηκε ευρέως εναλλασσόμενο ρεύμα (Madden & Houston 1976, Ackerman et al. 2001, Ross & Ross 2008), αλλά, εξαιτίας των βλαβών που προκαλεί στους ιχθύς (Lamarque 1990, Walker et al. 1994), χρησιμοποιείται πλέον συνεχές ρεύμα με τάση 12 V ή παλλόμενο συνεχές ρεύμα με συχνότητα 50 Hz και τάση 60 V (Walker et al. 1994, Ackerman et al. 2001). Για την εφαρμογή συνεχούς ρεύματος, χρησιμοποιούνται δύο ηλεκτρόδια, μεταξύ των οποίων αναπτύσσεται τάση 12 V, υπό την οποία οι ιχθύες ακινητοποιούνται σε όρθια στάση με κατεύθυνση παράλληλη προς το ηλεκτρόδιο της ανόδου (Stoskopf 1993), χωρίς όμως

να χάνουν τις αισθήσεις τους, οπότε ο όρος «ηλεκτροαναισθησία» είναι ουσιαστικά παραπλανητικός (Coyle et al. 2004). Σε αντίθεση με το συνεχές, το εναλλασσόμενο ρεύμα προκαλεί μια κατάσταση μικρής διάρκειας, η οποία προσομοιάζει την αναισθησία, και η οποία συνεχίζεται και μετά τη διακοπή της παροχής του ρεύματος. Με τάση 110-115 V η κατάσταση αυτή διαρκεί λιγότερο από 1 min, ενώ με τάση 220-240 V μπορεί να διαρκέσει έως 5 min (Coyle et al. 2004).

Εκτός από την τάση του ρεύματος και τη διάρκεια χορήγησής του, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου επηρεάζεται και από παράγοντες όπως η αγωγιμότητα και η θερμοκρασία του νερού, και το είδος και το μέγεθος των ιχθύων (Ackerman et al. 2001). Όσον αφορά την αγωγιμότητα του νερού, η μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε ιχθύς αλμυρού νερού, επειδή αυτό, λόγω της μεγάλης περιεκτικότητάς του σε άλατα, παρουσιάζει μεγαλύτερη αγωγιμότητα στο ηλεκτρικό ρεύμα από ό,τι το σώμα των ιχθύων. Αντίθετα, δεν παρουσιάζονται ανάλογα προβλήματα σε ιχθύς γλυκού νερού, λόγω της, συγκριτικά με το νερό, μεγαλύτερης αγωγιμότητας του σώματός τους στο ηλεκτρικό ρεύμα (Coyle et al. 2004). Όσον αφορά το μέγεθος των ιχθύων, οι μεγαλύτεροι ιχθύες ακινητοποιούνται γρηγορότερα από τους μικρότερους, ενώ η διάρκεια της ακινητοποίησης αυξάνεται ανάλογα με το μήκος του σώματός τους (Coyle et al. 2004).

Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι επιτυγχάνονται ταχύτερη ακινητοποίηση και ανάνηψη και δεν απαιτείται χρόνος αναμονής, ενώ στα μειονεκτήματά της περιλαμβάνονται η ανάγκη προμήθειας ειδικού εξοπλισμού και η επικινδυνότητά της τόσο για το χειριστή όσο και για τους ιχθύς (Ackerman et al. 2001). Κατά την εφαρμογή της μεθόδου στην ιριδίζουσα πέστροφα παρατηρήθηκαν, για τουλάχιστον έξι ώρες μετά την εφαρμογή της, αύξηση της κορτιζόλης και της γλυκόζης και διαταραχές της καρδιαγγειακής λειτουργίας (Ackerman et al. 2001). Ακόμα, έχουν αναφερθεί εξάρθρωση σπονδύλων, καρδιακή μαρμαρυγή και εσωτερικές αιμορραγίες (Stoskopf 1993).

## **II. ΣΤΡΕΣ**

### **A. Το στρες στους ιχθύς**

Όλα τα ζώα χρειάζονται σταθερότητα του περιβάλλοντος διαβίωσής τους προκειμένου να επιβιώσουν, να αναπτυχθούν και να αναπαραχθούν. Η σταθερότητα αυτή είναι ζωτικής σημασίας επειδή εξασφαλίζει τη δυναμική ισορροπία του

οργανισμού, η οποία καλείται ομοιοστασία. Η ομοιοστασία μπορεί να διαταραχτεί σε συνθήκες στρες. Ο όρος στρες έχει διπλή σημασία, καθώς υποδηλώνει την ταυτόχρονη ύπαρξη δράσης, δηλαδή βλαπτικής επίδρασης εκ μέρους ενός εξωγενούς ή ενδογενούς παράγοντα, και αντίδρασης σε αυτή, δηλαδή κινητοποίησης διάφορων νευροορμονικών μηχανισμών του οργανισμού, με στόχο την αποκατάσταση της ομοιοστασίας του (Παπουτσόγλου 1998, Ross & Ross 2008). Οι παράγοντες, οι οποίοι προκαλούν στρες, είναι ποικίλοι και ονομάζονται στρεσικοί παράγοντες. Ο οργανισμός έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται απέναντι σε αυτούς, τροποποιώντας τόσο τη φυσιολογία όσο και τη συμπεριφορά του, με σκοπό να αντεπεξέλθει στη δράση τους και να διατηρήσει ή να ανακτήσει την ομοιοστασία του (Sutanto & de Kloet 1994, Tsigos & Chrousos 1994). Όταν η δράση του στρεσικού παράγοντα είναι χρόνια, ο οργανισμός μπορεί να χάσει την προσαρμοστικότητά του και να γίνει δυσλειτουργικός, με τελικό αποτέλεσμα την ανάρθρωση της ανάπτυξης, την αδυναμία αναπαραγωγής και τη μειωμένη άμυνα σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Wendelaar Bonga 1997, Ross & Ross 2008).

Στους ιχθύς, αν και η φυσιολογία του στρες είναι ανάλογη με αυτή των υπόλοιπων σπονδυλωτών (Wedemeyer et al. 1990, Barton & Iwama 1991, Wendelaar Bonga 1997, Ross & Ross 2008), η ταυτοποίησή του σε συνθήκες ιχθυοκαλλιέργειας παρουσιάζει προβλήματα, επειδή είναι εξαιρετικά δύσκολο να καθοριστούν τα όρια αφενός μεταξύ μιας φυσιολογικής κατάστασης και μιας κατάστασης που συνδυάζεται με στρες, και αφετέρου μεταξύ της προσαρμοστικής αντίδρασης του οργανισμού σε ήπιους στρεσικούς παράγοντες και της αντίστοιχης αντίδρασής του σε έντονους στρεσικούς παράγοντες. Αυτός είναι ίσως και ο κύριος λόγος για τον οποίο η ταυτοποίηση του στρες είναι ουσιαστικά αυθαίρετη. Εξάλλου, ακόμη και η πλέον ήπια προσπάθεια ταυτοποίησης του στρες αποτελεί και η ίδια στρεσικό παράγοντα, έτσι ώστε να θεωρείται ότι είναι πρακτικά αδύνατο να διερευνηθεί η φυσιολογία ενός απόλυτα μη στρεσαρισμένου ιχθύος (Ross & Ross 2008). Ωστόσο, στρεσικοί παράγοντες θεωρούνται όλοι εκείνοι οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν στους ιχθύς έντονη προσαρμοστική αντίδραση. Σε αυτούς περιλαμβάνονται: α) ξαφνικές ή ακραίες μεταβολές του φυσικού περιβάλλοντός τους, όπως μεταβολές της θερμοκρασίας, της θολερότητας και της αλατότητας, αλλά και η μόλυνση του νερού, η οποία εκδηλώνεται με χαμηλές τιμές pH, παρουσία βαρέων μετάλλων και καταλοίπων οργανικών ουσιών, β) μεταβολές των σχέσεων μεταξύ των ατόμων, όπως ο έντονος ανταγωνισμός για



χώρο, τροφή ή αναπαραγωγή, και γ) διάφοροι ιχθυοκαλλιεργητικοί χειρισμοί, όπως η σύλληψη, η διαχείριση, η μεταφορά, η συγκέντρωση κ.ά. (Wendelaar Bonga 1997).

Οι προσαρμοστικές αντιδράσεις των ιχθύων στην αντιμετώπιση των στρεσικών παραγόντων μπορούν να διακριθούν σε πρωτεύουσες, δευτερεύουσες και τριτεύουσες (Wedemeyer et al. 1990, Pickering & Pottinger 1995). Οι πρωτεύουσες αντιδράσεις είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των κέντρων του εγκεφάλου, η οποία προκαλεί μαζική απελευθέρωση κατεχολαμινών, όπως η αδρεναλίνη και η νοραδρεναλίνη, και κορτικοστεροειδών, όπως η κορτιζόλη, μέσω του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια (Weld et al. 1987, Okawara et al. 1992, Sumpter 1997, Ross & Ross 2008). Η συγκέντρωση της κορτιζόλης στο αίμα σχετίζεται άμεσα με την ένταση και τη διάρκεια της επίδρασης του στρεσικού παράγοντα (Pickering & Pottinger 1989, Pottinger & Moran 1993, Pottinger et al. 1994), ενώ επανέρχεται στα φυσιολογικά πλαίσια με το τέλος της επίδρασης αυτής, οπότε ο οργανισμός ανακτά τις φυσιολογικές λειτουργίες του (Pickering & Pottinger 1995).

Οι δευτερεύουσες αντιδράσεις συνήθως καθορίζονται ως τα πολλαπλά άμεσα αποτελέσματα της δράσης των παραπάνω ορμονών σε επίπεδο αίματος και ιστών. Στην περίπτωση που, λόγω της φύσης του στρεσικού παράγοντα, οι κατεχολαμίνες και η κορτιζόλη βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο αίμα, ενεργοποιούνται μηχανισμοί, όπως η έκκριση ορμονών από την υπόφυση και τον θυρεοειδή αδένα και η αύξηση της έκκρισης της ντοπαμίνης και της σεροτονίνης. Στα αποτελέσματα της δράσης όλων των παραπάνω ορμονών περιλαμβάνεται η αύξηση του καρδιακού ρυθμού, η οποία συνεπάγεται αύξηση της ροής του αίματος στα βράγχια και οδηγεί σε βελτίωση της αναπνευστικής λειτουργίας. Ακόμη, περιλαμβάνονται η αύξηση της πρόσληψης του οξυγόνου και της κατανάλωσης των ενεργειακών αποθεμάτων, μέσω καταβολισμού των υδατανθράκων και των λιπιδίων και οξειδώσεως των πρωτεϊνών, καθώς και οι μεταβολές της ηλεκτρολυτικής ισορροπίας (Pickering 1981, Ross & Ross 2008).

Οι πρωτεύουσες και οι δευτερεύουσες αντιδράσεις εκδηλώνονται όταν οι στρεσικοί παράγοντες έχουν μικρή ένταση και διάρκεια. Όταν η δράση των παραγόντων αυτών συνεχίζεται ή επαναλαμβάνεται ή είναι μεγάλης έντασης, ο οργανισμός καταφεύγει στις τριτεύουσες αντιδράσεις, οι οποίες αφορούν ολόκληρο τον οργανισμό ή και τον πληθυσμό των ιχθύων και είναι η αναστολή της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής, η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος και η μείωση της

ικανότητας του οργανισμού να αντεπεξέρχεται σε επακόλουθους ή επιπρόσθετους στρεσικούς παράγοντες (Conès 1999, Schreck 2000). Πάντως, η ταξινόμηση των αντιδράσεων σε πρωτεύουσες, δευτερεύουσες και τριτεύουσες δεν πρέπει να θεωρείται απόλυτη, ιδίως όσον αφορά τη διάκριση μεταξύ δευτερευουσών και τριτευουσών αντιδράσεων, καθώς στην ουσία, η ανταπόκριση των ιχθύων στο στρες είναι ιδιαίτερα πολυσύνθετη και ευέλικτη (Wendelaar Bonga 1997). Οι προσαρμοστικές αντιδράσεις, μέσω των παραμέτρων που επηρεάζονται κατά την εκδήλωσή τους, μπορούν να χρησιμεύσουν ως δείκτες του στρες στους ιχθύς (Πίνακας 2).

## **B. Αίτια πρόκλησης στρες στους ιχθύς**

Τα σημαντικότερα αίτια πρόκλησης στρες στους ιχθύς των ιχθυοκαλλιεργειών είναι οι ιχθυοκαλλιεργητικοί και οι κτηνιατρικοί χειρισμοί, οι συνθήκες εκτροφής, η διατροφή, η ποιότητα του νερού εκτροφής και η μεταφορά τους.

### **B.1. Ιχθυοκαλλιεργητικοί και κτηνιατρικοί χειρισμοί**

Πολλοί από τους χειρισμούς που πραγματοποιούνται καθημερινά στις ιχθυοκαλλιέργειες προκαλούν στρες. Σε αυτούς περιλαμβάνονται ο καθαρισμός των χώρων εκτροφής, η παροχή τροφής, η διαλογή μεγέθους, το ζύγισμα, ο εμβολιασμός, η διαδικασία της αναισθητοποίησης, ο περιορισμός σε μικρότερο χώρο, η απομάκρυνση από το υδάτινο περιβάλλον, ο έλεγχος νηκτικής κύστης, η σήμανση, η μεταφορά, η αιμοληψία, ο προσδιορισμός της γεννητικής ωριμότητας και η τεχνητή γονιμοποίηση (Jolly et al. 1972, Stoskopf 1993, FAWC 1996, Coyle et al. 2004, Neiffer 2007, Ross & Ross 2008). Κατά τη διάρκεια ιδίως των κτηνιατρικών χειρισμών είναι απαραίτητος ο περιορισμός των ιχθύων σε χώρους μικρότερους από αυτούς που διαβιούν, με αποτέλεσμα τόσο λόγω των χειρισμών όσο και λόγω του περιορισμού να προκαλείται στρες (Barnett & Pankhurst 1998, Ortuño et al. 2001, Rotllant et al. 2001, Ross & Ross 2008). Στρες πολλές φορές μπορεί να εμφανιστεί και κατά τη χορήγηση διαφόρων φαρμάκων, εμβολίων ή αναισθητικών ουσιών σε ενέσιμη μορφή, κυρίως εξαιτίας της πρόκλησης φλεγμονής στο σημείο έγχυσης. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση εμβολίων με ελαιούχα έκδοχα σε σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*) προκάλεσε στρες, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ανάπτυξη και την κακή ποιότητα σάρκας (Midtlyng 1997).

**Πίνακας 2.** Δείκτες του στρες στους ιχθύς

<b>Προσαρμοστικές αντιδράσεις</b>	<b>Παράμετροι που επηρεάζονται</b>
<b>Πρωτεύουσες</b>	Κατεχολαμίνες πλάσματος Κορτικοστεροειδή πλάσματος Φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη (ACTH) πλάσματος
<b>Δευτερεύουσες</b> <b>Μεταβολικές</b>	Γλυκόζη πλάσματος Γαλακτικό οξύ πλάσματος Γλυκογόνο ήπατος και μυών Χοληστερόλη πλάσματος
	<b>Αιματολογικές</b>
	Αιματοκρίτης Λευκοκυτταρικός τύπος Αριθμός ερυθροκυττάρων Αριθμός λευκοκυττάρων Λόγος λεμφοκυττάρων-ερυθροκυττάρων Αριθμός αιμοπεταλίων Χρόνος πήξης αίματος Αιμοσφαιρίνη
<b>Ηλεκτρολυτικές και πρωτεϊνών</b>	Χλώριο πλάσματος Νάτριο πλάσματος Κάλιο πλάσματος Πρωτεΐνες πλάσματος Οσμωτική συγκέντρωση πλάσματος
	<b>Δομικές</b>
	Μέγεθος νεφρικών κυττάρων Διάμετρος πυρήνα νεφρικών κυττάρων Μορφολογία γαστρικού ιστού Οργανοσωματικοί δείκτες
<b>Τριτεύουσες</b>	Ανάπτυξη Μεταβολικός ρυθμός Αντίσταση στα νοσήματα Αντοχή στη θερμότητα Αντοχή στην υποξία Κολυμβητική συμπεριφορά Αναπαραγωγική ικανότητα

(Barton & Iwama 1991) (τροποποιημένος)

## **B.2. Συνθήκες εκτροφής**

Μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους εκτροφής των ιχθύων στις ιχθυοκαλλιέργειες είναι η ιχθυοπυκνότητα, η οποία ορίζεται ως η βιομάζα των ιχθύων στη μονάδα όγκου του νερού και πρέπει να είναι πάντα στην κατάλληλη τιμή για κάθε είδος ιχθύων (Schwedler & Johnson 2000). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι, ενώ η ιδανική ιχθυοπυκνότητα για το γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*) είναι ιδιαίτερα υψηλή (Davis et al. 1991), για την ιριδίσουσα πέστροφα είναι ιδιαίτερα χαμηλή λόγω της κυριαρχικής τάσης της (Li & Brocksen 1977).

Άλλη σημαντική παράμετρος είναι η θερμοκρασία του νερού, η οποία πρέπει να ρυθμίζεται στη βέλτιστη για κάθε είδος ιχθύων περιοχή τιμών, ενώ, παράλληλα, πρέπει να αποφεύγονται οι απότομες μεταβολές της, δηλαδή πάνω από 3 °C ανά ώρα (Schwedler & Johnson 2000). Οι υψηλές θερμοκρασίες νερού επιτείνουν τις δυσμενείς συνέπειες του στρες, κυρίως εξαιτίας της μειωμένης συγκεντρώσεως οξυγόνου (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Άλλες παράμετροι, οι οποίες είναι ιδιαίτερα σημαντικές σε ορισμένες εκτροφές, όπως οι πεστροφοκαλλιέργειες, είναι η στάθμη και η ροή του νερού εκτροφής, αφού οποιαδήποτε αλλαγή τους μπορεί να αποτελέσει αίτιο πρόκλησης στρες (Flodmark et al. 2002).

Η διάρκεια φωτισμού που εκφράζεται σε ώρες ανά εικοσιτετράωρο (φωτοπερίοδος) και η ένταση του φωτός μπορούν, επίσης, να αποτελέσουν αίτια πρόκλησης στρες αν δεν έχουν ρυθμιστεί στις κατάλληλες για το κάθε είδος ιχθύων τιμές. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι τα τροπικά είδη χρειάζονται μεγάλη φωτοπερίοδο, ενώ τα βενθικά είδη πολύ μικρή (Moe 1992).

## **B.3. Διατροφή**

Ο ρόλος της διατροφής στη διατήρηση της ομοιοστασίας των ιχθύων είναι πολύ σημαντικός, καθώς η μη κάλυψη των ενεργειακών αναγκών τους συνιστά παράγοντα πρόκλησης στρες.

Οι ιχθυοτροφές έχουν συνήθως τη μορφή κόκκου ή κυλίνδρου (pellet). Η πρώτη ύλη παρασκευής τους είναι τα ιχθυάλευρα, στα οποία προστίθενται ειδικές αδρανείς ουσίες, ώστε να διατηρείται η μορφή τους συνεκτική και να μειώνεται ο ρυθμός καταβύθισής τους. Οι ιχθυοτροφές χαρακτηρίζονται συνήθως από μεγάλη

περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, η οποία είναι 45-52%, και σε λιπίδια, η οποία είναι 8-12% (Παπουτσόγλου 2008).

Ιδιαίτερα σημαντικό θέμα για την ομαλή ανάπτυξη των ιχθυδίων είναι, επίσης, η περιεκτικότητα του σιτηρεσίου σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, η οποία π.χ. για το λαβράκι πρέπει να ανέρχεται σε 0,7-2%. Δεν αποκλείεται ο συνδυασμός σχετικά αυξημένης θερμοκρασίας του νερού εκτροφής με χαμηλά επίπεδα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων της τροφής να προκαλέσει ανεπαρκή κάλυψη των αναγκών των ιχθύων στα οξέα αυτά, λόγω του αναμενόμενου αυξημένου μεταβολικού ρυθμού. Η μείωση, άλλωστε, του μεταβολικού ρυθμού των ιχθύων, λόγω μειωμένης θερμοκρασίας του νερού εκτροφής (13-16 °C), προκαλεί σχετικά έντονη συσσώρευση σωματικού λίπους. Αυτή συνδέεται άμεσα με την προσλαμβανόμενη ποσότητα της τροφής, της οποίας το επίπεδο στο λαβράκι δεν φαίνεται να επηρεάζεται ιδιαίτερα αρνητικά από τη χαμηλή θερμοκρασία, γεγονός το οποίο μπορεί να αποδοθεί στην υψηλού βαθμού αδηφαγία του. Καλύτερη αξιοποίηση της τροφής γίνεται με χορήγηση μόνο της απαιτούμενης ποσότητάς της, σχεδόν ανεξάρτητα από το ποσοστό των ολικών λιπών της, αν και ο ρυθμός ανάπτυξης μπορεί να αυξηθεί με χορήγηση μεγαλύτερης ποσότητας τροφής και με σχετικά υψηλή περιεκτικότητα λιπών (Παπουτσόγλου 2008).

Η ποσότητα της χορηγούμενης ιχθυοτροφής εξαρτάται από το μέγεθος των ιχθύων και τη θερμοκρασία του νερού εκτροφής. Ο αριθμός των γευμάτων, επίσης, ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος των ιχθύων. Στα νεαρά ιχθύδια απαιτούνται συνήθως 8-9 γεύματα ημερησίως, τα οποία σταδιακά μειώνονται στα 3 όταν το βάρος των ιχθύων υπερβεί τα 100 g. Οι ιχθυοκαλλιεργητές πρέπει να τροποποιούν το πρόγραμμα διατροφής των ιχθύων με βάση τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της εκτροφής και την εμπειρία τους. Έχει παρατηρηθεί ότι η συνεχής παροχή τροφής μέχρι κορεσμού με σχετικά υψηλά ποσοστά λιπών (20-30%) προκαλεί μείωση της αποδοχής της χορηγούμενης τροφής, προφανώς λόγω πλήρους κάλυψης των ενεργειακών αναγκών των ιχθύων, χωρίς ωστόσο να επηρεάζεται ο ρυθμός ανάπτυξης. Αν και το λαβράκι προσαρμόζει σε κάποιο βαθμό τη διατροφική συμπεριφορά του, ως προς την ώρα του εικοσιτετραώρου που προτιμά να προσλαμβάνει την τροφή του, ανεξάρτητα από τις συνθήκες φωτός που επικρατούν στους χώρους εκτροφής, ωστόσο, η ημερησίως προσλαμβανόμενη ποσότητα τροφής καθορίζεται κυρίως από το ενεργειακό περιεχόμενό της και όχι από τις συνθήκες φωτισμού. Οι ημερήσιες ενεργειακές ανάγκες

συντήρησης του λαβρακιού είναι περίπου 14-16 kJ/kg σωματικού βάρους (Παπουτσόγλου 2008).

Ο χώρος αποθήκευσης των ιχθυοτροφών έχει μεγάλη σημασία για τη διατήρηση της ποιότητάς τους. Οι ιχθυοτροφές πρέπει να αποθηκεύονται σε σκιερό μέρος, με καλό αερισμό και χωρίς υγρασία. Κάθε τυποποιημένη ιχθυοτροφή έχει ημερομηνία λήξης πέραν της οποίας δεν πρέπει να χορηγείται. Αντί της τυποποιημένης ιχθυοτροφής είναι δυνατόν να χορηγηθούν φρέσκοι ή κατεψυγμένοι ιχθύες ή μαλάκια. Η νωπή αυτή τροφή, η οποία ειδικά στους γεννήτορες είναι απαραίτητη, είναι κατά κανόνα οικονομικότερη, αλλά κρύβει σοβαρούς κινδύνους μόλυνσης ή ρύπανσης και για το λόγο αυτό συνήθως αποφεύγεται (Παπουτσόγλου 2008).

#### **B.4. Ποιότητα του νερού**

Η ποιότητα του νερού της εκτροφής εκφράζεται μέσω διαφόρων παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία, το pH, η αλατότητα, η σκληρότητα, η αλκαλικότητα, κ.ά. Εξυπακούεται ότι το νερό της εκτροφής πρέπει να είναι απαλλαγμένο από τοξικές ουσίες και μικροοργανισμούς ικανούς να προκαλέσουν βλάβη στους ιχθύς. Τυχόν τοξικές ουσίες είναι δυνατόν να προέρχονται και από το υλικό κατασκευής των δεξαμενών, από τα προϊόντα μεταβολισμού των ιχθύων, όπως η αμμωνία και το CO<sub>2</sub>, και από τα προϊόντα αποσύνθεσης των περιττωμάτων τους, όπως το υδρόθειο και τα νιτρικά άλατα (Schwedler & Johnson 2000).

Η θερμοκρασία του νερού της εκτροφής ποικίλει ανάλογα με το είδος των ιχθύων και θα πρέπει να ρυθμίζεται στη βέλτιστη για κάθε είδος περιοχή τιμών (Schwedler & Johnson 2000). Γενικά, οι υψηλότερες θερμοκρασίες νερού επιτείνουν τις δυσμενείς συνέπειες του στρες, κυρίως εξαιτίας της μειωμένης συγκέντρωσης οξυγόνου (Χώτος & Ρογδάκης 1992). Απότομες μεταβολές της θερμοκρασίας του νερού κατά τη μεταφορά ιχθύων από δεξαμενή σε δεξαμενή μπορούν να προκαλέσουν ακόμη και καταπληξία (Jensen 1990).

Άλλη σημαντική παράμετρος είναι το pH του νερού της εκτροφής, επειδή επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη διαλυτότητα ορισμένων αερίων και οργανικών και ανόργανων οξέων, καθώς και τη σχέση της αδιάστατης προς την ιονισμένη αμμωνία (Fromm 1980, Moe 1992, Schwedler & Johnson 2000, Barker et al. 2002).

Παράμετροι, όπως η αλατότητα, η οποία καθορίζεται από τη συγκέντρωση των ιόντων, κυρίως του νατρίου και του χλωρίου, στο νερό και, συνεπώς, εκφράζει το

ποσοστό του χλωριούχου νατρίου σε αυτό (Schwedler & Johnson 2000), η αλκαλικότητα, η οποία εκφράζει τη συγκέντρωση διττανθρακικών, ανθρακικών, φωσφορικών και άλλων αλάτων, καθώς και η σκληρότητα, η οποία εκφράζει την περιεκτικότητα του νερού σε ασβέστιο, μαγνήσιο και άλλα δισθενή κατιόντα, πρέπει επίσης να ρυθμίζονται στις κατάλληλες περιοχές τιμών για κάθε είδος ιχθύων, προκειμένου να αποφεύγεται η πρόκληση στρες (Tucker 1993).

### **B.5. Μεταφορά**

Κατά τη μεταφορά, οι ιχθύες, όπως και τα υπόλοιπα παραγωγικά ζώα, υφίστανται στρες. Στην περίπτωση των ιχθύων, το στρες οφείλεται σε παράγοντες όπως η αλλαγή του περιβάλλοντος διαβίωσής τους κατά τη μεταφορά από δεξαμενές εκτροφής σε δεξαμενές μεταφοράς, οι μικροτραυματισμοί τους λόγω του μικρού διαθέσιμου χώρου στις δεξαμενές μεταφοράς και η κακή ποιότητα του νερού μεταφοράς λόγω ρύπανσής του με περιττώματα ή λόγω ατελούς αερισμού του (Bandeem & Leatherland 1997).

### **Γ. Μέτρα ελαχιστοποίησης του στρες**

Οι περισσότερες παρεμβάσεις, οι οποίες προκαλούν στρες στους ιχθύς των ιχθυοκαλλιεργειών, όπως η παροχή τροφής, ο διαχωρισμός κατά μεγέθη, η διαδικασία της αναισθητοποίησης, το ζύγισμα, ο καθαρισμός των χώρων εκτροφής, η μεταφορά ζωντανών ιχθύων κ.λπ., συνιστούν καθημερινές ενέργειες της διαδικασίας εκτροφής τους και συνεπώς είναι αδύνατον να αποφευχθούν. Αν και η πλήρης απουσία των δυσμενών επιδράσεων του στρες κατά τη μαζική εκτροφή των ιχθύων είναι πρακτικά αδύνατη, εντούτοις μπορούν εύκολα να εφαρμοστούν τα παρακάτω μέτρα, τα οποία συμβάλουν στην ελαχιστοποίησή του (Barton 1988, Colombo et al. 1990, Barton & Iwama 1991, Pickering 1993).

α) Τα ιχθύδια που χρησιμοποιούνται στις εκτροφές πρέπει να είναι απαλλαγμένα από ασθένειες και να βρίσκονται σε καλή κατάσταση.

β) Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ διαδοχικών επεμβάσεων που προκαλούν στρες πρέπει να επιτρέπει κάθε φορά την επαναφορά των ιχθύων στη φυσιολογική κατάστασή τους, ώστε να αποφεύγεται η τυχόν αθροιστική δράση των επιμέρους στρεσικών παραγόντων. Έτσι, πρέπει να επιδιώκεται η όσο το δυνατόν ταχύτερη αποπεράτωση των διάφορων χειρισμών και να αποφεύγεται η ταυτόχρονη επίδραση περισσότερων του ενός στρεσικών παραγόντων, όπως π.χ. η μεταφορά σε νέο χώρο εκτροφής, ο

οποίος, επιπλέον, εμφανίζει διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες από τον προηγούμενο.

γ) Ο χρόνος επαναφοράς των ιχθύων στη φυσιολογική κατάστασή τους πρέπει να είναι ανάλογος της σοβαρότητας και της διάρκειας της δράσης του στρεστικού παράγοντα.

δ) Οι περιβαλλοντικές παράμετροι που επιτείνουν το στρες, όπως η θερμοκρασία, πρέπει να ρυθμίζονται στη βέλτιστη για κάθε είδος ιχθύων περιοχή τιμών και να αποφεύγονται οι ακραίες τιμές. Υπενθυμίζεται ότι οι υψηλές θερμοκρασίες του νερού επιτείνουν τις δυσμενείς συνέπειες του στρες, κυρίως, εξαιτίας της πρόκλησης αυξημένης μεταβολικής δραστηριότητας και της μειωμένης συγκέντρωσης του οξυγόνου. Επίσης, πρέπει να αποφεύγεται η απότομη μεταβολή της θερμοκρασίας του νερού πάνω από 5-6 °C.

ε) Ενέργειες, οι οποίες προκαλούν στρες και δεν είναι τελείως απαραίτητες, πρέπει να αποφεύγονται σε ορισμένες φάσεις του κύκλου ζωής ορισμένων ιχθύων, οι οποίοι είναι κατά τις φάσεις αυτές ιδιαίτερα ευαίσθητοι στο στρες.

στ) Κατά τη μεταφορά των ιχθύων πρέπει να γίνεται βαθιά ηρέμησή τους και, επιπλέον, προσθήκη αλάτων στο νερό μεταφοράς, ώστε να αποφεύγεται η συχνά παρατηρούμενη απώλεια ιόντων νατρίου και χλωρίου.

ζ) Κατά τη διάρκεια της νύχτας πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στη μεταφορά των ιχθύων και στην τοποθέτησή τους σε κλωβούς ώστε να αποφεύγονται οι ακραίες θερμοκρασίες, η καταπληξία εξαιτίας του απότομου φωτισμού και η αυξημένη επιθετικότητα.

η) Πρέπει να καταγράφονται καθημερινά τόσο η κατάσταση της υγείας όσο και η φυσιολογική κατάσταση του ιχθυοπληθυσμού, έτσι ώστε, σε περίπτωση εμφάνισης θνησιμότητας εξαιτίας κάποιου στρεστικού παράγοντα, αυτός να είναι εύκολο να καθοριστεί.

#### **Δ. Τρόποι εκτίμησης του στρες**

Όπως προαναφέρθηκε, οι παράμετροι που επηρεάζονται κατά την εκδήλωση των προσαρμοστικών αντιδράσεων, μπορούν να χρησιμεύσουν ως δείκτες του στρες στους ιχθύς (Πίνακας 2).

Ένας από τους πιο διαδεδομένους τρόπους ποσοτικής εκτίμησης του στρες είναι η μέτρηση της αύξησης της συγκέντρωσης των **κορτικοστεροειδών** και, κυρίως, της κορτιζόλης στο πλάσμα των ιχθύων (Patiño et al. 1987), αφενός επειδή η αύξηση της



κορτιζόλης βρίσκεται σε άμεση σχέση με την οξύτητα των στρεσικών παραγόντων, αποτελώντας μια από τις πρωτεύουσες προσαρμοστικές αντιδράσεις του οργανισμού και έχοντας λειτουργική σημασία στις φυσιολογικές διαδικασίες που σχετίζονται με την υγεία των ιχθύων (Pickering & Pottinger 1989), και αφετέρου επειδή ο τρόπος μέτρησής της είναι σχετικά απλός.

Η κορτιζόλη εκκρίνεται κυρίως από τα στεροειδογόνα κύτταρα του ενδονεφρικού συστήματος των τελεόστων ιχθύων, τα οποία βρίσκονται στο πρόσθιο μέρος των νεφρών (Mommsen et al. 1999). Ωστόσο, στους ελασμοβράγχιους ιχθύς, δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί η έκκρισή της από το ίδιο σύστημα (Παπουτσόγλου 1998). Η έκκριση της κορτιζόλης στους τελεόστους ιχθύς, ενεργοποιείται από τη φλοιοεπινεφριδιοτρόπο ορμόνη (ACTH) (Mommsen et al. 1999), η οποία συντίθεται στα κύτταρα ε του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, και της οποίας η έκκριση ενεργοποιείται από τις κορτικοεκλυτίνες που συντίθενται στον υποθάλαμο. Η έκκριση της κορτιζόλης μπορεί, επίσης, να ενεργοποιηθεί, σε μικρότερο όμως βαθμό, από τη δι-ακετυλο-α-μελανοχρωστικοτρόπο ορμόνη, η οποία συντίθεται στα κύτταρα ε του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, και της οποίας η έκκριση ενεργοποιείται από τις μελανοεκλυτίνες που συντίθενται στον υποθάλαμο. Εξάλλου, η έκκριση κορτιζόλης μπορεί να ενεργοποιηθεί και από διάφορες άλλες ορμόνες, όπως η αυξητική ορμόνη, οι γοναδοτροπίνες, η θυροξίνη, η αγγειοπιεσίνη και οι κατεχολαμίνες, από το πεπτίδιο οπιο-μελανοκορτίνη, καθώς και από μηχανισμούς ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος των τελεόστων ιχθύων (Παπουτσόγλου 1998).

Το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την αύξηση και για την επαναφορά της συγκέντρωσης της κορτιζόλης σε φυσιολογικές τιμές, καθώς και το ποσοστό αύξησης της συγκέντρωσής της, μπορεί να εμφανίζουν μεγάλες αποκλίσεις, επειδή εξαρτώνται από την ένταση και τη διάρκεια δράσης του στρεσικού παράγοντα, το είδος του ιχθύος και τις ιδιαιτερότητες που παρατηρούνται μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους. Αυτό έχει ως συνέπεια η μέτρηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης να μην δίνει πάντα μια επακριβή εκτίμηση της έντασης του στρες (Παπουτσόγλου 1998).

Κατά το οξύ στρες, οπότε ο στρεσικός παράγων δρα για μικρό χρονικό διάστημα, όπως π.χ. κατά τους συνήθεις χειρισμούς ή κατά τον περιορισμό διάρκειας μίας ώρας, η συγκέντρωση της κορτιζόλης αυξάνεται ταχύτατα, συχνά μέσα σε 1 min και επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα μετά από 24-48 ώρες (Mommsen et al. 1999). Στο λαβράκι, αμέσως μετά την αύξηση της ιχθυοπυκνότητας για 5 min, η συγκέντρωση της

κορτιζόλης είχε τριπλασιαστεί (Marino et al. 2001), ενώ στην τσιπούρα, αμέσως μετά από χειρισμούς και αύξηση της ιχθυοπυκνότητας για μία ώρα, ήταν 200 φορές υψηλότερη από τη συγκέντρωση στους μάρτυρες, και παρέμενε περίπου 10 φορές υψηλότερη μετά από 168 ώρες (Rotllant et al. 2001).

Κατά το χρόνιο στρες, οπότε ο στρεστικός παράγων δρα για μεγάλο χρονικό διάστημα, όπως π.χ. κατά τον περιορισμό ή την αύξηση της ιχθυοπυκνότητας για αρκετές ημέρες, η συγκέντρωση της κορτιζόλης παραμένει αυξημένη για πολλές ημέρες ή και για εβδομάδες, γεγονός το οποίο μπορεί να έχει επιβλαβή αποτελέσματα για τον οργανισμό (Rotllant et al. 2001). Αν και κατά το χρόνιο στρες, ο οργανισμός προσπαθεί να μειώσει τη συγκέντρωση της κορτιζόλης σε φυσιολογικά επίπεδα (Pickering & Pottinger 1989, Ross & Ross 2008), αυτό δεν είναι ούτε πάντοτε ούτε απόλυτα επιτυχές και, ουσιαστικά, επιτυγχάνεται κυρίως με τη διακοπή της δράσης του στρεστικού παράγοντα (Παπουτσόγλου 1998, Ross & Ross 2008). Μετά από χρόνιο στρες, η κορτιζόλη επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα καθυστερημένα και, μάλιστα, 10 ημέρες μετά την παύση της δράσης του στρεστικού παράγοντα (Pickering et al. 1982).

Γενικά, η συγκέντρωση της κορτιζόλης σε ιχθύς που δεν έχουν υποστεί στρες είναι μικρότερη από 3-4  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (Wedemeyer et al. 1990), αν και, ιδανικά, θα έπρεπε να είναι μικρότερη από 0,5  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (Pickering & Pottinger 1989). Πολλοί παράγοντες, όπως η διατροφή, η θερμοκρασία, η εποχή του έτους ή η ώρα της ημέρας, μπορεί να επηρεάζουν τη φυσιολογική συγκέντρωση της κορτιζόλης στους ιχθύς (Barton & Iwama 1991).

Στο λαβράκι η φυσιολογική συγκέντρωση της κορτιζόλης κυμαίνεται από  $5,0 \pm 1,8$   $\mu\text{g}/\text{dl}$  (Roche et al. 1989) έως 20,0  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (Hanke et al. 1991), ενώ οι Planas et al. (1990) αναφέρουν τιμές της τάξης των 40-60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . Ωστόσο, κατά τη διάρκεια του έτους η συγκέντρωση της κορτιζόλης παρουσιάζει διακυμάνσεις, οι οποίες εξαρτώνται από παράγοντες τόσο περιβαλλοντικούς, όπως η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία, όσο και βιολογικούς, όπως η μετανάστευση και η αναπαραγωγή (Planas et al. 1990). Έτσι, κατά τους μήνες με τις χαμηλότερες θερμοκρασίες (Ιανουάριο έως Μάιο) κυμαίνεται από 10 έως 25  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , ενώ τους μήνες με τις υψηλότερες θερμοκρασίες (Ιούλιο έως Οκτώβριο) από 40 έως 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (Planas et al. 1990). Ακόμη, παρουσιάζει διακυμάνσεις και κατά τη διάρκεια της ημέρας και εξαρτάται από τη χρονική διάρκεια της ημέρας και της νύχτας και από την ώρα χορήγησης της τροφής (Planas et al. 1990), ενώ ποικίλλει και από άτομο σε άτομο (Marino et al. 2001).

Η συγκέντρωση της κορτιζόλης σε ιχθύς που έχουν υποστεί στρες είναι συνήθως 4-20 µg/dl (Pickering & Pottinger 1989). Ωστόσο, ακόμη υψηλότερες τιμές έχουν καταγραφεί σε ορισμένα είδη ιχθύων (Davis & Parker 1986) ή σε ιχθύς που έχουν υποστεί την επίδραση πολλαπλών στρεστικών παραγόντων (Barton et al. 1986, Maule et al. 1988).

Με βάση το γεγονός ότι το στρες προκαλεί μη φυσιολογική αύξηση της συγκέντρωσης των κορτικοστεροειδών στο πλάσμα, μπορεί να υποθέσει κανείς ότι η καταγραφή φυσιολογικών συγκεντρώσεών τους υποδηλώνει απουσία στρες. Όμως, η υπόθεση αυτή δεν ισχύει πάντα, καθώς στρεστικές καταστάσεις, όπως η έκθεση σε τοξικές ουσίες ή οι αιμοπαρασιτώσεις, δεν συνδυάζονται πάντα με αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης (Barton & Iwama 1991). Ωστόσο, αυτό δεν είναι το ίδιο με το φαινόμενο που παρατηρείται όταν ήπια ηρεμιστικές δόσεις αναισθητικών αυξάνουν τη συγκέντρωση της κορτιζόλης τόσο όσο και το οξύ στρες (Strange & Schreck 1978), ενώ, αντίθετα, υψηλότερες δόσεις, οι οποίες προκαλούν ταχεία ακινητοποίηση των ιχθύων, δεν την αυξάνουν (Strange & Schreck 1978). Στην περίπτωση αυτή, οι τιμές της κορτιζόλης είναι οι αναμενόμενες, καθώς οι χαμηλές δόσεις δεν επιτρέπουν τη μείωση του στρες, οπότε η κορτιζόλη αυξάνεται, ενώ οι υψηλές δόσεις αποτρέπουν την εκδήλωσή του, οπότε η κορτιζόλη παραμένει χαμηλή.

Άλλος τρόπος ποσοτικής εκτίμησης του στρες είναι η μέτρηση της αύξησης της συγκέντρωσης των **κατεχολαμινών** και κυρίως της αδρεναλίνης στο πλάσμα των ιχθύων (Mazeaud et al. 1977). Όμως, η έκκριση των κατεχολαμινών στο πλάσμα είναι πολύ γρηγορότερη από ό,τι των κορτικοστεροειδών και, επομένως, η μέτρησή τους είναι περισσότερο προβληματική (Nilsson 1984). Για το λόγο αυτό διάφορες άλλες ορμόνες, όπως η ACTH (Sumpter & Donaldson 1986), η ενδορφίνη (Sumpter et al. 1985), η θυροξίνη (Brown et al. 1978), η γοναδοτροπίνη (Leatherland et al. 1982) και η προλακτίνη (Spieler & Meier 1976), έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί ως δείκτες εκτίμησης του στρες των ιχθύων.

Εκτός από τη μέτρηση της αύξησης των διάφορων ορμονών, η οποία αποτελεί πρωτεύουσα προσαρμοστική αντίδραση των ιχθύων στην αντιμετώπιση στρεστικών παραγόντων, το στρες μπορεί να εκτιμηθεί και με χρήση των δευτερευουσών προσαρμοστικών αντιδράσεων, οι οποίες διακρίνονται σε μεταβολικές, αιματολογικές και ηλεκτρολυτικές (Πίνακας 2). Αυτές θεωρούνται αποτέλεσμα της δράσης των πρωτευουσών αντιδράσεων και ιδιαίτερα εκείνων που συνδέονται με τη δράση των

κατεχολαμινών και των κορτικοστεροειδών (Mazeaud et al. 1977). Τριτεύουσες αντιδράσεις έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως δείκτες εκτίμησης του στρες, αλλά η δυνατότητα εκτίμησής του με βάση αυτές είναι συγκριτικά πολύ περιορισμένη (Beitinger & McCauley 1990, Wedemeyer et al. 1990).

Η μέτρηση της αύξησης της συγκέντρωσης της **γλυκόζης**, η οποία συνιστά δευτερεύουσα προσαρμοστική αντίδραση του οργανισμού στο στρες (Πίνακας 2) είναι ένας άλλος διαδεδομένος τρόπος ποσοτικής εκτίμησής του (Barton & Iwama 1991). Ωστόσο, οι μεταβολές της συγκέντρωσης της γλυκόζης κατά το στρες είναι γενικά πιο ήπιες από τις μεταβολές της συγκέντρωσης της κορτιζόλης (Marino et al. 2001).

Στους τελεόστεους ιχθύς η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης κατά το στρες είναι αποτέλεσμα της αύξησης της κορτιζόλης, η οποία, συμβάλλοντας στην αντιμετώπιση των αυξημένων ενεργειακών αναγκών που εμφανίζονται κατά το στρες, προκαλεί υπεργλυκαιμία, καθώς προάγει τη γλυκονογένεση και τη μετατροπή του γλυκογόνου του ήπατος σε γλυκόζη, ενώ παράλληλα, μειώνει τη χρησιμοποίηση της γλυκόζης (Barton & Iwama 1991, Παπουτσόγλου 1998, Roncarati et al. 2006). Ωστόσο, η οφειλόμενη στην κορτιζόλη αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης παρατηρείται κατά το στρες μεσαίας διάρκειας (Vijayan et al. 1997), ενώ κατά το οξύ στρες οφείλεται στις κατεχολαμίνες (Andersen et al. 1991).

Το χρονικό διάστημα που απαιτείται αφενός για την αύξηση και αφετέρου για την επαναφορά της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε φυσιολογικά επίπεδα, καθώς και το ποσοστό αύξησής της εξαρτώνται από τη θρεπτική κατάσταση του ιχθύος και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως π.χ. η θερμοκρασία (Pickering et al. 1982, Wells & Pankhurst 1999). Στην ιριδίζουσα πέστροφα, λόγω χειρισμών και συνωστισμού, προκλήθηκε άμεση αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης, η οποία ήταν ευθέως ανάλογη της διάρκειάς τους (Wells & Pankhurst 1999). Στο λαβράκι η συγκέντρωση της γλυκόζης σχεδόν διπλασιάστηκε αμέσως μετά από αύξηση της ιχθυοπυκνότητας για 5 min (Marino et al. 2001), ενώ το ίδιο παρατηρήθηκε και στην τσιπούρα αμέσως μετά από χειρισμούς και αύξηση της ιχθυοπυκνότητας για μία ώρα, η δε συγκέντρωση της γλυκόζης επέστρεψε στα κανονικά επίπεδα μέσα σε 24 ώρες (Rotllant et al. 2001). Εξάλλου, στο λαβράκι η συγκέντρωση της γλυκόζης αυξήθηκε σημαντικά λόγω υψηλής ιχθυοπυκνότητας ( $40 \text{ kg/m}^3$ ) διάρκειας 18 μηνών, φτάνοντας τα  $133 \text{ mg/dl}$ , ενώ, όταν η ιχθυοπυκνότητα ήταν  $20 \text{ kg/m}^3$ , η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν 69

mg/dl χωρίς, ωστόσο να παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά από τους μάρτυρες, στους οποίους ήταν 60 mg/dl (Roncarati et al. 2006).

Το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την επαναφορά της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε φυσιολογικά επίπεδα εξαρτάται επίσης από τη διάρκεια δράσης και τη σοβαρότητα του στρεσικού παράγοντα. Έτσι, στην άγρια πέστροφα (*Salmo trutta*), κατά το χρόνιο στρες λόγω συνωστισμού, αυτό το χρονικό διάστημα μπορεί να είναι 16 ημέρες, ενώ σε στρες μικρής διάρκειας είναι περίπου 24 ώρες (Pickering et al. 1982).

Στο λαβράκι η φυσιολογική συγκέντρωση της γλυκόζης κυμαίνεται από 60,1±23 mg/dl (Roncarati et al. 2006) έως 172 mg/dl (Pavlidis et al. 1997). Αυτές οι μεγάλες αποκλίσεις εξηγούνται από το γεγονός ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Έτσι, στο λαβράκι παρουσιάζει ρυθμικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της ημέρας, φθάνοντας στα υψηλότερα επίπεδα στις 6 μ.μ. και στα χαμηλότερα στις 2 π.μ. (Pavlidis et al. 1997) ή στο τέλος της νύχτας (Carrillo et al. 1982), ενώ υπάρχουν αντικρουόμενα ευρήματα όσον αφορά το αν επηρεάζονται (Perez et al. 1988) ή όχι (Cerdá -Reverter et al. 1998) από την ώρα πρόσληψης της τροφής.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των **πρωτεϊνών του πλάσματος** των ιχθύων συνιστά επίσης τρόπο εκτίμησης του στρες, αφού η τιμή τους συνήθως αυξάνεται κατά τη διάρκειά του, αποτελώντας μια από τις δευτερεύουσες προσαρμοστικές αντιδράσεις (Πίνακας 2) σε αυτό (Wells et al. 1986, Wells & Pankhurst 1999). Ωστόσο, ενίοτε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών παραμένει αμετάβλητη (Angelidis et al. 1987, Marino et al. 2001, Rotllant et al. 2001). Γενικά, οι μεταβολές της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, ιδίως κατά το οξύ στρες, είναι πιο ήπιες από αυτές της κορτιζόλης και της γλυκόζης και, συνεπώς, η μέτρηση της συγκέντρωσής τους θα πρέπει να θεωρηθεί περισσότερο ως ένα επικουρικό βοήθημα για την εκτίμηση του στρες (Wells & Pankhurst 1999).

Η αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών κατά το στρες φαίνεται να συνδέεται με την απώλεια νερού μέσω των βραγχίων, η οποία προκύπτει υπό την επίδραση της αδρεναλίνης (Marino et al. 2001), και συνήθως εκδηλώνεται μέσα σε 10 έως 30 min από την επίδραση του στρεσικού παράγοντα (Wood et al. 1983, Wells et al. 1986, Wells & Pankhurst 1999). Ωστόσο, η αύξηση αυτή είναι ιδιαίτερα έντονη κυρίως όταν το στρες οφείλεται σε στέρηση τροφής ή όταν συνοδεύεται από σοβαρή ιστική βλάβη (Wood et al. 1983, Wells et al. 1986, Wells & Pankhurst 1999).

Στο λαβράκι η φυσιολογική συγκέντρωση των πρωτεϊνών του πλάσματος κυμαίνεται από 3,2±0,4 g/dl (Roncarati et al. 2006) και 3,6±0,2 g/dl (Hadj Kacem et al.

1986) έως  $4,7 \pm 0,3$  g/dl (Hadj Kacem et al. 1988). Γενικά, η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο λαβράκι δεν φαίνεται να παρουσιάζει ρυθμικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της ημέρας (Pavlidis et al. 1997) ή να επηρεάζεται ουσιαστικά από άλλους παράγοντες εκτός από το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη λήψη της τροφής, το οποίο, μάλιστα, επηρεάζει τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών πιο πολύ από ό,τι το στρες λόγω αύξησης της ιχθυοπυκνότητας για 5 min (Marino et al. 2001).

Πάντως, εκτός από αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών λόγω στρες, έχει παρατηρηθεί και μείωση. Έτσι, στο λαβράκι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών μειώθηκε σημαντικά όταν υποβλήθηκε σε στρες λόγω υψηλής ιχθυοπυκνότητας ( $40 \text{ kg/m}^3$ ) διάρκειας 18 μηνών, πέφτοντας στην τιμή 2,5 g/dl, ενώ όταν η ιχθυοπυκνότητα ήταν  $20 \text{ kg/m}^3$ , η συγκέντρωση των πρωτεϊνών ήταν 3,1 g/dl και δεν διέφερε από τους μάρτυρες στους οποίους ήταν 3,4 g/dl (Roncarati et al. 2006). Η μείωση αυτή φαίνεται να προκλήθηκε από την αύξηση του καταβολισμού των πρωτεϊνών λόγω του χρόνιου στρες (Roncarati et al. 2006).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, εκτός από τους στρεσικούς παράγοντες, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες οι οποίοι δεν προκαλούν στρες αλλά μπορεί να αλλοιώσουν τα αποτελέσματα όλων των παραπάνω μετρήσεων και να οδηγήσουν σε λανθασμένες εκτιμήσεις (Barton 1988). Σε αυτούς υπάγονται η θερμοκρασία εγκλιματισμού (Strange et al. 1977), η ποιότητα του νερού (Barton et al. 1985), η ηλικία, ο γονότυπος, η φυσιολογική κατάσταση, η ιεραρχία, τα ατομικά χαρακτηριστικά, διαφορές μεταξύ των ειδών των ιχθύων κ.ά., οι οποίοι μπορεί να επηρεάσουν την ανταπόκριση στους στρεσικούς παράγοντες (Wendelaar Bonga 1997). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι οι πρωτεΐνες και οι δευτερεύουσες αντιδράσεις δεν εκδηλώνονται απαραίτητα ταυτόχρονα (Wendelaar Bonga 1997). Βρέθηκε ότι οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης και του γαλακτικού οξέως στο πλάσμα άγριας πέστροφας που είχε υποβληθεί σε χειρισμούς για 2 min μειώθηκαν στα φυσιολογικά επίπεδα μέσα σε 4 ώρες, ενώ η γλυκόζη του πλάσματος έφθασε τη μέγιστη τιμή σε 4 ώρες και η μέγιστη καταστολή των λευκοκυττάρων συνέβη σε 30 ώρες χωρίς επαναφορά μέχρι την 72<sup>η</sup> ώρα (Pickering et al. 1982). Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν την αναγκαιότητα εκτίμησης του στρες στους ιχθύς με τη βοήθεια περισσότερων του ενός δεικτών (Barton & Iwama 1991).

## **E. Στρες και ηλεκτρολυτική ισορροπία**

Το αναπνευστικό σύστημα των οστεϊχθύων αποτελείται από τα βράγχια. Τόσο η ανταλλαγή των αερίων, όσο και η ηλεκτρολυτική ισορροπία, η οξεοβασική ισορροπία και ο μεταβολισμός του αζώτου φαίνεται να συνδέονται στενά μεταξύ τους, διαμέσου διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στα βράγχια (Evans 1987, McDonald et al. 1991, McCormick 1995, Flik et al. 1996).

Μια εκτενής ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας σχετικά με τη δομή των βραγχίων στα διάφορα είδη ιχθύων έχει δημοσιευτεί από τον Laurent (1994). Τα βράγχια είναι οργανωμένα σε πέντε ζεύγη βραγχιακών τόξων. Τα βραγχιακά τόξα είναι τοποθετημένα μέσα στις βραγχιακές κοιλότητες, οι οποίες σκεπάζονται από τα βραγχιακά επικαλύμματα. Τα τέσσερα πρώτα βραγχιακά τόξα φέρουν στην εξωτερική επιφάνειά τους, η οποία είναι σε επαφή με το βραγχιακό επικάλυμμα, τα πρωτογενή βραγχιακά νημάτια ή ελάσματα, ενώ το τελευταίο φέρει τα φαρυγγικά οστά. Κάθε βραγχιακό νημάτιο ή έλασμα, φέρει σε κάθε πλευρά του τα πλούσια σε αιμοφόρα αγγεία δευτερογενή νημάτια. Σε κάθε δευτερογενές νημάτιο καταλήγουν τριχοειδή αγγεία, τα οποία προέρχονται από την προσαγωγό αρτηρία του βραγχιακού τόξου. Σε αυτά, εκτός από την οξυγόνωση του αίματος από το περιβάλλον, πραγματοποιείται και η ανταλλαγή των προϊόντων του μεταβολισμού μεταξύ του φλεβικού αίματος και του νερού. Στους ιχθύς του γλυκού νερού γίνεται ανταλλαγή ιόντων νατρίου του νερού με ιόντα  $\text{NH}_4$  του αίματος προερχόμενα από την πέψη της γλουταμίνης. Ακόμη, γίνεται ανταλλαγή ιόντων χλωρίου του νερού με διττανθρακικά ιόντα του αίματος. Επίσης, απομακρύνονται ουσίες βλαβερές για τον οργανισμό, όπως η αμμωνία (μέχρι 90%) και η ουρία (μέχρι 70%). Έπειτα από τη διαδικασία αυτή, το αίμα, οξυγονωμένο πλέον, ρέει προς την απαγωγό αρτηρία. Η κατεύθυνση του νερού πάνω στα δευτερογενή ελάσματα είναι αντίθετη από την κατεύθυνση του αίματος των τριχοειδών αγγείων, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα κατακράτησης του 80% και πλέον του διαλυμένου οξυγόνου από το αναπνευστικό επιθήλιο (Φώτης 1999).

Η ροή του αίματος στα βράγχια ρυθμίζεται από ποικίλους παράγοντες, μεταξύ των οποίων τον κύριο ρόλο έχουν οι κατεχολαμίνες (Randall & Perry 1992). Η αδρεναλίνη αυξάνει τη διαβροχή των δευτερογενών νηματίων διαστέλλοντας την προσαγωγό αρτηρία και συστέλλοντας τις αρτηριοφλεβικές αναστομώσεις. Αν και η πρόσληψη του οξυγόνου από τα βράγχια μπορεί να ενεργοποιηθεί από την υψηλή συγκέντρωση

κατεχολαμινών, η δομή τους μπορεί να επηρεαστεί από τους στρεσικούς παράγοντες με αρνητικές επιδράσεις σε όλες τις λειτουργίες των βραγχίων (Wendelaar Bonga 1997).

Η διαταραχή της ηλεκτρολυτικής ισορροπίας αποτελεί μια από τις πλέον χαρακτηριστικές επιπτώσεις του στρες στους ιχθύς. Η ένταση και το είδος των μεταβολών ποικίλει ανάλογα με το είδος του ιχθύος και του στρεσικού παράγοντα (Ross & Ross 2008). Η διαταραχή της ηλεκτρολυτικής ισορροπίας οφείλεται κυρίως στην πολύ στενή αλληλεξάρτηση μεταξύ των εντός των βραγχίων υγρών και του νερού του περιβάλλοντος. Η περιεκτικότητα του αίματος των ιχθύων σε αλάτι είναι μόλις το  $\frac{1}{3}$  της αντίστοιχης του θαλασσινού νερού και, χονδρικά, 100 φορές μεγαλύτερη από αυτή του γλυκού νερού. Αυτές οι μεγάλες διαφορές συγκεντρώσεων κατά μήκος του βραγχιακού επιθηλίου, το οποίο σχηματίζει ένα εκτεταμένο αλλά λεπτό φράγμα μεταξύ του αίματος και του νερού, διευκολύνουν την παθητική διάχυση ιόντων και νερού. Για την εξασφάλιση της ηλεκτρολυτικής ισορροπίας είναι αναγκαία η διατήρηση αφενός της διαπερατότητας των μεμβρανών σε νερό και ιόντα και αφετέρου των κατάλληλων διεπιθηλιακών ηλεκτρικών δυναμικών, καθώς και η παρουσία αποτελεσματικών επανορθωτικών μηχανισμών μεταφοράς ιόντων (Wendelaar Bonga 1997). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, στους ιχθύς του θαλασσινού νερού, η απώλεια νερού και η πρόσληψη ιόντων από το δέρμα και ιδιαίτερα από το βραγχιακό επιθήλιο αντισταθμίζονται από την πρόσληψη θαλασσινού νερού διαμέσου του εντέρου, την απέκκριση μεγάλων ποσοτήτων ιόντων χλωρίου και νατρίου και τη νεφρική και εντερική απέκκριση των δυσθετών ιόντων. Αντίστροφα, στους ιχθύς του γλυκού νερού, η πρόσληψη νερού και οι απώλειες ιόντων χλωρίου, νατρίου και ασβεστίου διά της διάχυσης εξισορροπούνται από την απέκκριση μεγάλου όγκου αραιών ούρων και την ενεργό πρόσληψη των χαμένων ιόντων διαμέσου των βραγχίων (Wendelaar Bonga 1997). Ωστόσο, κατά το στρες, η παραπάνω ισορροπία διαταράσσεται, καθώς η απώλεια νερού και η πρόσληψη ιόντων στους ιχθύς του θαλασσινού νερού και η πρόσληψη νερού και οι απώλειες ιόντων στους ιχθύς του γλυκού νερού αυξάνονται, χωρίς όμως να είναι αποτελεσματικοί οι αντισταθμιστικοί μηχανισμοί (Wendelaar Bonga 1997). Άρα το στρες φαίνεται να προκαλεί απώλεια ιόντων στους ιχθύς του γλυκού νερού και το αντίθετο στους ιχθύς του θαλασσινού νερού. Αυξήσεις των ιόντων νατρίου, χλωρίου, ασβεστίου και καλίου εξαιτίας διάφορων στρεσικών παραγόντων έχουν διαπιστωθεί στο λαβράκι (Hadj Kacem et al. 1986, Marino et al. 2001) και σε άλλους ιχθύς του θαλασσινού νερού (Wells et al. 1986, Waring et al. 1996).



## **ΣΤ. Στρες, μεταβολισμός και ανάπτυξη ιχθύων**

Όπως προαναφέρθηκε, ο οργανισμός έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται απέναντι στους στρεσικούς παράγοντες, τροποποιώντας τη φυσιολογία και τη συμπεριφορά του, με σκοπό να αντεπεξέλθει στη δράση τους και να διατηρήσει την ομοιοστασία του (Sutanto & de Kloet 1994, Tsigos & Chrousos 1994). Η επαναφορά της ομοιοστασίας απαιτεί εντατικοποίηση κάποιων λειτουργιών, η οποία απαιτεί ενέργεια που εξασφαλίζεται με κατανάλωση μέρους της ενέργειας που προοριζόταν για λειτουργίες όπως η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή, με αποτέλεσμα τη μείωση των αποδόσεων των ιχθύων ιδίως μετά από χρόνιο ή οξύ στρες (Wendelaar Bonga 1997). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μειωμένης ανάπτυξης, με συνέπεια ορισμένοι δείκτες ανάπτυξης, όπως η όρεξη, η κατανάλωση τροφής, η λειτουργικότητα του πεπτικού σωλήνα, ο μεταβολικός ρυθμός και οι ορμονικοί μηχανισμοί ανάπτυξης, να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στους ιχθύς ως αξιόπιστοι δείκτες του στρες.

### **ΣΤ.1. Επίδραση του στρες στην όρεξη και στην κατανάλωση τροφής**

Η εξαιτίας του στρες μειωμένη πρόσληψη τροφής (Pickering et al. 1982) και η μη αποτελεσματική χρησιμοποίησή της ίσως να είναι οι κύριες αιτίες μειωμένης ανάπτυξης (Pickering & Stewart 1984). Στις ιχθυοκαλλιέργειες, η ιχθυοπυκνότητα αποτελεί τον κύριο παράγοντα που επηρεάζει την πρόσληψη της τροφής με συγκεκριμένο για κάθε είδος τρόπο. Έτσι, το στρες λόγω μεγάλης ιχθυοπυκνότητας συνοδεύτηκε από μείωση της κατανάλωσης τροφής και του ρυθμού ανάπτυξης σε είδη όπως η ιριδίζουσα πέστροφα, αλλά από αύξησή τους στο σαλβελίνο τον άλπειο (*Salvelinus alpinus*) (Alanära & Brännäs 1996).

### **ΣΤ.2. Επίδραση του στρες στη λειτουργικότητα του πεπτικού σωλήνα**

Το στρες είναι δυνατόν να προκαλέσει σημαντικές μεταβολές στη λειτουργία του πεπτικού σωλήνα, πιθανώς με ιδιαίτερα δυσμενείς επιπτώσεις στην ανάπτυξη, όπως παρατηρήθηκε σε χέλια (*Anguilla anguilla*), τα οποία, αφού υπέστησαν στρες, παρουσίασαν ατροφία του στομάχου (Peters 1982).

### **ΣΤ.3. Επίδραση του στρες στο μεταβολικό ρυθμό**

Αν και τόσο το οξύ όσο και το χρόνιο στρες μπορεί να αυξήσουν το μεταβολικό ρυθμό των ιχθύων, η άμεση μέτρηση του μεταβολικού ρυθμού σε κατάσταση στρες έχει απασχολήσει λίγους σχετικά ερευνητές. Έτσι, η μελέτη του μεταβολικού ρυθμού των ιχθύων κατά την έκθεσή τους σε στρεσικούς παράγοντες βασίζεται ουσιαστικά στη διαπίστωση ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα, η οποία είναι ευθέως ανάλογη του μεταβολικού ρυθμού, αυξάνεται σε περιπτώσεις στρες. Με βάση τις μετρήσεις της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα, ορισμένοι ερευνητές ανέφεραν ότι σύντομοι χειρισμοί σε ιριδίζουσα πέστροφα προκαλούν αύξηση του κανονικού μεταβολισμού κατά 25% (Barton 1988), ενώ άλλοι διαπίστωσαν ότι αυξήσεις του μεταβολικού ρυθμού κατά 10 και 20% προκαλούν μείωση του ρυθμού ανάπτυξης της περκοπέστροφας (*Micropterus salmoides*) κατά 22 και 42%, αντίστοιχα (Rice 1990).

Εκτός από τη μέτρηση της γλυκόζης στο πλάσμα, η μελέτη του μεταβολικού ρυθμού των ιχθύων μπορεί να διενεργηθεί με τη μέτρηση του αναπνευστικού ρυθμού και την κατανάλωση οξυγόνου (Barton & Iwama 1991). Ο αναπνευστικός ρυθμός ιχθυδίων ιριδίζουσας πέστροφας σχεδόν διπλασιαζόταν μία ώρα μετά την εφαρμογή δίλεπτων χειρισμών, ενώ η αύξηση του αναπνευστικού ρυθμού κατά 20% σε σολομό του είδους *Oncorhynchus kisutch* συνδυάστηκε με μείωση του ρυθμού ανάπτυξης κατά 8-16% (Wendelaar Bonga 1997).

Η μεταβολή του μεταβολικού ρυθμού των ιχθύων από τους ίδιους στρεσικούς παράγοντες δεν είναι σταθερή, καθώς ορισμένα είδη ιχθύων αντιδρούν στο στρες, π.χ. λόγω υποξίας, στέρησης τροφής ή άλλων παραγόντων, μειώνοντας τη μεταβολική δραστηριότητά τους αρκετά κάτω του φυσιολογικού, μία προσαρμοστική αντίδραση η οποία ονομάζεται μεταβολική καταστολή (van Ginneken & van den Thillart 2009). Η μεταβολική καταστολή αποτρέπει την σπατάλη ενέργειας, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες επιβίωσης. Ο βαθμός της μεταβολικής καταστολής εξαρτάται από το είδος και την ένταση του στρεσικού παράγοντα αλλά και από το είδος των ιχθύων και κυμαίνεται από 0 έως 80 % (van Ginneken & van den Thillart 2009).

### **ΣΤ.4. Επίδραση του στρες στους ορμονικούς μηχανισμούς ανάπτυξης**

Η ανάπτυξη των ζωικών οργανισμών βρίσκεται γενικά κάτω από πολλαπλό ορμονικό έλεγχο, με την αυξητική ορμόνη να παίζει πρωτεύοντα ρόλο και άλλες ορμόνες, όπως η ινσουλίνη, οι ορμόνες του θυρεοειδούς αδένα και οι στεροειδείς

ορμόνες των γονάδων, ιδιαίτερα κατά την αρχική φάση της σεξουαλικής ωρίμανσης, να βελτιώνουν την ανάπτυξη. Αρνητικό ρόλο στην ανάπτυξη παίζουν άλλες ορμόνες, όπως οι κατεχολαμίνες και η κορτιζόλη (Pickering 1990).

Η φυσιολογική δράση της αυξητικής ορμόνης στους ιχθύς έχει μελετηθεί ευρύτατα. Ωστόσο, η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσής της στο πλάσμα και του ρυθμού ανάπτυξης παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστη, επειδή αν και η χορήγηση της αυξητικής ορμόνης ευνοεί γενικά την ανάπτυξη, αρκετοί ερευνητές διαπίστωσαν μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της αυξητικής ορμόνης και του ρυθμού ανάπτυξης στην ιριδίζουσα πέστροφα κατά τη διάρκεια νηστείας (Rand-Weaver et al. 1994). Αντίθετα, βρέθηκε ισχυρά θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της αυξητικής ορμόνης στο πλάσμα του σολομού του Ατλαντικού και της ανάπτυξής του (Björnsson et al. 1995). Εξαιτίας ίσως αυτής της αντίφασης, όλες σχεδόν οι αναφορές της διεθνούς βιβλιογραφίας σχετικά με τις συγκεντρώσεις της αυξητικής ορμόνης στο πλάσμα ιχθύων που έχουν υποστεί στρες είναι δύσκολο να ερμηνευτούν. Έτσι έχει αναφερθεί ότι η συγκέντρωση της αυξητικής ορμόνης στο πλάσμα αυξάνεται μετά από στρες λόγω εμβολιασμού σε χρυσόψαρο (Cook & Peter 1984) αλλά παραμένει αμετάβλητη σε σολομό είδους *Oncorhynchus keta* μετά από στρες λόγω χειρισμών (Wagner & McKeown 1986). Αντίθετα, σε ιριδίζουσα πέστροφα παρατηρήθηκε ελάττωση της συγκέντρωσης της αυξητικής ορμόνης στο πλάσμα μετά από χειρισμούς και περιορισμό, αν και οι συγκεντρώσεις της ACTH και της κορτιζόλης στο πλάσμα ήταν υψηλές (Pickering et al. 1991). Ωστόσο, όταν οι ίδιοι ιχθύες βρέθηκαν για μικρό χρονικό διάστημα σε νερό με περιορισμένη περιεκτικότητα σε οξυγόνο, παρατηρήθηκε πάλι αύξηση των συγκεντρώσεων της ACTH και της κορτιζόλης στο πλάσμα, η οποία όμως αυτή τη φορά συνοδεύτηκε και από αύξηση της αυξητικής ορμόνης (Pickering et al. 1991).

Μελέτες των επιπτώσεων του στρες στην ανάπτυξη έδειξαν ότι, όταν ιριδίζουσες πέστροφες υποβλήθηκαν σε οξύ στρες, η συγκέντρωση της αυξητικής ορμόνης στο πλάσμα τους μειώθηκε, ενώ, όταν υποβλήθηκαν σε χρόνιο στρες, ο ρυθμός ανάπτυξης μειώθηκε αλλά η συγκέντρωση της αυξητικής ορμόνης αυξήθηκε και η αύξηση αυτή συνοδεύτηκε από αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης (Pickering 1990, Pickering et al. 1991). Αυτή η αύξηση της συγκέντρωσης της αυξητικής ορμόνης στο πλάσμα και η αντίστροφη σχέση μεταξύ του ρυθμού ανάπτυξης και της συγκέντρωσης της αυξητικής ορμόνης και της κορτιζόλης στους ιχθύς που υποβλήθηκαν σε χρόνιο στρες

υποδηλώνει ότι η πιθανή μείωση της ανάπτυξης λόγω στρες μπορεί να σχετίζεται με τη δράση και άλλων αυξητικών παραγόντων εκτός από την αυξητική ορμόνη (Wendelaar Bonga 1997).

Έχει υποστηριχθεί ότι οι κατεχολαμίνες και η κορτιζόλη παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των ιχθύων διαμέσου διάφορων μηχανισμών, όπως η αύξηση της κατανάλωσης ενέργειας, η επιτάχυνση της γλυκονεογένεσης και της λιπόλυσης και, πιθανώς, η μεταβολή της δράσης διάφορων ορμονών που ευνοούν την ανάπτυξη και κυρίως της αυξητικής ορμόνης, αν και ο ενδεχόμενος ρόλος του τελευταίου μηχανισμού είναι υπό συζήτηση (Wendelaar Bonga 1997). Οι Nishioka et al. (1985) βρήκαν ότι η κορτιζόλη αυξάνει *in vitro* την έκκριση της αυξητικής ορμόνης από την υπόφυση της τιλάπιας (*Oreochromis mossambicus*), ενώ άλλοι ερευνητές ανέφεραν ότι η έκκριση της αυξητικής ορμόνης παύει αμέσως μετά την έκθεση των ίδιων ιχθύων σε όξινο νερό, το οποίο αυξάνει απότομα τη συγκέντρωση της κορτιζόλης (Wendelaar Bonga 1997). Ωστόσο, η μειωμένη ανάπτυξη μπορεί να οφείλεται και στην απευθείας επίδραση των κατεχολαμινών και της κορτιζόλης (Pickering 1990, Ross & Ross 2008), οι οποίες εκλύονται κατά το στρες. Πέστροφες, οι οποίες επιλέχθηκαν με βάση την έντονη ανταπόκρισή τους στο στρες με έκλυση μεγάλων ποσοτήτων κορτιζόλης, είχαν πιο αργή ανάπτυξη από άλλες με λιγότερο έντονη ανταπόκριση (Øverli et al. 2006). Επίσης, η μακροχρόνια διατροφή γατόψαρων (Davis et al. 1985) και ιριδίζουσας πέστροφας (Barton et al. 1987) με ιχθυοτροφή εμπλουτισμένη με κορτιζόλη, σε βαθμό τέτοιο ώστε η συγκέντρωσή της να είναι ανάλογη εκείνης που συνήθως παρατηρείται λόγω στρες, προκάλεσε σημαντική μείωση του σωματικού βάρους τους.

## **Z. Στρες και ανοσοποιητικό σύστημα ιχθύων**

Το ενδιαφέρον για τη μελέτη της επίδρασης του στρες στο ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων προέκυψε από την ανάγκη εξασφάλισης της καλής υγείας και της παραγωγικότητάς τους προκειμένου να υποστηριχθεί η ραγδαία ανάπτυξη των ιχθυοκαλλιεργειών. Το ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων και ειδικότερα των τελεόστεων, στους οποίους περιλαμβάνεται το λαβράκι, δεν παρουσιάζει μεγάλες διαφορές από αυτό των θηλαστικών και εξασφαλίζει, μέσω ενός συνόλου μηχανισμών, την έμφυτη και την επίκτητη ανοσία (Ellis 1999).

### **Z.1. Έμφυτη χυμική και κυτταρική ανοσία**

Η έμφυτη ή φυσική ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού και ενεργοποιεί την παραγωγή ανοσολογικών παραγόντων εναντίον διάφορων μικροοργανισμών με στόχο την εξάλειψή τους. Εάν αυτή η πρώτη γραμμή άμυνας ξεπεραστεί, δρα η επίκτητη ή προσαρμοστική ανοσία, η οποία απαιτεί την ειδική αναγνώριση των αντιγόνων των μικροοργανισμών προκειμένου να γίνει αποτελεσματική. Οι επίκτητες ανοσοαποκρίσεις κατευθύνονται κατά μικροοργανισμών και μη μικροβιακών αντιγόνων. Η εμπλοκή των μηχανισμών της έμφυτης ανοσίας στις ανοσολογικές αποκρίσεις των ιχθύων στις μολυσματικές ασθένειες θεωρείται δεδομένη. Στους μηχανισμούς αυτούς συμμετέχουν διάφοροι χυμικής φύσης παράγοντες, όπως η τρανσφερίνη, οι αντιπροτεάσες, οι λεκτίνες, οι λυσίνες και οι ιστόνες (Dalmo et al. 1997, Robertsen 1999, Abbas & Lichtman 2004).

Εκτός από τους παράγοντες χυμικής φύσης, στην έμφυτη ανοσία φαίνεται να εμπλέκονται διάφορα κύτταρα, όπως τα φαγοκύτταρα (μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα), τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού κατά των βακτηρίων (Ellis 1999, Do Vale et al. 2002), και τα φυσικά κυτταροτοξικά κύτταρα. Η έμφυτη ανοσία δεν αποτελεί απλά την πρώτη γραμμή άμυνας απέναντι στις λοιμώξεις, αλλά παίζει, επίσης, καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση των μηχανισμών επίκτητης ανοσίας, οι οποίοι στηρίζονται στη δράση των Β και Τ λεμφοκυττάρων. Αποτελεί επομένως το φυσικό πέρασμα στην επίκτητη ανοσία (Abbas & Lichtman 2004). Η ενεργοποίηση των παραπάνω κυττάρων χαρακτηρίζεται επιπλέον και από την ανάπτυξη μνήμης εναντίον των αντιγόνων τα οποία τα ενεργοποίησαν, με αποτέλεσμα την προστασία του οργανισμού σε μελλοντικές επαναμολύνσεις από τον ίδιο μικροοργανισμό (Roitt et al. 1987).

### **Z.2. Επίκτητη χυμική και κυτταρική ανοσία**

Οι μηχανισμοί της επίκτητης ανοσίας των ιχθύων σε μολυσματικές ασθένειες διακρίνονται σε αυτούς στους οποίους εμπλέκονται διάφοροι παράγοντες χυμικής φύσης, όπως τα αντισώματα ή οι ανοσοσφαιρίνες (Ig), και σε εκείνους στους οποίους εμπλέκονται παράγοντες κυτταρικής φύσης, όπως τα λεμφοκύτταρα Τ (Partula et al. 1995, Pilström & Bengtén 1996, Ellis 1999).

Τα αντισώματα δρουν κατά των συγκολλητινών, οι οποίες είναι πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων και χρησιμεύουν για την προσκόλληση των

βακτηρίων στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή. Τα αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών αυτών μπορούν να αποτρέψουν την προσκόλληση των βακτηρίων και επομένως την επαφή τους με τον ξενιστή. Σε αντίθεση με τα θηλαστικά, οι ιχθύες έχουν αντισώματα που ανήκουν αποκλειστικά στην ομάδα M. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί και η ύπαρξη αντισωμάτων άλλων ομάδων, όπως των IgD, IgZ και IgT (Cheng et al. 2006). Στους ιχθύς υπάρχει μόνο μία τετραμερής μορφή της ανοσοσφαιρίνης M, σε αντίθεση με αυτή των θηλαστικών, η οποία είναι πενταμερής (Acton et al. 1971). Τα αντισώματα έχουν και τη δυνατότητα εξουδετέρωσης κάποιων βακτηριακών προϊόντων, όπως οι τοξίνες (Ellis 1999).

Τα λεμφοκύτταρα T, τα οποία αποτελούν έναν άλλον παράγοντα της επίκτητης κυτταρικής ανοσίας, παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού αφού, έπειτα από την επαφή τους με αντιγόνο, ενεργοποιούν τα μακροφάγα μέσω της έκκρισης, πιθανώς, ιντερφερόνης  $\gamma$ . Η ενεργοποίηση των μακροφάγων, όπως αναφέρθηκε, συμβάλλει στην απελευθέρωση ουσιών με βακτηριοκτόνο δράση (Ellis 2001).

### **Z.3. Επίδραση του στρες στο ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων**

Η ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος των ιχθύων απέναντι σε κάποιο στρεστικό παράγοντα συνιστά τριτεύουσα προσαρμοστική αντίδραση και εκδηλώνεται τόσο κατά το οξύ όσο και κατά το χρόνιο στρες. Το οξύ στρες προκαλεί κυρίως ανοσοενίσχυση, η οποία φαίνεται από την αύξηση της συγκέντρωσης της λυσοζύμης και των πρωτεϊνών του συμπληρώματος στο πλάσμα, καθώς και από την αποτελεσματικότερη εξουδετέρωση κυρίως των μυκήτων από τα φαγοκύτταρα. Αντίθετα, το χρόνιο στρες προκαλεί κυρίως ανοσοκαταστολή (Ortuño et al. 2001). Ωστόσο, αυτή η θετική ή αρνητική επίδραση του οξέος ή του χρόνιου στρες, αντίστοιχα, στο ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων δεν είναι απόλυτη. Έτσι, το οξύ στρες λόγω ολιγόλεπτου συνωστισμού φαίνεται, με βάση κάποιους δείκτες εκτίμησης της κατάστασης του ανοσοποιητικού συστήματος, να προκαλεί ανοσοενίσχυση και, παράλληλα, με βάση κάποιους άλλους δείκτες, ανοσοκαταστολή (Ortuño et al. 2001). Εξάλλου, οι Ortuño et al. (2002 a, c) διαπίστωσαν ότι ο συνωστισμός αλλά και η αναισθησία με φαινοξυαιθανόλη ή βενζοκαΐνη διάρκειας μίας ώρας προκάλεσαν ανοσοκαταστολή στην τσιπούρα. Γενικά, είναι αποδεκτό ότι το στρες μειώνει την άμυνα του οργανισμού των ιχθύων έναντι των λοιμωδών νοσημάτων (Wedemeyer 1970, Snieszko 1974). Η μέση θνησιμότητα ιριδίζουσας πέστροφας που είχε

πειραματικά μολυνθεί με *Aeromonas salmonicida* αυξήθηκε, από περίπου 40% στους ιχθύς που δεν είχαν υποστεί στρες, σε περίπου 60% στους ιχθύς που είχαν υποστεί οξύ στρες (Angelidis et al. 1987). Χειρισμοί διάρκειας 2 min σε άγρια πέστροφα προκάλεσαν λεμφοκυτταροπενία για τουλάχιστον 8 ώρες και χρειάστηκαν 72 συνολικά ώρες για να επανέλθουν τα λεμφοκύτταρα σε φυσιολογικό αριθμό (Pickering et al. 1982), ενώ χειρισμοί διάρκειας 30 sec προκάλεσαν σε πέντε είδη σολομού μείωση του αριθμού των λεμφοκυττάρων κατά 26-67% (Barton & Iwama 1991). Εξάλλου, η αιχμαλωσία ιχθύων του είδους *Fundulus heteroclitus* για 4 εβδομάδες μείωσε την ικανότητα των λεμφοκυττάρων τους να προκαλούν ανοσολογική αντίδραση σε αντιγόνα δοκιμής (Miller & Tripp 1982).

Σύγχρονες μελέτες σχετικές με την επίδραση του στρες στο ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων υποδεικνύουν ότι τα κορτικοστεροειδή που εκκρίνονται λόγω στρες ευθύνονται τουλάχιστον εν μέρει για την ανοσοκαταστολή των ιχθύων. Έτσι, όταν σε άγρια πέστροφα δόθηκε εφάπαξ σιτηρέσιο που περιείχε κορτιζόλη σε φυσιολογική δόση, ο αριθμός των λεμφοκυττάρων μειώθηκε περίπου κατά 65% και επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα εντός 24 ωρών (Pickering 1984). Επιπλέον, καθημερινή χορήγηση σε ιριδιζούσα πέστροφα σιτηρεσίου επιβαρυνμένου με κορτιζόλη προκάλεσε, 2 εβδομάδες μετά την πρώτη χορήγηση, μείωση του αριθμού των λεμφοκυττάρων (Barton et al. 1987). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι αριθμοί των λεμφοκυττάρων παραμένουν χαμηλοί για όσο διάστημα οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης είναι αυξημένες. Ωστόσο, βρέθηκε ότι οι αριθμοί των λεμφοκυττάρων σε άγριες και ιριδιζούσες πέστροφες, οι οποίες είχαν υποβληθεί σε χρόνιο συνωστισμό, παρέμεναν χαμηλές ακόμα και όταν οι αυξημένες, λόγω στρες, συγκεντρώσεις της κορτιζόλης είχαν επιστρέψει στα φυσιολογικά επίπεδα (Pickering & Pottinger 1987). Η χορήγηση κορτικοστεροειδών σε ιχθύς με άλλες μεθόδους, όπως η έγχυση (McLeay 1973) ή η εμφύτευση (Pickering et al. 1989), επίσης μειώνει τον αριθμό των λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι εμφυτεύματα κορτιζόλης προκάλεσαν λεμφοκυτταροπενία σε άγρια αλλά όχι σε ιριδιζούσα πέστροφα, παρά το ότι και στα δύο είδη η συγκέντρωση της κορτιζόλης στο αίμα ήταν στο ίδιο υψηλό επίπεδο (Pickering et al. 1989).

Ο μηχανισμός δράσης της κορτιζόλης στην καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος των ιχθύων δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί πλήρως. Εντούτοις, αρκετοί συγγραφείς υποδεικνύουν ότι η δράση της κορτιζόλης μπορεί να συνίσταται στην

παρεμπόδιση παραγόντων αντίστοιχων προς την ιντερλευκίνη, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων από πρόδρομα κύτταρά τους (Kaattari & Tripp 1987, Tripp et al. 1987).

Η ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος των ιχθύων σε κάποιον στρεσικό παράγοντα εκτιμάται με τη βοήθεια διάφορων δεικτών, όπως η φυσική αιμολυτική δραστηριότητα του συμπληρώματος, η οξειδωτική δραστηριότητα των φαγοκυττάρων, η φαγοκυτταρική δραστηριότητα, ο αριθμός των μονοκυττάρων και των μακροφάγων καθώς και των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων στο πρόσθιο τμήμα των νεφρών και στο αίμα, η μεταναστευτική ικανότητα των λευκοκυττάρων από τους λεμφοειδείς ιστούς στο αίμα κ.ά. (Wendelaar Bonga 1997, Ortuño et al. 2001 & 2002 a, b, c). Η μέτρηση της φυσικής αιμολυτικής δραστηριότητας του συμπληρώματος δεν δίνει την πραγματική εικόνα της κατάστασης του ανοσοποιητικού συστήματος, αφού επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους, όπως η φύση του στρεσικού παράγοντα, η χρονική στιγμή της δειγματοληψίας και ατομικές ιδιαιτερότητες μέσα στην ίδια ομάδα (Ortuño et al. 2002 b). Αντίθετα, οι υπόλοιποι δείκτες και ιδίως η οξειδωτική δραστηριότητα των φαγοκυττάρων, θεωρούνται πιο εξειδικευμένοι και δίνουν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα όταν διερευνάται η ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος, όχι σε ένα μολυσματικό παράγοντα ή σε μία νόσο, αλλά στο στρες το οποίο προκαλείται από τις συνήθεις ενέργειες στις ιχθυοκαλλιέργειες (Tort et al. 1996).

Η οξειδωτική δραστηριότητα των φαγοκυττάρων, η οποία είναι απαραίτητη για την καταστροφή των μικροοργανισμών κατά τη φαγοκυττάρωση, υπολογίζεται με βάση τη συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών ανιόντος του σουπεροξειδίου<sup>1</sup> ( $O_2^{\cdot-}$ ) στα λευκοκύτταρα του πρόσθιου τμήματος των νεφρών των ιχθύων (Chung & Secombes 1988). Αυτά αποτελούνται κυρίως από φαγοκύτταρα, όπως τα μακροφάγα, τα οποία είναι διαφοροποιημένα μονοκύτταρα ικανά να αναγνωρίσουν και να φαγοκυτταρώσουν μικροοργανισμούς. Γενικά, τα μονοκύτταρα συναντώνται στο αίμα αλλά και στους ιστούς, όπου επιβιώνουν για μακρές περιόδους και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Τα μονοκύτταρα του αίματος και τα μακροφάγα των ιστών είναι δύο διακριτά στάδια ωρίμανσης του ίδιου κυτταρικού τύπου και αποτελούν το σύστημα των μονοπύρηνων

---

<sup>1</sup> Σουπεροξείδιο είναι μια δυαδική ένωση με οξυγόνο στην οξειδωτική κατάσταση  $-1/2$ , ενώ υπεροξείδιο είναι μια ένωση με οξυγόνο στην οξειδωτική κατάσταση  $-1$ . Τα σουπεροξείδια περιέχουν το ιόν του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ), ενώ τα υπεροξείδια περιέχουν είτε το ιόν  $O_2^{2-}$  είτε την ομοιοπολικά ενωμένη ομάδα  $-O-O-$  (Ebbing & Gammon 2002).



φαγοκυττάρων. Τα μόνιμα τοπικά μακροφάγα βρίσκονται στο συνδετικό ιστό και σε κάθε όργανο του σώματος, όπου επιτελούν τις ίδιες λειτουργίες με τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα, τα οποία βρίσκονται στο αίμα (Abbas & Lichtman 2004). Τα μακροφάγα αναγνωρίζουν τους μικροοργανισμούς μέσω επιφανειακών υποδοχέων, με αποτέλεσμα τη φαγοκυττάρωσή τους και την ενεργοποίηση μηχανισμών εξουδετέρωσής τους. Κατά τη φαγοκυττάρωση, το φαγοκύτταρο επεκτείνει γύρω από τον μικροοργανισμό την κυτταρική μεμβράνη του, η οποία στη συνέχεια κλείνει, αποκόπτεται και μετακινείται προς το εσωτερικό του κυττάρου με τον μικροοργανισμό έγκλειστο, πλέον, σε ένα κυστίδιο, το φαγόςωμα. Τα φαγόςωματα ενώνονται με λυσοσώματα, οπότε σχηματίζονται τα φαγολυσοσώματα. Πριν από τη δημιουργία των φαγολυσοσωμάτων, καθώς ο μικροοργανισμός συνδέεται με τους υποδοχείς του φαγοκυττάρου, ενεργοποιούνται διάφορα ένζυμα μέσα στα υπό κατασκευή φαγολυσοσώματα. Ένα από αυτά είναι η οξειδάση των φαγοκυττάρων (NADPH oxidase), η οποία, καταναλώνοντας μοριακό οξυγόνο, σχηματίζει ελεύθερες ρίζες σουπεροξειδίου ( $O_2^-$ ), υπεροξειδίου του υδρογόνου και άλλες ρίζες. Η διαδικασία αυτή συνιστά την οξειδωτική δραστηριότητα των φαγοκυττάρων, κατά την οποία προκύπτουν ουσίες, οι οποίες είναι δραστικοί μεταβολίτες του οξυγόνου και οι οποίες, σε συνδυασμό με τα ένζυμα των λυσοσωμάτων, θανατώνουν τον φαγοκυτταρωμένο μικροοργανισμό (Stave & Roberson 1985, Chung & Secombes 1988, Abbas & Lichtman 2004).

Η οξειδωτική δραστηριότητα των φαγοκυττάρων και, επομένως, η συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών σουπεροξειδίου στους ιχθύς επηρεάζεται από τη συγκέντρωση της κορτιζόλης (Stave & Roberson 1985, Angelidis et al. 1987), αν και, για να κατασταλεί, χρειάζονται υψηλές συγκεντρώσεις της (Ainsworth et al. 1991).

Σε ιριδίζουσα πέστροφα, 24 ώρες μετά από πρόκληση στρες, η οξειδωτική δραστηριότητα ήταν μειωμένη (Angelidis et al. 1987), ενώ σε σολομό του Ατλαντικού παρατηρήθηκε μείωσή της κατά 40% μετά από στρες λόγω περιορισμού διάρκειας 2 ωρών (Thompson et al. 1993). Εξάλλου, στην τσιπούρα οι Ortuño et al. (2002a) διαπίστωσαν ότι η οξειδωτική δραστηριότητα μειώθηκε κατά περίπου 40% μετά από μία ώρα αναισθησίας με φαινοξυαιθανόλη ενώ οι Bressler & Ron (2004) παρατήρησαν ανάλογη μείωση μετά από αναισθησία μόλις λίγων λεπτών με βενζοκαΐνη.

### **III. ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ**

Οι ιχθυοκαλλιέργειες αποτελούν σήμερα έναν από τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους κλάδους παραγωγής τροφίμων στον κόσμο. Οι κύριοι λόγοι για την αυξημένη κατανάλωση ιχθύων είναι η υψηλή διατροφική αξία τους, σε σχέση με άλλες πηγές πρωτεϊνών, και η αύξηση του πληθυσμού της γης. Με τις ιχθυοκαλλιέργειες επιχειρείται η μείωση του ελλείμματος της συλλεκτικής αλιείας, η οποία, μετά τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, αδυνατεί να καλύψει τη ζήτηση, κυρίως λόγω μείωσης των φυσικών αποθεμάτων ιχθύων, η οποία οφείλεται στην υπεραλίευση και στην υποβάθμιση της ποιότητας του υδάτινου περιβάλλοντος από τις ανθρώπινες δραστηριότητες (Fromm 1980, FAO 2008).

Οι ιχθυοκαλλιέργειες αποτελούν για την Ελλάδα σημαντικό τομέα της πρωτογενούς παραγωγής. Στην ελληνική ακτογραμμή, λόγω του εκτεταμένου μήκους και της μορφολογίας της, σχηματίζεται ένας μεγάλος αριθμός προστατευμένων περιοχών και κόλπων. Παράλληλα, η ύπαρξη πολυάριθμων νησιών και το ήπιο κλίμα παρέχουν τις ιδανικές συνθήκες για όλες τις μορφές εκτροφής των θαλάσσιων οργανισμών. Οι περισσότερες ιχθυοκαλλιεργητικές μονάδες χρησιμοποιούν μεθόδους εντατικής μορφής σε επιπλέοντες κλωβούς ή σε τσιμεντένιες καναλόμορφες (raceways) δεξαμενές, αλλά υπάρχουν και ημιεντατικές εκτροφές σε χωμάτινες δεξαμενές (ponds), καθώς και εκτατικές εκτροφές σε λιμνοθάλασσες ή σε χωμάτινες δεξαμενές στην ξηρά (off-shore) (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

#### **A. Παραγωγή λαβρακιού στην Ελλάδα και στην υφήλιο**

Την τελευταία εικοσιπενταετία η εκτροφή ευρύαλων ιχθύων, κυρίως λαβρακιού και τσιπούρας, παρουσίασε ραγδαία ανάπτυξη στην Ελλάδα. Κύριοι λόγοι για αυτή την ανάπτυξη ήταν οι ευνοϊκές συνθήκες του υδάτινου περιβάλλοντος της χώρας, όπως τα καθαρά, διαυγή και ανακυκλούμενα νερά των πολυάριθμων, απάνεμων κόλπων της εκτεταμένης ακτογραμμής, οι ευνοϊκές κλιματικές συνθήκες και οι ήπιες θερμοκρασίες του νερού καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, η επιτυχημένη αξιοποίηση της τεχνογνωσίας που εξελίσσεται συνεχώς τα τελευταία 25 χρόνια με τις πιο προηγμένες μεθόδους παραγωγής και τις πιο πρωτοποριακές τεχνολογίες, η ανάγκη για μακροχρόνια κάλυψη των καταναλωτικών αναγκών και, τέλος, η ικανοποιητική χρηματοδότηση από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Η Ελλάδα, με παραγωγή 90.985 τόνων ιχθύων θαλασσινού νερού, το έτος 2007 ήταν τρίτη, μετά τη Νορβηγία και το Ηνωμένο Βασίλειο, σε παραγωγή

ιχθύων θαλασσινού νερού και ευρύαλων ειδών, κυρίως λαβρακιού και τσιπούρας (Zampogna 2009). Εξάλλου, το ίδιο έτος, η Ελλάδα ήταν η πρώτη χώρα της Ευρώπης σε παραγωγή λαβρακιού με 34.761 τόνους, οι οποίοι αντιπροσώπευαν το 38% της εθνικής παραγωγής ιχθύων θαλασσινού νερού. Άλλες ευρωπαϊκές χώρες όπου το κύριο ιχθυοκαλλιεργητικό προϊόν είναι το λαβράκι είναι η Κύπρος με 740 τόνους και η Μάλτα με 75 τόνους παραγωγής το 2007 (Zampogna 2009). Τέλος, σύμφωνα με το Σύνδεσμο Ευρωπαϊκών Υδατοκαλλιεργειών (Federation of European Aquaculture Producers, FEAP), το 2008 η Ελλάδα ήταν πάλι η πρώτη χώρα της Ευρώπης και η δεύτερη παγκοσμίως σε παραγωγή λαβρακιού με 35.000 τόνους, ενώ πρώτη παγκοσμίως ήταν η Τουρκία με 38.000 τόνους, τρίτη η Ισπανία με 11.800 τόνους και τέταρτη η Ιταλία με 9.800 τόνους. Ακολουθούσαν η Γαλλία (4.000 τόνους), η Αίγυπτος (2.600 τόνους), η Κροατία (2.000 τόνους), η Πορτογαλία (1.400 τόνους) και η Τυνησία (800 τόνους).

## **B. Το λαβράκι**

### **B.1. Ταξινόμηση και περιγραφή**

Το λαβράκι είναι οστεϊχθύς της τάξης *Perciformes*, της οικογένειας *Serranidae* και του γένους *Dicentrarchus*. Στο γένος αυτό ανήκουν τα είδη *Dicentrarchus labrax* Linneus 1758 και *Dicentrarchus punctatus* Bloch 1792. Το εκτρεφόμενο λαβράκι, *Dicentrarchus labrax*, διαφοροποιείται από το *Dicentrarchus punctatus* με βάση τα παρακάτω στοιχεία (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

α) Ο *D. punctatus* παρουσιάζει σκοτεινές κηλίδες στη ράχη και στα πλευρά, οι οποίες είναι μόνιμες καθ' όλη τη ζωή του. Αντίθετα, ο *D. labrax* παρουσιάζει τέτοιες κηλίδες μόνο κατά το πρώτο και σπάνια κατά το δεύτερο έτος της ζωής του, ενώ από το τρίτο έτος και μετά οι κηλίδες αυτές εκλείπουν.

β) Στο *D. punctatus* τα δόντια της ινιακής περιοχής του ουρανίσκου καταλαμβάνουν όλη την περιοχή, σχηματίζοντας ένα είδος κλειστού τόξου, ενώ στο *D. labrax* εμφανίζονται μόνο στο πρόσθιο μέρος του ουρανίσκου, σχηματίζοντας ένα τμήμα ανοιχτού τόξου.

γ) Στο *D. punctatus* η διάμετρος του ματιού σε σχέση με τη μεσοκογχική απόσταση είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του *D. Labrax*.

Το λαβράκι είναι ένας ευρύαλος ιχθύς μεσαίου μεγέθους με επίμηκες σώμα. Το μήκος του είναι περίπου 50 cm, ενώ μπορεί να φτάσει μέχρι το 1 μέτρο. Στο επάνω

μέρος της κεφαλής φέρει κυκλοειδή λέπια. Το στόμα του είναι αιχμηρό και προεξέχει ελαφρά. Παρουσιάζει μικρά δόντια στις σιαγόνες και στον ουρανίσκο και δεν έχει κυνόδοντες. Το ραχιαίο πτερύγιο είναι διπλό και το πρώτο τμήμα του φέρει 8-10 σκληρές ακτίνες, ενώ το δεύτερο 1 σκληρή και 11-14 μαλακές ακτίνες. Το ουραίο πτερύγιο είναι μέτρια διχλωτό. Το σώμα του λαβρακιού καλύπτεται από μικρά λέπια και στην πλευρική γραμμή, η οποία είναι εκτεταμένη δίχως να φτάνει στην ουρά, υπάρχουν 71-72 λέπια.

## **B.2. Βιολογία**

Το λαβράκι συναντάται στον Ατλαντικό ωκεανό, από τις ακτές του Μαρόκου ως τη Βαλτική θάλασσα. Επίσης συναντάται σε κάθε περιοχή της Μεσόγειου και των γύρω θαλασσών, εισχωρώντας στις εκβολές των ποταμών και στις λιμνοθάλασσες. Ζει γενικά κατά μήκος των βραχωδών περιοχών, συχνά όμως, και ιδίως σε περιπτώσεις κακοκαιρίας, καταφεύγει σε αμμώδεις περιοχές. Προσαρμόζεται και αναπτύσσεται εύκολα ακόμα και σε γλυκά νερά. Οι ιδανικές συνθήκες αλατότητας για άριστη ανάπτυξη είναι 20–30‰. Η θερμοκρασία στην οποία διατρέφεται είναι 7-30 °C με ιδανικό εύρος τους 14-28 °C. Σε θερμοκρασίες κάτω των 7 °C παύει να τρέφεται, ενώ κάτω των 2 °C πεθαίνει (Χώτος & Ρογδάκης 1992). Αυτοί άλλωστε είναι και οι λόγοι για τους οποίους αναγκάζεται να μεταναστεύει όταν παρουσιάζονται μεγάλες μεταβολές θερμοκρασίας και αλατότητας.

Το λαβράκι είναι σαρκοφάγο και αρπακτικό είδος. Τα χαρακτηριστικά αυτά υποδεικνύονται από τον τύπο πέψης, τα είδη των ενζύμων που εκκρίνονται στον πεπτικό σωλήνα και τον τύπο των δοντιών. Το λαβράκι κυνηγά ατομικά στο επιφανειακό υδάτινο στρώμα και, αφού επιλέξει τη λεία του, της επιτίθεται από κάτω, την αρπάζει και απομακρύνεται. Στο φυσικό περιβάλλον τους, τα νεαρά λαβράκια τρέφονται κυρίως με αμφίποδα αλλά και διάφορες προνύμφες εντόμων (χειρονομίδες) και άλλα ασπόνδυλα, ενώ, όσο αυξάνεται η ηλικία τους, τρέφονται όλο και περισσότερο με μικρού μεγέθους ιχθύς, όπως αθερίνες (*Atherina boyeri*), σαρδέλες (*Sardina pilchardus*) και μικρά κεφαλόπουλα (*Mugil cephalus*), αλλά και καρκινοειδή και μαλάκια. Έρευνες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τροφής είναι μεγαλύτερη κατά τους μήνες Μάιο, Ιούνιο και Αύγουστο (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Το λαβράκι είναι γονοχωριστικό είδος. Τα ώριμα γεννητικώς αρσενικά άτομα έχουν ηλικία 2-3 έτη και μήκος σώματος 23-24 cm, ενώ τα θηλυκά έχουν ηλικία 3-5

έτη και μήκος σώματος 31-40 cm. Η γονιμοποίηση είναι εξωτερική. Το θηλυκό ελευθερώνει τα αυγά του, τα οποία γονιμοποιούνται από το σπέρμα του αρσενικού. Η σεξουαλική συμπεριφορά είναι ίδια στο φυσικό περιβάλλον και σε δεξαμενές (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Η αναπαραγωγή του λαβρακιού γίνεται κοντά στις εκβολές των ποταμών, σε βραχώδεις παράκτιες περιοχές. Στη Μεσόγειο, η ωρίμανση των γονάδων αρχίζει το Δεκέμβριο και ολοκληρώνεται τον Ιανουάριο, με θερμοκρασία νερού περίπου 12 °C. Στο στάδιο αυτό αρχίζει η αναπαραγωγή, η οποία ολοκληρώνεται στις αρχές Απριλίου. Αντίθετα, στον Ατλαντικό ωκεανό η περίοδος αναπαραγωγής είναι κατά 2-3 μήνες αργότερα (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Από τα αυγά εκκολάπτονται οι νύμφες, οι οποίες, μετά από μερικές ημέρες, μεταμορφώνονται σε ιχθύδια. Την άνοιξη τα ιχθύδια καταφεύγουν κυρίως σε εκβολές ποταμών ή λιμνοθάλασσες, όπου η θερμοκρασία του νερού είναι κατά κανόνα μεγαλύτερη εκείνης της θάλασσας, η αλατότητα μικρότερη και το νερό περισσότερο εύτροφο. Στη συνέχεια, μετακινούνται προς την ανοικτή θάλασσα, κυρίως λόγω καλύτερης δυνατότητας ανεύρεσης τροφής και μεγαλύτερης σταθερότητας των συνθηκών του περιβάλλοντος (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

### **B.3. Εκτροφή**

Κατά το πρώτο έτος της ζωής τους στις λιμνοθάλασσες, τα νεαρά ιχθύδια αποκτούν βάρος 60-90 g, ενώ κατά το τρίτο έτος φθάνουν το εμπορεύσιμο βάρος των 350-400 g. Η συλλογή των ιχθύων αυτών γίνεται κατά την κάθοδό τους προς την ανοικτή θάλασσα με χρήση ιχθυοπαγίδων, οι οποίες τοποθετούνται κατάλληλα στο στόμιο επικοινωνίας της λιμνοθάλασσας με τη θάλασσα. Η διαχείριση των λιμνοθαλασσών και η παραγωγή ιχθύων με τον τρόπο αυτό δεν μπορεί να θεωρηθεί ιχθυοκαλλιέργεια με την αυστηρή σημασία του όρου, επειδή ο εμπλουτισμός σε γόνιο είναι φυσικός, δεν χορηγείται τροφή άμεσα ή έμμεσα και δεν ελέγχονται οι συνθήκες του περιβάλλοντος. Εξέλιξη αυτού του συστήματος είναι η εκτατική, η ημιεντατική και η εντατική εκτροφή, δηλαδή η ανάπτυξη των ιχθυδίων σε ελεγχόμενους χώρους χωρίς χορήγηση τροφής (εκτατική εκτροφή) ή με άμεση ή έμμεση χορήγηση τροφής τουλάχιστον σε κάποιο στάδιο της ζωής τους (ημιεντατική εκτροφή) ή με χορήγηση τροφής καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους (εντατική εκτροφή) (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

### **B.3.1. Εκτατική και ημιεντατική εκτροφή**

Οι εκτροφές αυτές αποτελούν εκσυγχρονισμό και βελτίωση της διαχείρισης των λιμνοθαλασσών. Οι ανάγκες αύξησης της παραγωγής ανάγκασαν τους ιχθυοκαλλιεργητές να αναζητήσουν γόνο σε άλλες περιοχές και να τον μεταφέρουν στις λιμνοθάλασσες εφαρμόζοντας έτσι ένα σύστημα εμπλουτισμού τους, το οποίο, σε συνδυασμό με διάφορα έργα βελτίωσης των συνθηκών εκτροφής, μετέτρεψε την παραδοσιακή μορφή εκμετάλλευσης των λιμνοθαλασσών σε εκτατικής μορφή ιχθυοκαλλιέργεια. Επιπλέον, ο εγκλιματισμός και η προανάπτυξη των ιχθυδίων, ώστε να αποκτήσουν μέγεθος που τους επιτρέπει να προστατευθούν από τους θηρευτές τους πριν από τη μεταφορά τους στις λιμνοθάλασσες, μετέτρεψε την εκτατικής μορφής ιχθυοκαλλιέργεια σε ημιεντατική (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Το λαβράκι παρουσιάζει ιδιαίτερα προβλήματα στις εκτατικές και ημιεντατικές καλλιέργειες. Ένα από αυτά οφείλεται στο ότι η τροφή του δεν έχει άμεση σχέση με τη φυσική παραγωγή της λιμνοθάλασσας σε βενθικά ασπόνδυλα, αλλά εξαρτάται από τη φυσική ή τεχνητή φόρτισή της με άλλα είδη που αποτελούν την τροφή του, όπως αθερίνες, κεφαλόπουλα κ.ά. Ένα άλλο πρόβλημα οφείλεται στην επιθετικότητά του, η οποία καθιστά δύσκολη αν όχι αδύνατη τη συγκαλλιέργειά του με άλλα είδη ιχθύων καθώς και με ιχθύδια του ίδιου είδους. Ωστόσο, εκτροφές εκτατικής και ημιεντατικής ιχθυοκαλλιέργειας λαβρακιού έχουν πραγματοποιηθεί με ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε αβαθείς λεκάνες στάσιμου νερού στις γαλλικές ακτές του Ατλαντικού (Carprenier 1984), ενώ ιχθύες βάρους 160 g με πυκνότητα 100 άτομα/στρέμμα που τοποθετήθηκαν σε λεκάνες εκτατικής εκτροφής έφθασαν εννέα μήνες αργότερα το βάρος των 273 g με επιβίωση 90% (Barnabe 1989).

### **B.3.2. Εντατική εκτροφή σε κλωβούς**

Η εντατική εκτροφή του λαβρακιού μπορεί να διενεργηθεί σε κλωβούς ή σε δεξαμενές. Η αρχή της εκτροφής σε κλωβούς είναι πολύ απλή. Τα λαβράκια εκτρέφονται εγκλωβισμένα σε μια επιπλέουσα διχτυωτή δεξαμενή, σαν μεγάλη απόχη. Η εκτροφή πραγματοποιείται στο φυσικό περιβάλλον των ιχθύων και οι διαχειριστικές επεμβάσεις περιορίζονται μόνο στη διατροφή και στην προστασία των εγκαταστάσεων από τις περιβαλλοντικές διαταραχές. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η

αδυναμία ελέγχου των συνθηκών εκτροφής, αλλά μπορεί να ξεπεραστεί με κατάλληλη επιλογή της θέσης εγκατάστασης της μονάδας (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

### **B.3.3. Εντατική εκτροφή σε δεξαμενές**

Τα πρώτα σημαντικά πειράματα εκτροφής του λαβρακιού σε δεξαμενές πραγματοποιήθηκαν από τους Barnabe & Paris (1984), αλλά οι πρώτες αποδοτικές μορφές παραγωγής επιτεύχθηκαν από τον Conte (1984). Η εντατική πάχυνση σε δεξαμενές συνιστά διαδικασία κατά την οποία οι ιχθύες εκτρέφονται σε τσιμεντένιες συνήθως λεκάνες μέσα στις οποίες κυκλοφορεί θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με αέρα ή καθαρό οξυγόνο, το οποίο επιστρέφει στη θάλασσα με τη βαρύτητα ή ανακυκλώνεται μέσω μηχανικών και βιολογικών φίλτρων.

Οι δεξαμενές εντατικής εκτροφής διαφέρουν από τις τεχνητές λεκάνες ως προς το μέγεθος, το υλικό κατασκευής και την πυκνότητα των ιχθύων. Οι δεξαμενές έχουν συνήθως όγκο μικρότερο από 1.000 m<sup>3</sup> και είναι κατασκευασμένες από μπετόν ή πλαστικό, ενώ η πυκνότητα εκτροφής είναι συνήθως 10-15 kg/m<sup>3</sup>, αλλά μπορεί να φθάσει και τα 40 kg/m<sup>3</sup> με πρόσθετη παροχή καθαρού οξυγόνου. Αντιθέτως, οι τεχνητές λεκάνες είναι χωμάτινες, όγκου 3.000-30.000 m<sup>3</sup> και οι συνήθεις πυκνότητες είναι 0,5-2 kg/m<sup>3</sup>. Η πάχυνση σε τεχνητές λεκάνες έχει καθιερωθεί να χαρακτηρίζεται ως ημιεντατική ή εκτατική, ενώ η πάχυνση στις δεξαμενές ως εντατική. Αυτό όμως δεν σημαίνει ότι η πάχυνση σε τεχνητές λεκάνες δεν μπορεί να χαρακτηριστεί εντατική, αν και η παραγωγικές αποδόσεις σε αυτή την περίπτωση είναι συνήθως μικρές (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Η ιδανική δεξαμενή για εντατική ιχθυοκαλλιέργεια πρέπει να έχει απολύτως λείες εσωτερικές επιφάνειες, δυνατότητα αυτοκαθαρισμού, δηλαδή απομάκρυνσης της λάσπης και των οργανικών αποβλήτων, υλικό κατασκευής που δεν επηρεάζει την ποιότητα του νερού, ανθεκτικότητα στο χρόνο με όριο ζωής τουλάχιστον 10 χρόνια, το μικρότερο δυνατό κόστος κατασκευής και διαχείριση χωρίς δυσκολίες. Οι δεξαμενές που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες διακρίνονται σε αυτές που έχουν κυκλικό σχήμα, σε καναλόμορφες (raceways) και σε ωοειδείς (Foster Lucas). Οι δεξαμενές τετραγωνικού σχήματος είναι ακατάλληλες λόγω κακής κυκλοφορίας του νερού (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Οι κυκλικές δεξαμενές αποτελούνται από ένα κύλινδρο ύψους 1-1,5 m και κωνικό πυθμένα με κλίση 10%. Στο κέντρο του πυθμένα υπάρχει το σιφώνι απορροής, ενώ η

στάθμη του νερού διατηρείται σταθερή με κατάλληλη ρύθμιση του αγωγού απορροής. Οι κυκλικές δεξαμενές τοποθετούνται μεμονωμένες, με συνέπεια να απαιτείται μεγαλύτερος χώρος για την εγκατάστασή τους από ό,τι για τους άλλους τύπους δεξαμενών. Σε μεγάλες παροχές νερού δημιουργούνται ισχυροί στροβιλισμοί, οι οποίοι είναι επικίνδυνοι για τους ιχθύς, ενώ οι νεκρές, από πλευράς ανανέωσης του νερού, ζώνες είναι σημαντικές (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Οι καναλόμορφες δεξαμενές έχουν σχήμα ορθογωνίου παραλληλόγραμμου με σχέση μήκους/πλάτους 7/1 και βάθος 1,2-1,8 m. Το μήκος τους, κατά κανόνα, δεν μπορεί να υπερβαίνει τα 25 m, επειδή αυξάνονται οι νεκρές ζώνες. Το νερό εισέρχεται από τη μία πλευρά και εξέρχεται από την άλλη, ενώ η κλίση του πυθμένα είναι συνήθως 5%. Το ύψος του νερού ρυθμίζεται με τον αγωγό απορροής, όπως και στις κυκλικές δεξαμενές, ή με κλασικό «καλόγηρο». Η δεξαμενή έχει υψηλό βαθμό αυτοκαθαρισμού που φθάνει το 100% για ταχύτητα νερού 0,3 m/sec (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Οι ωοειδείς δεξαμενές έχουν τα πλεονεκτήματα και των δύο άλλων τύπων. Στο μέσον τους υπάρχει ένα διάφραγμα τοποθετημένο έτσι ώστε το νερό να εισέρχεται από το ένα άκρο και να εξέρχεται από το άλλο. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια πεπιεσμένου αέρα, ο οποίος διοχετευόμενος από τη μια πλευρά αναγκάζει το νερό να εκτελεί κυκλική κίνηση και τελικά να εξέρχεται από το ίδιο σημείο. Η παροχή του νερού βρίσκεται συνήθως στο κέντρο της δεξαμενής και στα δύο διαμερίσματα, με προσανατολισμό που διευκολύνει την κυκλική κίνηση του νερού. Η στάθμη του νερού ρυθμίζεται όπως και στους προηγούμενους τύπους δεξαμενών (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Η διαχείριση της εκτροφής σε δεξαμενές διακρίνεται σε δύο φάσεις. Η πρώτη αφορά την προπάχυνση και εκτροφή των νεοεισερχομένων ιχθυδίων. Τα ιχθύδια εισάγονται συνήθως κάθε άνοιξη, με βάρος περίπου 2 g και τοποθετούνται στις δεξαμενές εκτροφής, οι οποίες στη φάση αυτή έχουν συνήθως όγκο μέχρι 50 m<sup>3</sup>. Η αρχική ιχθυοπυκνότητα είναι 0,5 kg/m<sup>3</sup>, αλλά όταν τα ιχθύδια αποκτήσουν μέσο ατομικό βάρος 15-20 g αρχίζουν οι αραιώσεις και ενδεχομένως μία τουλάχιστον διαλογή κατά μέγεθος. Η φάση αυτή ολοκληρώνεται σε 10-14 μήνες, οπότε οι ιχθύες έχουν αποκτήσει μέσο ατομικό βάρος 100-120 g. Στο τέλος της πρώτης φάσης, οπότε η συνήθης τελική ιχθυοπυκνότητα είναι 10 kg/m<sup>3</sup>, αρχίζει η μεταφορά των ιχθύων στις εγκαταστάσεις εκτροφής της δεύτερης φάσης, ενώ, παράλληλα, γίνεται η υποδοχή των



ιχθυδίων του νέου κύκλου εκτροφής. Η συνήθης αναμενόμενη επιβίωση στη φάση αυτή είναι 85-90% (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Η δεύτερη φάση εκτροφής αρχίζει στις αρχές του δεύτερου έτους με τη μεταφορά των ιχθύων σε δεξαμενές χωρητικότητας 100-250 m<sup>3</sup> με πυκνότητα 45-60 άτομα/m<sup>3</sup>. Η μέση τελική ιχθυοπυκνότητα είναι της τάξης των 15 kg/m<sup>3</sup> και η συνήθης επιβίωση είναι 90-95% (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Αν και η διαχείριση της εκτροφής σε δεξαμενές δεν διαφέρει σημαντικά από την αντίστοιχη διαχείριση σε κλωβούς, μία σημαντική διαφορά που σχετίζεται με τον τρόπο λειτουργίας των δύο αυτών συστημάτων κάνει την εκτροφή στις δεξαμενές ιδιαίτερα δαπανηρή επένδυση και αυξάνει σημαντικά το κόστος λειτουργίας της. Αυτό συμβαίνει επειδή στους κλωβούς οι ιχθύες εκτρέφονται στο φυσικό περιβάλλον τους, ενώ στις δεξαμενές απαιτείται άντληση του νερού και έλεγχος και διατήρηση της ποιότητάς του σε ικανοποιητικά επίπεδα, ώστε να δημιουργείται κατάλληλο περιβάλλον για την εκτροφή τους (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Καθοριστικοί παράγοντες για τη διατήρηση της ποιότητας του νερού είναι ο ρυθμός ανανέωσής του και η ιχθυοχωρητικότητα του συστήματος εκτροφής. Η ιχθυοχωρητικότητα εκφράζει την ικανότητα φόρτισης σε βιομάζα του συστήματος εκτροφής. Καθορίζεται από τις βιολογικές δυνατότητες του είδους των ιχθύων και από το σύστημα και τα χαρακτηριστικά της εκτροφής και μπορεί να εκφραστεί με διάφορα μεγέθη από τα οποία τα πιο συνηθισμένα είναι η ιχθυοπυκνότητα και η ιχθυοφόρτιση. Η ιχθυοπυκνότητα (P) αποτελεί μια πλήρη έκφραση της ιχθυοχωρητικότητας ενός συστήματος εκτροφής στις περιπτώσεις κατά τις οποίες ο ρυθμός ανανέωσης του νερού είναι σταθερός και καθορίζεται από την εξίσωση  $P = M/V$ , όπου M είναι το βάρος της εκτρεφόμενης βιομάζας (kg) και V ο όγκος της δεξαμενής (m<sup>3</sup>) (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Η ιχθυοφόρτιση αποτελεί μια διαφορετική έκφραση της ιχθυοχωρητικότητας ενός συστήματος εκτροφής, αφού εμπεριέχει και τον παράγοντα της παροχής νερού στο σύστημα. Η ιχθυοφόρτιση (I) καθορίζεται από την εξίσωση  $I = M/Q$ , όπου M είναι το βάρος της εκτρεφόμενης βιομάζας (kg) και Q η παροχή νερού (l/min) (Χώτος & Ρογδάκης 1992). Η ιχθυοφόρτιση συνδέεται με την ιχθυοπυκνότητα με τη σχέση  $I = P \times 0,06/R$ , όπου R είναι ο ρυθμός ανανέωσης του νερού της δεξαμενής/h και R είναι  $Q \times 60/V$ , όπου Q είναι η παροχή νερού (l/min) και V ο όγκος της δεξαμενής (l) (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Η συνήθης ιχθυοφόρτιση για λαβράκι είναι 0,5-1,2 kg/l/min και για ένα ρυθμό ανανέωσης του νερού με 1-5 εναλλαγές ανά ώρα (Huguenin & Colt 1989). Με την αύξηση της παροχής νερού, η ιχθυοφόρτιση του συστήματος μειώνεται και επομένως αυξάνεται η πυκνότητα εκτροφής. Θεωρητικά, η αύξηση της πυκνότητας εκτροφής είναι τόσο μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη είναι η αύξηση της παροχής νερού και περιορίζεται μόνο από την αντοχή των ιχθύων στο μεγάλο συνωστισμό. Πρακτικά όμως περιορίζεται από την ικανότητα του εκτρεφόμενου είδους να αντιστέκεται στις μεγάλες ταχύτητες ροής του νερού που χρησιμοποιούνται καθώς και από τις τεχνικές και οικονομικές δυνατότητες του ιχθυοκαλλιεργητή. Με βάση τα παραπάνω, οι συνήθεις ιχθυοπυκνότητες για το λαβράκι είναι 15-20 kg/m<sup>3</sup> και μπορούν να φθάσουν, υπό ορισμένες προϋποθέσεις, τα 35-40 kg/m<sup>3</sup> (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Η ανανέωση του νερού της δεξαμενής είναι απαραίτητη για τον εμπλουτισμό του σε οξυγόνο και την απομάκρυνση των υπολειμμάτων της ιχθυοτροφής και των προϊόντων μεταβολισμού των ιχθύων. Ο βαθμός απομάκρυνσης διαπιστώνεται από τη συγκέντρωση της αμμωνίας στο νερό της εκτροφής. Επομένως, οι συγκεντρώσεις του οξυγόνου και της αμμωνίας στο νερό της εκτροφής είναι εκείνες που ουσιαστικά καθορίζουν το ρυθμό εναλλαγής του νερού στις δεξαμενές, έτσι ώστε σε καμία περίπτωση οι συγκεντρώσεις αυτές να μην πλησιάσουν τα όρια αντοχής των ιχθύων. Τα όρια αυτά καθορίζονται από το μέγεθος των ιχθύων, τη συνολική βιομάζα του εκτρεφόμενου πληθυσμού και από τη θερμοκρασία και την αλατότητα του νερού της εκτροφής. Επειδή το οξυγόνο μπορεί να διοχετευθεί στους ιχθύς και με άλλα μέσα εκτός της εναλλαγής του νερού εκτροφής, η αμμωνία αποτελεί ουσιαστικά τον παράγοντα εκείνο που συνήθως φθάνει πρώτος στα όρια αντοχής του οργανισμού των ιχθύων και καθορίζει τελικά το βαθμό ανανέωσης του νερού (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η αμμωνία επηρεάζει τους ιχθύς δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Συντελεί πάντως στη μείωση της ανταλλαγής των αερίων, στη βλάβη που επιτηλεί των βραγχίων, στη μείωση της ικανότητας του αίματος να μεταφέρει οξυγόνο στους ιστούς, στη μείωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και στην πρόκληση αιμόλυσης. Τα όρια ασφαλείας για τους ιχθύς δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί επακριβώς, αλλά διαπιστώνεται ότι συγκεντρώσεις αμμωνίας μικρότερες από 0,02 mg/l δεν προκαλούν προβλήματα υγείας στους ιχθύς (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Η συγκέντρωση της αμμωνίας αυξάνεται ακόμα και με την ελάχιστη αύξηση της τιμής του pH, της θερμοκρασίας και της αλατότητας του νερού. Αύξηση της αμμωνίας παρατηρείται επίσης και από τη μείωση του CO<sub>2</sub> στο νερό εκτροφής. Ο μόνος ασφαλής τρόπος μείωσης της συγκέντρωσης της αμμωνίας στο νερό εκτροφής είναι η άμεση αλλαγή του (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Εκτός από την αμμωνία, η ποσότητα του οξυγόνου στο νερό αποτελεί το δεύτερο σημαντικό παράγοντα που καθορίζει την ανανέωση του νερού εκτροφής. Αυτή μπορεί να αυξηθεί στον επιθυμητό βαθμό με ανανέωση του νερού εκτροφής διαμέσου του συστήματος άντλησης, με εμπλουτισμό του νερού σε οξυγόνο με χρήση ειδικών αναδευτήρων και με διοχέτευση στο νερό πεπιεσμένου αέρα. Η συγκέντρωση του οξυγόνου στο νερό πρέπει να είναι τουλάχιστον 6 mg/l. Καθώς οι αιτίες μείωσης του οξυγόνου στο νερό εκτροφής είναι οι ιχθύες, τα υπολείμματα της τροφής και οι φυτικοί οργανισμοί, ο καθαρισμός των δεξαμενών και η διατήρηση σωστών πυκνοτήτων στον ιχθυοπληθυσμό είναι τα κύρια σημεία που πρέπει να προσέχει κάθε ιχθυοκαλλιεργητής για να εξασφαλίζει τα σωστά επίπεδα οξυγόνου (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

#### **B.3.4. Εκκολαπτήρια**

Η εντατική καλλιέργεια λαβρακιού απαιτεί μεγάλο αριθμό γόνου, ο οποίος μπορεί να παραχθεί είτε μέσω της αλιείας είτε στα εκκολαπτήρια. Στα εκκολαπτήρια η αναπαραγωγή των γεννητόρων πραγματοποιείται είτε με φυσικές γεννήσεις είτε με τεχνητή γονιμοποίηση. Οι φυσικές γεννήσεις γίνονται υπό ελεγχόμενες συνθήκες, οι οποίες προσομοιάζουν εκείνες της φύσης, ενώ η τεχνητή γονιμοποίηση εφαρμόζεται σε ιχθύς ευρισκόμενους στο στάδιο της αναπαραγωγής με χρήση ορμονών. Οι φυσικές γεννήσεις εξασφαλίζουν συνήθως ένα μεγάλο αριθμό βιώσιμων αυγών. Αντίθετα η τεχνητή γονιμοποίηση, αν και έχει εφαρμοστεί εκτενώς στους ιχθύς αλμυρού νερού, έχει σχεδόν εγκαταλειφθεί, επειδή τα αυγά έχουν μικρό ποσοστό βιωσιμότητας και συνήθως είναι κακής ποιότητας (Χώτος και Ρογδάκης 1992).

Ο αριθμός των αυγών κάθε ωοτοκίας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Γενικά, εκτιμάται ότι το λαβράκι δίνει, κατά μέσο όρο, 150.000 αυγά/kg θηλυκού ατόμου, τιμή η οποία αφορά τα βιώσιμα αυγά που συλλέγονται κατά τις φυσικές γεννήσεις. Κατά την τεχνητή γονιμοποίηση, αν και έχουν αναφερθεί τιμές της τάξης των 200.000-250.000 αυγών/kg θηλυκού ατόμου, ο τελικός αριθμός είναι στα ίδια επίπεδα με τις φυσικές γέννες, λόγω της κακής ποιότητας και του χαμηλού ποσοστού βιωσιμότητας των

νυμφών (Χώτος και Ρογδάκης 1992). Το μέγεθος των αυγών του λαβρακιού είναι 1,10-1,32 mm, με μέση διάμετρο 1,25 mm, αν και τα μικρότερα σε μέγεθος αυγά λαμβάνονται με τεχνητή γονιμοποίηση. Από τις δεξαμενές των γεννητόρων τα γονιμοποιημένα αυγά συλλέγονται με απόχη ή με αυτόματο συλλέκτη, γίνεται επιλογή των βιώσιμων και ακολουθεί η μέτρησή τους. Μετά τοποθετούνται στις εγκαταστάσεις επώασης, όπου παραμένουν τουλάχιστον έως την ολοκλήρωση του σχηματισμού του εμβρύου. Η εκκόλαψη πραγματοποιείται την 5<sup>η</sup> ημέρα σε θερμοκρασία 15-18°C (Χώτος και Ρογδάκης 1992).

Μετά την εκκόλαψη ακολουθεί η φάση του λεκιθοφόρου ιχθυδίου ή προνύμφης, κατά την οποία τα εκκολαφθέντα ιχθύδια διατρέφονται από τη λέκιθο. Η φάση αυτή διαρκεί 4 ημέρες σε θερμοκρασία 18-20°C. Οι προνύμφες δεν έχουν σχηματισμένους οφθαλμούς ούτε πεπτικό σωλήνα και το στόμα τους παραμένει κλειστό. Η κολύμβησή τους είναι πολύ σύντομη και γίνεται μόνο για να αποφύγουν κάποιο εμπόδιο. Ακολουθεί η φάση της νύμφης, οπότε τα ιχθύδια διατρέφονται με ζωντανούς ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς. Οι νύμφες έχουν ήδη μήκος 4,9 mm και βάρος 0,4 mg, ενώ έχουν σχηματισθεί τα μάτια και έχει ανοίξει το στόμα τους. Η περίοδος διατροφής με ζωντανούς οργανισμούς διαρκεί 40-60 ημέρες μέχρι την απόκτηση ενός μέσου ατομικού βάρους 70-120 mg. Τέλος, ακολουθεί η φάση του «απογαλακτισμού» ή της αποκοπής, κατά την οποία αλλάζει η διατροφή των νυμφών από ζωντανά θηράματα σε αδρανή τροφή. Η φάση αυτή αρχίζει περί την 40η-50η ημέρα από την εκκόλαψη και συνήθως συνδυάζεται με την αλλαγή της δεξαμενής (Χώτος και Ρογδάκης 1992).

Στο εκκολαπτήριο, μεταξύ 23<sup>ης</sup> και 40<sup>ης</sup> ημέρας μετά την εκκόλαψη γίνεται ο έλεγχος νηκτικής κύστης (Chapman et al. 1988). Η νηκτική κύστη είναι ένας μονόχωρος ή δίχωρος μεμβρανώδης και ανθεκτικός σάκος, με τοίχωμα πλούσιο σε αιμοφόρα αγγεία. Αποτελεί ειδικό υδροστατικό όργανο, υπαρκτό στις περισσότερες οικογένειες ιχθύων, το οποίο, μαζί με τα πτερύγια, επιτρέπει την μετακίνηση των ιχθύων μέσα στο νερό σε οποιοδήποτε βάθος, από τον πυθμένα μέχρι την επιφάνεια, χωρίς την κατανάλωση μεγάλης ποσότητας ενέργειας. Τα είδη που δεν έχουν νηκτική κύστη πρέπει είτε να κινούν συνέχεια τα πτερύγιά τους είτε να ζουν μόνιμα στον πυθμένα. Η θέση της νηκτικής κύστης σχετίζεται άμεσα με το κέντρο βάρους του ιχθύος. Στα περισσότερα είδη ιχθύων συνδέεται με τον οισοφάγο μέσω ενός ειδικού αεραγωγού, διαμέσου του οποίου οι ιχθύς ρυθμίζουν την ποσότητα του αέρα της νηκτικής κύστης. Στα είδη των ιχθύων, από τα οποία απουσιάζει αυτός ο αγωγός, η

ρύθμιση της ποσότητας του αέρα της νηκτικής κύστης γίνεται με παροχή ή απορρόφηση αερίων από το αίμα με τη βοήθεια των τριχοειδών αγγείων που βρίσκονται σε ορισμένες θέσεις του τοιχώματός της. Η πλήρωση της νηκτικής κύστης με αέρα στα είδη με αεραγωγό δεν γίνεται αμέσως μετά την εκκόλαψη των αυγών, αλλά λίγες ημέρες αργότερα με την κατάποση ατμοσφαιρικού αέρα. Στα είδη που δεν φέρουν αεραγωγό η νηκτική κύστη γεμίζει με αέρα από ένα όργανο, το οποίο εμφανίζεται τις πρώτες ημέρες της ζωής τους και κλείνει την 5<sup>η</sup> έως την 8η ημέρα από την εκκόλαψή τους, ενώ η αυξομείωση του όγκου του αέρα της νηκτικής κύστης γίνεται από δύο αδένες, οι οποίοι αναπτύσσονται λίγες ημέρες μετά. Η σύνθεση του αέρα της νηκτικής κύστης ποικίλλει όχι μόνο ανάμεσα στα είδη αλλά και ανάμεσα στα άτομα του ίδιου είδους και περιλαμβάνει οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα και άζωτο (Νεοφύτου 1997). Η πρώτη είσοδος αέρα στη νηκτική κύστη γίνεται με την άνοδο των νυμφών στην επιφάνεια της δεξαμενής και την κατάποση ατμοσφαιρικού αέρα. Στο λαβράκι, εάν αυτό δεν επιτευχθεί, το ενδεχόμενο να επιτευχθεί αργότερα είναι πολύ μικρό, καθώς ο αεραγωγός που ενώνει τη νηκτική κύστη με τον οισοφάγο εκφυλίζεται. Επομένως, το λαβράκι, το οποίο για διάφορους λόγους αποτυγχάνει να καταπιεί αέρα όσο ο αεραγωγός είναι ανοικτός, αναπτύσσεται χωρίς νηκτική κύστη. Αυτό, λόγω της υπέρμετρης προσπάθειας των ιχθύων για να παραμένουν στην επιφάνεια και να τρέφονται, έχει ως αποτέλεσμα την λόρδωση και άλλες σκελετικές ανωμαλίες, οι οποίες αρχίζουν να εμφανίζονται μετά την 40η ημέρα, με μείωση έτσι της αξίας του τελικού προϊόντος (Χώτος και Ρογδάκης 1992). Για τον λόγο αυτό ο έλεγχος νηκτικής κύστης θεωρείται απαραίτητος. Κατά τη διαδικασία αυτή οι νύμφες τοποθετούνται σε δεξαμενές με νερό αλατότητας 12,5‰ όπου έχει προστεθεί μια αναισθητική ουσία. Οι νύμφες με λειτουργική νηκτική κύστη παραμένουν στην επιφάνεια όπου και συλλέγονται, ενώ αυτές που η νηκτική κύστη τους δεν περιέχει αέρα βυθίζονται, οπότε και απορρίπτονται (Henderson-Arzapalo et al. 1992).

#### **B.4. Ανάπτυξη και πάχυνση λαβρακιού**

Με τον όρο ανάπτυξη εννοείται η αύξηση των σωματικών μεγεθών των ιχθύων, όπως το μήκος, το ύψος, το πλάτος και το βάρος. Η ανάπτυξη συνήθως εκφράζεται με τη σχέση μεταξύ μήκους και ύψους ή μήκους και πλάτους ή μήκους και βάρους ή μόνο με το βάρος. Μπορεί επίσης να εκφρασθεί με την αύξηση του όγκου ή της μάζας του σώματος, καθώς και με την αύξηση των συγκεντρώσεων διαφόρων χημικών

συστατικών του σώματος, όπως οι πρωτεΐνες και τα λίπη. Η σχέση μεταξύ μήκους και βάρους, η οποία ονομάζεται και συντελεστής ευρωστίας (K), αποτελεί τον περισσότερο διαδεδομένο τρόπο έκφρασης της ανάπτυξης των ιχθύων και δίδεται με τη μαθηματική σχέση  $K = (W/L^3) \times 100$ , όπου W είναι το βάρος (g) και L το μήκος των ιχθύων (cm) (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

Η ανάπτυξη των ευρύαλων ιχθύων εξαρτάται γενικά από τη θερμοκρασία του νερού εκτροφής, την ηλικία και το είδος τους. Κατά κανόνα, η αύξηση του βάρους των εκτρεφόμενων ιχθύων μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας και αυξάνεται με την ανύψωση της θερμοκρασίας μέχρι τους 28 °C (Χώτος & Ρογδάκης 1992). Η θερμοκρασία παίζει τον πιο σημαντικό ίσως ρόλο στην αύξηση του λαβρακιού (Alliot et al. 1983). Ο Barnabe (1990) ανέφερε ότι οι ελάχιστες τιμές θερμοκρασίας στις οποίες παρατηρείται ανάπτυξη του λαβρακιού είναι 11-15 °C, ενώ οι βέλτιστες είναι 23-27 °C. Σε αντίθεση, ο Tesseyre (1979) υποστήριξε ότι θερμοκρασία 14 °C επιβραδύνει την ανάπτυξη. Η επίδραση της αλατότητας στην ανάπτυξη είναι μεγάλη (Dendrinis & Thorpe 1985).

Άλλοι ερευνητές (Χώτος & Ρογδάκης 1992) διατύπωσαν την άποψη ότι τους πρώτους θερινούς μήνες, με θερμοκρασία νερού 18-24 °C, η αύξηση του βάρους των νεοεισερχόμενων στη μονάδα ιχθυδίων φθάνει συνήθως στο 140% τον πρώτο μήνα, ενώ μπορεί να φθάσει στο 300% τον δεύτερο μήνα. Το χειμώνα, με θερμοκρασία νερού περίπου 15 °C, η ανάπτυξη περιορίζεται στο 10-15% ή είναι μηδενική. Κατά το δεύτερο καλοκαίρι της εκτροφής τους, όταν οι ιχθύες ζυγίζουν 150-200 g, η ανάπτυξη φθάνει στο 20-30%. Στις ελληνικές θάλασσες, το λαβράκι αποκτά το εμπορεύσιμο μέγεθος των 350 g σε 18-24 μήνες. Αυτός ο ρυθμός ανάπτυξης είναι ίδιος ή ελαφρά καλύτερος από εκείνον που παρατηρείται στις ελληνικές λιμνοθάλασσες για τους φυσικούς πληθυσμούς.

Οι ιχθύες του ίδιου είδους και της ίδιας ηλικίας, αν και όταν τοποθετούνται στους κλωβούς έχουν ίδιο μέσο βάρος, δεν αποκτούν όλοι συγχρόνως το εμπορεύσιμο μέγεθος. Το 30% του πληθυσμού αποκτά το εμπορεύσιμο μέγεθος στους 12-14 μήνες, το 50-60% σε 18-20 και το υπόλοιπο σε 24 μήνες. Αυτή η διαφοροποίηση προκαλεί σοβαρά προβλήματα στην εκτροφή του λαβρακιού, αλλά μπορεί να αμβλυνθεί σε σημαντικό βαθμό εάν γίνει διαχωρισμός των ιχθύων κατά μέγεθος, επειδή τότε οι μικρότεροι ιχθύες αποκτούν εκ νέου τον αναμενόμενο ρυθμό ανάπτυξης και αυξάνονται κανονικά. Η απόκλιση στο μέσο βάρος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 30-35%, ενώ οι

ιχθύες που προέρχονται από διαλογή θα αποκτήσουν το ήμισυ της παραπάνω αναλογίας διαφοροποίησης σε 3-8 μήνες, ανάλογα με το μέγεθος και την εποχή στην οποία θα πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

**Πίνακας 3.** Αναμενόμενα μέσα ατομικά βάρη λαβρακιού κατά την εκτροφή του στη βορειοδυτική Μεσόγειο

Μήνας	Μέση Θερμοκρασία (°C)	Αναμενόμενο μέσο ατομικό βάρος (g)		
		1 <sup>ο</sup> έτος	2 <sup>ο</sup> έτος	3 <sup>ο</sup> έτος
Ιανουάριος	8		43,8	196
Φεβρουάριος	7		43,0	194
Μάρτιος	11		44,3	197
Απρίλιος	14		49,9	212
Μάιος	19	4,33	63,9	246
Ιούνιος	22	8,92	86,1	297
Ιούλιος	25	18,00	120,0	370
Αύγουστος	23	29,4	156,0	442
Σεπτέμβριος	19	39,5	185,0	
Οκτώβριος	13	43,3	195,0	
Νοέμβριος	11	44,6	198,0	
Δεκέμβριος	9	44,3	197,0	

Με βάση την αντίληψη ότι η αύξηση και ο ρυθμός αύξησης είναι δείκτες ελέγχου μιας εκτροφής, έχουν καταβληθεί τα τελευταία χρόνια προσπάθειες για τη δημιουργία μοντέλων αύξησης ικανών να καλύπτουν πλήρως τις τεχνικές και διαχειριστικές ανάγκες των ιχθυοκαλλιεργειών. Κατά καιρούς προτάθηκαν μοντέλα, τα οποία στηρίζονται στην εμπειρία από την εκτροφή ιχθύων γλυκού νερού, όπως ο σολομός του Ατλαντικού και η ιριδίζουσα πέστροφα. Ένα από αυτά που έχει προταθεί για το λαβράκι (Querellou 1984) περιγράφεται από την εξίσωση  $W = k (ST')^a$ , όπου W είναι το αναμενόμενο μέσο ατομικό βάρος, k και a είναι συντελεστές, ST' είναι ο βαθμός θερμοηλικίας, ο οποίος είναι το γινόμενο της ηλικίας σε ημέρες επί τη θερμοκρασία  $T' = T - 10$  °C, και T είναι η μετρούμενη θερμοκρασία. Το μοντέλο αυτό συνδέει το ρυθμό ανάπτυξης με την ηλικία και τη θερμοκρασία, την οποία θεωρεί ως τον πλέον έντονο ρυθμιστικό αβιοτικό παράγοντα που διαμορφώνει τον μεταβολικό ρυθμό και καθορίζει την ανάπτυξη (Brett 1979). Στο μοντέλο αυτό, ο βαθμός θερμοηλικίας προσδιορίζεται

από το γινόμενο της ηλικίας σε ημέρες επί τη θερμοκρασία μειωμένη κατά 10 °C, επειδή, από παρατηρήσεις σε ιχθυοκαλλιέργειες των χωρών της βορειοδυτικής Μεσογείου, φάνηκε ότι η διατροφή και η ανάπτυξη αναστέλλονται σε θερμοκρασία μικρότερη των 10 °C. Η εξίσωση που προκύπτει είναι η  $W = 0,9 \times 10^{-8} \times (ST')^{2,81}$  (Χώτος & Ρογδάκης 1992). Τα αναμενόμενα μέσα ατομικά βάρη από την εφαρμογή του μοντέλου αυτού στη βορειοδυτική Μεσόγειο παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 4.** Αναμενόμενα μέσα ατομικά βάρη λαβρακιού κατά την εκτροφή του στην κεντροδυτική Ελλάδα

Μήνας	Μέση Θερμοκρασία (°C)	Αναμενόμενο μέσο ατομικό βάρος (g)	
		1 <sup>ο</sup> έτος	2 <sup>ο</sup> έτος
Ιανουάριος	15		102
Φεβρουάριος	14		105
Μάρτιος	15		109
Απρίλιος	18	2,4	123
Μάιος	20	5,1	143
Ιούνιος	22	11,0	171
Ιούλιος	23	21,4	205
Αύγουστος	23	37,2	243
Σεπτέμβριος	22	57,1	279
Οκτώβριος	20	77,0	310
Νοέμβριος	19	88,6	338
Δεκέμβριος	17	97,4	357

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η αύξηση επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες εκτός από τη θερμοκρασία και την ηλικία, ένα αντίστοιχο μοντέλο θα μπορούσε να εφαρμοστεί και στις ιχθυοκαλλιέργειες που είναι εγκαταστημένες σε άλλες γεωγραφικές περιοχές. Έτσι οι εξισώσεις που περιγράφουν το μοντέλο αυτό στην περιοχή της κεντροδυτικής Ελλάδας είναι οι εξής:  $W = 0,113 \times 10^{-8} \times (ST')^{3,21}$  και  $W = 3,051 \times 10^{-6} \times (ST')^{2,19}$  (Χώτος & Ρογδάκης 1992). Η πρώτη εξίσωση ανταποκρίνεται σε ειδικό ρυθμό ανάπτυξης μεγαλύτερο ή ίσο με 1 και αφορά τους νεοεισερχόμενους στη μονάδα ιχθύς μέχρι το φθινόπωρο και την απόκτηση ενός μέσου βάρους 60-70 g. Η δεύτερη εξίσωση ανταποκρίνεται σε ένα ειδικό ρυθμό αύξησης μικρότερο από ή ίσο με 1 και αφορά ιχθύς με ατομικό βάρος μεγαλύτερο από 60 g. Η θερμοηλικία



προσδιορίστηκε για  $T' = T-13$ , αφού παρατηρήθηκε ότι κάτω από τη θερμοκρασία των  $13\text{ }^{\circ}\text{C}$  αναστέλλεται η αύξηση. Τα αναμενόμενα μέσα ατομικά βάρη από την εφαρμογή του μοντέλου αυτού στην κεντροδυτική Ελλάδα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4, ενώ στον Πίνακα 5 παρουσιάζεται η αύξηση του μήκους και του βάρους λαβρακιών της Μεσογείου σε σχέση με την ηλικία τους (Χώτος & Ρογδάκης 1992).

**Πίνακας 5.** Αύξηση του μήκους και του βάρους λαβρακιού της Μεσογείου σε σχέση με την ηλικία

<b>Ηλικία (έτη)</b>	<b>Μέγεθος (cm)</b>	<b>Βάρος (g)</b>
1	17,4	55,2
2	28,3	213,6
3	38,2	549,0
4	48,6	974,4
5	53,9	1.372,0
6	57,6	1.882,0



## ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

### Η ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΕΥΝΑ

#### Ι. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ, ΩΣ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ, ΤΗΣ ΤΡΙΚΑΪΝΗΣ, ΤΗΣ ΒΕΝΖΟΚΑΪΝΗΣ, ΤΗΣ ΦΑΙΝΟΞΥΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΓΑΡΙΦΑΛΕΛΑΙΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΔΟΣΗΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟ ΛΑΒΡΑΚΙ

##### A. Υλικά και μέθοδοι

###### A.1. Ζωικό υλικό

Κατά τον πειραματισμό, ο οποίος διενεργήθηκε το δεύτερο δεκαήμερο του Απριλίου στον κρατικό ιχθυογεννητικό σταθμό της Πρέβεζας, χρησιμοποιήθηκαν 200 περίπου ιχθύδια του είδους *Dicentrarchus labrax*, ηλικίας 4 μηνών και σωματικού βάρους  $20,2 \pm 1,9$  g. Στην ηλικία αυτή δεν είναι δυνατός ο καθορισμός του φύλου από τα μακροσκοπικά και μόνο γνωρίσματα.

###### A.2. Δεξαμενές εκτροφής

Τα ιχθύδια χωρίστηκαν σε ισάριθμες ομάδες και κατανεμήθηκαν σε τέσσερις καναλόμορφες δεξαμενές (raceways) εντατικής εκτροφής, οι οποίες είχαν απολυμανθεί με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου. Οι δεξαμενές ήταν κατασκευασμένες από σκυρόδεμα και είχαν βάθος 1 m, μήκος 10 m και πλάτος 1 m. Καθώς η στάθμη του νερού σε κάθε δεξαμενή έφτανε στο ύψος των 80 cm, ο συνολικός όγκος νερού ήταν 8 m<sup>3</sup> και, επομένως, η ιχθυοπυκνότητα ήταν 0,126 kg/m<sup>3</sup>. Οι δεξαμενές ήταν σε παράλληλη διάταξη και ανοιχτού κυκλώματος, διέθεταν ρυθμιζόμενους αγωγούς παροχής και αποχέτευσης νερού και ήταν εφοδιασμένες με αερόλιθους, ώστε να εξασφαλίζεται ικανοποιητικός εμπλουτισμός με οξυγόνο. Το θαλασσινό νερό, με το οποίο τροφοδοτούνταν οι δεξαμενές, προερχόταν, μετά από φιλτράρισμά του, από την κεντρική γεώτρηση του ιχθυογεννητικού σταθμού.

###### A.3. Συνθήκες εκτροφής

Κατά την εκτροφή των ιχθυδίων ακολουθήθηκαν όλες οι οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΚ 2003) που αφορούν τη μεταχείριση των πειραματόζωων. Η ποιότητα του

νερού των δεξαμενών ήταν τέτοια ώστε να εξασφαλίζεται η άριστη διαβίωση των ιχθυδίων. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία του νερού ήταν  $19,4\pm 0,3$  °C, η τιμή του pH  $8,00\pm 0,03$  και η ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου  $9,2\pm 0,2$  mg/l. Η θερμοκρασία και η περιεκτικότητα του νερού σε οξυγόνο ελέγχονταν καθημερινά, ενώ το pH του και η περιεκτικότητά του σε νιτρικά ιόντα, νιτρώδη ιόντα, αμμωνία και υδρόθειο κάθε δύο ημέρες. Η μέτρηση της θερμοκρασίας του νερού και της ποσότητας του διαλυμένου οξυγόνου γινόταν με ειδική φορητή συσκευή (Dissolved oxygen meter HI 9143, HANNA Instruments, Woonsocket, USA), ενώ η μέτρηση του pH του νερού και της περιεκτικότητάς του σε νιτρικά και νιτρώδη ιόντα και σε αμμωνία γινόταν με ειδικές ταινίες (pH test strips, nitrate/nitrite test strips, ammonia test strips, Mars Fishcare, Chalfont, USA), όπως άλλωστε και η μέτρηση της περιεκτικότητάς του σε υδρόθειο (Hydrogen Sulfide Water Test strips, Industrial Test Systems, Rock Hill, USA). Το νερό των δεξαμενών ανανεωνόταν κατά 25% κάθε ημέρα, ενώ ο φωτισμός των δεξαμενών, οι οποίες βρισκόταν σε σκιερό μέρος, ήταν φυσικός.

Με σκοπό τον εγκλιματισμό τους στις συνθήκες του περιβάλλοντος, τα ιχθύδια παρέμειναν στις δεξαμενές εκτροφής για μία εβδομάδα πριν από την έναρξη του πειραματισμού. Κατά το διάστημα αυτό, ελεγχόταν καθημερινά η κατάσταση της υγείας τους με βάση τη συμπεριφορά τους, καθώς και άλλα χαρακτηριστικά, όπως η θρεπτική κατάσταση, η κινητικότητα, τα αντανακλαστικά, η αναπνευστική δραστηριότητα, ο τρόπος πλεύσης και η κατάσταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματός τους, τα οποία συνιστούν κριτήρια αξιολόγησης της υγείας (Austin & Austin 2007).

Επιπλέον, την τρίτη ημέρα, 10 ιχθύδια από κάθε δεξαμενή υποβλήθηκαν σε νεκροσκοπικές, βακτηριολογικές, παρασιτολογικές και ιστολογικές εξετάσεις. Η βακτηριολογική εξέταση διενεργήθηκε σε δείγματα νεφρών και σπλήνα και η παρασιτολογική εξέταση σε δείγματα βραγχίων, δέρματος, εγκεφάλου, πεπτικού σωλήνα, νεφρών, καρδιάς, χοληδόχου κύστης, ήπατος και σπλήνα σύμφωνα με τους Roberts & Snail (2001). Στα ιχθύδια χορηγούνταν εμπορικό σιτηρέσιο (Εταιρεία Ζωοτροφών ELBIZ AE, Θεσσαλονίκη) σε μορφή κυλινδρικών συμπύκνων διαμέτρου 2,5 mm. Με βάση τα στοιχεία της παρασκευάστριας εταιρείας, η σύνθεση του σιτηρεσίου παρουσιάζεται στον Πίνακα 6 και η χημική συστασή του στον Πίνακα 7. Το σιτηρέσιο χορηγούνταν στα ιχθύδια κάθε 12 ώρες (περί τις 8 π.μ. και 8 μ.μ.) με το χέρι

σε ποσότητα ίση με το 2% του σωματικού βάρους τους ανά 24ωρο. Η χορήγηση τροφής διακοπτόταν 24 ώρες πριν από την έναρξη κάθε πειραματισμού.

**Πίνακας 6.** Σύνθεση σιτηρεσίου ιχθυδίων

Συστατικά	Περιεκτικότητα (g/kg)
Σπόροι σίτου	222,5
Σπόροι σόγιας	181,1
Ιχθυάλευρο (70-72%)	398,9
Ιχθυέλαιο	50,0
Γλουτένη αραβοσίτου	97,5
Βήτες σιταριού	7,48
Συγκολλητικό μέσο	8,0
Μαρμαρόσκονη	21,0
Φωσφορικό ασβέστιο	3,0
L-Λυσίνη HCL	0,2
DL-Μεθειονίνη	3,6
Βιταμίνη A/D3 1000/200	0,011
Βιταμίνη A (retinyl acetate)	0,01
Βιταμίνη E (50% DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate)	0,5
Βιταμίνη K3 (50% menadione)	0,04
Βιταμίνη B1	0,05
Βιταμίνη B2 (80%)	0,05
Βιταμίνη B6	0,03
Βιταμίνη B12 (1%)	0,01
Νιασίνη	0,350
Βιοτίνη (2%)	0,075
Παντοθενικό οξύ (90%)	0,15
Φολικό οξύ (99%)	0,008
Ινοσιτόλη	0,2
Χολίνη (50%)	4,0
Βιταμίνη C	0,716
Οξειδίο του μαγγανίου (62%)	0,113
Οξειδίο του ψευδαργύρου (78%)	0,09
Θευκός χαλκός (25%)	0,02
Θευκό κοβάλτιο (20%)	0,005
Σελήνιο (1%)	0,01
Ιώδιο	0,004
Θευκός σίδηρος (30%)	0,170
Αντιοξειδωτικό Endox	0,1

#### A.4. Δεξαμενές αναισθησίας και δεξαμενές ανάνηψης

Ως δεξαμενές αναισθησίας χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις πλαστικές δεξαμενές με μήκος 1 m, πλάτος 0,5 m και βάθος 0,5 m. Ανάλογες δεξαμενές χρησιμοποιήθηκαν και ως δεξαμενές ανάνηψης. Κάθε δεξαμενή ήταν εφοδιασμένη με αερόλιθους, ώστε να

εξασφαλίζεται ικανοποιητικός εμπλουτισμός με οξυγόνο, και περιείχε 100 l θαλασσινού νερού προερχόμενου από την κεντρική γεώτρηση του ιχθυογεννητικού σταθμού.

**Πίνακας 7.** Χημική σύσταση σιτηρεσίου ιχθυδίων (g/kg)

<b>Με βάση τη χημική ανάλυση</b>	
Ξηρή ουσία	854,1
Πρωτεΐνες (N x 6,25)	447,2
Λιπαρές ουσίες	129,4
Κυτταρίνες	17,1
Ανόργανη ουσία	84,3
<b>Από υπολογισμό με βάση τη σύνθεση</b>	
Ασβέστιο	18,3
Φώσφορος (ολικός)	12,0
Λυσίνη	31,2
Μεθειονίνη	13,9
Μεθειονίνη + Κυστίνη	19,2
Θρεονίνη	17,3
Τρυπτοφάνη	4,78

#### **A.5. Αναισθητικές ουσίες και παρασκευή διαλυμάτων τους**

Οι αναισθητικές ουσίες που μελετήθηκαν ήταν η τρικαΐνη, η βενζοκαΐνη, η φαινοξυαιθανόλη και το γαριφαλέλαιο. Από τις ουσίες αυτές παρασκευάστηκαν τα αντίστοιχα μητρικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη των επιθυμητών συγκεντρώσεων των αναισθητικών ουσιών στις δεξαμενές αναισθησίας.

Το μητρικό διάλυμα της τρικαΐνης παρασκευάστηκε διαλύοντας 16,5 g της καθαρής ουσίας (Western Chemical Inc, West Australia) σε 100 ml απεσταγμένου νερού μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Η συγκέντρωση ήταν 165 mg καθαρής τρικαΐνης/ml.

Το μητρικό διάλυμα της βενζοκαΐνης παρασκευάστηκε διαλύοντας 9 g της καθαρής ουσίας (Euro Pharma Ltd, London, UK) σε 100 ml αιθανόλης μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Η συγκέντρωση ήταν 90 mg καθαρής βενζοκαΐνης/ml.

Το μητρικό διάλυμα της φαινοξυαιθανόλης παρασκευάστηκε διαλύοντας 75 ml της καθαρής ουσίας (MERCK, Schucherd, Germany) με περιεκτικότητα 99% και πυκνότητα 1,107 g/ml σε 1.000 ml απεσταγμένου νερού μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 1.000 ml. Η συγκέντρωση ήταν 84,39 mg καθαρής φαινοξυαιθανόλης/ml.

Το μητρικό διάλυμα του γαριφαλέλαιου παρασκευάστηκε διαλύοντας 4,5 ml της καθαρής ουσίας (GHG, Gregoris Hadjigregoriou Ltd, Cyprus) με περιεκτικότητα 85%

και πυκνότητα 1,057 g/ml σε 100 ml αιθανόλης μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Η συγκέντρωση ήταν 40,43 mg καθαρού γαριφαλέλαιου/ml.

#### **A.6. Δόσεις αναισθητικών ουσιών**

Για κάθε αναισθητική ουσία επιλέχθηκαν τρεις δόσεις, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις της. Η επιλογή των δόσεων έγινε με βάση τα ευρήματα άλλων ερευνητών σε άλλα και κατά προτίμηση συγγενή είδη ιχθύων. Για την τρικαΐνη, προστέθηκαν 27,27 ml, 33,33 ml και 39,39 ml μητρικού διαλύματος στα 100 l θαλασσινού νερού της αντίστοιχης δεξαμενής αναισθησίας, οπότε, οι συγκεντρώσεις τρικαΐνης στο νερό κάθε δεξαμενής ήταν 45 mg/l, 55 mg/l και 65 mg/l, αντίστοιχα. Για τη βενζοκαΐνη, προστέθηκαν 22,22 ml, 33,33 ml και 44,44 ml μητρικού διαλύματος στα 100 l θαλασσινού νερού της αντίστοιχης δεξαμενής αναισθησίας, οπότε, οι συγκεντρώσεις βενζοκαΐνης στο νερό κάθε δεξαμενής ήταν 20 mg/l, 30 mg/l και 40 mg/l, αντίστοιχα. Για τη φαινοξυαιθανόλη, προστέθηκαν 259,75 ml, 324,68 ml και 389,62 ml μητρικού διαλύματος στα 100 l θαλασσινού νερού της αντίστοιχης δεξαμενής αναισθησίας, οπότε, οι συγκεντρώσεις φαινοξυαιθανόλης στο νερό κάθε δεξαμενής ήταν 219,2 mg/l, 274 mg/l και 328,8 mg/l, αντίστοιχα. Για το γαριφαλέλαιο, προστέθηκαν 22,08 ml, 33,11 ml και 44,15 ml μητρικού διαλύματος στα 100 l θαλασσινού νερού της αντίστοιχης δεξαμενής αναισθησίας, οπότε, οι συγκεντρώσεις γαριφαλέλαιου στο νερό κάθε δεξαμενής ήταν 8,92 mg/l, 13,38 mg/l και 17,85 mg/l, αντίστοιχα.

#### **A.7. Πειραματικό πρωτόκολλο**

Η μελέτη διενεργήθηκε σε τέσσερις φάσεις. Αρχικά διερευνήθηκε η τυχόν επίδραση της αιθανόλης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης για την παρασκευή των μητρικών διαλυμάτων της βενζοκαΐνης και του γαριφαλέλαιου, στην αναισθησία και στη θνησιμότητα των ιχθυδίων. Στη δεύτερη, τρίτη και τέταρτη φάση διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της μικρής, της μεσαίας και της μεγάλης δόσης, αντίστοιχα, της τρικαΐνης, της βενζοκαΐνης, της φαινοξυαιθανόλης και του γαριφαλέλαιου.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η μέγιστη προσθήκη μητρικού διαλύματος βενζοκαΐνης ή γαριφαλέλαιου στις δεξαμενές αναισθησίας που περιείχαν 100 l νερού ήταν περίπου 44 ml, υπολογίστηκε ότι η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης στο νερό της δεξαμενής ήταν

περίπου 0,4 ml/l. Για τη μελέτη της επίδρασης της αιθανόλης, 10 ιχθύδια μεταφέρθηκαν σε δεξαμενή αναισθησίας η οποία περιείχε νερό με περιεκτικότητα σε αιθανόλη 0,4 ml/l και παρέμειναν εκεί για περισσότερο από 30 min, ενώ ταυτόχρονα καταγραφόταν οποιαδήποτε αλλαγή συμπεριφοράς ή ενδείξεων αναισθησίας ακόμη και πρώτου σταδίου.

Για τη διενέργεια κάθε μίας από τις επόμενες τρεις φάσεις χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις πλαστικές δεξαμενές αναισθησίας και τέσσερις πλαστικές δεξαμενές ανάνηψης, μία για κάθε αναισθητική ουσία. Σε κάθε δεξαμενή αναισθησίας τοποθετήθηκαν 100 l θαλασσινού νερού και ακολούθησε η προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας μητρικού διαλύματος της κάθε αναισθητικής ουσίας. Στη συνέχεια, σε κάθε δεξαμενή αναισθησίας μεταφέρθηκε προσεκτικά με τη βοήθεια απόχης από ένα ιχθύδιο από κάθε μία από τις δεξαμενές εκτροφής και καταγράφηκε ο χρόνος εγκατάστασης της αναισθησίας, δηλαδή ο χρόνος μεταξύ της εμβάπτισης του ιχθυδίου στο νερό της δεξαμενής και της εμφάνισης των ενδείξεων που χαρακτηρίζουν το στάδιο της ελαφράς αναισθησίας (Πίνακας 1). Αμέσως μετά την καταγραφή του χρόνου εγκατάστασης της αναισθησίας, κάθε ιχθύδιο μεταφέρθηκε προσεκτικά με τη βοήθεια απόχης στη δεξαμενή ανάνηψης που περιείχε θαλασσινό νερό, στο οποίο δεν είχε προστεθεί αναισθητική ουσία. Στις δεξαμενές ανάνηψης καταγράφηκαν ο χρόνος που απαιτούνταν για την ολική επαναφορά του ιχθυδίου στην αρχική κατάστασή του, δηλαδή ο χρόνος ανάνηψης από την αναισθησία, καθώς και ο αριθμός τυχόν θανάτων. Η μέτρηση των χρόνων εγκατάστασης και ανάνηψης γινόταν με ηλεκτρονικό χρονόμετρο ακρίβειας 0,01 sec.

Για την ολοκλήρωση της κάθε φάσης, η διαδικασία μέτρησης των χρόνων εγκατάστασης και ανάνηψης καθώς και η καταγραφή των θανάτων επαναλήφθηκαν σε 9 ακόμη ιχθύδια από κάθε δεξαμενή εκτροφής, έτσι ώστε ο συνολικός αριθμός των ιχθυδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας κάθε δόσης κάθε μίας από τις αναισθητικές ουσίες να ανέρχεται σε 10. Η θνησιμότητα προσδιορίστηκε με βάση τη σχέση:  $\text{θνησιμότητα (\%)} \text{ ιχθυδίων} = (\text{αριθμός νεκρών ιχθυδίων} / \text{αρχικός αριθμός ιχθυδίων}) \times 100$ .

Μετά το πέρας όλων των παραπάνω πειραματισμών τα ιχθύδια μεταφέρθηκαν σε δεξαμενές όμοιες με αυτές της ανάνηψης, ομαδοποιημένα κατά αναισθητική ουσία και δόση, και παρέμειναν εκεί για 5 ημέρες με σκοπό τον έλεγχο της βιωσιμότητας και της συμπεριφοράς τους. Το αυτό έγινε και με τα ιχθύδια τα οποία εκτέθηκαν μόνο σε



αιθανόλη. Κατά το διάστημα αυτό, η θερμοκρασία, το pH και η περιεκτικότητα του νερού σε διαλυμένο οξυγόνο ελέγχονταν καθημερινά, και η περιεκτικότητά του σε νιτρικά ιόντα, νιτρώδη ιόντα, αμμωνία και υδρόθειο κάθε δύο ημέρες. Οι δεξαμενές αυτές διέθεταν επίσης αερόλιθους και γενικά οι συνθήκες διαβίωσης και διατροφής των ιχθυδίων σε αυτές ήταν ανάλογες με εκείνες που ίσχυαν και για τις δεξαμενές εκτροφής.

#### **A.8. Στατιστική ανάλυση**

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που αφορούσαν την αποτελεσματικότητα της χορηγούμενης δόσης χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία της ανάλυσης διακύμανσης μίας κατεύθυνσης (Πετρίδης 2000), σύμφωνα με το εντελώς τυχαίοποιημένο σχέδιο ανάλυσης (One-way ANOVA, completely randomized design), ενώ τα ποσοστά θνησιμότητας ελέγχθηκαν με το κριτήριο της  $\chi^2$  κατανομής (Pearson chi-square test) (Πετρίδης 2000).

Για την επεξεργασία των στοιχείων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS (SPSS 13.0, SPSS Ltd, Woking, Surrey, UK), ενώ η πειραματική μονάδα σε όλες τις μετρήσεις ήταν το ιχθύδιο. Η ομοιογένεια των διακυμάνσεων σε όλες τις ομάδες ελέγχθηκε με τη δοκιμή του Levene, ενώ σε περιπτώσεις ετερογένειας έγιναν οι κατάλληλοι μετασχηματισμοί με στόχο την ομοιογένεια των διακυμάνσεων ή χρησιμοποιήθηκε ο μη παραμετρικός έλεγχος των Kruskal-Wallis (Πετρίδης 2000). Όπου η ανάλυση διακύμανσης αξιολογήθηκε ως στατιστικώς σημαντική χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή του πολλαπλού εύρους του Duncan με στόχο την αξιολόγηση της ακριβούς θέσης των στατιστικών διαφορών. Οι τιμές του χρόνου εγκατάστασης και του χρόνου ανάνηψης εκφράζονται ως αριθμητικός μέσος και τυπική απόκλιση του μέσου. Στατιστικώς σημαντική θεωρήθηκε μια διαφορά με επίπεδο σημαντικότητας 5% ( $P \leq 0,05$ ).

#### **B. Αποτελέσματα**

Οι νεκροσκοπικές, βακτηριολογικές, παρασιτολογικές και ιστολογικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν σε 10 ιχθύδια από κάθε δεξαμενή εκτροφής κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού, έδειξαν ότι όλα τα ιχθύδια ήταν υγιή. Ακόμη, ο τακτικός έλεγχος της υγείας τους με βάση τη συμπεριφορά και άλλα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά τους κατά τη διάρκεια τόσο της περιόδου εγκλιματισμού όσο και των

πρώτων 5 ημερών μετά την ανάνηψη από την αναισθησία έδειξε ότι τα ιχθύδια παρέμεναν υγιή καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού.

Από την πρώτη φάση του πειραματισμού αυτού διαπιστώθηκε ότι η αιθανόλη, η οποία χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή των μητρικών αναισθητικών διαλυμάτων της βενζοκαΐνης και του γαριφαλέλαιου, δεν έχει επίδραση στην αναισθησία των ιχθυδίων, καθώς κανένα από αυτά δεν παρουσίασε αλλαγή συμπεριφοράς ή ενδείξεις αναισθησίας ούτε καν του πρώτου σταδίου. Επιπλέον, δεν προκαλεί θνησιμότητα.

Η επίδραση της χορηγούμενης δόσης στην αποτελεσματικότητα και στην ασφάλεια της τρικαΐνης παρουσιάζεται στον Πίνακα 8. Η αύξηση της δόσης της τρικαΐνης από τα 45 στα 55 mg/l προκάλεσε κλινικώς και στατιστικώς σημαντική ( $P \leq 0,01$ ) μείωση του χρόνου εγκατάστασης της αναισθησίας, αλλά δεν επηρέασε ουσιαστικά τον χρόνο ανάνηψης. Η περαιτέρω αύξηση της δόσης στα 65 mg/l δεν επηρέασε ουσιαστικά τον χρόνο εγκατάστασης, αλλά προκάλεσε κλινικώς και στατιστικώς σημαντική ( $P \leq 0,01$ ) αύξηση του χρόνου ανάνηψης. Επιπλέον, συνδυάστηκε με ιδιαίτερα υψηλή θνησιμότητα κατά την αναισθησία, σε αντίθεση με τις άλλες δόσεις με τις οποίες η θνησιμότητα ήταν μηδενική.

**Πίνακας 8.** Επίδραση της δόσης της τρικαΐνης στον χρόνο εγκατάστασης και ανάνηψης και στην κατά την αναισθησία θνησιμότητα του εκτρεφόμενου λαβρακιού (n=10)

Δόση (mg/l)	Χρόνος εγκατάστασης (min)	Χρόνος ανάνηψης (min)	Θνησιμότητα (%)
45	4,23±1,25 <sup>a</sup>	0,12±0,03 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
55	1,28±0,19 <sup>b</sup>	0,52±0,05 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
65	0,60±0,09 <sup>b</sup>	4,26±0,91 <sup>b</sup>	40 <sup>b</sup>

Τιμές στην ίδια στήλη με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,01$ ) μεταξύ τους.

**Πίνακας 9.** Επίδραση της δόσης της βενζοκαΐνης στον χρόνο εγκατάστασης και ανάνηψης και στην κατά την αναισθησία θνησιμότητα του εκτρεφόμενου λαβρακιού (n=10)

Δόση (mg/l)	Χρόνος εγκατάστασης (min)	Χρόνος ανάνηψης (min)	Θνησιμότητα (%)
20	5,46±1,58 <sup>a</sup>	0,17±0,04 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
30	2,25±0,29 <sup>b</sup>	0,44±0,07 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
40	1,09±0,14 <sup>b</sup>	7,59±1,24 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>

Τιμές στην ίδια στήλη με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,01$ ) μεταξύ τους.

Η επίδραση της χορηγούμενης δόσης στην αποτελεσματικότητα και στην ασφάλεια της βενζοκαΐνης παρουσιάζεται στον Πίνακα 9. Η αύξηση της δόσης της βενζοκαΐνης από τα 20 στα 30 mg/l προκάλεσε κλινικώς και στατιστικώς σημαντική ( $P \leq 0,01$ ) μείωση του χρόνου εγκατάστασης της αναισθησίας, αλλά δεν επηρέασε ουσιαστικά τον χρόνο ανάνηψης. Η περαιτέρω αύξηση της δόσης στα 40 mg/l δεν επηρέασε ουσιαστικά τον χρόνο εγκατάστασης, αλλά προκάλεσε κλινικώς και στατιστικώς σημαντική ( $P \leq 0,01$ ) αύξηση του χρόνου ανάνηψης. Επιπλέον, συνδυάστηκε με εξαιρετικά υψηλή θνησιμότητα κατά την αναισθησία, σε αντίθεση με τις άλλες δόσεις με τις οποίες η θνησιμότητα ήταν μηδενική.

Η επίδραση της χορηγούμενης δόσης στην αποτελεσματικότητα και στην ασφάλεια της φαινοξυαιθανόλης παρουσιάζεται στον Πίνακα 10. Η αύξηση της δόσης της φαινοξυαιθανόλης από τα 219,2 στα 274,0 mg/l προκάλεσε κλινικώς και στατιστικώς σημαντική ( $P \leq 0,01$ ) μείωση του χρόνου εγκατάστασης της αναισθησίας, αλλά δεν επηρέασε ουσιαστικά τον χρόνο ανάνηψης. Η περαιτέρω αύξηση της δόσης στα 328,8 mg/l δεν επηρέασε ουσιαστικά τον χρόνο εγκατάστασης, αλλά προκάλεσε κλινικώς και στατιστικώς σημαντική ( $P \leq 0,01$ ) αύξηση του χρόνου ανάνηψης. Επιπλέον, συνδυάστηκε με υψηλή θνησιμότητα κατά την αναισθησία, σε αντίθεση με τις άλλες δόσεις με τις οποίες η θνησιμότητα ήταν μηδενική.

**Πίνακας 10.** Επίδραση της δόσης της φαινοξυαιθανόλης στον χρόνο εγκατάστασης και ανάνηψης και στην κατά την αναισθησία θνησιμότητα του εκτρεφόμενου λαβρακιού (n=10)

Δόση (mg/l)	Χρόνος εγκατάστασης (min)	Χρόνος ανάνηψης (min)	Θνησιμότητα (%)
219,2	6,22±1,43 <sup>a</sup>	0,99±0,20 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
274,0	1,49±0,38 <sup>b</sup>	1,60±0,26 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
328,8	0,97±0,04 <sup>b</sup>	6,72±1,32 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>

Τιμές στην ίδια στήλη με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,01$ ) μεταξύ τους.

Η επίδραση της χορηγούμενης δόσης στην αποτελεσματικότητα και στην ασφάλεια του γαριφαλέλαιου παρουσιάζεται στον Πίνακα 11. Η αύξηση της δόσης του γαριφαλέλαιου από τα 8,92 στα 13,38 mg/l προκάλεσε κλινικώς και στατιστικώς σημαντική ( $P \leq 0,01$ ) μείωση του χρόνου εγκατάστασης της αναισθησίας, αλλά δεν επηρέασε ουσιαστικά τον χρόνο ανάνηψης. Η περαιτέρω αύξηση της δόσης στα 17,85 mg/l δεν επηρέασε ουσιαστικά τον χρόνο εγκατάστασης, αλλά προκάλεσε κλινικώς και στατιστικώς σημαντική ( $P \leq 0,01$ ) αύξηση του χρόνου ανάνηψης. Επιπλέον,

συνδυάστηκε με υψηλή θνησιμότητα κατά την αναισθησία, σε αντίθεση με τις άλλες δόσεις με τις οποίες η θνησιμότητα ήταν μηδενική.

**Πίνακας 11.** Επίδραση της δόσης του γαριφαλέλαιου στον χρόνο εγκατάστασης και ανάνηψης και στην κατά την αναισθησία θνησιμότητα του εκτρεφόμενου λαβρακιού (n=10)

Δόση (mg/l)	Χρόνος εγκατάστασης (min)	Χρόνος ανάνηψης (min)	Θνησιμότητα (%)
8,92	4,64±1,44 <sup>a</sup>	0,20±0,05 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
13,38	1,50±0,40 <sup>b</sup>	1,10±0,05 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
17,85	0,69±0,13 <sup>b</sup>	4,22±0,74 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>

Τιμές στην ίδια στήλη με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,01$ ) μεταξύ τους.

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται οι χρόνοι εγκατάστασης και ανάνηψης που σημειώθηκαν κατά τη χρήση των βέλτιστων δόσεων της τρικαΐνης, της φαινοξυαιθανόλης, της βενζοκαΐνης και του γαριφαλέλαιου στο εκτρεφόμενο λαβράκι. Οι χρόνοι εγκατάστασης με την τρικαΐνη, τη φαινοξυαιθανόλη ή το γαριφαλέλαιο δεν διέφεραν μεταξύ τους, αλλά ήταν μικρότεροι στατιστικώς ( $P \leq 0,01$ ) και κλινικώς από τον χρόνο εγκατάστασης με τη βενζοκαΐνη. Επίσης, οι χρόνοι ανάνηψης με την τρικαΐνη ή τη βενζοκαΐνη δεν διέφεραν μεταξύ τους, αλλά ήταν μικρότεροι στατιστικώς ( $P \leq 0,01$ ) και κλινικώς από τους χρόνους ανάνηψης με τη φαινοξυαιθανόλη ή το γαριφαλέλαιο. Εξάλλου, ο χρόνος ανάνηψης με το γαριφαλέλαιο ήταν μικρότερος στατιστικώς ( $P = 0,02$ ) και κλινικώς από τον χρόνο ανάνηψης με την φαινοξυαιθανόλη.

**Πίνακας 12.** Χρόνοι εγκατάστασης και ανάνηψης με χρήση των βέλτιστων δόσεων της τρικαΐνης, της βενζοκαΐνης, της φαινοξυαιθανόλης ή του γαριφαλέλαιου (n=10)

Αναισθητικό	Δόση (mg/l)	Χρόνος εγκατάστασης (min)	Χρόνος ανάνηψης (min)
Τρικαΐνη	55,00	1,28±0,19 <sup>a</sup>	0,52±0,05 <sup>b</sup>
Βενζοκαΐνη	30,00	2,25±0,29 <sup>b</sup>	0,44±0,07 <sup>b</sup>
Φαινοξυαιθανόλη	274,00	1,49±0,38 <sup>a</sup>	1,60±0,26 <sup>a</sup>
Γαριφαλέλαιο	13,38	1,50±0,40 <sup>a</sup>	1,10±0,05 <sup>c</sup>

Τιμές στην ίδια στήλη με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,02$ ) μεταξύ τους.

## Γ. Συζήτηση

Η μελέτη της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας των αναισθητικών ουσιών στο λαβράκι είναι περιορισμένη και αποσπασματική. Ο Ghion (1975) χορήγησε μέσα

στο νερό μείγμα αλοθανίου και αέρα και διαπίστωσε ότι εξασφαλίζει αποτελεσματική και ασφαλή αναισθησία διάρκειας μέχρι 8 ωρών. Οι Yanar & Kumlu (2001) ανέφεραν ότι η θειική κινολδίνη δίνει καλύτερη και ασφαλέστερη αναισθησία όταν συνδυάζεται με διαζεπάμη. Οι Chatain & Corrao (1992) χρησιμοποίησαν τρικαΐνη σε δόσεις 20-100 mg/l για την αναισθητοποίηση προνυμφών λαβρακιού μήκους 7-31 mm και θεώρησαν ως καλύτερη τη δόση των 70 mg/l, ενώ οι Hadj Kacem et al. (1988) συνέκριναν την τρικαΐνη σε δόση 15 mg/l με την καραζολόλη, ως παράγοντες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για περιορισμό του στρες λόγω μεταφοράς. Οι μόνες συγκριτικές μελέτες αναισθητικών ουσιών έγιναν από τους Maršić-Lučić et al. (2005) και τους Mylonas et al. (2005), εκ των οποίων, οι πρώτοι συνέκριναν τη φαινοξυαιθανόλη με την ετομιδάτη σε ιχθύδια λαβρακιού βάρους μικρότερου του 1 g και οι δεύτεροι συνέκριναν τη φαινοξυαιθανόλη με το γαριφαλέλαιο σε λαβράκι μέσου σωματικού βάρους 30-45 g. Στην παρούσα έρευνα έγινε συγκριτική μελέτη τεσσάρων αναισθητικών ουσιών, προκειμένου να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλειά τους και να καθοριστούν οι βέλτιστες δόσεις τους.

Η τρικαΐνη έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό ειδών ιχθύων σε δόσεις οι οποίες, ανάλογα με τις ανάγκες, συνήθως κυμαίνονται από 20 έως 350 mg/l και οι οποίες είναι συγκριτικά μικρότερες στα νεαρά άτομα (Jolly et al. 1972, Sylvester 1975, Reinitz & Rix 1977, Smit & Hattingh 1979, Gilderhus & Marking 1987, Mattson & Riple 1989, Malmstrøm et al. 1993, Stoskopf 1993, Oikawa et al. 1994, Masee et al. 1995, Munday & Wilson 1997, Hseu et al. 1998, Smith et al. 1999, Cho & Heath 2000, Ortuño et al. 2002 a, Wagner et al. 2002 & 2003, Ross & Ross 2008, Weber et al. 2009b, Zahl et al. 2010). Στην παρούσα μελέτη η αύξηση της δόσης της τρικαΐνης από τα 45 στα 55 mg/l μείωσε τον χρόνο εγκατάστασης της αναισθησίας από τα 4,23 στα 1,28 min, αλλά δεν επηρέασε ουσιαστικά το χρόνο ανάνηψης. Αντίθετα, η περαιτέρω αύξηση της δόσης στα 65 mg/l δεν επηρέασε ουσιαστικά τον χρόνο εγκατάστασης, αλλά αύξησε σημαντικά τον χρόνο ανάνηψης. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με τη βενζοκαΐνη, τη φαινοξυαιθανόλη και το γαριφαλέλαιο.

Οι Chatain & Corrao (1992), οι οποίοι χρησιμοποίησαν τρικαΐνη σε δόσεις 20-100 mg/l για την αναισθητοποίηση προνυμφών λαβρακιού, διαπίστωσαν ότι ο χρόνος εγκατάστασης ήταν 1-3 min όταν οι δόσεις ήταν 70-100 mg/l, αλλά έφτανε τα 11 min όταν ήταν 40-60 mg/l. Ο χρόνος ανάνηψης δεν υπερέβαινε τα 5 min όταν η δόση δεν ξεπερνούσε τα 60 mg/l, αλλά έφτανε τα 7 min με τις μεγαλύτερες δόσεις και ήταν πιο

παρατεταμένος στις μικρότερες προνύμφες. Γενικά, η αύξηση της χορηγούμενης δόσης της τρικαΐνης, όπως και άλλων αναισθητικών ουσιών συνοδεύεται από μείωση του χρόνου εγκατάστασης (Mattson & Ripple 1989, Hseu et al. 1998, Weber et al. 2009b) και αύξηση του χρόνου ανάνηψης (Palić et al. 2006), αν και συχνά ο χρόνος ανάνηψης μπορεί να μην επηρεάζεται από τη δόση (Mattson & Ripple 1989, Hseu et al. 1998, Weber et al. 2009b).

Η σημαντική αύξηση του χρόνου ανάνηψης και η εμφάνιση θνησιμότητας σε ποσοστό 40%, όταν η τρικαΐνη χορηγήθηκε στη μεγαλύτερη εκ των τριών δόσεων που μελετήθηκαν, ήταν οι λόγοι για τους οποίους η δόση των 65 mg/l κρίθηκε ακατάλληλη. Εξάλλου, ο μεγάλος χρόνος εγκατάστασης ήταν ο λόγος για τον οποίο δεν προτιμήθηκε η μικρότερη δόση των 45 mg/l. Αντίθετα, η δόση των 55 mg/l συνδυάζει ταχεία εγκατάσταση και ανάνηψη και μηδενική θνησιμότητα και επιλέχθηκε ως η βέλτιστη εκ των τριών δόσεων, καθώς πληροί τα κριτήρια των Gilderhus & Marking (1987), σύμφωνα με τα οποία η αποτελεσματική και ασφαλής δόση μιας αναισθητικής ουσίας για ιχθύς πρέπει να προκαλεί ελαφρά αναισθησία μέσα σε 3 min, να επιτρέπει ανάνηψη το αργότερο σε 10 min ή, ακόμη καλύτερα, σε 5 min (Ross & Ross 2008) και να μην προκαλεί θνησιμότητα.

Η βενζοκαΐνη έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό ειδών ιχθύων σε δόσεις οι οποίες, ανάλογα με τις ανάγκες, συνήθως κυμαίνονται από 25 έως 200 mg/l (Barham et al. 1979, Ferreira et al. 1984, Mattson & Ripple 1989, Gilderhus 1990, Gilderhus et al. 1991, Stoskopf 1993, Munday & Wilson 1997, Hseu et al. 1998, Gomes et al. 2001, Ortuño et al. 2002 a, Walsh & Pease 2002, Iversen et al. 2003, Ross & Ross 2008, Zahl et al. 2010). Στην παρούσα μελέτη η αύξηση της δόσης της βενζοκαΐνης από τα 20 στα 30 mg/l μείωσε τον χρόνο εγκατάστασης της αναισθησίας από τα 5,46 στα 2,25 min, αλλά δεν επηρέασε ουσιαστικά τον χρόνο ανάνηψης. Αντίθετα, η περαιτέρω αύξηση της δόσης στα 40 mg/l δεν επηρέασε ουσιαστικά τον χρόνο εγκατάστασης, αλλά αύξησε σημαντικά τον χρόνο ανάνηψης. Γενικά, η αύξηση της χορηγούμενης δόσης της βενζοκαΐνης, όπως και άλλων αναισθητικών ουσιών συνοδεύεται από μείωση του χρόνου εγκατάστασης (Barham et al. 1979, Hseu et al. 1998, Iversen et al. 2003), αλλά ο χρόνος ανάνηψης πιθανώς να μην επηρεάζεται από τη δόση (Mattson & Ripple 1989, Hseu et al. 1998).

Η σημαντική αύξηση του χρόνου ανάνηψης και η εμφάνιση θνησιμότητας σε ποσοστό 50%, όταν η βενζοκαΐνη χορηγήθηκε στη μεγαλύτερη εκ των τριών δόσεων

που μελετήθηκαν, ήταν οι λόγοι για τους οποίους η δόση των 40 mg/l κρίθηκε ακατάλληλη. Εξάλλου, ο μεγάλος χρόνος εγκατάστασης ήταν ο λόγος για τον οποίο δεν προτιμήθηκε η μικρότερη δόση των 20 mg/l. Αντίθετα, η δόση των 30 mg/l συνδυάζει ταχεία εγκατάσταση και ανάνηψη και μηδενική θνησιμότητα και επιλέχθηκε ως η βέλτιστη εκ των τριών δόσεων, καθώς πληροί τα κριτήρια των Gilderhus & Marking (1987).

Η φαινοξυαιθανόλη έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό ειδών ιχθύων σε δόσεις οι οποίες, ανάλογα με τις ανάγκες, συνήθως κυμαίνονται από 100 έως 600 mg/l (Gilderhus & Marking 1987, Mattson & Ripple 1989, Josa et al. 1992, Hseu et al. 1994, Weyl et al. 1996, Hseu et al. 1997, Munday & Wilson 1997, Hseu et al. 1998, Kamiński et al. 2001, Ortuño et al. 2002 a, Tort et al. 2002, Myszkowski et al. 2003, Tsantilas et al. 2006, Weber et al. 2009b, Zahl et al. 2010). Στην παρούσα μελέτη η αύξηση της δόσης της φαινοξυαιθανόλης από τα 219,2 στα 274,0 mg/l μείωσε τον χρόνο εγκατάστασης της αναισθησίας από τα 6,22 στα 1,49 min, αλλά η περαιτέρω αύξηση της δόσης στα 328,8 mg/l δεν τον επηρέασε ουσιαστικά. Οι Mylonas et al. (2005) διαπίστωσαν ότι η φαινοξυαιθανόλη, σε δόσεις 200, 300 και 400 mg/l, προκάλεσε χειρουργική αναισθησία σε λαβράκια μέσου σωματικού βάρους 30-45 g σε 8, 2,5 και 1 min, αντίστοιχα. Εξάλλου, οι Maršić-Lučić et al. (2005) διαπίστωσαν ότι η φαινοξυαιθανόλη, στις ιδιαίτερα μεγάλες δόσεις των 320, 560 και 1.000 mg/l,, εξασφάλισε εγκατάσταση της αναισθησίας σε ιχθύδια λαβρακιού μέσου σωματικού βάρους 0,86 g σε 9,66, 4,15 και 2,50 min, αντίστοιχα. Οι μικρές διαφορές μεταξύ των ευρημάτων της παρούσας έρευνας και αυτής των Mylonas et al. (2005) θα μπορούσαν ίσως να αποδοθούν αφενός στη διαφορά μεγέθους μεταξύ των ιχθυδίων (20,2 έναντι 30-45 g, αντίστοιχα) και αφετέρου στη διαφορά θερμοκρασιών του νερού των δεξαμενών αναισθησίας (19,4 έναντι 25°C, αντίστοιχα). Εξάλλου, οι διαφορές μεταξύ των ευρημάτων της παρούσας έρευνας και αυτής των Maršić-Lučić et al. (2005) θα μπορούσαν πιθανότατα επίσης να αποδοθούν στην ιδιαίτερα μεγάλη διαφορά μεγέθους μεταξύ των ιχθυδίων (20,2 έναντι 0,86 g, αντίστοιχα).

Γενικά, ο ρόλος του σωματικού μεγέθους και του βάρους των ιχθύων, καθώς και της θερμοκρασίας του νερού στην αναισθησία δεν έχει ξεκαθαριστεί. Έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχει ευθέως ανάλογη σχέση μεταξύ του σωματικού βάρους και της απαιτούμενης δόσης της αναισθητικής ουσίας (Neiffer 2007, Ross & Ross 2008), οπότε είναι αναμενόμενο τα μεγαλόσωμα άτομα ενός είδους είτε να χρειάζονται μεγαλύτερες

δόσεις (Oikawa et al. 1994) είτε να εμφανίζουν μεγαλύτερο χρόνο εγκατάστασης της αναισθησίας από τα μικρόσωμα (Hseu et al. 1994, Woody et al. 2002, Small 2003, Hoskonen & Pirhonen 2004, Tsantilas et al. 2006, Weber et al. 2009b, Zahl et al. 2010). Ωστόσο, συχνά είναι τα μεγαλόσωμα άτομα εκείνα που αναισθητοποιούνται γρηγορότερα και όχι τα μικρόσωμα (Hoskonen & Pirhonen 2004, Ross & Ross 2008), ενώ άλλοτε δεν υπάρχουν διαφορές (Walsh & Pease 2002, Woody et al. 2002, Weber et al. 2009b, Zahl et al. 2010). Επίσης, ο χρόνος ανάνηψης από την αναισθησία μπορεί να είναι μεγαλύτερος στα μεγαλόσωμα ή στα μικρόσωμα άτομα (Small 2003, Tsantilas et al. 2006, Park et al. 2009, Weber et al. 2009b, Zahl et al. 2010) ή να μην επηρεάζεται από το σωματικό μέγεθος (Hseu et al. 1994, Weyl et al. 1996, Stehly & Gingerich 1999, Kamiński et al. 2001, Woody et al. 2002, Hoskonen & Pirhonen 2004, Tsantilas et al. 2006, Weber et al. 2009b, Zahl et al. 2010). Αυτά τα αντιφατικά ευρήματα μεταξύ των διάφορων ειδών ιχθύων πιθανώς οφείλονται σε διαφορές ως προς την αναλογία μεταξύ της επιφάνειας των βραγχίων και του σωματικού βάρους, την ενζυμική δραστηριότητα του ήπατος και την εναπόθεση λίπους στους ιστούς, ιδίως όταν χρησιμοποιούνται ουσίες, όπως η τρικαιΐνη και η βενζοκαΐνη, οι οποίες έχουν έντονη τάση εναπόθεσης στο λίπος (Ross & Ross 2008).

Όσον αφορά τη θερμοκρασία, αν και υπάρχουν εξαιρέσεις, (Weyl et al. 1996), οι χαμηλότερες θερμοκρασίες συνήθως συνδυάζονται με αύξηση του χρόνου εγκατάστασης και ανάνηψης (Stehly & Gingerich 1999, Zahl et al. 2010) ενώ το αντίστροφο παρατηρείται σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Zahl et al. 2010), όπως διαπίστωσαν και οι Mylonas et al. (2005) στο λαβράκι, φαινόμενο το οποίο συνδέεται κυρίως με τις αλλαγές του αναπνευστικού ρυθμού. Οι υψηλές θερμοκρασίες, εκτός του ότι αυξάνουν τον μεταβολισμό, ευνοούν την ανάπτυξη υπερκαπνίας, η οποία προκαλεί υπεραερισμό, με αποτέλεσμα την ταχύτερη πρόσληψη και απέκκριση των αναισθητικών από τα βράγχια, οπότε η εγκατάσταση και η ανάνηψη επιταχύνονται (Neiffer 2007), ενώ το αντίθετο συμβαίνει κατά τον υποαερισμό (Stehly & Gingerich 1999). Πάντως, συχνά σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση και στην ένταση του φαινομένου παίζει και η ίδια η αναισθητική ουσία (Ross & Ross 2008).

Αν και η αύξηση της δόσης της φαινοξυαιθανόλης από τα 219,2 στα 274,0 mg/l μείωσε τον χρόνο εγκατάστασης, δεν επηρέασε ουσιαστικά τον χρόνο ανάνηψης. Ομοίως, οι Maršić-Lučić et al. (2005) και οι Mylonas et al. (2005), χρησιμοποιώντας ανάλογες ή και μεγαλύτερες δόσεις φαινοξυαιθανόλης στο λαβράκι, δεν παρατήρησαν



ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των χρόνων ανάνηψης. Ωστόσο, κατά την παρούσα έρευνα, η περαιτέρω αύξηση της δόσης στα 328,8 mg/l αύξησε σημαντικά τον χρόνο ανάνηψης. Δεν είναι σαφές πού οφείλεται αυτή η διαφορά μεταξύ των ευρημάτων μας και εκείνων των άλλων ερευνητών, αν και, ενδεχομένως, θα μπορούσε και αυτή να αποδοθεί, για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, στη διαφορά μεγέθους μεταξύ των ιχθυδίων και στη διαφορά θερμοκρασιών του νερού των δεξαμενών αναισθησίας. Εξάλλου, ανάλογα αντιφατικά ευρήματα όσον αφορά το χρόνο ανάνηψης έχουν αναφερθεί κατά τη χρήση της φαινοξυαιθανόλης και σε άλλα είδη ιχθύων, καθώς αύξηση της δόσης της δεν επηρέασε (Hseu et al. 1998), αύξησε (Josa et al. 1992, Hseu et al. 1994, Tsantilas et al. 2006) ή, αντίθετα, μείωσε τον χρόνο ανάνηψης (Weber et al. 2009b).

Η σημαντική αύξηση του χρόνου ανάνηψης και η εμφάνιση θνησιμότητας σε ποσοστό 30%, όταν η φαινοξυαιθανόλη χορηγήθηκε στη μεγαλύτερη εκ των τριών δόσεων που μελετήθηκαν, ήταν οι λόγοι για τους οποίους η δόση των 328,8 mg/l κρίθηκε ακατάλληλη. Εξάλλου, ο μεγάλος χρόνος εγκατάστασης ήταν ο λόγος για τον οποίο δεν προτιμήθηκε η μικρότερη δόση των 219,2 mg/l. Αντίθετα, η δόση των 274,0 mg/l συνδυάζει ταχεία εγκατάσταση και ανάνηψη και μηδενική θνησιμότητα και επιλέχθηκε ως η βέλτιστη εκ των τριών δόσεων, καθώς πληροί τα κριτήρια των Gilderhus & Marking (1987).

Τις τελευταίες δεκαετίες το γαριφαλέλαιο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μεγάλο αριθμό ειδών ιχθύων σε δόσεις οι οποίες, ανάλογα με τις ανάγκες, συνήθως κυμαίνονται από 25 έως 200 mg/l (Soto & Burhanuddin 1995, Anderson et al. 1997, Munday & Wilson 1997, Keene et al. 1998, Peake 1998, Waterstrat 1999, Cho & Heath 2000, Prince & Powell 2000, Tort et al. 2002, Walsh & Pease 2002, Iversen et al. 2003, Small 2003, Wagner et al. 2003, Hoskonen & Pirhonen 2004, Ross & Ross 2008, Park et al. 2009, Weber et al. 2009b). Στην παρούσα μελέτη η αύξηση της δόσης του γαριφαλέλαιου από τα 8,92 στα 13,38 mg/l μείωσε τον χρόνο εγκατάστασης της αναισθησίας από τα 4,64 στα 1,50 min, αλλά δεν επηρέασε ουσιαστικά τον χρόνο ανάνηψης. Αντίθετα, η περαιτέρω αύξηση της δόσης στα 17,85 mg/l δεν επηρέασε ουσιαστικά τον χρόνο εγκατάστασης, αλλά αύξησε σημαντικά τον χρόνο ανάνηψης. Γενικά, η αύξηση της χορηγούμενης δόσης του γαριφαλέλαιου, όπως και άλλων αναισθητικών ουσιών, συνοδεύεται συχνά από μείωση του χρόνου εγκατάστασης (Iversen et al. 2003, Mylonas et al. 2005, Park et al. 2009, Weber et al. 2009b), αν και

όχι πάντα (Tort et al. 2002). Εξάλλου, η αύξηση της χορηγούμενης δόσης μπορεί να αυξάνει (Tort et al. 2002, Park et al. 2009), να μην επηρεάζει (Tort et al. 2002, Mylonas et al. 2005, Weber et al. 2009b), ή να μειώνει το χρόνο ανάνηψης, όπως παρατήρησαν οι Mylonas et al. (2005) στο λαβράκι. Το τελευταίο αυτό φαινόμενο το απέδωσαν στο ότι οι ιχθύες, οι οποίοι είχαν εκτεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις γαριφαλέλαιου, απομακρύνθηκαν ταχύτερα από το αναισθητικό διάλυμα, με αποτέλεσμα να προσλάβουν τελικώς μικρότερη ποσότητα αναισθητικού (Mylonas et al. 2005). Επιπλέον, οι Mylonas et al. (2005) διαπίστωσαν ότι το γαριφαλέλαιο χορηγούμενο στο λαβράκι σε δόσεις 15, 25 και 50 mg/l εξασφάλισε εγκατάσταση αναισθησίας σε 10, 5 και 1,5 min, αντίστοιχα. Οι μικρές διαφορές μεταξύ αυτών των ευρημάτων των Mylonas et al. (2005) και των ευρημάτων της παρούσας έρευνας θα μπορούσαν ίσως να αποδοθούν στη διαφορά μεγέθους μεταξύ των ιχθυδίων (20,2 έναντι 36 g, αντίστοιχα) και στη διαφορά θερμοκρασιών του νερού των δεξαμενών αναισθησίας (19,4 έναντι 25°C, αντίστοιχα).

Η σημαντική αύξηση του χρόνου ανάνηψης και η εμφάνιση θνησιμότητας σε ποσοστό 30%, όταν το γαριφαλέλαιο χορηγήθηκε στη μεγαλύτερη εκ των τριών δόσεων που μελετήθηκαν, ήταν οι λόγοι για τους οποίους η δόση των 17,85 mg/l κρίθηκε ακατάλληλη. Εξάλλου, ο μεγάλος χρόνος εγκατάστασης ήταν ο λόγος για τον οποίο δεν προτιμήθηκε η μικρότερη δόση των 8,92 mg/l. Αντίθετα, η δόση των 13,38 mg/l συνδυάζει ταχεία εγκατάσταση και ανάνηψη και μηδενική θνησιμότητα και επιλέχθηκε ως η βέλτιστη εκ των τριών δόσεων, καθώς πληροί τα κριτήρια των Gilderhus & Marking (1987).

Από τη συγκριτική μελέτη των χρόνων εγκατάστασης και ανάνηψης κατά τη χρήση των βέλτιστων δόσεων της τρικαΐνης, της βενζοκαΐνης, της φαινοξυαιθανόλης ή του γαριφαλέλαιου στο εκτρεφόμενο λαβράκι φαίνεται ότι οι χρόνοι εγκατάστασης με την τρικαΐνη (1,28 min), τη φαινοξυαιθανόλη (1,49 min) ή το γαριφαλέλαιο (1,50 min) δεν διέφεραν μεταξύ τους, αλλά ήταν μικρότεροι από τον χρόνο εγκατάστασης με τη βενζοκαΐνη (2,25 min). Επίσης, οι χρόνοι ανάνηψης με την τρικαΐνη (0,52 min) ή τη βενζοκαΐνη (0,44 min) δεν διέφεραν μεταξύ τους, αλλά ήταν μικρότεροι από τον χρόνο ανάνηψης με το γαριφαλέλαιο (1,10 min) ή τη φαινοξυαιθανόλη (1,60 min). Συνεπώς, η τρικαΐνη στη δόση των 55 mg/l, συγκρινόμενη με τη βενζοκαΐνη, τη φαινοξυαιθανόλη ή το γαριφαλέλαιο στις βέλτιστες δόσεις τους, εξασφάλισε τον καλύτερο συνδυασμό ταχείας εγκατάστασης και ταχείας ανάνηψης από την αναισθησία και θα μπορούσε

ενδεχομένως να θεωρηθεί ως η πλέον κατάλληλη αναισθητική ουσία για το εκτρεφόμενο λαβράκι.

## **Π. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΤΗΣ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΗΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΛΟΣΗΣ ΤΗΣ ΤΡΙΚΑΪΝΗΣ, ΤΗΣ ΒΕΝΖΟΚΑΪΝΗΣ, ΤΗΣ ΦΑΙΝΟΞΥΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΓΑΡΙΦΑΛΕΛΑΙΟΥ ΣΤΟ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟ ΛΑΒΡΑΚΙ**

### **A. Υλικά και μέθοδοι**

#### **A.1. Ζωικό υλικό**

Κατά τον πειραματισμό, ο οποίος διενεργήθηκε στις αρχές Ιουνίου στον κρατικό ιχθυογεννητικό σταθμό της Πρέβεζας, χρησιμοποιήθηκαν 200 περίπου ιχθύδια του είδους *Dicentrarchus labrax*, ηλικίας 5,5 μηνών και σωματικού βάρους  $24,4 \pm 1,2$  g. Στην ηλικία αυτή δεν είναι δυνατός ο καθορισμός του φύλου από τα μακροσκοπικά και μόνο γνωρίσματα.

#### **A.2. Δεξαμενές εκτροφής**

Τα ιχθύδια χωρίστηκαν σε ισάριθμες ομάδες και κατανεμήθηκαν σε τέσσερις καναλόμορφες δεξαμενές (raceways) εντατικής εκτροφής, οι οποίες ήταν ίδιες και χρησιμοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο με εκείνες του προηγούμενου πειραματισμού. Η ιχθυοπυκνότητα ήταν  $0,152 \text{ kg/m}^3$ .

#### **A.3. Συνθήκες εκτροφής**

Κατά την εκτροφή των ιχθυδίων εφαρμόστηκαν, από κάθε άποψη, όλα όσα αναφέρθηκαν και κατά τον προηγούμενο πειραματισμό. Η θερμοκρασία του νερού ήταν  $21 \pm 0,5$  °C, η τιμή του pH  $8,04 \pm 0,01$  και η ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου  $8,9 \pm 0,3$  mg/l.

#### **A.4. Δεξαμενές αναισθησίας και δεξαμενές ανάνηψης**

Όσον αφορά τις δεξαμενές αναισθησίας και τις δεξαμενές ανάνηψης, εφαρμόστηκε ό,τι και κατά τον προηγούμενο πειραματισμό.

#### **A.5. Αναισθητικές ουσίες**

Τα μητρικά διαλύματα τρικαΐνης, βενζοκαΐνης, φαινοξυαιθανόλης και γαριφαλέλαιου παρασκευάστηκαν κατά τρόπο ανάλογο με αυτόν που περιγράφηκε κατά τον προηγούμενο πειραματισμό. Η τελική συγκέντρωση της κάθε αναισθητικής

ουσίας στην αντίστοιχη δεξαμενή αναισθησίας ήταν ίση με εκείνη που προσδιορίστηκε κατά τον προηγούμενο πειραματισμό ως η πλέον αποτελεσματική και ασφαλής, δηλαδή 55 mg/l για την τρικαΐνη, 30 mg/l για τη βενζοκαΐνη, 274 mg/l για τη φαινοξυαιθανόλη και 13,38 mg/l για το γαριφαλέλαιο.

#### **A.6. Πειραματικό πρωτόκολλο**

Η μελέτη διενεργήθηκε σε δύο φάσεις. Αρχικά ο χρόνος έκθεσης στην αναισθητική ουσία και άρα ο χρόνος αναισθησίας παρατάθηκε κατά 5 min και διερευνήθηκε η τυχόν επίδραση της παράτασης αυτής στην αποτελεσματικότητα και στην ασφάλεια της κάθε αναισθητικής ουσίας. Στη συνέχεια η μελέτη επαναλήφθηκε, αλλά με παράταση του χρόνου αναισθησίας κατά 60 min.

Κατά την πρώτη φάση της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις πλαστικές δεξαμενές αναισθησίας και τέσσερις πλαστικές δεξαμενές ανάνηψης, μία για κάθε αναισθητική ουσία. Σε κάθε δεξαμενή αναισθησίας τοποθετήθηκαν 100 l θαλασσινού νερού και ακολούθησε η προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας μητρικού διαλύματος της κάθε αναισθητικής ουσίας. Στη συνέχεια, σε κάθε δεξαμενή αναισθησίας μεταφέρθηκε προσεκτικά με τη βοήθεια απόχης από ένα ιχθύδιο από κάθε μία από τις δεξαμενές εκτροφής και καταγράφηκε ο χρόνος εγκατάστασης της αναισθησίας. Το ιχθύδιο παρέμεινε στη δεξαμενή αναισθησίας για άλλα 5 min και, στη συνέχεια, μεταφέρθηκε προσεκτικά με τη βοήθεια απόχης σε δεξαμενή ανάνηψης που περιείχε θαλασσινό νερό, στο οποίο δεν είχε προστεθεί αναισθητική ουσία. Στις δεξαμενές ανάνηψης καταγράφηκαν ο χρόνος ανάνηψης από την αναισθησία καθώς και ο αριθμός τυχόν θανάτων. Η μέτρηση των χρόνων εγκατάστασης και ανάνηψης γινόταν με ηλεκτρονικό χρονόμετρο ακρίβειας 0,01 sec. Η διαδικασία επαναλήφθηκε σε 9 ακόμη ιχθύδια από κάθε δεξαμενή εκτροφής, έτσι ώστε ο συνολικός αριθμός των ιχθυδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας κάθε μίας αναισθητικής ουσίας να ανέρχεται σε 10.

Κατά τη δεύτερη φάση της μελέτης έγινε ακριβώς η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι τα ιχθύδια που αναισθητοποιήθηκαν παρέμειναν στη δεξαμενή αναισθησίας για άλλα 60 min.

Μετά το πέρας όλων των παραπάνω πειραματισμών, τα ιχθύδια μεταφέρθηκαν σε δεξαμενές όμοιες με αυτές της ανάνηψης, ομαδοποιημένα κατά αναισθητική ουσία, και παρέμειναν εκεί για 5 ημέρες με σκοπό τον έλεγχο της βιωσιμότητας και της

συμπεριφοράς τους. Κατά το διάστημα αυτό τηρήθηκαν όλα όσα αναφέρθηκαν και κατά τον προηγούμενο πειραματισμό.

#### A.7. Στατιστική ανάλυση

Κατά τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που αφορούσαν την επίδραση της διάρκειας αναισθησίας στην αποτελεσματικότητα και στην ασφάλεια των αναισθητικών ουσιών εφαρμόστηκε ακριβώς ό,τι και κατά τον προηγούμενο πειραματισμό.

#### B. Αποτελέσματα

Οι νεκροσκοπικές, βακτηριολογικές, παρασιτολογικές και ιστολογικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν σε 10 ιχθύδια από κάθε δεξαμενή εκτροφής κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού, έδειξαν ότι όλα τα ιχθύδια ήταν υγιή. Ακόμη, ο τακτικός έλεγχος της υγείας τους με βάση τη συμπεριφορά και άλλα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά τους, κατά τη διάρκεια τόσο της περιόδου εγκλιματισμού όσο και των πρώτων 5 ημερών μετά την ανάνηψη από την αναισθησία, έδειξε ότι τα ιχθύδια παρέμεναν υγιή καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού.

**Πίνακας 13.** Επίδραση της αναισθησίας διάρκειας 5 και 60 min στο χρόνο ανάνηψης και στη θνησιμότητα του εκτρεφόμενου λαβρακιού (n=10)

Αναισθητική Ουσία	Δόση (mg/l)	Διάρκεια αναισθησίας (min)	Χρόνος εγκατάστασης (min)	Χρόνος ανάνηψης (min)	Θνησιμότητα (%)
Τρικάϊνη	55,00	5	1,29±0,20	0,46±0,10 <sup>a</sup>	0
		60	1,27±0,16	1,34±0,17 <sup>b</sup>	0
Βενζοκαϊνη	30,00	5	2,25±0,58	0,43±0,05 <sup>a</sup>	0
		60	2,23±0,61	1,17±0,05 <sup>b</sup>	0
Φαινοξυαιθανόλη	274,00	5	1,52±0,44	1,59±0,53 <sup>a</sup>	0
		60	1,53±0,46	2,75±0,51 <sup>b</sup>	0
Γαριφαλέλαιο	13,38	5	1,49±0,40	0,87±0,05 <sup>a</sup>	0
		60	1,51±0,46	3,36±0,70 <sup>b</sup>	0

Τιμές που αφορούν την ίδια αναισθητική ουσία και έχουν διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,039$ ) μεταξύ τους.

Η επίδραση της αναισθησίας διάρκειας 5 και 60 min στην αποτελεσματικότητα και στην ασφάλεια της τρικάϊνης, της βενζοκαϊνης, της φαινοξυαιθανόλης και του

γαριφαλέλαιου παρουσιάζεται στον Πίνακα 13. Από τη συγκριτική μελέτη και τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των Πινάκων 12 και 13 προκύπτει ότι η παράταση της αναισθησίας κατά 5 min δεν επηρέασε τον χρόνο ανάνηψης από την αναισθησία. Ωστόσο, η παράταση της αναισθησίας κατά 60 min προκάλεσε, με όλες τις αναισθητικές ουσίες, αύξηση ( $P \leq 0,039$ ) των χρόνων ανάνηψης που είχαν σημειωθεί αφενός κατά τον προηγούμενο πειραματισμό και αφετέρου όταν η αναισθησία παρατάθηκε κατά 5 min. Η παράταση της αναισθησίας κατά 5 ή 60 min δεν συνδυάστηκε με θνησιμότητα.

**Πίνακας 14.** Χρόνοι εγκατάστασης και ανάνηψης του εκτρεφόμενου λαβρακιού μετά από αναισθησία διάρκειας 5 min (n=10)

Αναισθητική ουσία	Δόση (mg/l)	Διάρκεια αναισθησίας (min)	Χρόνος εγκατάστασης (min)	Χρόνος ανάνηψης (min)
Τρικαΐνη	55,00	5	1,29±0,20 <sup>a</sup>	0,46±0,10 <sup>a</sup>
Βενζοκαΐνη	30,00	5	2,25±0,58 <sup>b</sup>	0,43±0,05 <sup>a</sup>
Φαινοξυαιθανόλη	274,00	5	1,52±0,44 <sup>a</sup>	1,59±0,53 <sup>b</sup>
Γαριφαλέλαιο	13,38	5	1,49±0,40 <sup>a</sup>	0,87±0,05 <sup>a</sup>

Τιμές στην ίδια στήλη με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,047$ ) μεταξύ τους.

Στους Πίνακες 14 και 15 παρατίθενται οι χρόνοι εγκατάστασης της αναισθησίας και ανάνηψης από αναισθησία διάρκειας 5 και 60 min, αντίστοιχα, που καταγράφηκαν κατά τη χρήση των βέλτιστων δόσεων της τρικαΐνης, της φαινοξυαιθανόλης, της βενζοκαΐνης ή του γαριφαλέλαιου. Οι χρόνοι εγκατάστασης της αναισθησίας με τρικαΐνη, φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο δεν διέφεραν μεταξύ τους, αλλά ήταν μικρότεροι στατιστικώς ( $P \leq 0,047$ ) και κλινικώς από τον χρόνο εγκατάστασης της αναισθησίας με βενζοκαΐνη. Μετά από αναισθησία διάρκειας 5 min, οι χρόνοι ανάνηψης μετά από χρήση τρικαΐνης ή βενζοκαΐνης δεν διέφεραν μεταξύ τους, ήταν όμως μικρότεροι κλινικώς, αλλά όχι στατιστικώς, από το χρόνο ανάνηψης μετά από χρήση γαριφαλέλαιου και μικρότεροι στατιστικώς ( $P \leq 0,043$ ) και κλινικώς από τον χρόνο ανάνηψης μετά από χρήση φαινοξυαιθανόλης. Εξάλλου, μικρότερος στατιστικώς

( $P=0,043$ ) και κλινικώς από τον χρόνο ανάνηψης μετά από χρήση φαινοξυαιθανόλης ήταν και ο χρόνος ανάνηψης μετά από χρήση γαριφαλέλαιου, μετά από αναισθησία διάρκειας 5 min, ενώ, αντίθετα, μετά από αναισθησία διάρκειας 60 min, ήταν μεγαλύτερος κλινικώς αν και όχι στατιστικώς. Τέλος, μετά από αναισθησία διάρκειας 60 min, οι χρόνοι ανάνηψης μετά από χρήση τρικαΐνης ή βενζοκαΐνης, επίσης δεν διέφεραν μεταξύ τους και ήταν μικρότεροι στατιστικώς ( $P\leq 0,01$ ) και κλινικώς από τους χρόνους ανάνηψης μετά από χρήση φαινοξυαιθανόλης ή γαριφαλέλαιου.

**Πίνακας 15.** Χρόνοι εγκατάστασης και ανάνηψης του εκτρεφόμενου λαβρακιού μετά από αναισθησία διάρκειας 60 min (n=10)

Αναισθητική ουσία	Δόση (mg/l)	Διάρκεια αναισθησίας (min)	Χρόνος εγκατάστασης (min)	Χρόνος ανάνηψης (min)
Τρικαΐνη	55,00	60	1,27±0,16 <sup>a</sup>	1,34±0,17 <sup>a</sup>
Βενζοκαΐνη	30,00	60	2,23±0,61 <sup>b</sup>	1,17±0,05 <sup>a</sup>
Φαινοξυαιθανόλη	274,00	60	1,53±0,46 <sup>a</sup>	2,75±0,51 <sup>b</sup>
Γαριφαλέλαιο	13,38	60	1,51±0,46 <sup>a</sup>	3,36±0,70 <sup>b</sup>

Τιμές στην ίδια στήλη με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P\leq 0,047$ ) μεταξύ τους.

## Γ. Συζήτηση

Αρκετές από τις ιχθυοκαλλιεργητικές παρεμβάσεις, για τις οποίες απαιτείται αναισθητοποίηση των ιχθύων, μπορούν να διενεργηθούν εντός 5 min. Ωστόσο, πολλές φορές, η αναισθησία διάρκειας 5 min αποδεικνύεται ανεπαρκής και απαιτείται παράτασή της. Για το λόγο αυτό διερευνήθηκε η επίδραση της διάρκειας της αναισθησίας στην αποτελεσματικότητα και στην ασφάλεια των αναισθητικών ουσιών στο λαβράκι.

Αν και στην παρούσα έρευνα, με όλες τις αναισθητικές ουσίες, η αναισθησία διάρκειας 60 min συνδυάστηκε με αυξημένο χρόνο ανάνηψης, η μέση τιμή του παρέμεινε χαμηλή, καθώς κυμάνθηκε από περίπου 1 έως 3,5 min, και δεν συνδυάστηκε με θνησιμότητα. Συνεπώς, η αναισθησία διάρκειας 60 min είναι απόλυτα ασφαλής στο λαβράκι με τις δόσεις που επιλέχθηκαν κατά τον προηγούμενο πειραματισμό.



Μέτρια αύξηση του χρόνου ανάνηψης, η οποία επίσης δεν συνδυάστηκε με θνησιμότητα, διαπίστωσαν στο λαβράκι και οι Mylonas et al. (2005) κατά την παράταση της αναισθησίας με φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο κατά 5, 10 και 15 min.

Η επίδραση της διάρκειας της αναισθησίας στο χρόνο ανάνηψης δεν είναι απόλυτα σαφής, καθώς υπάρχουν αντικρουόμενα ευρήματα. Γενικά, πιστεύεται ότι, συνήθως, η αύξηση της διάρκειας της αναισθησίας παρατείνει το χρόνο ανάνηψης, καθώς η συγκέντρωση κάποιων αναισθητικών ουσιών, όπως π.χ. η τρικαΐνη, συνεχίζει, καθ' όλη τη διάρκεια της αναισθησίας, να αυξάνεται στον εγκέφαλο και στις μυϊκές μάζες, παρά το ότι παραμένει πλέον σταθερή στο αίμα (Neiffer 2007). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ιδιαίτερα βαθιά αναισθησία, παρατεταμένο υποαερισμό, υποξία και θάνατο, ακόμη και κατά την περίοδο της ανάνηψης, οπότε οι ιχθύες έχουν πλέον απομακρυνθεί από το αναισθητικό διάλυμα (Neiffer 2007). Με βάση τόσο τα ευρήματα της παρούσας μελέτης όσο και εκείνα πολλών ερευνητών φαίνεται ότι όντως η παρατεταμένη αναισθησία ακολουθείται από παρατεταμένη ανάνηψη (Keene et al. 1998, Gomes et al. 2001, Mylonas et al. 2005). Ωστόσο, οι Weyl et al. (1996) διαπίστωσαν ότι ο χρόνος ανάνηψης ήταν ανεξάρτητος από τη διάρκεια της αναισθησίας και υποστήριξαν ότι η διάρκειά του καθορίζεται κυρίως από τη δόση της αναισθητικής ουσίας και όχι από τη διάρκεια της αναισθησίας. Ο συνδυασμός των ευρημάτων του πρώτου και του δεύτερου πειραματισμού της παρούσας έρευνας φαίνεται να υποστηρίζει την άποψη αυτή, καθώς ο μέσος χρόνος ανάνηψης ήταν πιο παρατεταμένος, κυμαινόμενος από 4,2 έως 7,6 min, όταν χρησιμοποιήθηκαν οι μεγαλύτερες δόσεις των αναισθητικών ουσιών για εγκατάσταση και μόνο της αναισθησίας, παρά όταν χρησιμοποιήθηκαν οι ενδιάμεσες δόσεις και η αναισθησία παρατάθηκε για 60 min. Οι Weyl et al. (1996) υποστήριξαν την άποψή τους και με βάση τα ευρήματα του Bonath (1977), ο οποίος παρατήρησε ότι ο πενταπλασιασμός της διάρκειας της αναισθησίας δεν επηρέασε τον χρόνο ανάνηψης. Πάντως, παράγοντες όπως τα χαρακτηριστικά της κάθε αναισθητικής ουσίας, οι διαφορές της φυσιολογίας μεταξύ των ειδών των ιχθύων, το σωματικό βάρος και η θερμοκρασία του νερού ενδέχεται να παίζουν επίσης ρόλο και να ευθύνονται για τα αντικρουόμενα ευρήματα.

Όπως διαπιστώθηκε και κατά τον προηγούμενο πειραματισμό της παρούσας μελέτης, οι χρόνοι ανάνηψης μετά από χρήση τρικαΐνης ή βενζοκαΐνης δεν διέφεραν μεταξύ τους, ήταν όμως μικρότεροι από τους χρόνους ανάνηψης μετά από χρήση φαινοξυαιθανόλης ή γαριφαλέλαιου. Εξάλλου, μετά από αναισθησία διάρκειας 5 min, ο

χρόνος ανάνηψης μετά από χρήση γαριφαλέλαιου ήταν μικρότερος από τον χρόνο ανάνηψης μετά από χρήση φαινοξυαιθανόλης, ενώ, αντίθετα, μετά από αναισθησία διάρκειας 60 min, ήταν μεγαλύτερος κλινικώς αν και όχι στατιστικώς από τον χρόνο ανάνηψης μετά από χρήση φαινοξυαιθανόλης. Οι Mylonas et al. (2005), μετά από αναισθησία διάρκειας 5, 10 και 15 min, κατέγραψαν στο λαβράκι μεγαλύτερους χρόνους ανάνηψης μετά τη χρήση γαριφαλέλαιου, σε σχέση με τη χρήση φαινοξυαιθανόλης, ενώ και άλλοι ερευνητές έχουν αναφέρει ότι οι χρόνοι ανάνηψης είναι πιο παρατεταμένοι μετά από χρήση γαριφαλέλαιου συγκρινόμενοι με τους χρόνους ανάνηψης μετά από χρήση άλλων αναισθητικών ουσιών σε διάφορα είδη ιχθύων (Anderson et al. 1997, Munday & Wilson 1997, Keene et al. 1998, Prince & Powell 2000, Sladky et al. 2001, Wagner et al. 2002). Δεν είναι γνωστό πού οφείλεται η καθυστερημένη ανάνηψη μετά από αναισθησία με γαριφαλέλαιο. Οι Keene et al. (1998), συγκρίνοντας τους χρόνους ανάνηψης μετά από αναισθησία με τρικαΐνη ή γαριφαλέλαιο σε ιριδιζούσα πέστροφα, υπέθεσαν ότι η μεταξύ τους διαφορά ίσως να οφείλεται σε έντονη καταστολή του αναπνευστικού συστήματος από το γαριφαλέλαιο, με αποτέλεσμα τη μείωση του αναπνευστικού ρυθμού και, κατ' επέκταση, τη βραδύτερη απομάκρυνσή του από τον οργανισμό. Ωστόσο, καταστολή του αναπνευστικού συστήματος μπορεί να προκληθεί από όλες τις χρησιμοποιούμενες στους ιχθύς αναισθητικές ουσίες και, φυσικά, και από την τρικαΐνη, οπότε το αίτιο της καθυστερημένης ανάνηψης μετά από αναισθησία με γαριφαλέλαιο ίσως θα πρέπει να αναζητηθεί αλλού.

Στην παρούσα μελέτη η παράταση της αναισθησίας κατά 5 ή 60 min δεν συνοδεύτηκε από θνησιμότητα. Αυτό θα πρέπει μάλλον να αποδοθεί στο ότι χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεκριμένες και όχι μεγαλύτερες δόσεις αναισθητικών και όχι τόσο στο ότι οι μέσοι χρόνοι ανάνηψης, αν και παρατάθηκαν, δεν ξεπέρασαν τα 3,5 min. Θνησιμότητα στο λαβράκι δεν διαπίστωσαν ούτε οι Mylonas et al. (2005) κατά την παράταση της αναισθησίας με φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο κατά 5, 10 και 15 min. Αντίθετα, οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν, με τις ίδιες συνθήκες πειραματισμού, υψηλή θνησιμότητα, η οποία, μάλιστα, συνδυάστηκε με αυξημένο χρόνο ανάνηψης, στην τσιπούρα (Mylonas et al. 2005), γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι οι διαφορές της φυσιολογίας μεταξύ των ειδών των ιχθύων πιθανώς επηρεάζουν το χρόνο ανάνηψης και τη θνησιμότητα. Ανάλογες διαφορές στην αντοχή διαφορετικών ειδών ιχθύων στην παρατεταμένη αναισθησία και στα ποσοστά θνησιμότητας διαπιστώθηκαν και από

άλλους ερευνητές (Endo et al. 1972, Taylor & Roberts 1999). Οι Tsantilas et al. (2006) παρατήρησαν σε σαργό (*Diplodus sargus*) και χιόνα (*Diplodus puntazzo*) που αναισθητοποιήθηκαν για 60 min με φαινοξυαιθανόλη, ότι, όταν χρησιμοποιήθηκαν σχετικά υψηλές δόσεις, εμφανίστηκε μέτρια (20-40%) έως υψηλή (60-70%) θνησιμότητα, η οποία, τις περισσότερες φορές, συνδυάστηκε με χρόνο ανάνηψης που κυμάνθηκε από  $6,13 \pm 0,15$  min έως  $6,56 \pm 0,17$  min και από  $6,21 \pm 0,14$  min έως  $7,25 \pm 0,24$  min, αντίστοιχα. Ωστόσο, με βάση τα ευρήματά τους, απέδωσαν την αύξηση του ποσοστού θνησιμότητας και την παράταση του χρόνου ανάνηψης στην υψηλή δόση της φαινοξυαιθανόλης και όχι το ένα στο άλλο (Tsantilas et al. 2006). Τόσο τα ευρήματα αυτά των Tsantilas et al. (2006) όσο και τα ανωτέρω αναφερθέντα ευρήματα των Mylonas et al. (2005) υποδηλώνουν ότι η υψηλή θνησιμότητα συνδυάζεται με παρατεταμένη ανάνηψη, αλλά όχι και ότι είναι αποτέλεσμα αυτής.

Τέλος, ο πειραματισμός αυτός φαίνεται να επιβεβαιώνει το συμπέρασμα που προέκυψε από τον προηγούμενο πειραματισμό, δηλαδή ότι η τρικαΐνη θα μπορούσε ενδεχομένως να θεωρηθεί ως η πλέον κατάλληλη αναισθητική ουσία για το εκτρεφόμενο λαβράκι, καθώς στη δόση των 55 mg/l, συγκρινόμενη με τη βενζοκαΐνη, τη φαινοξυαιθανόλη ή το γαριφαλέλαιο στις βέλτιστες δόσεις τους, εξασφάλισε και πάλι τον καλύτερο συνδυασμό ταχείας εγκατάστασης και ταχείας ανάνηψης από την αναισθησία.

### **ΙΙΙ. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΒΟΛΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΜΕ ΤΡΙΚΑΪΝΗ, BENZOKΑΪΝΗ, ΦΑΙΝΟΞΥΑΙΘΑΝΟΛΗ Η ΓΑΡΙΦΑΛΕΛΑΙΟ, ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΤΗΣ, ΣΤΟΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟΥ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ**

#### **A. Υλικά και μέθοδοι**

##### **A.1. Ζωικό υλικό**

Κατά τον πειραματισμό, ο οποίος διενεργήθηκε στις αρχές Ιουλίου στον κρατικό ιχθυογεννητικό σταθμό της Πρέβεζας, χρησιμοποιήθηκαν 200 περίπου ιχθύδια του είδους *Dicentrarchus labrax*, ηλικίας 6,5 μηνών και σωματικού βάρους  $27,2 \pm 1,5$  g. Στην ηλικία αυτή δεν είναι δυνατός ο καθορισμός του φύλου από τα μακροσκοπικά και μόνο γνωρίσματα.

##### **A.2. Δεξαμενές εκτροφής**

Τα ιχθύδια χωρίστηκαν σε ισάριθμες ομάδες και κατανεμήθηκαν σε δύο καναλόμορφες δεξαμενές (raceways) εντατικής εκτροφής, οι οποίες ήταν ίδιες και χρησιμοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο με εκείνες των προηγούμενων πειραματισμών. Η ιχθυοπυκνότητα ήταν  $0,34 \text{ kg/m}^3$ .

##### **A.3. Συνθήκες εκτροφής**

Κατά την εκτροφή των ιχθυδίων εφαρμόστηκαν, από κάθε άποψη, όλα όσα αναφέρθηκαν και κατά τους προηγούμενους πειραματισμούς. Η θερμοκρασία του νερού ήταν  $21,4 \pm 0,4^\circ\text{C}$ , η τιμή του pH  $8,02 \pm 0,02$  και η ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου  $8,8 \pm 0,2 \text{ mg/l}$ .

##### **A.4. Δεξαμενές αναισθησίας και δεξαμενές ανάνηψης**

Όσον αφορά τις δεξαμενές αναισθησίας και τις δεξαμενές ανάνηψης, εφαρμόστηκε ό,τι και κατά τους προηγούμενους πειραματισμούς, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν 5 και όχι 4 δεξαμενές.

#### **A.5. Αναισθητικές ουσίες**

Τα μητρικά διαλύματα τρικαΐνης, βενζοκαΐνης, φαινοξυαιθανόλης και γαριφαλέλαιου παρασκευάστηκαν κατά τρόπο ανάλογο με αυτόν που περιγράφηκε κατά τον πρώτο πειραματισμό. Η τελική συγκέντρωση της κάθε αναισθητικής ουσίας στην αντίστοιχη δεξαμενή αναισθησίας ήταν ίση με εκείνη που προσδιορίστηκε κατά τον πρώτο πειραματισμό ως η πλέον αποτελεσματική και ασφαλής, δηλαδή 55 mg/l για την τρικαΐνη, 30 mg/l για τη βενζοκαΐνη, 274 mg/l για τη φαινοξυαιθανόλη και 13,38 mg/l για το γαριφαλέλαιο.

#### **A.6. Πειραματικό πρωτόκολλο**

Η μελέτη διενεργήθηκε σε δύο φάσεις. Αρχικά διερευνήθηκε η επίδραση της αναισθησίας με τρικαΐνη, βενζοκαΐνη, φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο, και διάρκειας 5 min, πέραν του χρόνου εγκατάστασης, στον περιορισμό του στρες και στο ανοσοποιητικό σύστημα του εκτρεφόμενου λαβρακιού. Στη συνέχεια η μελέτη επαναλήφθηκε, αλλά με αναισθησία διάρκειας 60 min, πέραν του χρόνου εγκατάστασης. Για τους λόγους που αναπτύχθηκαν κατά τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, ως δείκτες εκτίμησης του στρες και της κατάστασης του ανοσοποιητικού συστήματος χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης, της γλυκόζης και των πρωτεϊνών του πλάσματος καθώς και η συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου στα λευκοκύτταρα του πρόσθιου τμήματος των νεφρών.

Χρησιμοποιήθηκαν πέντε πλαστικές δεξαμενές αναισθησίας, οι τέσσερις για τη μελέτη της επίδρασης των αναισθητικών ουσιών και η πέμπτη για τη μελέτη της επίδρασης μόνο της διαδικασίας της αναισθητοποίησης. Σε κάθε δεξαμενή αναισθησίας τοποθετήθηκαν 100 l θαλασσινού νερού και στις τέσσερις από αυτές έγινε προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας μητρικού διαλύματος της κάθε αναισθητικής ουσίας. Στην πέμπτη δεξαμενή δεν προστέθηκε αναισθητική ουσία.

Κατά την πρώτη φάση της μελέτης, 6 ιχθύδια λαμβάνονταν με απόχες από την πρώτη δεξαμενή εκτροφής. Ένα από αυτά, το οποίο χρησίμευε ως μάρτυρας της δεξαμενής εκτροφής (Μάρτυρας 1), υποβαλλόταν αμέσως σε λήψη 1 ml αίματος από την ουραία φλέβα με σύριγγα ινσουλίνης, προκειμένου να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης, της γλυκόζης και των πρωτεϊνών, και, στη συνέχεια, σε άσηπτη εξαγωγή του νεφρών, προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου, η οποία εκφράζει την οξειδωτική δραστηριότητα που είναι ευρύτερα

γνωστή στη διεθνή βιβλιογραφία ως “respiratory burst activity”. Τα άλλα 5 ιχθύδια μεταφέρονταν προσεκτικά με τη βοήθεια απόχης από ένα σε κάθε μία από τις πέντε δεξαμενές αναισθησίας, εκ των οποίων, όπως αναφέρθηκε, μόνο τέσσερις περιείχαν αναισθητική ουσία. Σε κάθε μία από τις τέσσερις αυτές δεξαμενές το κάθε ένα από τα ιχθύδια παρέμενε για 5 min μετά την είσοδό του στο στάδιο της ελαφράς αναισθησίας. Στην πέμπτη δεξαμενή, η οποία δεν περιείχε αναισθητική ουσία, το ιχθύδιο, το οποίο χρησίμευε ως μάρτυρας της διαδικασίας της αναισθητοποίησης (Μάρτυρας 2), παρέμενε για 6,5 min, επειδή ο μέσος χρόνος εγκατάστασης της αναισθησίας με κάθε μία από τις αναισθητικές ουσίες που εξετάστηκαν ήταν περίπου 1,5 min. Ακολουθούσε λήψη 1 ml αίματος από την ουραία φλέβα των 5 ιχθυδίων με σύριγγα ινσουλίνης και, στη συνέχεια, άσηπτη εξαγωγή των νεφρών. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 9 ακόμη φορές, έτσι ώστε ο συνολικός αριθμός των ιχθυδίων που χρησιμοποιήθηκαν να ανέρχεται σε 60. Κατά τη δεύτερη φάση της μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν τα ιχθύδια της δεύτερης δεξαμενής εκτροφής και εφαρμόστηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία, με τη διαφορά ότι τα ιχθύδια παρέμεναν στις δεξαμενές αναισθησίας που περιείχαν αναισθητική ουσία επί 60 min μετά την είσοδό τους στο στάδιο της ελαφράς αναισθησίας, και στη δεξαμενή αναισθησίας που δεν περιείχε αναισθητική ουσία επί 61,5 min. Κάθε φορά η όλη διαδικασία γινόταν την ίδια ώρα της ημέρας.

Όλα τα δείγματα αίματος αφήνονταν σε ηρεμία για 30 min και, στη συνέχεια, υποβάλλονταν σε φυγοκέντρηση  $1.300 \times g$  για 10 min. Ο ορός που προέκυπτε φυλασσόταν σε καταψύκτη, ο οποίος εξασφάλιζε θερμοκρασία  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , μέχρι να διενεργηθεί η μέτρηση της κορτιζόλης, της γλυκόζης και των πρωτεϊνών. Τα δείγματα νεφρών τοποθετούνταν σε διάλυμα τύπου L-15 (Leibovitz, Gibco) και μεταφέρονταν, σε συνθήκες ψύξης στους  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , στο Ινστιτούτο ΠΑΣΤΕΡ της Αθήνας για ανάλυση.

#### **A.7. Προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης, της γλυκόζης, των πρωτεϊνών και των ριζών σουπεροξειδίου**

Οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης μετρήθηκαν με την ανοσοενζυμική δοκιμή ELISA (Immulite Cortisol 1000 DPC, Los Angeles, CA, USA). Η δοκιμή αυτή είχε ευαισθησία μέτρησης 2 ng κορτιζόλης/ml στην περιοχή 10-500 ng κορτιζόλης/ml, διακύμανση μεταξύ των μετρήσεων 7,2-9,4% και ανάκτηση 89-102% (Palić et al. 2006). Οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης και των πρωτεϊνών μετρήθηκαν σε

αυτοματοποιημένη συσκευή βιοχημικών αναλύσεων (ADVIA 1200, BAYER, Germany).

Πριν από τη μέτρηση της συγκέντρωσης των ριζών σουπεροξειδίου, η οποία έγινε με φωτομετρική μέθοδο, απομονώθηκαν τα λευκοκύτταρα του πρόσθιου τμήματος των νεφρών. Για την απομόνωση των κυττάρων, ακολουθήθηκε η μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Neumann et al. (1995) και Neumann & Belosevic (1996). Σύμφωνα με αυτή, μετά τη θανάτωση των ιχθυδίων, γίνεται άσηπτη εξαγωγή του πρόσθιου μέρους των νεφρών, το οποίο τοποθετείται σε διάλυμα τύπου L-15 (Leibovitz, Gibco), το οποίο περιέχει 2% ορού εμβρύου μόσχου (Foetal Calf Serum, Gibco), 1% διαλύματος πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Gibco) και 20 UI/ml ηπαρίνης (Sigma Chemicals Ltd), και διατηρείται υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία ψύξης (3-4 °C). Το εναιώρημα αυτό υποβάλλεται σε διήθηση, με συμπίεση, μέσα από αποστειρωμένο μεταλλικό ηθμό και, στη συνέχεια, σε δύο διαδοχικές καθιζήσεις με τη βοήθεια ψυχρού διαλύματος L-15, έτσι ώστε να παραληφθεί ο κατά το δυνατόν μεγαλύτερος αριθμός των απομονωμένων κυττάρων. Το εναιώρημα αυτό των κυττάρων υποβάλλεται σε φυγοκέντρωση σε 800 x g για 7 min και, στη συνέχεια, απορρίπτεται η υπερκείμενη φάση, προστίθενται 5 ml διαλύματος L-15 και ακολουθεί μεταφορά του νέου εναιωρήματος σε σωλήνα φυγοκέντρωσης, ο οποίος περιέχει 4 ml 51% Percoll (Pharmacia). Για το διαχωρισμό των λευκοκυττάρων από τα ερυθροκύτταρα, ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 400 x g για 25 min, οπότε και παραλαμβάνονται τα διαχωρισθέντα λευκοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά υποβάλλονται δύο φορές σε έκπλυση με διάλυμα L-15 που περιέχει 0,1% ορού εμβρύου μόσχου, 1% διαλύματος πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης και 20 UI/ml ηπαρίνης. Μετά την έκπλυση, τα λευκοκύτταρα αραιώνονται με διάλυμα L-15 που περιέχει 10% ορού εμβρύου μόσχου και 1% διαλύματος πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης, έτσι ώστε η συγκέντρωση των λευκοκυττάρων να είναι  $2 \times 10^6$  κύτταρα/ml. Για τον προσδιορισμό του αριθμού των ζώντων κυττάρων εφαρμόστηκε χρώση με 0,4% Trypan-Blue, η οποία χρωματίζει μωβ-μπλε τα νεκρά κύτταρα και κίτρινα τα ζώντα κύτταρα, και η αρίθμηση των κυττάρων διενεργήθηκε με τη βοήθεια αιμοκυτταρομέτρου.

Για τον προσδιορισμό της συγκεντρώσεως των ριζών σουπεροξειδίου στα κύτταρα, τα οποία απομονώθηκαν με την παραπάνω διαδικασία, εφαρμόστηκε η μέθοδος των Rook et al. (1985). Σύμφωνα με αυτή, ποσότητες 100 μl από τα δείγματα τοποθετούνται σε δύο γειτονικά βοηθία συσκευής ELISA των 96 βοηθίων. Στη συνέχεια, προστίθενται

στο πρώτο βοθρίο 50 μl διαλύματος nitroblue tetrazolium (NBT) συγκέντρωσης 2 mg/ml (Sigma Chem, USA) και 50 μl διαλύματος L-15, ενώ στο δεύτερο βοθρίο 50 μl διαλύματος NBT και 50 μl διαλύματος phorbol myristate acetate (PMA) συγκέντρωσης 50 ng/ml (Sigma Chem, USA). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 200 x g για 2 min και, μετά την καθίζηση των κυττάρων, επώαση για 25 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το τέλος της επώασης, το υπερκείμενο υγρό κάθε βοθρίου απομακρύνεται προσεκτικά και ακολουθεί προσθήκη 200 μl 70% μεθανόλης για τη μονιμοποίηση των κυττάρων. Η μεθανόλη απομακρύνεται και η διαδικασία έκπλυσής της επαναλαμβάνεται άλλες 4 φορές, έτσι ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το NBT που δεν ανάχθηκε σε φορμαζάνη. Η φορμαζάνη διαλύεται σε 60 μl 2 M KOH υπό έντονη ανάδευση, έτσι ώστε να διαλυθεί όλη η ποσότητα, και ακολουθεί προσθήκη στα βοθρία 70 μl διμεθυλοσουλφοξειδίου. Η συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου προσδιορίζεται με βάση τις τιμές απορρόφησης του περιεχομένου των βοθρίων στα 620 nm.

Το διάλυμα NBT παρασκευάστηκε διαλύοντας 1 mg NBT σε 0,5 ml διμεθυλοσουλφοξειδίου/L-15 (20:80, v/v) στους 50 °C και αναμιγνύοντας το διάλυμα αυτό με άλλο που παρασκευάστηκε διαλύοντας 1 mg NBT σε 0,5 ml διμεθυλοσουλφοξειδίου (Merck, Germany). Το PMA παρασκευάστηκε διαλύοντας 1 mg PMA σε 1 ml διμεθυλοσουλφοξειδίου και αραιώνοντας κατάλληλα με διάλυμα L-15.

#### **A.8. Στατιστική ανάλυση**

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που αφορούσαν την επίδραση της αναισθησίας και της διάρκειάς της στον περιορισμό του στρες και στο ανοσοποιητικό σύστημα του εκτρεφόμενου λαβρακιού εφαρμόστηκε ακριβώς ό,τι και κατά τους προηγούμενους πειραματισμούς. Οι τιμές των συγκεντρώσεων κορτιζόλης, γλυκόζης, πρωτεϊνών και ριζών σουπεροξειδίου εκφράζονται ως αριθμητικός μέσος και τυπική απόκλιση του μέσου.

#### **B. Αποτελέσματα**

Οι νεκροσκοπικές, βακτηριολογικές, παρασιτολογικές και ιστολογικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν σε 10 ιχθύδια από κάθε δεξαμενή εκτροφής κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού, έδειξαν ότι όλα τα ιχθύδια ήταν υγιή. Ακόμη, ο τακτικός



έλεγχος της υγείας τους κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού έδειξε ότι τα ιχθύδια παρέμεναν υγιή καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού.

Στους Πίνακες 16 και 17 παρουσιάζεται η επίδραση της αναισθησίας με τρικαΐνη, βενζοκαΐνη, φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο, και διάρκειας 5 min και 60 min, αντίστοιχα, στις συγκεντρώσεις της κορτιζόλης, της γλυκόζης, των πρωτεϊνών και των ριζών σουπεροξειδίου.

**Πίνακας 16.** Επίδραση της αναισθησίας διάρκειας 5 min στις συγκεντρώσεις της κορτιζόλης, της γλυκόζης, των πρωτεϊνών και των ριζών σουπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) (n=10)

	<b>Κορτιζόλη (<math>\mu\text{g/dl}</math>)</b>	<b>Γλυκόζη (<math>\text{mg/dl}</math>)</b>	<b>Πρωτεΐνες (<math>\text{g/dl}</math>)</b>	<b>Ρίζες σουπεροξειδίου</b>
Μάρτυρες 1 (δεξαμενής εκτροφής)	30,2±4,2 <sup>a</sup>	153,6±4,5 <sup>a</sup>	3,9±0,6 <sup>a</sup>	0,122±0,010 <sup>a</sup>
Μάρτυρες 2 (διαδικασίας αναισθητοποίησης)	49,0±2,4 <sup>b</sup>	181,3±3,4 <sup>b,c</sup>	4,1±0,5 <sup>a</sup>	0,112±0,021 <sup>a</sup>
Τρικαΐνη (55 mg/l)	34,5±3,2 <sup>a</sup>	191,7±4,6 <sup>e</sup>	4,0±0,5 <sup>a</sup>	0,133±0,016 <sup>a</sup>
Βενζοκαΐνη (30 mg/l)	57,4±2,3 <sup>c</sup>	210,4±3,9 <sup>d</sup>	4,0±0,5 <sup>a</sup>	0,092±0,015 <sup>a</sup>
Φαινοξυαιθανόλη (274 mg/l)	34,4±2,7 <sup>a</sup>	170,7±3,6 <sup>b,c</sup>	3,9±0,5 <sup>a</sup>	0,127±0,014 <sup>a</sup>
Γαριφαλέλαιο (13,38 mg/l)	29,9±3,8 <sup>a</sup>	161,2±3,5 <sup>a,c</sup>	4,0±0,5 <sup>a</sup>	0,119±0,026 <sup>a</sup>

Τιμές στην ίδια στήλη με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,01$ ) μεταξύ τους.

Από τον Πίνακα 16 φαίνεται ότι τα ιχθύδια που μεταφέρθηκαν από τη δεξαμενή εκτροφής στη δεξαμενή αναισθησίας χωρίς να αναισθητοποιηθούν (Μάρτυρες 2), παρουσίασαν σημαντική αύξηση ( $P \leq 0,01$ ) των συγκεντρώσεων **κορτιζόλης** σε σχέση με τους Μάρτυρες 1. Αντίθετα, τα ιχθύδια, τα οποία, αφού μεταφέρθηκαν στη δεξαμενή αναισθησίας, υποβλήθηκαν σε αναισθησία διάρκειας 5 min με τρικαΐνη, φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο παρουσίασαν μειωμένες ( $P \leq 0,01$ ) συγκεντρώσεις κορτιζόλης σε σχέση με τους Μάρτυρες 2. Οι συγκεντρώσεις αυτές δεν διέφεραν μεταξύ τους ούτε παρουσίαζαν διαφορές από τη συγκέντρωση της κορτιζόλης στους

Μάρτυρες 1. Σε αντιδιαστολή με τις τρεις αυτές αναισθητικές ουσίες, κατά την αναισθησία με βενζοκαΐνη η συγκέντρωση της κορτιζόλης ήταν υψηλή ( $P=0,008$ ) ξεπερνώντας ακόμη και αυτή των Μαρτύρων 2.

**Πίνακας 17.** Επίδραση της αναισθησίας διάρκειας 60 min στις συγκεντρώσεις της κορτιζόλης, της γλυκόζης, των πρωτεϊνών και των ριζών σουπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) (n=10)

	<b>Κορτιζόλη (<math>\mu\text{g/dl}</math>)</b>	<b>Γλυκόζη (<math>\text{mg/dl}</math>)</b>	<b>Πρωτεΐνες (<math>\text{g/dl}</math>)</b>	<b>Ρίζες σουπεροξειδίου</b>
Μάρτυρες 1 (δεξαμενής εκτροφής)	30,2±4,2 <sup>a</sup>	153,6±4,5 <sup>a</sup>	3,9±0,6 <sup>a</sup>	0,122±0,010 <sup>a</sup>
Μάρτυρες 2 (διαδικασίας αναισθητοποίησης)	51,1±3,1 <sup>b</sup>	185,3±6,0 <sup>b,e</sup>	4,1±0,5 <sup>a</sup>	0,119±0,014 <sup>a</sup>
Τρικαΐνη (55 mg/l)	51,5±4,5 <sup>b</sup>	191,8±5,2 <sup>c</sup>	4,0±0,5 <sup>a</sup>	0,124±0,018 <sup>a</sup>
Βενζοκαΐνη (30 mg/l)	64,4±3,4 <sup>c</sup>	216,7±6,9 <sup>d</sup>	4,0±0,5 <sup>a</sup>	0,064±0,012 <sup>b</sup>
Φαινοξυαιθανόλη (274 mg/l)	47,3±3,5 <sup>b</sup>	176,2±4,6 <sup>b,c</sup>	4,1±0,5 <sup>a</sup>	0,116±0,018 <sup>a</sup>
Γαριφαλέλαιο (13,38 mg/l)	46,5±3,2 <sup>b</sup>	166,2±4,4 <sup>a,c</sup>	4,1±0,5 <sup>a</sup>	0,128±0,016 <sup>a</sup>

Τιμές στην ίδια στήλη με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P\leq 0,01$ ) μεταξύ τους.

Από τον Πίνακα 17 φαίνεται ότι η παράταση της απλής παραμονής στη δεξαμενή αναισθησίας κατά 60 min (Μάρτυρες 2) συνοδεύτηκε από υψηλότερη ( $P\leq 0,01$ ) συγκέντρωση κορτιζόλης από αυτή των Μαρτύρων 1. Συγκεντρώσεις κορτιζόλης μεγαλύτερες ( $P\leq 0,01$ ) από εκείνη των Μαρτύρων 1, οι οποίες μάλιστα δεν διέφεραν μεταξύ τους ούτε από τη συγκέντρωση της κορτιζόλης στους Μάρτυρες 2, παρουσίασαν επίσης και όλα τα ιχθύδια που υποβλήθηκαν σε αναισθησία διάρκειας 60 min με τρικαΐνη, φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο. Αντίθετα, κατά την αναισθησία με βενζοκαΐνη η συγκέντρωση της κορτιζόλης ήταν υψηλότερη ( $P\leq 0,01$ ) τόσο από αυτή των Μαρτύρων 2 όσο και από εκείνες που παρατηρήθηκαν κατά τη χρήση των τριών άλλων αναισθητικών ουσιών.

Στον Πίνακα 18 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης κατά την αναισθησία διάρκειας 5 και 60 min. Αν και η παράταση, από 5 σε 60 min, της απλής παραμονής στη δεξαμενή αναισθησίας δεν επηρέασε τις συγκεντρώσεις της κορτιζόλης, η παράταση της αναισθησίας κατά το ίδιο χρονικό διάστημα με όλες τις αναισθητικές ουσίες συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση ( $P \leq 0,01$ ) των συγκεντρώσεών της.

**Πίνακας 18.** Επίδραση της αναισθησίας διάρκειας 5 και 60 min στη συγκέντρωση της κορτιζόλης (n=10)

	Κορτιζόλη (μg/dl)	
	5 min	60 min
Μάρτυρες 2 (διαδικασίας αναισθητοποίησης)	49,0±2,4 <sup>a</sup>	51,1±3,1 <sup>a</sup>
Τρικαΐνη (55 mg/l)	34,5±3,2 <sup>a</sup>	51,5±4,5 <sup>b</sup>
Βενζοκαΐνη (30 mg/l)	57,4±2,3 <sup>a</sup>	64,4±3,4 <sup>b</sup>
Φαινοξυαιθανόλη (274,00 mg/l)	34,4±2,7 <sup>a</sup>	47,3±3,5 <sup>b</sup>
Γαριφαλέλαιο (13,38 mg/l)	29,9±3,8 <sup>a</sup>	46,5±3,2 <sup>b</sup>

Τιμές στην ίδια γραμμή με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,01$ ) μεταξύ τους.

Από τον Πίνακα 16 φαίνεται, επιπλέον, ότι τα ιχθύδια που μεταφέρθηκαν από τη δεξαμενή εκτροφής στη δεξαμενή αναισθησίας χωρίς να αναισθητοποιηθούν (Μάρτυρες 2), παρουσίασαν μεγαλύτερες ( $P \leq 0,01$ ) συγκεντρώσεις γλυκόζης σε σχέση με τους Μάρτυρες 1. Τα ιχθύδια, τα οποία υποβλήθηκαν σε αναισθησία διάρκειας 5 min με τρικαΐνη ή φαινοξυαιθανόλη, παρουσίασαν συγκεντρώσεις γλυκόζης οι οποίες, ενώ διέφεραν σημαντικά ( $P \leq 0,01$ ) μεταξύ τους και από εκείνες των Μαρτύρων 1, δεν παρουσίαζαν σημαντική διαφορά από εκείνες των Μαρτύρων 2. Αντίθετα, τα ιχθύδια που υποβλήθηκαν σε αναισθησία διάρκειας 5 min με βενζοκαΐνη ή γαριφαλέλαιο, παρουσίασαν συγκεντρώσεις γλυκόζης οι οποίες διέφεραν σημαντικά ( $P \leq 0,01$ ) μεταξύ τους και ήταν μεγαλύτερες ή μικρότερες ( $P \leq 0,01$ ), αντίστοιχα, από εκείνη των Μαρτύρων 2, ενώ τα ιχθύδια που αναισθητοποιήθηκαν με βενζοκαΐνη παρουσίασαν συγκεντρώσεις γλυκόζης οι οποίες ήταν μεγαλύτερες ( $P \leq 0,01$ ) και από των Μαρτύρων 1. Εξάλλου, όπως φαίνεται από τον Πίνακα 17, ακριβώς ανάλογες διαφορές παρατηρήθηκαν και όταν η αναισθησία διήρκεσε 60 min. Τέλος, στον Πίνακα 19 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης κατά την αναισθησία διάρκειας 5 και

60 min, από όπου φαίνεται ότι η παράταση, από 5 σε 60 min, τόσο της αναισθησίας όσο και της απλής παραμονής στη δεξαμενή αναισθησίας δεν επηρέασε τις συγκεντρώσεις της γλυκόζης.

**Πίνακας 19.** Επίδραση της αναισθησίας διάρκειας 5 και 60 min στη συγκέντρωση της γλυκόζης (n=10)

	Γλυκόζη (mg/dl)	
	5 min	60 min
Μάρτυρες 2 (διαδικασίας αναισθητοποίησης)	181,3±3,4	185,3±6,0
Τρικάϊνη (55 mg/l)	191,7±4,6	191,8±5,2
Βενζοκαϊνη (30 mg/l)	210,4±3,9	216,7±6,9
Φαινοξυαιθανόλη (274,00 mg/l)	170,7±3,6	176,2±4,6
Γαριφαλέλαιο (13,38 mg/l)	161,2±3,5	166,2±4,4

Καμία απολύτως διαφορά δεν παρατηρήθηκε ως προς τη συγκέντρωση των **πρωτεϊνών**, η οποία δεν επηρεάστηκε κατά τον πειραματισμό (Πίνακες 16, 17 και 20).

**Πίνακας 20.** Επίδραση της αναισθησίας διάρκειας 5 και 60 min στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών (n=10)

	Πρωτεΐνες (g/dl)	
	5 min	60 min
Μάρτυρες 2 (διαδικασίας αναισθητοποίησης)	4,1±0,5	4,1±0,5
Τρικάϊνη (55 mg/l)	4,0±0,5	4,0±0,5
Βενζοκαϊνη (30 mg/l)	4,0±0,5	4,0±0,5
Φαινοξυαιθανόλη (274,00 mg/l)	3,9±0,5	4,1±0,5
Γαριφαλέλαιο (13,38 mg/l)	4,0±0,5	4,1±0,5

Από τον Πίνακα 16 φαίνεται ότι μεταξύ των Μαρτύρων 1 και των ιχθυδίων που μεταφέρθηκαν από τη δεξαμενή εκτροφής στη δεξαμενή αναισθησίας χωρίς να αναισθητοποιηθούν (Μάρτυρες 2) ή των ιχθυδίων που υποβλήθηκαν σε αναισθησία διάρκειας 5 min δεν υπήρξαν διαφορές ως προς τη συγκέντρωση των **ριζών σουπεροξειδίου**. Ωστόσο, όταν χρησιμοποιήθηκε βενζοκαϊνη, η συγκέντρωση των

ριζών σουπεροξειδίου παρουσίασε τάση μείωσης, αλλά δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική ( $P=0,548$ ) διαφορά. Εξάλλου, από τον Πίνακα 17 φαίνεται ότι κατά τους χειρισμούς αναισθητοποίησης και κατά την αναισθησία διάρκειας 60 min με τρικαΐνη, φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο, δεν υπήρξε μεταβολή των συγκεντρώσεων των ριζών σουπεροξειδίου σε σχέση με την ομάδα των Μαρτύρων 1. Όμως, η αναισθησία διάρκειας 60 min με βενζοκαΐνη χαρακτηρίστηκε από μειωμένη συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου, η οποία διέφερε σημαντικά από εκείνες των Μαρτύρων 1 ( $P=0,013$ ) και 2 ( $P=0,021$ ) και από εκείνες που παρατηρήθηκαν κατά την αναισθησία με τις άλλες αναισθητικές ουσίες ( $P\leq 0,034$ ). Τέλος, από τον Πίνακα 21 φαίνεται ότι η παράταση από 5 σε 60 min, τόσο της απλής διαδικασίας της αναισθητοποίησης όσο και της αναισθησίας με τρικαΐνη, φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο δεν επηρέασε τη συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου. Αντίθετα, κατά την παράταση από 5 σε 60 min της αναισθησίας με βενζοκαΐνη, η συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου μειώθηκε ( $P=0,041$ ).

**Πίνακας 21.** Επίδραση της αναισθησίας διάρκειας 5 και 60 min στη συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) (n=10)

	Ρίζες σουπεροξειδίου	
	5 min	60 min
Μάρτυρες 2 (διαδικασίας αναισθητοποίησης)	0,112±0,012 <sup>a</sup>	0,119±0,014 <sup>a</sup>
Τρικαΐνη (55 mg/l)	0,133±0,016 <sup>a</sup>	0,124±0,018 <sup>a</sup>
Βενζοκαΐνη (30 mg/l)	0,092±0,015 <sup>a</sup>	0,064±0,012 <sup>b</sup>
Φαινοξυαιθανόλη (274,00 mg/l)	0,127±0,017 <sup>a</sup>	0,116±0,018 <sup>a</sup>
Γαριφαλέλαιο (13,38 mg/l)	0,119±0,022 <sup>a</sup>	0,128±0,016 <sup>a</sup>

Τιμές στην ίδια γραμμή με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P=0,041$ ) μεταξύ τους.

### Γ. Συζήτηση

Όπως προαναφέρθηκε, στις ιχθυοκαλλιέργειες, ως δείκτες εκτίμησης του στρες χρησιμοποιούνται κυρίως οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης, της γλυκόζης και των πρωτεϊνών του πλάσματος, και ως δείκτης εκτίμησης της κατάστασης του ανοσοποιητικού συστήματος η συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου στα

λευκοκύτταρα του πρόσθιου τμήματος των νεφρών (Pickering 1998, Wells & Pankhurst 1999, Bressler & Ron 2004).

Όπως ήταν αναμενόμενο, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης κάνουν σαφές ότι ακόμη και μια απλή διαδικασία, όπως η μεταφορά και η παραμονή χωρίς αναισθησία για 6,5 min σε μία δεξαμενή χωρίς την εκτέλεση κανενός άλλου χειρισμού (Μάρτυρες 2), προκαλεί στο λαβράκι στρες, καθώς συνοδεύεται από σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης και της γλυκόζης. Ωστόσο, η παράταση του χρόνου παραμονής στη δεξαμενή αυτή από τα 6,5 στα 61,5 min δεν προκαλεί περαιτέρω αύξηση των συγκεντρώσεων αυτών, αν και δεν αποκλείεται κάτι τέτοιο να συμβαίνει όταν οι ιχθύες υποβάλλονται σε έντονους χειρισμούς. Στην περίπτωση αυτή άλλωστε ενδέχεται και η αρχική αύξηση των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης και της γλυκόζης να είναι αισθητά μεγαλύτερη.

Αντίθετα, η μεταφορά σε μια δεξαμενή και η αναισθησία, διάρκειας 6,5 min, με τρικαΐνη, φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο δεν συνοδεύεται από αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης. Ωστόσο, η αναισθησία, διάρκειας 6,5 min, με τρικαΐνη ή φαινοξυαιθανόλη συνοδεύεται από αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης, ανάλογη με αυτή που παρατηρείται κατά την απλή μεταφορά των ιχθυδίων στη δεξαμενή αναισθησίας (Μάρτυρες 2), ενώ αυτό δεν παρατηρείται κατά την αναισθησία με γαριφαλέλαιο. Τέλος, κατά την αναισθησία, διάρκειας 6,5 min, με βενζοκαΐνη παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης και της κορτιζόλης και της γλυκόζης.

Η παράταση του χρόνου διατήρησης της αναισθησίας από τα 5 στα 60 min, με όλες τις αναισθητικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν, συνοδεύεται από αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης, αλλά δεν προκαλεί περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης. Συνεπώς, φαίνεται ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης έχει την τάση να αυξάνεται εξαρχής κατά την αναισθησία, αλλά η αύξηση αυτή δεν επιτείνεται κατά την παράταση της αναισθησίας, ενώ, αντίθετα, η κορτιζόλη παραμένει χαμηλή κατά την αναισθησία μικρής διάρκειας, αλλά αυξάνεται όταν η αναισθησία παρατείνεται.

Ανακεφαλαιώνοντας, φαίνεται ότι στο λαβράκι η αναισθησία με βενζοκαΐνη αποτελεί παράγοντα πρόκλησης στρες ενώ, αντίθετα, η αναισθησία με γαριφαλέλαιο περιορίζει σημαντικά το στρες και η αναισθησία με τρικαΐνη ή φαινοξυαιθανόλη έχει ανάλογο, αλλά λιγότερο έντονο, αποτέλεσμα. Πάντως, είναι πιθανό ότι ο συγκριτικός περιορισμός του στρες θα ήταν αναλογικά μεγαλύτερος και με τις ουσίες αυτές ή ακόμη

και με την βενζοκαΐνη αν η σύγκριση είχε γίνει με ιχθύδια, τα οποία είχαν υποβληθεί σε έντονους χειρισμούς και όχι με ιχθύδια που απλώς μεταφέρθηκαν από τη δεξαμενή εκτροφής στη δεξαμενή αναισθησίας, αλλά δεν αναισθητοποιήθηκαν.

Από τα ευρήματα της παρούσας έρευνας προκύπτει επίσης ότι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών δεν επηρεάζεται ούτε από τη μεταφορά και παραμονή των ιχθύων για 6,5 ή 61,5 min σε μία δεξαμενή ούτε από την αναισθητοποίησή τους για αυτά τα χρονικά διαστήματα. Ωστόσο, η συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου εμφανίζει τάση μείωσης και τελικά μειώνεται κατά την αναισθησία διάρκειας 6,5 και 61,5 min, αντίστοιχα, με βενζοκαΐνη, υποδηλώνοντας αρνητική επίδρασή της στο ανοσοποιητικό σύστημα. Αντίθετα, δεν επηρεάζεται από τις άλλες αναισθητικές ουσίες, υποδηλώνοντας ότι αναισθησία διάρκειας τουλάχιστον μίας ώρας με τρικαΐνη, φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο δεν έχει αρνητική επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα του λαβρακιού.

Γενικά, η χρήση αναισθητικών ουσιών στους ιχθύς όχι μόνο διευκολύνει τις παρεμβάσεις, οι οποίες είναι αναγκαίες στις ιχθυοκαλλιέργειες, αλλά, επιπλέον, μειώνει το στρες που εμφανίζεται κατά την εκτέλεσή τους και τις βλαπτικές επιδράσεις του (Le Bras 1982, Kreiberg & Powell 1991, Stoskopf 1993, Gerwick et al. 1999, Tort et al. 2002, Small 2003, Neiffer 2007, Ross & Ross 2008). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό επειδή το στρες, το οποίο μπορεί να είναι ιδιαίτερα έντονο ακόμη και με σχετικά μικρές παρεμβάσεις, εκτός από τις πιθανές επιπτώσεις του στο ανοσοποιητικό σύστημα και στην ανάπτυξη, μπορεί να προκαλέσει υποξία, τραυματισμούς, ακόμη και θάνατο (Jolly et al. 1972, Green 1979, Stoskopf 1993, Neiffer 2007, Ross & Ross 2008). Ωστόσο, αν και η χρήση αναισθητικών ουσιών μειώνει το στρες, ενδέχεται, υπό ορισμένες συνθήκες, τόσο η διαδικασία της αναισθησίας αυτή καθ' εαυτή όσο και μια συγκεκριμένη αναισθητική ουσία, όχι μόνο να μην περιορίζει αλλά και να προκαλεί στρες στους ιχθύς (Iwama et al. 1989, Bressler & Ron 2004, Neiffer 2007, Ross & Ross 2008). Σίγουρα, η όλη διαδικασία της αναισθησίας συνιστά, για κάθε οργανισμό, έναν εξωγενή παράγοντα, ο οποίος επηρεάζει την ομοιοστασία του και του προκαλεί ποικίλες μεταβολές της φυσιολογίας του, ανάλογες με αυτές που παρατηρούνται υπό την επίδραση στρεσικών παραγόντων (Ross & Ross 2008). Ενδεχομένως, η αρχική έκλυση κατεχολαμινών που παρατηρείται κατά την αναισθησία (Rothwell et al. 2005) και οι άλλες μεταβολές, οι οποίες προκύπτουν εξαιτίας της έκλυσης αυτής, να είναι αποτέλεσμα της υποξαιμίας λόγω υποαερισμού και όχι της απευθείας δράσης των

αναισθητικών ουσιών, αν και ουσίες στις οποίες δεν έχουν προστεθεί ρυθμιστικά διαλύματα προκαλούν στρες (Neiffer 2007).

Η αύξηση της συγκέντρωσης της **κορτιζόλης** κατά το στρες συνιστά πρωτεύουσα προσαρμοστική αντίδραση του οργανισμού σε αυτό. Η έκκριση της κορτιζόλης, κυρίως από τα στεροειδογόνα κύτταρα του ενδονεφρικού συστήματος, ενεργοποιείται κυρίως από τη φλοιοεπινεφριδιοτρόπο ορμόνη (ACTH) (Mommensen et al. 1999). Το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης και το ποσοστό αύξησης της συγκέντρωσής της, εμφανίζουν μεγάλες αποκλίσεις, επειδή εξαρτώνται από την ένταση και τη διάρκεια δράσης του στρεστικού παράγοντα, από το είδος του ιχθύος αλλά και από τις ιδιαιτερότητες που παρατηρούνται μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους (Παπουτσόγλου 1998). Κατά το οξύ στρες η συγκέντρωση της κορτιζόλης αυξάνεται ταχύτατα, συχνά μέσα σε 1 min, και επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα μετά από 24-48 ώρες (Mommensen et al. 1999), ενώ κατά το χρόνιο στρες παραμένει αυξημένη για αρκετές ημέρες ή εβδομάδες (Rotllant et al. 2001, Ross & Ross 2008).

Στο λαβράκι η φυσιολογική συγκέντρωση της κορτιζόλης κυμαίνεται από  $5,0 \pm 1,8$   $\mu\text{g/dl}$  (Roche et al. 1989) έως  $20,0$   $\mu\text{g/dl}$  (Hanke et al. 1991), ενώ οι Planas et al. (1990) αναφέρουν τιμές της τάξης των  $10-60$   $\mu\text{g/dl}$ . Ωστόσο, παρουσιάζει διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της ημέρας και εξαρτάται από τη χρονική διάρκεια της ημέρας και της νύχτας και από την ώρα χορήγησης της τροφής (Planas et al. 1990), ενώ ποικίλλει και από άτομο σε άτομο (Marino et al. 2001). Εξάλλου, παρουσιάζει διακυμάνσεις και κατά τη διάρκεια του έτους, οι οποίες εξαρτώνται από παράγοντες τόσο περιβαλλοντικούς, όπως η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία, όσο και βιολογικούς, όπως η μετανάστευση και η αναπαραγωγή (Planas et al. 1990). Έτσι, κατά τους μήνες με τις χαμηλότερες θερμοκρασίες (Ιανουάριο έως Μάιο), κυμαίνεται από  $10$  έως  $25$   $\mu\text{g/dl}$ , ενώ τους μήνες με τις υψηλότερες θερμοκρασίες (Ιούλιο έως Οκτώβριο) από  $40$  έως  $60$   $\mu\text{g/dl}$  (Planas et al. 1990). Κατά την παρούσα έρευνα, η οποία διενεργήθηκε στις αρχές Ιουλίου, προέκυψαν ενδιάμεσες φυσιολογικές τιμές ( $30,2 \pm 4,2$   $\mu\text{g/dl}$ ).

Η διαπίστωσή μας ότι τα ιχθύδια που υποβλήθηκαν σε μια απλή διαδικασία, όπως η μεταφορά και η απλή παραμονή για  $6,5$  min σε μία δεξαμενή, συνοδεύτηκε από αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης ( $49 \pm 2,4$   $\mu\text{g/dl}$ ), συμφωνεί με τα ευρήματα των Marino et al. (2001), οι οποίοι παρατήρησαν ότι σε εκτρεφόμενο λαβράκι βάρους  $372$  g, χειρισμοί διάρκειας  $2$  min δεν επηρέασαν τη συγκέντρωση της κορτιζόλης ( $9,5$



μg/dl), αλλά ο περιορισμός για 5 min και η αύξηση της ιχθυοπυκνότητας σε 50 kg/m<sup>3</sup> την αύξησαν σημαντικά (32,3 μg/l). Εξάλλου, σε λαβράκι που υποβλήθηκε σε περιορισμό και αύξηση της ιχθυοπυκνότητας για 15 ή 45 min, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης περίπου κατά 400% ή περισσότερο από 1.000%, αντίστοιχα (Marino et al. 1989). Αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης μετά από σύντομους χειρισμούς έχει διαπιστωθεί και σε άλλα είδη ιχθύων (Barton et al. 1986, Davis & Parker 1986, Maule et al. 1988, Pickering & Pottinger 1989, Pankhurst et al. 1992, Waring et al. 1992), υποδηλώνοντας ότι όλοι οι χειρισμοί προκαλούν, συχνά έντονο, στρες στους ιχθύς.

Η μη αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης κατά την αναισθησία, διάρκειας 6,5 min, με τρικαΐνη, φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο, την οποία διαπιστώσαμε στο λαβράκι, επίσης συμφωνεί με τα ευρήματα των Marino et al. (2001), οι οποίοι παρατήρησαν ότι, στο λαβράκι, η ολιγόλεπτη αναισθησία με τρικαΐνη (140 mg/l), σε αντίθεση με τον περιορισμό για 5 min και την αύξηση της ιχθυοπυκνότητας σε 50 kg/m<sup>3</sup>, δεν αύξησε σημαντικά τη συγκέντρωση της κορτιζόλης. Ανάλογα ευρήματα προέκυψαν και κατά την ολιγόλεπτη αναισθησία με τρικαΐνη ή γαριφαλέλαιο σε ιριδίζουσα πέστροφα (Wagner et al. 2003) και με γαριφαλέλαιο σε ιχθύδια σολομού του είδους *Onchorhynchus tshawytscha* (Cho & Heath 2000).

Ωστόσο, αντίθετα με τα παραπάνω ευρήματα είναι εκείνα των Tort et al. (2002), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι αναισθησία, διάρκειας 10 min, με γαριφαλέλαιο (50, 100 ή 200 mg/l) ή φαινοξυαιθανόλη (500 mg/l) σε τσιπούρα και σε ιριδίζουσα πέστροφα συνοδεύτηκε από αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης σε σχέση με τους μάρτυρες. Ανάλογα ευρήματα προέκυψαν και αμέσως μετά την εγκατάσταση αναισθησίας με γαριφαλέλαιο (46,6 mg/l) σε τσιπούρα (Bressler & Ron 2004).

Η διαπίστωσή μας ότι η αναισθησία με βενζοκαΐνη συνοδεύεται από αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης (57,4±2,3 μg/dl) στο λαβράκι, η οποία μάλιστα είναι μεγαλύτερη και από εκείνη που προκαλείται κατά τη μεταφορά και απλή παραμονή των ιχθυδίων για 6,5 min σε μία δεξαμενή, συμφωνεί με τα ευρήματα του Bolasina (2006), ο οποίος διαπίστωσε ότι, στον ουροσαλούβαρδο Βραζιλίας (*Urophycis brasiliensis*) βάρους 150 g, η εντός 2-3 min εγκατάσταση της αναισθησίας με βενζοκαΐνη (40 mg/l) συνοδεύτηκε από αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης από 8,62 σε 35,75 ng/ml. Επίσης, αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης από 5 ng/ml σε 65 ng/ml διαπιστώθηκε και αμέσως μετά την εγκατάσταση αναισθησίας με βενζοκαΐνη (26,3

mg/l) σε τσιπούρα (Bressler & Ron 2004). Εξάλλου, οι Iversen et al. (2003) διαπίστωσαν ότι κατά την αναισθησία με βενζοκαΐνη σε σολομό του Ατλαντικού, η αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης ήταν ευθέως ανάλογη με τη διάρκεια της αναισθησίας, ενώ η αύξηση της δόσης της βενζοκαΐνης δεν συνδυάστηκε με μείωση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης.

Αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης, στα  $64,4 \pm 3,4$   $\mu\text{g/dl}$  από τα  $57,4 \pm 2,3$   $\mu\text{g/dl}$ , κατά την παράταση του χρόνου διατήρησης της αναισθησίας με βενζοκαΐνη από τα 5 στα 60 min, διαπιστώθηκε και κατά την παρούσα έρευνα. Το ίδιο εξάλλου παρατηρήθηκε, και μάλιστα με μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ και των αρχικών και των τελικών τιμών, αλλά όχι και με μεγαλύτερες τελικές τιμές, οι οποίες κυμάνθηκαν από  $46,5 \pm 3,2$  έως  $51,5 \pm 4,5$   $\mu\text{g/dl}$ , και κατά την παράταση του χρόνου διατήρησης της αναισθησίας με τις άλλες αναισθητικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν, όχι όμως και κατά την παράταση του χρόνου παραμονής των ιχθυδίων σε μία δεξαμενή, χωρίς την εκτέλεση κανενός άλλου χειρισμού.

Με βάση τα ευρήματα της παρούσας έρευνας, στο λαβράκι η παράταση του χρόνου διατήρησης της αναισθησίας από τα 5 στα 60 min, με όλες τις αναισθητικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν, συνοδεύεται από αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης. Ωστόσο, η επίδραση της διάρκειας της αναισθησίας, του είδους και της δόσης της αναισθητικής ουσίας, καθώς και του είδους του ιχθύος στη συγκέντρωση της κορτιζόλης δεν είναι ξεκάθαρη.

Στο γατόψαρο διαπιστώθηκε ιδιαίτερα αυξημένη συγκέντρωση κορτιζόλης μετά από αναισθησία διάρκειας 10-20 min με τρικαΐνη (100 mg/l), αλλά όχι με γαριφαλέλαιο (100 mg/l) (Small 2003). Ωστόσο, η συγκέντρωση της κορτιζόλης ήταν ιδιαίτερα αυξημένη στην ιριδίζουσα πέστροφα μετά από αναισθησία διάρκειας 30 min με γαριφαλέλαιο (9,2 mg/l) (Davidson et al. 2000). Αντίθετα, οι Wagner et al. (2002) διαπίστωσαν ότι κατά την αναισθησία διάρκειας 1 ώρας με γαριφαλέλαιο (20 mg/l) σε ιριδίζουσα πέστροφα που υποβαλλόταν σε εξαγωγή αυγών δεν αυξήθηκε η συγκέντρωση της κορτιζόλης, ενώ αυτό συνέβη κατά την αναισθησία με τρικαΐνη (60 mg/l). Οι Thomas & Robertson (1991) διαπίστωσαν ότι απαιτείται αναισθησία διάρκειας τουλάχιστον 15 min με τρικαΐνη ή κινολιδίνη ώστε να αυξηθεί σημαντικά η συγκέντρωση της κορτιζόλης στο στικτομυλοκόπι (*Sciaenops ocellatus*). Εξάλλου, οι King et al. (2005) βρήκαν ότι, στη μαύρη πέρκα (*Centropristis striata* L.), η συγκέντρωση της κορτιζόλης αυξήθηκε κατά την παράταση της αναισθησίας από τα 10

στα 20 και στα 30 min όταν χρησιμοποιήθηκε τρικαΐνη (125 mg/l), αλλά παρέμεινε σταθερή όταν χρησιμοποιήθηκαν φαινοξυαιθανόλη (300 mg/l) ή γαριφαλέλαιο (40 mg/l). Αντίθετα, σε σολομό του Ατλαντικού, όταν χρησιμοποιήθηκε γαριφαλέλαιο σε δόση <20 mg/l, η συγκέντρωση της κορτιζόλης αυξήθηκε κατά την παράταση της αναισθησίας στα 10, στα 20 και στα 30 min (Iversen et al. 2003). Ωστόσο, όταν η δόση του γαριφαλέλαιου ήταν  $\geq 20$  mg/l η συγκέντρωση της κορτιζόλης παρέμεινε σταθερή (Iversen et al. 2003). Επίσης, σε σολομό του είδους *Onchorhynchus tshawytscha* οι σχετικά μικρές δόσεις (<25 mg/l) τρικαΐνης συνδυάστηκαν με αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης, όχι όμως και οι μεγαλύτερες (>50 mg/l) (Strange & Schreck 1978). Αντίθετα, οι Molinero & Gonzalez (1995) διαπίστωσαν ότι, κατά την αναισθησία με τρικαΐνη ή φαινοξυαιθανόλη σε τσιπούρα, η αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης είναι συνήθως ευθέως ανάλογη με την αύξηση της δόσης των αναισθητικών ουσιών.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η επίδραση της αναισθησίας με τρικαΐνη, γαριφαλέλαιο ή φαινοξυαιθανόλη στη συγκέντρωση της κορτιζόλης δεν έχει ξεκαθαριστεί (Neiffer 2007), καθώς άλλοτε συνδυάζεται με αύξησή της (Takashima et al. 1983, Thomas & Robertson 1991, Molinero & Gonzalez 1995, Olsen et al. 1995, Davidson et al. 2000, Tort et al. 2002, Wagner et al. 2002, Iversen et al. 2003, Small 2003, Wagner et al. 2003, Bressler & Ron 2004, Davis & Griffin 2004, King et al. 2005) και άλλοτε όχι (Strange & Schreck 1978, Cho & Heath 2000, Marino et al. 2001, Iversen et al. 2003, Small 2003, Wagner et al. 2003, King et al. 2005). Αντίθετα, η αναισθησία με βενζοκαΐνη φαίνεται να συνδυάζεται με αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης (Iversen et al. 2003, Bressler & Ron 2004, Bolasina 2006).

Αυτά τα αντικρουόμενα ευρήματα δεν είναι εύκολο να ερμηνευτούν. Τυχόν ιδιαιτερότητες μεταξύ των διάφορων ειδών ιχθύων ή των αναισθητικών ουσιών μπορεί να είναι τουλάχιστον εν μέρει υπεύθυνες για αυτά. Επίσης, παράμετροι όπως οι περιβαλλοντικές συνθήκες και οι αναπόφευκτες διαφορές μεταξύ των πειραματικών πρωτοκόλλων ενδέχεται να παίζουν σημαντικό ρόλο. Εξάλλου, όπως προαναφέρθηκε, η αναισθησία συνιστά ένα στρεσικό παράγοντα για τον οργανισμό (Ross & Ross 2008) και, συνεπώς, η παράτασή της θα ήταν αναμενόμενο να επιτείνει τις φυσιολογικές μεταβολές που χαρακτηρίζουν το στρες και άρα, να συνοδεύεται από αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης, αν και αυτό δεν φαίνεται να συμβαίνει πάντα. Οπωσδήποτε πάντως, η υποξαιμία λόγω υποαερισμού, η οποία πιθανώς είναι υπεύθυνη

για την αρχική έκλυση κατεχολαμινών που παρατηρείται κατά την αναισθησία (Rothwell et al. 2005), γίνεται πιο έντονη όσο η αναισθησία παρατείνεται.

Προκειμένου να ερμηνεύσουν τα αντικρουόμενα ευρήματα, οι Olsen et al. (1995) διατύπωσαν την άποψη ότι αναισθητικές ουσίες, οι οποίες προλαμβάνουν την ενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια σε υψηλές δόσεις, ίσως να μην είναι εξίσου ικανές να πετύχουν το αυτό και σε χαμηλές δόσεις. Όμως, από τις συνήθεις αναισθητικές ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται στους ιχθύς, μόνο η μετομιδάτη προλαμβάνει σταθερά και ουσιαστικά την ενεργοποίηση του άξονα αυτού σε μεγάλο αριθμό ειδών ιχθύων (Thomas & Robertson 1991, Olsen et al. 1995, Iversen et al. 2003, Small 2003, Davis & Griffin 2004, Neiffer 2007, Ross & Ross 2008). Αντίθετα, οι συχνά μεγάλες διαφορές μεταξύ των δόσεων που χρησιμοποιούνται από τους διάφορους ερευνητές, συνιστούν μια πιο πιθανή εξήγηση των παρατηρούμενων διαφορών. Εξάλλου, συγκριτικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης φαίνεται να είναι αντιστρόφως ανάλογη της αύξησης της δόσης της αναισθητικής ουσίας (Strange & Schreck 1978, Iversen et al. 2003), αν και έχει αναφερθεί και το αντίθετο (Molinero & Gonzalez 1995) Ενδεχομένως, το φαινόμενο οι ήπια ηρεμιστικές δόσεις των αναισθητικών να αυξάνουν τη συγκέντρωση της κορτιζόλης, σε αντίθεση με τις υψηλότερες δόσεις (Strange & Schreck 1978, Iversen et al. 2003), να οφείλεται στο ότι απλώς οι χαμηλές δόσεις, καθώς δεν εξασφαλίζουν βαθιά ηρέμηση ή αναισθησία, δεν αποτρέπουν την εκδήλωση του στρες, οπότε η κορτιζόλη αυξάνεται. Αυτό σημαίνει ότι οι χαμηλές δόσεις των αναισθητικών ουσιών μπορεί ουσιαστικά να αποτελούν έμμεσα στρεσικό παράγοντα.

Η αύξηση της συγκέντρωσης της **γλυκόζης** κατά το στρες συνιστά δευτερεύουσα προσαρμοστική αντίδραση του οργανισμού σε αυτό. Οφείλεται αφενός στη διέγερση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και στη συνακόλουθη έκλυση κατεχολαμινών και αφετέρου στην αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης, με αποτέλεσμα να προάγεται η γλυκονογένεση και η μετατροπή του γλυκογόνου του ήπατος σε γλυκόζη, ενώ παράλληλα, μειώνεται η χρησιμοποίηση της γλυκόζης (Παπουτσόγλου 1998, Rotllant et al. 2001, Bressler & Ron 2004, Davis & Griffin 2004, Roncarati et al. 2006, Ross & Ross 2008). Πάντως, το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης και το ποσοστό αύξησής της εξαρτώνται από την κατάσταση θρέψης του ιχθύος και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως π.χ. η θερμοκρασία (Pickering et al. 1982, Wells & Pankhurst 1999).

Η διαπίστωσή μας ότι στα ιχθύδια που υποβλήθηκαν σε μια απλή διαδικασία, όπως η μεταφορά και η απλή παραμονή για 6,5 min σε μία δεξαμενή, αυξήθηκε η συγκέντρωση της γλυκόζης ( $181,3 \pm 3,4$  mg/dl), συμφωνεί με τα ευρήματα των Marino et al. (2001), οι οποίοι παρατήρησαν ότι στο λαβράκι χειρισμοί διάρκειας 2 min και αύξηση της ιχθυοπυκνότητας για 5 min αύξησαν τη συγκέντρωση της γλυκόζης ( $97,9$  mg/dl). Επίσης, αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης έχει παρατηρηθεί στο λαβράκι μετά από καθαρισμό, διάρκειας 5 min, των τοιχωμάτων της δεξαμενής παραμονής του (Hadj Kacem et al. 1986), αύξηση της θερμοκρασίας για 60 min (Hadj Kacem et al. 1987) και περιορισμό και αύξηση της ιχθυοπυκνότητας για 15 ή 45 min (Marino et al. 1989). Αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης μετά από σύντομους χειρισμούς έχει διαπιστωθεί και σε άλλα είδη ιχθύων (Barton et al. 1986, Waring et al. 1992, Wells & Pankhurst 1999, Rotllant et al. 2001, Wagner et al. 2002, Wagner et al. 2003) υποδηλώνοντας και πάλι ότι όλοι οι χειρισμοί προκαλούν, συχνά έντονο, στρες στους ιχθύς. Πάντως, οι μεταβολές των συγκεντρώσεων της γλυκόζης στο λαβράκι και άλλα είδη ιχθύων που υποβάλλονται σε χειρισμούς φαίνεται να είναι γενικά μικρότερες από εκείνες της κορτιζόλης (Waring et al. 1996, Marino et al. 2001), παρατήρηση η οποία επιβεβαιώνεται και από τα ευρήματα της παρούσας έρευνας.

Η παρατήρησή μας ότι η αναισθησία, διάρκειας 6,5 min, με τρικαΐνη, βενζοκαΐνη ή φαινοξυαιθανόλη συνοδεύτηκε από αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης, η οποία κυμάνθηκε από  $170,7 \pm 3,6$  mg/dl έως  $210,4 \pm 3,9$  mg/dl και παρέμεινε σταθερή κατά την παράταση της αναισθησίας κατά 55 min, δεν συμφωνεί με τα ευρήματα των Marino et al. (2001), οι οποίοι δεν διαπίστωσαν αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο λαβράκι μετά από ολιγόλεπτη αναισθησία με τρικαΐνη (140 mg/l). Ωστόσο, συμφωνεί με τα ευρήματα των Ortuño et al. (2002 a), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι, σε τσιπούρα, η αναισθησία διάρκειας μίας ώρας με τρικαΐνη (50 mg/l), βενζοκαΐνη (35 mg/l) ή φαινοξυαιθανόλη (221 mg/l) αύξησε τη συγκέντρωση της γλυκόζης από 70 σε 100, σε 200 ή σε 220 mg/dl, αντίστοιχα. Εξάλλου, αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο ίδιο είδος ιχθύων αμέσως μετά την εγκατάσταση αναισθησίας με βενζοκαΐνη (26,3 mg/l) παρατήρησαν και οι Bressler & Ron (2004), ενώ αύξησή της παρατηρήθηκε και μετά από αναισθησία, διάρκειας 15 min, με τρικαΐνη σε άλλα είδη ιχθύων (Thomas & Robertson 1991, Davis & Griffin 2004). Αντίθετα, οι Iversen et al. (2003) διαπίστωσαν ότι η αναισθησία, διάρκειας 10-30 min, με βενζοκαΐνη σε σολομό του Ατλαντικού δεν αύξησε τη συγκέντρωση της γλυκόζης, ενώ ο Bolasina (2006) παρατήρησε ότι στον

ουροσαλούβαρδο Βραζιλίας μείωσε τη συγκέντρωση της γλυκόζης από 55 σε 20 mg/dl.

Οι Iversen et al. (2003) διαπίστωσαν ότι στο σολομό του Ατλαντικού ούτε η αναισθησία, διάρκειας 10-30 min, με γαριφαλέλαιο αύξησε τη συγκέντρωση της γλυκόζης, εύρημα το οποίο συμφωνεί με τη δική μας παρατήρηση ότι, αντίθετα από ό,τι συνέβη με την τρικαΐνη, τη βενζοκαΐνη και τη φαινοξυαιθανόλη, η αναισθησία με γαριφαλέλαιο δεν αύξησε τη συγκέντρωση της γλυκόζης. Ανάλογα ευρήματα μετά από αναισθησία με γαριφαλέλαιο αναφέρθηκαν στην ιριδίζουσα πέστροφα (Davidson et al. 2000), στον ογκόρυγχο (*Onchorhynchus tshawytscha*) (Cho & Heath 2000), σε ιχθύς του είδους *Oplegnathus fasciatus* (Park et al. 2009) και στο πακού (*Colossoma macroporum*) μετά από αναισθησία με ευγενόλη (Roubach et al. 2005). Ωστόσο, οι Bressler & Ron (2004), αμέσως μετά την εγκατάσταση αναισθησίας με γαριφαλέλαιο (46,6 mg/l) σε τσιπούρα, διαπίστωσαν αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης, ενώ ανάλογη αύξηση παρατηρήθηκε και σε άλλα είδη ιχθύων (Sladky et al. 2001, Davis & Griffin 2004).

Συμπερασματικά, με βάση τόσο τα ευρήματα της διεθνούς βιβλιογραφίας όσο και της παρούσας έρευνας, φαίνεται ότι κατά την αναισθησία με τρικαΐνη, βενζοκαΐνη ή φαινοξυαιθανόλη συνήθως παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης, ενώ αυτό δεν συμβαίνει κατά την αναισθησία με γαριφαλέλαιο. Οι εξαιρέσεις, οι οποίες έχουν παρατηρηθεί, θα μπορούσαν ίσως να αποδοθούν, τουλάχιστον εν μέρει, σε τυχόν διαφορές μεταξύ των διάφορων ειδών ιχθύων ή των αναισθητικών ουσιών, καθώς και σε παραμέτρους όπως οι περιβαλλοντικές συνθήκες και οι αναπόφευκτες διαφορές μεταξύ των πειραματικών πρωτοκόλλων. Όντως, φαίνεται ότι η μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης κατά την αναισθησία ενδέχεται να επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες. Οι Ortuño et al. (2002 c) ανέφεραν ότι, σε τσιπούρα, η αναισθησία διάρκειας 60 min με φαινοξυαιθανόλη (66 mg/l) συνδυάστηκε με αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης, όταν η ιχθυοπυκνότητα ήταν 9 kg/m<sup>3</sup>, αλλά δεν την επηρέασε όταν η ιχθυοπυκνότητα ήταν 100 kg/m<sup>3</sup>. Ωστόσο, όταν η δόση της φαινοξυαιθανόλης αυξήθηκε (220 mg/l) παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης και με την ιχθυοπυκνότητα των 100 kg/m<sup>3</sup> (Ortuño et al. 2002 c). Αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης με την αύξηση της δόσης παρατήρησαν στο ίδιο είδος ιχθύων και οι Molinero & Gonzalez (1995) κατά την αναισθησία με τρικαΐνη (15, 20 ή 30 mg/l) ή φαινοξυαιθανόλη (0,05, 0,075 ή 0,1 mg/l). Οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις γλυκόζης ήταν 75, 100 ή 150 mg/dl κατά την αναισθησία με τρικαΐνη και 100, 140 ή

150 mg/dl κατά την αναισθησία με φαινοξυαιθανόλη.

Η αύξηση της συγκέντρωσης των **πρωτεϊνών του πλάσματος** των ιχθύων συνιστά επίσης μια δευτερεύουσα προσαρμοστική αντίδραση του οργανισμού στο στρες (Wells et al. 1986, Wells & Pankhurst 1999) και φαίνεται να συνδέεται με την απώλεια νερού μέσω των βραγχίων, η οποία προκύπτει υπό την επίδραση της αδρεναλίνης (Waring et al. 1992, Marino et al. 2001). Συνήθως, εκδηλώνεται μέσα σε 10 έως 30 min από την επίδραση του στρεστικού παράγοντα (Wood et al. 1983, Wells et al. 1986, Wells & Pankhurst 1999), αν και, ενίοτε, δεν εμφανίζεται καθόλου (Angelidis et al. 1987, Marino et al. 2001, Rotllant et al. 2001). Συνεπώς, θα πρέπει να θεωρείται περισσότερο ως ένα επικουρικό βοήθημα για την εκτίμηση του στρες (Wells & Pankhurst 1999). Οπωσδήποτε, η αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, ιδίως κατά το οξύ στρες, είναι πιο ήπια από αυτή της κορτιζόλης και της γλυκόζης (Wells & Pankhurst 1999). Εξάλλου, κατά το χρόνιο στρες μπορεί, αντί για αύξηση, να παρατηρηθεί μείωση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, λόγω αύξησης του καταβολισμού τους (Roncarati et al. 2006).

Στο λαβράκι η φυσιολογική συγκέντρωση των πρωτεϊνών του πλάσματος κυμαίνεται από  $3,2\pm 0,4$  g/dl (Roncarati et al. 2006) και  $3,6\pm 0,2$  g/dl (Hadj Kacem et al. 1986) έως  $4,7\pm 0,3$  g/dl (Hadj Kacem et al. 1988). Ανάλογες τιμές ( $3,9\pm 0,6$  g/dl) προέκυψαν και κατά τη δική μας έρευνα.

Από τα ευρήματα της παρούσας έρευνας προκύπτει ότι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών δεν επηρεάζεται ούτε από τη μεταφορά και παραμονή των ιχθύων για 6,5 ή 61,5 min σε μία δεξαμενή, ούτε από την αναισθησία με τρικαΐνη, βενζοκαΐνη, φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο για αυτά τα χρονικά διαστήματα. Πάντως, ενδέχεται μέσα στα πρώτα 6,5 min η συγκέντρωση των πρωτεϊνών ούτως ή άλλως να μην προλάβαινε να μεταβληθεί. Ανάλογα με τα δικά μας είναι τα ευρήματα των Marino et al. (2001) στο λαβράκι, οι οποίοι διαπίστωσαν ότι οι σύντομοι χειρισμοί και η αύξηση της ιχθυοπυκνότητας στα  $50 \text{ kg/m}^3$  για 5 min δεν επηρέασαν τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών. Εξάλλου, αυτό δεν συνέβη ούτε με μεγαλύτερη αύξηση της ιχθυοπυκνότητας ( $60 \text{ kg/m}^3$ ) και για μακρύτερο χρονικό διάστημα (48 ώρες) (Vazzana et al. 2002). Ανάλογα ήταν και τα ευρήματα σε μπακαλιάρo του Ατλαντικού (*Gadus morhua*), μετά από αύξηση της ιχθυοπυκνότητας στα  $100 \text{ kg/m}^3$  για 60 min (Cairang et al. 2009), και σε τσιπούρα, μετά από αύξηση της ιχθυοπυκνότητας στα  $200 \text{ kg/m}^3$  για διαστήματα που κυμαινόταν από 60 min έως 168 ώρες (Rotllant et al. 2001).

Η επίδραση της αναισθησίας στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Στο λαβράκι, οι Marino et al. (2001) διαπίστωσαν ότι, μετά από ολιγόλεπτη αναισθησία με τρικαΐνη, η συγκέντρωση των πρωτεϊνών εμφάνισε τάση αύξησης, αλλά οι διαφορές δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές. Αντίθετα, σε ιριδίζουσα πέστροφα, αμέσως μετά την εγκατάσταση της αναισθησίας με τρικαΐνη, η συγκέντρωση των πρωτεϊνών αυξήθηκε (Laidley & Leatherland 1988). Στο ίδιο είδος ιχθύων, μετά από αναισθησία διάρκειας 30 min με ισοευγενόλη, η οποία αποτελεί συστατικό του γαριφαλέλαιου, η συγκέντρωση των πρωτεϊνών παρέμεινε αμετάβλητη 1, 2, 4, 8, 24 και 48 ώρες μετά, αν και ήταν αυξημένη 16 ώρες μετά (Davidson et al. 2000). Δεν είναι ξεκάθαρο πού θα μπορούσαν να αποδοθούν αυτές οι διαφορές. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών φαίνεται να επηρεάζεται κυρίως από το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη λήψη της τροφής (Marino et al. 2001), αλλά και από τη θερμοκρασία, την εποχή και το μέγεθος των ιχθύων (Magnadóttir et al. 1999 a, b), είναι, όμως, αμφίβολο αν αυτοί οι παράγοντες θα μπορούσαν να θεωρηθούν υπεύθυνοι για τις παραπάνω διαφορές. Πάντως, από τη μελέτη μας συνάγεται το συμπέρασμα ότι η αναισθησία διάρκειας μίας ώρας με τρικαΐνη, βενζοκαΐνη, φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο δεν φαίνεται να προκαλεί στο λαβράκι στρες τέτοιου βαθμού που να οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών.

Η ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος των ιχθύων στο στρες συνιστά τριτεύουσα προσαρμοστική αντίδραση του οργανισμού σε αυτό. Αν και το οξύ στρες προκαλεί κυρίως ανοσοενίσχυση και το χρόνιο κυρίως ανοσοκαταστολή, αυτό δεν είναι απόλυτο (Ortuño et al. 2001). Σε τσιπούρα, ο συνωστισμός αλλά και η αναισθησία, διάρκειας μίας ώρας, με φαινοξυαιθανόλη ή βενζοκαΐνη προκάλεσαν ανοσοκαταστολή (Ortuño et al. 2002 a, c). Η ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος στο στρες εκτιμάται με τη βοήθεια διάφορων δεικτών και η οξειδωτική δραστηριότητα των φαγοκυττάρων θεωρείται ένας από τους πιο εξειδικευμένους και αξιόπιστους (Tort et al. 1996). Κατά την οξειδωτική δραστηριότητα των φαγοκυττάρων καταναλώνεται μοριακό οξυγόνο και παράγονται **ρίζες σουπεροξειδίου ( $O_2^-$ )**, υπεροξείδιο του υδρογόνου και άλλες ρίζες, οι οποίες, σε συνδυασμό με τα ένζυμα των λυσοσωμάτων, θανατώνουν τους φαγοκυτταρωμένους μικροοργανισμούς (Stave & Roberson 1985, Chung & Secombes 1988, Abbas & Lichtman 2004). Η οξειδωτική δραστηριότητα των φαγοκυττάρων, η οποία υπολογίζεται με βάση τη συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου στα λευκοκύτταρα του πρόσθιου τμήματος των νεφρών των ιχθύων,



φαίνεται ότι επηρεάζεται από τη συγκέντρωση της κορτιζόλης (Stave & Roberson 1985, Angelidis et al. 1987), αν και, για να κατασταλεί, χρειάζονται υψηλές συγκεντρώσεις της (Ainsworth et al. 1991).

Στο λαβράκι η φυσιολογική συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου κυμαίνεται από 0,075 έως 0,340 (Muñoz et al. 1998 & 2000, Sarmiento et al. 2004 a, b) ή και έως 0,500 (Mourente et al. 2005). Ανάλογες τιμές ( $0,122 \pm 0,010$ ) προέκυψαν και κατά τη δική μας έρευνα.

Σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας έρευνας, η συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου δεν επηρεάζεται ούτε από τη μεταφορά και παραμονή των ιχθύων για 6,5 ή 61,5 min σε μία δεξαμενή, ούτε από την αναισθησία με τρικαΐνη, φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο για αυτά τα χρονικά διαστήματα, υποδηλώνοντας ότι η αναισθησία διάρκειας τουλάχιστον μίας ώρας με τις ουσίες αυτές δεν έχει αρνητική επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα του λαβρακιού. Ωστόσο, κατά την αναισθησία διάρκειας 6,5 min με βενζοκαΐνη η συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου εμφάνισε, σε σχέση με την αρχική τιμή ( $0,122 \pm 0,010$ ), τάση μείωσης ( $0,092 \pm 0,015$ ), ενώ κατά την αναισθησία διάρκειας 61,5 min εμφάνισε στατιστικώς σημαντική μείωση ( $0,074 \pm 0,012$ ), υποδηλώνοντας βλαπτική επίδραση της βενζοκαΐνης στο ανοσοποιητικό σύστημα. Εξάλλου, η αναισθησία διάρκειας 6,5 min με βενζοκαΐνη ήταν η μόνη που συνοδεύτηκε από αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης, ενώ κατά την αναισθησία διάρκειας 61,5 min με βενζοκαΐνη παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η οξειδωτική δραστηριότητα των φαγοκυττάρων και η μείωση της συγκέντρωσης των ριζών σουπεροξειδίου πιθανώς επηρεάστηκε από την υψηλή συγκέντρωση της κορτιζόλης, όπως έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές (Stave & Roberson 1985, Angelidis et al. 1987).

Ανάλογα με τα δικά μας είναι και τα ευρήματα των Vazzana et al. (2002) στο λαβράκι, όπου, κατά την αύξηση της ιχθυοπυκνότητας ( $60 \text{ kg/m}^3$ ) για 48 ώρες, η συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου δεν διέφερε από αυτή των μαρτύρων. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και κατά την εκτέλεση χειρισμών για 15 min ή κατά την αύξηση της ιχθυοπυκνότητας ( $100 \text{ kg/m}^3$ ) σε τσιπούρα, (Ortuño et al. 2002 b). Ωστόσο, η έκθεση για 2 min στον ατμοσφαιρικό αέρα προκάλεσε, μία ημέρα μετά, μείωση της συγκέντρωσης των ριζών σουπεροξειδίου (Ortuño et al. 2002 b).

Η επίδραση της αναισθησίας στη συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου έχει

διερευνηθεί μόνο στην τσιπούρα και δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως. Όπως και κατά τη δική μας έρευνα, οι Bressler & Ron (2004) διαπίστωσαν ότι η ολιγόλεπτη αναισθησία με βενζοκαΐνη (26,3 mg/l), η οποία συνδυάστηκε με σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης, μείωσε τη συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου, ενώ, αντίθετα, η αναισθησία με γαριφαλέλαιο (46,6 mg/l), η οποία συνδυάστηκε με μικρότερου βαθμού αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης, δεν τη μετέβαλε. Ωστόσο, οι Ortuño et al. (2002 a) διαπίστωσαν ότι η συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου παρέμεινε αμετάβλητη κατά την αναισθησία διάρκειας 60 min με τρικαΐνη (50 mg/l) ή βενζοκαΐνη (35 mg/l), αλλά δεν μέτρησαν τη συγκέντρωση της κορτιζόλης. Τέλος, κατά την αναισθησία, διάρκειας 60 min, με φαινοξυαιθανόλη η συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου δεν μεταβλήθηκε όταν η δόση ήταν 66 mg/l, αν και η συγκέντρωση της κορτιζόλης αυξήθηκε (Ortuño et al. 2002 b), αλλά μειώθηκε όταν η δόση ήταν 221 mg/l (Ortuño et al. 2002 a). Αυτή η τελευταία διαφορά ίσως να υποδηλώνει ότι η μείωση της συγκέντρωσης των ριζών σουπεροξειδίου επηρεάζεται από τη δόση της αναισθητικής ουσίας και είναι πιο έντονη όταν χρησιμοποιούνται υψηλότερες δόσεις.

Ανακεφαλαιώνοντας, από τον τρίτο αυτό πειραματισμό της παρούσας μελέτης στο λαβράκι, φαίνεται ότι ακόμη και μια απλή διαδικασία, όπως η μεταφορά και η παραμονή για 6,5 min σε μία δεξαμενή, χωρίς την εκτέλεση κανενός άλλου χειρισμού, του προκαλεί στρες, καθώς συνοδεύεται από σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης και της γλυκόζης, αλλά δεν επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημά του. Η αναισθησία, ιδίως με γαριφαλέλαιο, αλλά και με τρικαΐνη ή φαινοξυαιθανόλη, περιορίζει το στρες και δεν επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημά του, αν και η παράταση του χρόνου αναισθησίας συνιστά στρεσικό παράγοντα αυξάνοντας την κορτιζόλη. Τέλος, η αναισθησία με βενζοκαΐνη αποτελεί έναν σοβαρό παράγοντα πρόκλησης στρες, καθώς συνοδεύεται από σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης και της γλυκόζης, ενώ φαίνεται να έχει βλαπτική επίδραση και στο ανοσοποιητικό σύστημά του, καθώς μειώνει τη συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου.

## IV. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΒΟΛΗΣ ΤΗΣ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΜΕ ΤΡΙΚΑΪΝΗ, ΒΕΝΖΟΚΑΪΝΗ, ΦΑΙΝΟΞΥΑΙΘΑΝΟΛΗ Η ΓΑΡΙΦΑΛΕΛΑΙΟ ΣΤΟΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟΥ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ

### A. Υλικά και μέθοδοι

#### A.1. Ζωικό υλικό

Εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού των διαθέσιμων δεξαμενών εκτροφής στον Ιχθυογεννητικό Σταθμό της Πρέβεζας κατά τον μήνα Απρίλιο, ο πειραματισμός αυτός διενεργήθηκε σε δύο φάσεις. Κατά την πρώτη φάση, η οποία άρχισε λίγο μετά τα μέσα Απριλίου και ολοκληρώθηκε λίγο μετά τα μέσα Ιανουαρίου, χρησιμοποιήθηκαν 800 περίπου ιχθύδια του είδους *Dicentrarchus labrax*, τα οποία κατά την έναρξη του πειραματισμού ήταν ηλικίας 5 μηνών και σωματικού βάρους  $19,2 \pm 1,6$  g, ενώ κατά τη δεύτερη φάση, η οποία άρχισε 2 μήνες αργότερα, δηλαδή λίγο μετά τα μέσα Ιουνίου, και τελείωσε λίγο μετά τα μέσα Μαρτίου, χρησιμοποιήθηκαν άλλα 800 περίπου ιχθύδια του ίδιου είδους, τα οποία κατά την έναρξη του πειραματισμού ήταν ηλικίας 7 μηνών και σωματικού βάρους  $29,8 \pm 2,4$  g. Στις ηλικίες αυτές δεν είναι δυνατός ο καθορισμός του φύλου από τα μακροσκοπικά και μόνο γνωρίσματα.

#### A.2. Δεξαμενές εκτροφής

Τόσο κατά την πρώτη όσο και κατά τη δεύτερη φάση του πειραματισμού, τα ιχθύδια χωρίστηκαν σε ισάριθμες ομάδες και κατανεμήθηκαν σε τέσσερις καναλόμορφες δεξαμενές (raceways) εντατικής εκτροφής, οι οποίες ήταν ίδιες και χρησιμοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο με εκείνες των προηγούμενων πειραματισμών. Η ιχθυοπυκνότητα κατά την πρώτη φάση του πειραματισμού ήταν  $0,50 \text{ kg/m}^3$  και κατά τη δεύτερη  $0,75 \text{ kg/m}^3$ .

#### A.3. Συνθήκες εκτροφής

Κατά την εκτροφή των ιχθυδίων εφαρμόστηκαν, από κάθε άποψη, όλα όσα αναφέρθηκαν και κατά τους προηγούμενους πειραματισμούς. Επιπλέον, καθώς ο πειραματισμός διήρκεσε για μακρό χρονικό διάστημα, οι δεξαμενές καθαρίζονταν κάθε δύο ημέρες από τα κόπρανα και τα υπολείμματα της τροφής, ενώ, παράλληλα, γινόταν

καταγραφή των νεκρών ιχθυδίων. Καθ' όλη τη διάρκεια των δύο φάσεων του πειραματισμού, ελεγχόταν καθημερινά η κατάσταση της υγείας των ιχθυδίων. Οι νεκροσκοπικές, βακτηριολογικές, παρασιτολογικές και ιστολογικές εξετάσεις επαναλήφθηκαν σε 10 ιχθύδια από κάθε δεξαμενή 90 και 180 ημέρες από την έναρξη της κάθε φάσης του πειραματισμού. Στα ιχθύδια χορηγούνταν εμπορικό σιτηρέσιο σε μορφή κυλινδρικών συμπήκτων, η διάμετρος των οποίων ήταν 2,5 mm κατά την έναρξη και των δύο φάσεων του πειραματισμού, ενώ, όταν το μέσο βάρος των ιχθυδίων ξεπέρασε τα 80 g, η διάμετρος των συμπήκτων αυξήθηκε στα 3,5 mm. Το σιτηρέσιο χορηγούνταν σε ποσότητα, η οποία, αρχικά, ήταν ίση με το 2% του σωματικού βάρους τους ανά 24ωρο, ενώ όταν το μέσο βάρος τους ξεπέρασε τα 80 g αναπροσαρμόστηκε στο 1,4% του σωματικού βάρους τους ανά 24ωρο.

Στην αρχή της πρώτης φάσης του πειραματισμού η θερμοκρασία του νερού ήταν  $19,3 \pm 0,3$  °C, η τιμή του pH  $8,05 \pm 0,01$  και η ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου  $9,1 \pm 0,2$  mg/l, ενώ στην αρχή της δεύτερης φάσης η θερμοκρασία του νερού ήταν  $22,0 \pm 0,3$  °C, η τιμή του pH  $8,02 \pm 0,02$  και η ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου  $8,7 \pm 0,3$  mg/l.

#### **A.4. Δεξαμενές αναισθησίας και δεξαμενές ανάνηψης**

Όσον αφορά τις δεξαμενές αναισθησίας και τις δεξαμενές ανάνηψης, εφαρμόστηκε ό,τι και κατά τους προηγούμενους πειραματισμούς, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν 3 δεξαμενές με μήκος 1 m, πλάτος 1 m και βάθος 1 m και ότι η κάθε μία περιείχε 500 l θαλασσινού νερού.

#### **A.5. Αναισθητικές ουσίες**

Τα μητρικά διαλύματα τρικαΐνης, βενζοκαΐνης, φαινοξυαιθανόλης και γαριφαλέλαιου παρασκευάστηκαν κατά τρόπο ανάλογο με αυτόν που περιγράφηκε κατά τον πρώτο πειραματισμό. Η τελική συγκέντρωση της κάθε αναισθητικής ουσίας στην αντίστοιχη δεξαμενή αναισθησίας ήταν ίση με εκείνη που προσδιορίστηκε κατά τον πρώτο πειραματισμό ως η πλέον αποτελεσματική και ασφαλής, δηλαδή 55 mg/l για την τρικαΐνη, 30 mg/l για τη βενζοκαΐνη, 274 mg/l για τη φαινοξυαιθανόλη και 13,38 mg/l για το γαριφαλέλαιο.

## **A.6. Πειραματικό πρωτόκολλο**

Κατά την πρώτη φάση του πειραματισμού εξετάστηκε η επίδραση της επαναλαμβανόμενης αναισθησίας με βενζοκαΐνη και φαινοξυαιθανόλη στον περιορισμό του στρες και στο ανοσοποιητικό σύστημα και στην ανάπτυξη του εκτρεφόμενου λαβρακιού. Η αναισθησία επαναλαμβανόταν, αρχικά, κάθε 30 ημέρες για διάστημα 120 ημερών και, στη συνέχεια, κάθε 10 ημέρες για διάστημα άλλων 120 ημερών. Κατά τη δεύτερη φάση του πειραματισμού εφαρμόστηκε το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο, αλλά, ως αναισθητικές ουσίες, χρησιμοποιήθηκαν η τρικαΐνη και το γαριφαλέλαιο.

Για τους λόγους που αναπτύχθηκαν κατά τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, ως δείκτες εκτίμησης του στρες και της κατάστασης του ανοσοποιητικού συστήματος χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης, της γλυκόζης και των πρωτεϊνών του πλάσματος καθώς και η συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου στα λευκοκύτταρα του πρόσθιου τμήματος των νεφρών. Ως δείκτες εκτίμησης της ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν: α) το βάρος του σώματος, β) η μέση ημερήσια αύξηση του βάρους του σώματος ανά ιχθύδιο, γ) το συνολικό μήκος του σώματος, δ) η μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής ανά ιχθύδιο, ε) ο δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής και στ) ο συντελεστής ευρωστίας. Ο δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής υπολογίστηκε από τη σχέση: δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής = καταναλωθείσα ποσότητα τροφής / αύξηση του βάρους του σώματος, ενώ ο συντελεστής ευρωστίας (K) από τη σχέση:  $K = 100 W / l^3$ , όπου «W» είναι το βάρος του σώματος και «l» είναι το μήκος του σώματος του ιχθυδίου. Το βάρος του σώματος και η κατανάλωση της τροφής μετρήθηκαν με ζυγό ακρίβειας 0,1 g, ενώ το συνολικό μήκος του σώματος με ακρίβεια 1 mm. Ως συνολικό μήκος του σώματος θεωρήθηκε το μήκος μεταξύ της άκρης του ρύγχους και της άκρης του ουραίου πτερυγίου, όταν οι λοβοί του τελευταίου είναι συμπιεσμένοι.

Για τη διενέργεια της κάθε φάσης του πειραματισμού χρησιμοποιήθηκαν τρεις πλαστικές δεξαμενές αναισθησίας, οι δύο για τη μελέτη της επίδρασης των αναισθητικών ουσιών και η τρίτη για τη μελέτη της επίδρασης της διαδικασίας της αναισθητοποίησης. Σε κάθε δεξαμενή αναισθησίας τοποθετήθηκαν 500 l θαλασσινού νερού και στις δύο από αυτές έγινε προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας του μητρικού διαλύματος της κάθε αναισθητικής ουσίας, ενώ στην τρίτη δεν προστέθηκε αναισθητική ουσία. Σε κάθε μία από τις τρεις δεξαμενές αναισθησίας μεταφέρθηκαν προσεκτικά με απόχη όλα τα ιχθύδια (περίπου 200 κατά την πρώτη αναισθησία) της κάθε μίας από τις

τρεις εκ των τεσσάρων δεξαμενών εκτροφής. Τα ιχθύδια της τέταρτης δεξαμενής εκτροφής δεν υποβλήθηκαν σε κανέναν χειρισμό, καθώς αποτελούσαν τους μάρτυρες της δεξαμενής εκτροφής (Μάρτυρες 1). Στις δύο δεξαμενές αναισθησίας, οι οποίες περιείχαν αναισθητική ουσία, τα ιχθύδια παρέμεναν επί 60 min μετά την είσοδό τους στο στάδιο της ελαφράς αναισθησίας, ενώ στην τρίτη δεξαμενή, η οποία δεν περιείχε αναισθητική ουσία, τα ιχθύδια, τα οποία χρησίμευαν ως μάρτυρες της διαδικασίας της αναισθητοποίησης (Μάρτυρες 2), παρέμεναν για 61,5 min, επειδή ο μέσος χρόνος εγκατάστασης της αναισθησίας με κάθε μία από τις αναισθητικές ουσίες που εξετάστηκαν ήταν περίπου 1,5 min. Ακολουθούσε λήψη, με σύριγγα ινσουλίνης, 1 ml αίματος από την ουραία φλέβα 10 ιχθυδίων από κάθε μία από τις 3 δεξαμενές αναισθησίας καθώς και από τη δεξαμενή εκτροφής. Στη συνέχεια, τα ιχθύδια ζυγίζονταν, γινόταν μέτρηση του συνολικού μήκους τους και ακολουθούσε άσηπτη εξαγωγή των νεφρών.

Όλα τα δείγματα αίματος αφήνονταν σε ηρεμία για 30 min και, στη συνέχεια, υποβάλλονταν σε φυγοκέντρηση 1.300 g για 10 min. Ο ορός που προέκυπτε φυλασσόταν σε καταψύκτη, ο οποίος εξασφάλιζε θερμοκρασία  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , μέχρι να διενεργηθεί η μέτρηση της κορτιζόλης, της γλυκόζης και των πρωτεϊνών. Τα δείγματα νεφρών τοποθετούνταν σε διάλυμα τύπου L-15 (Leibovitz, Gibco) και μεταφέρονταν, σε συνθήκες ψύξης στους  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , στο Ινστιτούτο ΠΑΣΤΕΡ της Αθήνας για ανάλυση.

Μετά το πέρας κάθε αναισθησίας τα υπόλοιπα ιχθύδια μεταφέρονταν στις δεξαμενές εκτροφής, όπου και παρέμεναν μέχρι την επόμενη αναισθησία. Όπως προαναφέρθηκε, κατά το διάστημα αυτό ελεγχόταν καθημερινά η κατάσταση της υγείας τους και η συμπεριφορά τους.

Με εξαίρεση την άσηπτη εξαγωγή των νεφρών, προκειμένου να μετρηθεί η συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου, η οποία γινόταν κάθε 60 ημέρες, η δειγματοληψία και η συλλογή των απαιτούμενων στοιχείων, προκειμένου να υπολογιστούν οι σχετικοί δείκτες γινόταν κάθε 30 ημέρες, και συνέπιπτε πάντοτε με ημέρα κατά την οποία χορηγείτο αναισθησία.

#### **A.7. Προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης, της γλυκόζης, των πρωτεϊνών και της συγκέντρωσης των ριζών σουπεροξειδίου**

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης, της γλυκόζης, των πρωτεϊνών και των ριζών σουπεροξειδίου έγινε με τη μεθοδολογία που εφαρμόστηκε στον προηγούμενο πειραματισμό και περιγράφηκε αναλυτικά στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

#### **A.8. Στατιστική ανάλυση**

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που αφορούσαν την επίδραση της επαναλαμβανόμενης αναισθησίας στον περιορισμό του στρες και στο ανοσοποιητικό σύστημα και στην ανάπτυξη του εκτρεφόμενου λαβρακιού, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία της ανάλυσης διακύμανσης δύο κατευθύνσεων (Πετρίδης 2000), σύμφωνα με το σχέδιο ανάλυσης των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (Two-way ANOVA, repeated measures design). (Πετρίδης 2000). Κατά τα λοιπά, εφαρμόστηκε ακριβώς ό,τι και κατά τους προηγούμενους πειραματισμούς. Οι τιμές του βάρους του σώματος, του δείκτη μετατρεψιμότητας της τροφής, του μήκους του σώματος, του συντελεστή ευρωστίας καθώς και των συγκεντρώσεων κορτιζόλης, γλυκόζης, πρωτεϊνών και ριζών σουπεροξειδίου εκφράζονται ως αριθμητικός μέσος και τυπική απόκλιση του μέσου.

#### **B. Αποτελέσματα**

Οι νεκροσκοπικές, βακτηριολογικές, παρασιτολογικές και ιστολογικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν σε 10 ιχθύδια από κάθε δεξαμενή εκτροφής κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού καθώς και σε άλλα 10 κάθε φορά, 90 και 180 ημέρες από την έναρξη της κάθε φάσης του πειραματισμού, έδειξαν ότι όλα τα ιχθύδια ήταν υγιή. Ακόμη, ο τακτικός έλεγχος της υγείας των ιχθυδίων τόσο κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού όσο και καθ' όλη τη διάρκεια των δύο φάσεων του πειραματισμού έδειξε ότι παρέμεναν υγιή.

Από τον Πίνακα 22 φαίνεται ότι η επαναλαμβανόμενη αναισθησία με φαινοξυαιθανόλη ή βενζοκαΐνη δεν συνοδεύτηκε από μεταβολή των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης, της γλυκόζης, των πρωτεϊνών και των ριζών σουπεροξειδίου με την πάροδο του χρόνου ενώ, όπως ήταν αναμενόμενο, μεταβολές δεν παρατηρήθηκαν ούτε στους Μάρτυρες 1 και 2. Επίσης, φαίνεται ότι και κατά τον πειραματισμό αυτό προέκυψαν ευρήματα ανάλογα με εκείνα του 3<sup>ου</sup> πειραματισμού και συγκεκριμένα: α) τα ιχθύδια που μεταφέρθηκαν από τη δεξαμενή εκτροφής στη δεξαμενή αναισθησίας

και παρέμειναν εκεί για 61,5 min χωρίς να αναισθητοποιηθούν (Μάρτυρες 2), παρουσίαζαν σε κάθε δειγματοληψία υψηλότερη συγκέντρωση κορτιζόλης ( $P \leq 0,01$ ) και γλυκόζης ( $P \leq 0,017$ ) από αυτή των ιχθυδίων που παρέμειναν στη δεξαμενή εκτροφής (Μάρτυρες 1), β) κατά την αναισθησία με φαινοξυαιθανόλη η συγκέντρωση της κορτιζόλης και της γλυκόζης ήταν υψηλότερη ( $P \leq 0,01$ ) από εκείνη των Μαρτύρων 1, ενώ δεν διέφερε από εκείνη των Μαρτύρων 2, γ) κατά την αναισθησία με βενζοκαΐνη η συγκέντρωση της κορτιζόλης και της γλυκόζης ήταν υψηλότερη ( $P \leq 0,05$ ) τόσο από αυτή των Μαρτύρων 2 όσο και από εκείνη που παρατηρήθηκε κατά την αναισθησία με φαινοξυαιθανόλη, δ) καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε ως προς τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών και ε) η συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου ήταν σημαντικά χαμηλότερη ( $P \leq 0,05$ ) μόνο κατά την αναισθησία με βενζοκαΐνη.

Από τον Πίνακα 23 φαίνεται ότι η επαναλαμβανόμενη αναισθησία με τρικαΐνη ή γαριφαλέλαιο δεν συνοδεύτηκε από μεταβολή των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης, της γλυκόζης, των πρωτεϊνών και των ριζών σουπεροξειδίου με την πάροδο του χρόνου ενώ, όπως ήταν αναμενόμενο, μεταβολές δεν παρατηρήθηκαν ούτε στους Μάρτυρες 1 και 2. Επίσης, φαίνεται ότι και κατά τον πειραματισμό αυτό προέκυψαν ευρήματα ανάλογα με εκείνα του 3<sup>ου</sup> πειραματισμού και συγκεκριμένα: α) τα ιχθύδια που μεταφέρθηκαν από τη δεξαμενή εκτροφής στη δεξαμενή αναισθησίας και παρέμειναν εκεί για 61,5 min χωρίς να αναισθητοποιηθούν (Μάρτυρες 2) παρουσίαζαν σε κάθε δειγματοληψία υψηλότερες ( $P \leq 0,01$ ) συγκεντρώσεις κορτιζόλης και γλυκόζης από αυτή των ιχθυδίων που παρέμειναν στη δεξαμενή εκτροφής (Μάρτυρες 1), β) κατά την αναισθησία με τρικαΐνη ή γαριφαλέλαιο οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης, οι οποίες δεν διέφεραν μεταξύ τους, ήταν υψηλότερες ( $P \leq 0,01$ ) από εκείνες των Μαρτύρων 1, ενώ δεν διέφεραν από εκείνες των Μαρτύρων 2, γ) κατά την αναισθησία με γαριφαλέλαιο οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης ήταν παρόμοιες με εκείνες των Μαρτύρων 1 και κατά την αναισθησία με τρικαΐνη παρόμοιες με εκείνες των Μαρτύρων 2, ενώ κατά την αναισθησία με γαριφαλέλαιο ήταν χαμηλότερες ( $P \leq 0,01$ ) από ό,τι κατά την αναισθησία με τρικαΐνη και δ) καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε ως προς τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών και των ριζών σουπεροξειδίου.

Από τους Πίνακες 24 και 25 φαίνεται ότι η επανάληψη της αναισθησίας, αρχικά, κάθε 30 ημέρες για διάστημα 120 ημερών και, στη συνέχεια, κάθε 10 ημέρες για διάστημα επίσης 120 ημερών, δεν επηρέασε αρνητικά την ανάπτυξη, καθώς δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ιχθυδίων που υποβλήθηκαν σε



επαναλαμβανόμενη αναισθησία, εκείνων που παρέμειναν στη δεξαμενή εκτροφής και δεν αναισθητοποιήθηκαν (Μάρτυρες 1) και εκείνων που μεταφέρονταν στη δεξαμενή αναισθησίας και παρέμεναν εκεί χωρίς να αναισθητοποιηθούν (Μάρτυρες 2).

**Πίνακας 22.** Επίδραση της επαναλαμβανόμενης αναισθησίας με φαινοξυαιθανόλη ή βενζοκαΐνη στις συγκεντρώσεις της κορτιζόλης, της γλυκόζης, των πρωτεϊνών και των ριζών σουπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) (n=10)

Ημέρα		Αρχική αναισθησία	Επαναλαμβανόμενη αναισθησία ανά 30 ημέρες (30, 60, 90, 120)				Επαναλαμβανόμενη αναισθησία ανά 10 ημέρες (130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240)			
		0	30	60	90	120	150	180	210	240
<b>Κορτιζόλη (μg/dl)</b>	Μάρτυρες 1*	34,8±3,5 <sup>a</sup>	35,8±3,1 <sup>a</sup>	35,0±2,9 <sup>a</sup>	36,6±3,6 <sup>a</sup>	36,2±3,5 <sup>a</sup>	35,1±3,2 <sup>a</sup>	35,2±3,2 <sup>a</sup>	34,2±3,1 <sup>a</sup>	34,4±3,1 <sup>a</sup>
	Μάρτυρες 2**	45,8±4,8 <sup>b</sup>	48,7±3,6 <sup>b</sup>	51,1±4,3 <sup>b</sup>	52,0±3,5 <sup>b</sup>	50,0±5,2 <sup>b</sup>	52,9±3,4 <sup>b</sup>	52,2±5,4 <sup>b</sup>	51,4±3,0 <sup>b</sup>	51,1±3,4 <sup>b</sup>
	Φαινοξυαιθανόλη	46,9±3,5 <sup>b</sup>	47,0±2,9 <sup>b</sup>	48,8±2,9 <sup>b</sup>	48,7±3,6 <sup>b</sup>	47,0±3,9 <sup>b</sup>	53,6±4,1 <sup>b</sup>	51,3±3,9 <sup>b</sup>	50,6±4,6 <sup>b</sup>	49,6±3,7 <sup>b</sup>
	Βενζοκαΐνη	57,5±3,4 <sup>c</sup>	58,0±3,9 <sup>c</sup>	62,5±4,2 <sup>c</sup>	63,1±3,4 <sup>c</sup>	61,4±3,3 <sup>c</sup>	59,0±3,8 <sup>c</sup>	60,4±3,5 <sup>c</sup>	59,6±4,3 <sup>c</sup>	58,9±4,8 <sup>c</sup>
<b>Γλυκόζη (mg/dl)</b>	Μάρτυρες 1*	195,9±7,2 <sup>a</sup>	196,0±5,5 <sup>a</sup>	196,4±8,6 <sup>a</sup>	197,4±5,8 <sup>a</sup>	196,0±7,3 <sup>a</sup>	195,6±6,7 <sup>a</sup>	94,0±8,0 <sup>a</sup>	94,9±5,2 <sup>a</sup>	194,3±7,8 <sup>a</sup>
	Μάρτυρες 2**	209,5±6,7 <sup>b</sup>	209,4±6,1 <sup>b</sup>	209,2±5,8 <sup>b</sup>	209,9±6,3 <sup>b</sup>	210,4±6,4 <sup>b</sup>	210,2±4,9 <sup>b</sup>	209,3±5,2 <sup>b</sup>	209,5±5,5 <sup>b</sup>	209,1±7,0 <sup>b</sup>
	Φαινοξυαιθανόλη	209,5±7,0 <sup>b</sup>	209,7±6,7 <sup>b</sup>	210,2±6,1 <sup>b</sup>	211,5±5,8 <sup>b</sup>	211,0±5,8 <sup>b</sup>	211,1±6,8 <sup>b</sup>	210,4±5,2 <sup>b</sup>	208,5±6,4 <sup>b</sup>	208,7±5,4 <sup>b</sup>
	Βενζοκαΐνη	234,2±6,3 <sup>c</sup>	234,5±6,6 <sup>c</sup>	235,7±6,6 <sup>c</sup>	236,2±6,5 <sup>c</sup>	234,4±6,4 <sup>c</sup>	236,7±6,8 <sup>c</sup>	235,3±6,4 <sup>c</sup>	232,8±6,7 <sup>c</sup>	231,7±5,9 <sup>c</sup>
<b>Πρωτεΐνες (g/dl)</b>	Μάρτυρες 1*	4,0±0,4 <sup>a</sup>	4,1±0,3 <sup>a</sup>	4,0±0,3 <sup>a</sup>	4,0±0,3 <sup>a</sup>	3,9±0,4 <sup>a</sup>	4,0±0,4 <sup>a</sup>	4,0±0,3 <sup>a</sup>	3,8±0,3 <sup>a</sup>	4,2±0,6 <sup>a</sup>
	Μάρτυρες 2**	4,0±0,4 <sup>a</sup>	3,8±0,4 <sup>a</sup>	4,2±0,4 <sup>a</sup>	4,1±0,3 <sup>a</sup>	3,8±0,4 <sup>a</sup>	4,0±0,4 <sup>a</sup>	4,0±0,3 <sup>a</sup>	4,0±0,3 <sup>a</sup>	4,0±0,4 <sup>a</sup>
	Φαινοξυαιθανόλη	3,8±0,5 <sup>a</sup>	3,9±0,5 <sup>a</sup>	4,1±0,5 <sup>a</sup>	4,1±0,5 <sup>a</sup>	4,0±0,5 <sup>a</sup>	3,8±0,5 <sup>a</sup>	3,8±0,4 <sup>a</sup>	3,9±0,5 <sup>a</sup>	4,1±0,4 <sup>a</sup>
	Βενζοκαΐνη	3,9±0,5 <sup>a</sup>	4,0±0,4 <sup>a</sup>	3,9±0,4 <sup>a</sup>	3,8±0,3 <sup>a</sup>	4,2±0,3 <sup>a</sup>	3,9±0,5 <sup>a</sup>	4,0±0,4 <sup>a</sup>	3,9±0,3 <sup>a</sup>	3,8±0,4 <sup>a</sup>
<b>Ριζες σουπεροξειδίου</b>	Μάρτυρες 1*	0,142±0,018 <sup>a</sup>	-	0,153±0,011 <sup>a</sup>	-	0,144±0,008 <sup>a</sup>	-	0,131±0,028 <sup>a</sup>	-	0,143±0,011 <sup>a</sup>
	Μάρτυρες 2**	0,127±0,028 <sup>a</sup>	-	0,132±0,018 <sup>a</sup>	-	0,149±0,012 <sup>a</sup>	-	0,138±0,012 <sup>a</sup>	-	0,144±0,012 <sup>a</sup>
	Φαινοξυαιθανόλη	0,138±0,014 <sup>a</sup>	-	0,155±0,015 <sup>a</sup>	-	0,124±0,032 <sup>a</sup>	-	0,142±0,020 <sup>a</sup>	-	0,156±0,014 <sup>a</sup>
	Βενζοκαΐνη	0,092±0,015 <sup>b</sup>	-	0,101±0,016 <sup>b</sup>	-	0,097±0,012 <sup>b</sup>	-	0,089±0,016 <sup>b</sup>	-	0,094±0,008 <sup>b</sup>

\* δεξαμενής εκτροφής, \*\* διαδικασίας αναισθητοποίησης

Τιμές της κάθε παραμέτρου στην ίδια στήλη με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P \leq 0,05$ ) μεταξύ τους.

**Πίνακας 23.** Επίδραση της επαναλαμβανόμενης αναισθησίας με τρικαΐνη ή γαριφαλέλαιο στις συγκεντρώσεις της κορτιζόλης, της γλυκόζης, των πρωτεϊνών και των ριζών σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (n=10)

Ημέρα		Αρχική αναισθησία	Επαναλαμβανόμενη αναισθησία ανά 30 ημέρες (30, 60, 90, 120)				Επαναλαμβανόμενη αναισθησία ανά 10 ημέρες (130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240)			
		0	30	60	90	120	150	180	210	240
<b>Κορτιζόλη (μg/dl)</b>	Μάρτυρες 1*	40,3±4,2 <sup>a</sup>	39,7±4,4 <sup>a</sup>	40,5±3,8 <sup>a</sup>	41,4±5,4 <sup>a</sup>	41,3±6,0 <sup>a</sup>	42,7±5,7 <sup>a</sup>	42,0±5,8 <sup>a</sup>	39,9±4,8 <sup>a</sup>	42,2±6,2 <sup>a</sup>
	Μάρτυρες 2**	54,5±5,9 <sup>b</sup>	55,1±6,0 <sup>b</sup>	57,5±4,3 <sup>b</sup>	58,4±5,8 <sup>b</sup>	61,6±5,7 <sup>b</sup>	59,4±4,5 <sup>b</sup>	58,7±6,0 <sup>b</sup>	55,5±5,7 <sup>b</sup>	53,7±5,0 <sup>b</sup>
	Τρικαΐνη	55,8±4,6 <sup>b</sup>	58,2±3,5 <sup>b</sup>	60,3±4,6 <sup>b</sup>	62,2±4,4 <sup>b</sup>	59,1±6,2 <sup>b</sup>	57,4±4,5 <sup>b</sup>	60,2±6,0 <sup>b</sup>	60,0±4,7 <sup>b</sup>	61,2±3,1 <sup>b</sup>
	Γαριφαλέλαιο	54,6±6,1 <sup>b</sup>	55,3±5,6 <sup>b</sup>	58,7±6,0 <sup>b</sup>	61,6±5,7 <sup>b</sup>	55,9±4,8 <sup>b</sup>	55,9±4,8 <sup>b</sup>	56,2±6,8 <sup>b</sup>	56,5±7,1 <sup>b</sup>	57,3±5,1 <sup>b</sup>
<b>Γλυκόζη (mg/dl)</b>	Μάρτυρες 1*	214,5±6,5 <sup>a</sup>	214,0±5,9 <sup>a</sup>	215,4±6,9 <sup>a</sup>	216,1±3,5 <sup>a</sup>	214,0±5,9 <sup>a</sup>	213,9±5,7 <sup>a</sup>	212,7±7,0 <sup>a</sup>	211,3±7,6 <sup>a</sup>	209,6±6,2 <sup>a</sup>
	Μάρτυρες 2**	231,0±4,9 <sup>b</sup>	230,1±6,4 <sup>b</sup>	231,9±7,3 <sup>b</sup>	231,8±7,6 <sup>b</sup>	231,1±5,7 <sup>b</sup>	230,0±7,0 <sup>b</sup>	230,1±6,0 <sup>b</sup>	229,3±6,7 <sup>b</sup>	228,9±7,6 <sup>b</sup>
	Τρικαΐνη	236,4±4,6 <sup>b</sup>	237,6±4,5 <sup>b</sup>	237,7±4,6 <sup>b</sup>	238,9±4,3 <sup>b</sup>	237,5±4,5 <sup>b</sup>	237,5±4,5 <sup>b</sup>	235,7±5,1 <sup>b</sup>	235,9±5,3 <sup>b</sup>	232,8±6,7 <sup>b</sup>
	Γαριφαλέλαιο	214,2±5,5 <sup>a</sup>	215,7±6,5 <sup>a</sup>	216,7±5,8 <sup>a</sup>	213,9±5,7 <sup>a</sup>	212,3±6,9 <sup>a</sup>	212,3±6,3 <sup>a</sup>	212,1±6,1 <sup>a</sup>	209,4±6,1 <sup>a</sup>	207,2±6,9 <sup>a</sup>
<b>Πρωτεΐνες (g/dl)</b>	Μάρτυρες 1*	3,8±0,6 <sup>a</sup>	3,9±0,3 <sup>a</sup>	4,1±0,3 <sup>a</sup>	4,0±0,3 <sup>a</sup>	3,9±0,3 <sup>a</sup>	4,0±0,4 <sup>a</sup>	3,8±0,3 <sup>a</sup>	4,0±0,3 <sup>a</sup>	4,0±0,4 <sup>a</sup>
	Μάρτυρες 2**	4,0±0,4 <sup>a</sup>	3,9±0,4 <sup>a</sup>	3,8±0,3 <sup>a</sup>	4,1±0,3 <sup>a</sup>	4,0±0,4 <sup>a</sup>	4,0±0,3 <sup>a</sup>	3,9±0,3 <sup>a</sup>	3,9±0,3 <sup>a</sup>	3,9±0,3 <sup>a</sup>
	Τρικαΐνη	4,0±0,5 <sup>a</sup>	4,0±0,5 <sup>a</sup>	4,1±0,4 <sup>a</sup>	3,9±0,4 <sup>a</sup>	3,9±0,5 <sup>a</sup>	4,0±0,4 <sup>a</sup>	4,0±0,4 <sup>a</sup>	4,0±0,4 <sup>a</sup>	4,0±0,6 <sup>a</sup>
	Γαριφαλέλαιο	4,1±0,4 <sup>a</sup>	3,8±0,4 <sup>a</sup>	3,9±0,3 <sup>a</sup>	3,9±0,3 <sup>a</sup>	4,0±0,4 <sup>a</sup>	4,0±0,4 <sup>a</sup>	4,1±0,5 <sup>a</sup>	3,8±0,5 <sup>a</sup>	3,9±0,5 <sup>a</sup>
<b>Ριζες σουπεροξειδίου</b>	Μάρτυρες 1*	0,130±0,020 <sup>a</sup>	-	0,137±0,021 <sup>a</sup>	-	0,126±0,030 <sup>a</sup>	-	0,144±0,016 <sup>a</sup>	-	0,126±0,022 <sup>a</sup>
	Μάρτυρες 2**	0,121±0,028 <sup>a</sup>	-	0,136±0,006 <sup>a</sup>	-	0,150±0,010 <sup>a</sup>	-	0,142±0,022 <sup>a</sup>	-	0,137±0,015 <sup>a</sup>
	Τρικαΐνη	0,142±0,016 <sup>a</sup>	-	0,144±0,017 <sup>a</sup>	-	0,128±0,024 <sup>a</sup>	-	0,151±0,012 <sup>a</sup>	-	0,118±0,024 <sup>a</sup>
	Γαριφαλέλαιο	0,117±0,035 <sup>a</sup>	-	0,151±0,012 <sup>a</sup>	-	0,134±0,017 <sup>a</sup>	-	0,139±0,020 <sup>a</sup>	-	0,129±0,019 <sup>a</sup>

\* δεξαμενής εκτροφής, \*\* διαδικασίας αναισθητοποίησης

Τιμές της κάθε παραμέτρου στην ίδια στήλη με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά (P≤0,01) μεταξύ τους.

**Πίνακας 24.** Επίδραση της επαναλαμβανόμενης αναισθησίας με φαινοξυαιθανόλη ή βενζοκαΐνη στην ανάπτυξη του εκτρεφόμενου λαβρακιού (n=10)

		Αρχική αναισθησία	Επαναλαμβανόμενη αναισθησία ανά 30 ημέρες (30, 60, 90, 120)				Επαναλαμβανόμενη αναισθησία ανά 10 ημέρες (130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240)			
		0	30	60	90	120	150	180	210	240
Ημέρα		0	30	60	90	120	150	180	210	240
<b>Βάρος του σώματος (g)</b>	Μάρτυρες 1*	18,9±1,2	26,0±3,1	36,0±2,3	49,0±4,8	67,9±5,0	87,2±3,1	108,2±6,7	135,1±4,7	168,3±5,9
	Μάρτυρες 2**	19,0±1,2	26,3±2,8	36,6±2,2	49,4±4,3	70,2±4,2	87,5±2,8	109,2±5,5	137,6±4,4	170,4±5,0
	Φαινοξυαιθανόλη	19,5±1,8	26,7±4,3	36,9±3,1	51,2±3,5	71,0±4,6	90,1±5,2	112,0±5,6	140,0±7,2	177,0±6,5
	Βενζοκαΐνη	19,3±1,5	26,3±3,7	36,5±4,1	50,0±5,9	68,9±6,3	88,4±6,5	109,1±7,8	138,0±6,6	172,0±7,1
<b>Μέση ημερήσια αύξηση του βάρους ανά ιχθύδιο (g)</b>	Μάρτυρες 1*		0,24	0,33	0,43	0,63	0,64	0,70	0,90	1,11
	Μάρτυρες 2**		0,24	0,34	0,43	0,69	0,58	0,72	0,95	1,09
	Φαινοξυαιθανόλη		0,24	0,34	0,48	0,66	0,64	0,73	0,93	1,23
	Βενζοκαΐνη		0,23	0,34	0,45	0,63	0,65	0,69	0,96	1,13
<b>Μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής ανά ιχθύδιο (g)</b>	Μάρτυρες 1*		0,38	0,52	0,72	0,98	0,95	1,22	1,51	1,89
	Μάρτυρες 2**		0,38	0,52	0,73	0,98	0,96	1,23	1,52	1,90
	Φαινοξυαιθανόλη		0,39	0,53	0,74	1,02	0,99	1,26	1,57	1,96
	Βενζοκαΐνη		0,39	0,53	0,73	1,00	0,96	1,24	1,53	1,93
<b>Δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής</b>	Μάρτυρες 1*		1,60±0,03	1,58±0,02	1,61±0,02	1,59±0,03	1,56±0,04	1,60±0,04	1,62±0,04	1,64±0,03
	Μάρτυρες 2**		1,61±0,02	1,59±0,02	1,61±0,03	1,59±0,02	1,56±0,03	1,61±0,03	1,62±0,03	1,64±0,04
	Φαινοξυαιθανόλη		1,64±0,02	1,60±0,03	1,58±0,03	1,57±0,03	1,57±0,01	1,60±0,03	1,62±0,02	1,61±0,04
	Βενζοκαΐνη		1,65±0,03	1,59±0,01	1,60±0,02	1,60±0,02	1,57±0,02	1,62±0,04	1,61±0,04	1,63±0,05
<b>Μήκος του σώματος (cm)</b>	Μάρτυρες 1*		11,8±0,3	12,9±0,3	14,7±0,3	16,1±0,4	17,9±0,5	19,2±0,3	20,8±0,6	22,1±0,5
	Μάρτυρες 2**		11,9±0,3	13,2±0,3	14,6±0,3	16,1±0,3	18,2±0,5	19,4±0,3	20,9±0,5	22,1±0,4
	Φαινοξυαιθανόλη		12,0±0,4	13,2±0,2	14,9±0,2	16,4±0,3	18,3±0,3	19,7±0,5	21,0±0,5	22,4±0,3
	Βενζοκαΐνη		11,8±0,3	13,1±0,3	14,8±0,4	16,2±0,2	18,1±0,6	19,5±0,3	20,9±0,3	22,3±0,2
<b>Συντελεστής ευρωστίας</b>	Μάρτυρες 1*		1,15±0,04	1,21±0,04	1,13±0,04	1,17±0,06	1,18±0,07	1,23±0,04	1,20±0,07	1,25±0,06
	Μάρτυρες 2**		1,14±0,04	1,20±0,03	1,12±0,04	1,17±0,05	1,17±0,06	1,21±0,04	1,20±0,05	1,24±0,05
	Φαινοξυαιθανόλη		1,13±0,06	1,16±0,03	1,12±0,02	1,16±0,05	1,16±0,04	1,18±0,06	1,21±0,06	1,25±0,04
	Βενζοκαΐνη		1,17±0,05	1,17±0,04	1,13±0,06	1,18±0,03	1,16±0,06	1,19±0,04	1,20±0,04	1,24±0,03

\* δεξαμενής εκτροφής, \*\* διαδικασίας αναισθητοποίησης

**Πίνακας 25.** Επίδραση της επαναλαμβανόμενης αναισθησίας με τρικαΐνη ή γαριφαλέλαιο στην ανάπτυξη του εκτρεφόμενου λαβρακιού (n=10)

Ημέρα	Αρχική αναισθησία	Επαναλαμβανόμενη αναισθησία ανά 30 ημέρες (30, 60, 90, 120)				Επαναλαμβανόμενη αναισθησία ανά 10 ημέρες (130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240)				
	0	30	60	90	120	150	180	210	240	
<b>Βάρος του σώματος (g)</b>	Μάρτυρες 1*	30,3±2,1	41,5±3,5	57,2±4,1	79,0±4,3	108,3±6,4	138,1±6,0	175,7±6,7	219,1±8,3	273,6±8,3
	Μάρτυρες 2**	29,7±2,2	40,9±3,2	56,3±3,5	76,9±3,9	107,2±4,8	136,7±4,9	174,5±6,1	217,1±6,9	272,6±6,9
	Τρικαΐνη	29,5±2,7	40,6±4,0	55,3±5,0	76,8±5,0	104,9±5,7	134,2±7,2	170,7±6,9	212,9±7,2	270,3±10,2
	Γαριφαλέλαιο	29,8±2,3	40,8±2,8	56,1±3,0	77,0±4,1	106,7±4,7	134,2±5,9	171,1±8,1	217,8±8,2	274,5±8,6
<b>Μέση ημερήσια αύξηση του βάρους ανά ιχθύδιο (g)</b>	Μάρτυρες 1*		0,37	0,52	0,73	0,98	0,99	1,25	1,45	1,82
	Μάρτυρες 2**		0,37	0,51	0,69	1,01	0,98	1,26	1,42	1,85
	Τρικαΐνη		0,37	0,49	0,72	0,94	0,98	1,22	1,41	1,91
	Γαριφαλέλαιο		0,36	0,51	0,70	0,99	0,92	1,23	1,56	1,89
<b>Μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής ανά ιχθύδιο (g)</b>	Μάρτυρες 1*		0,61	0,83	1,14	1,58	1,52	1,93	2,46	3,07
	Μάρτυρες 2**		0,61	0,82	1,12	1,59	1,51	1,93	2,44	3,08
	Τρικαΐνη		0,59	0,81	1,11	1,54	1,47	1,88	2,39	2,98
	Γαριφαλέλαιο		0,59	0,81	1,12	1,54	1,49	1,87	2,39	3,04
<b>Δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής</b>	Μάρτυρες 1*		1,62±0,02	1,60±0,03	1,59±0,03	1,60±0,01	1,58±0,03	1,57±0,02	1,60±0,01	1,62±0,02
	Μάρτυρες 2**		1,61±0,02	1,61±0,02	1,58±0,02	1,61±0,02	1,57±0,03	1,57±0,03	1,59±0,02	1,62±0,03
	Τρικαΐνη		1,60±0,01	1,63±0,02	1,59±0,03	1,61±0,04	1,58±0,01	1,57±0,01	1,60±0,03	1,59±0,02
	Γαριφαλέλαιο		1,63±0,04	1,61±0,03	1,61±0,02	1,59±0,02	1,60±0,03	1,58±0,03	1,57±0,04	1,58±0,04
<b>Μήκος του σώματος (cm)</b>	Μάρτυρες 1*	13,6±0,2	15,1±0,3	16,9±0,2	18,7±0,4	20,8±0,3	22,7±0,5	24,3±0,3	26,0±0,6	27,8±0,4
	Μάρτυρες 2**	13,5±0,2	15,0±0,3	16,8±0,2	18,6±0,4	20,6±0,3	22,5±0,5	24,1±0,5	26,1±0,5	27,7±0,4
	Τρικαΐνη	13,5±0,3	14,9±0,4	16,6±0,3	18,6±0,3	20,5±0,5	22,4±0,3	24,0±0,5	25,8±0,5	27,6±0,5
	Γαριφαλέλαιο	13,6±0,2	15,0±0,3	16,7±0,3	18,6±0,4	20,7±0,5	22,5±0,5	23,9±0,6	25,9±0,6	27,9±0,7
<b>Συντελεστής ευρωστίας</b>	Μάρτυρες 1*	1,20±0,03	1,21±0,04	1,19±0,03	1,21±0,05	1,20±0,04	1,18±0,06	1,22±0,04	1,25±0,06	1,27±0,06
	Μάρτυρες 2**	1,19±0,03	1,20±0,04	1,19±0,04	1,20±0,05	1,21±0,05	1,18±0,05	1,23±0,04	1,24±0,07	1,28±0,06
	Τρικαΐνη	1,20±0,04	1,23±0,06	1,21±0,04	1,19±0,04	1,22±0,07	1,19±0,04	1,23±0,06	1,24±0,06	1,29±0,06
	Γαριφαλέλαιο	1,18±0,03	1,21±0,04	1,20±0,05	1,20±0,06	1,20±0,06	1,18±0,06	1,25±0,07	1,25±0,08	1,26±0,07

\* δεξαμενής εκτροφής, \*\* διαδικασίας της αναισθητοποίησης

## Γ. Συζήτηση

Όπως προαναφέρθηκε, η χρήση αναισθητικών ουσιών στους ιχθύς διευκολύνει τις παρεμβάσεις, οι οποίες είναι αναγκαίες στις ιχθυοκαλλιέργειες, και μειώνει το στρες που εμφανίζεται κατά την εκτέλεσή τους και τις βλαπτικές επιπτώσεις του στο ανοσοποιητικό σύστημα και στην ανάπτυξη (Jolly et al. 1972, Green 1979, Le Bras 1982, Kreiberg & Powell 1991, Stoskopf 1993, Gerwick et al. 1999, Tort et al. 2002, Small 2003, Neiffer 2007, Ross & Ross 2008). Η χρήση αναισθητικών ουσιών βρίσκει εφαρμογή καθ' όλο τον κύκλο εκτροφής του λαβρακιού, το οποίο αναισθητοποιείται τουλάχιστον 8-10 φορές μέσα σε 18,5-25 μήνες. Η πρώτη αναισθησία εφαρμόζεται σε προνύμφες 4 ημερών, βάρους περίπου 400 μg και μήκους 6-34 mm, όταν γίνεται ο έλεγχος νηκτικής κύστης (Chatain & Corrao 1992, Χώτος & Ρογδάκης 1992). Μετά από 40-60 ημέρες, ακολουθεί δεύτερη αναισθησία προκειμένου τα ιχθύδια, τα οποία ζυγίζουν 1-3 g, να μεταφερθούν με ασφάλεια στις δεξαμενές προπάχυνσης (Χώτος & Ρογδάκης 1992). Κατά τους 4 μήνες που παραμένουν εκεί, μέχρι να αποκτήσουν το βάρος των 20 g, τα ιχθύδια αναισθητοποιούνται ακόμη μία ή δύο φορές, προκειμένου να διευκολυνθεί η διαλογή τους κατά μέγεθος και επομένως να αποφευχθεί το φαινόμενο του κανιβαλισμού (Χώτος & Ρογδάκης 1992), και ακόμη μία φορά για να εμβολιαστούν με τη μέθοδο της εμβάπτουσης (Varvarigos 1999). Με το πέρας των 4 μηνών, γίνεται μία επιπλέον αναισθησία, προκειμένου τα ιχθύδια να μεταφερθούν στους κλωβούς ή στις δεξαμενές πάχυνσης (Χώτος & Ρογδάκης 1992). Μετά από περίπου ένα μήνα, οπότε αποκτούν το βάρος των 25 g, αναισθητοποιούνται και πάλι για να γίνει ο επαναληπτικός εμβολιασμός τους με εμβάπτουση ή ενδοπεριτοναϊκή έγχυση (Varvarigos 1999). Στους κλωβούς ή στις δεξαμενές πάχυνσης τα λαβράκια παραμένουν 13-19 μήνες μέχρι να αποκτήσουν το εμπορικό βάρος των 350 g (Χώτος & Ρογδάκης 1992). Κατά το διάστημα αυτό αναισθητοποιούνται κάθε 5-6 μήνες, όταν δηλαδή γίνεται η διαλογή τους κατά μέγεθος (Χώτος & Ρογδάκης 1992). Στους γεννήτορες εφαρμόζεται αναισθησία κυρίως κατά την περίοδο της αναπαραγωγής, σε τακτά χρονικά διαστήματα, προκειμένου να εξακριβωθεί το στάδιο της σεξουαλικής και της γοναδικής ωρίμανσης και να ακολουθήσει η τεχνητή γονιμοποίηση, η οποία περιλαμβάνει τη χορήγηση ορμονών και το συγχρονισμό της ωοτοκίας στα θηλυκά και τη λήψη σπέρματος από τα αρσενικά άτομα (FAWC 1996, Kahl et al. 2001). Επιπλέον, οι γεννήτορες αναισθητοποιούνται τουλάχιστον μία φορά το χρόνο όταν εμβολιάζονται

ή υποβάλλονται σε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση αντιβιοτικών (Varvarigos 1999). Ακόμη, αναισθησία γίνεται όταν εκτελούνται βιοψίες (Ross & Ross 2008).

Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, η όλη διαδικασία της αναισθησίας συνιστά, για τον οργανισμό, έναν εξωγενή παράγοντα και, συνεπώς, ενδέχεται, υπό ορισμένες συνθήκες, τόσο η αναισθησία αυτή καθ' εαυτή όσο και μια συγκεκριμένη αναισθητική ουσία να προκαλεί στρες (Iwama et al. 1989, Bressler & Ron 2004, Neiffer 2007, Ross & Ross 2008). Εξάλλου, καθώς είναι αναγκαίο να επαναλαμβάνεται σε μικρότερα ή μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι ίσως δρα αθροιστικά, προκαλώντας, σε σχέση με μία και μόνο αναισθησία, πιο έντονο και παρατεταμένο στρες με ιδιαίτερα βλαβερές επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα. Ομοίως, επειδή η επαναφορά της διαταραχθείσας, λόγω στρες, ομοιοστασίας απαιτεί κατανάλωση ενέργειας, η οποία φυσιολογικά θα διετίθετο για άλλες λειτουργίες όπως η ανάπτυξη, θα μπορούσε να αναμένει κανείς ότι, εάν η συχνή επανάληψη της αναισθησίας δρα αθροιστικά και προκαλεί πιο έντονο και παρατεταμένο στρες, θα υπάρχουν ουσιαστικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη, με αποτέλεσμα τη μείωση των αποδόσεων και την αύξηση του κόστους διατροφής των ιχθύων (Wendelaar Bonga 1997). Από τα ευρήματα της παρούσας έρευνας γίνεται σαφές ότι κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει στο λαβράκι κατά την επαναλαμβανόμενη αναισθησία με τρικαΐνη, βενζοκαΐνη, φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο, η οποία, με την πάροδο του χρόνου, ούτε πιο έντονο ή παρατεταμένο στρες προκάλεσε ούτε το ανοσοποιητικό σύστημα ούτε την ανάπτυξη του λαβρακιού επηρέασε αρνητικά.

Είναι βέβαιο ότι όταν η δράση ενός στρεσικού παράγοντα είναι συνεχής ή επαναλαμβανόμενη, ο οργανισμός μπορεί να χάσει την προσαρμοστικότητά του και να γίνει δυσλειτουργικός, με τελικό αποτέλεσμα την ανάσχεση της ανάπτυξης, την αδυναμία αναπαραγωγής, τη μειωμένη άμυνα σε παθογόνους μικροοργανισμούς και, ενδεχομένως, το θάνατο (Wendelaar Bonga 1997, Ross & Ross 2008). Όλα τα παραπάνω οφείλονται κυρίως στην συγκέντρωση της κορτιζόλης, η οποία κατά το χρόνιο στρες, παραμένει αυξημένη για αρκετές ημέρες ή εβδομάδες (Rotllant et al. 2001, Ross & Ross 2008). Αν και κατά το χρόνιο στρες ο οργανισμός προσπαθεί να μειώσει τη συγκέντρωση της κορτιζόλης σε φυσιολογικά επίπεδα (Pickering & Pottinger 1989), αυτό δεν είναι ούτε πάντα ούτε απόλυτα επιτυχές και, ουσιαστικά,

επιτυγχάνεται κυρίως με τη διακοπή της δράσης του στρεστικού παράγοντα (Παπουτσόγλου 1998).

Το γεγονός ότι το χρόνιο στρες επηρεάζει αρνητικά την πρόσληψη της τροφής και την ανάπτυξη των ιχθύων (Wendelaar Bonga 1997, Ross & Ross 2008) έχει ως συνέπεια οι δείκτες εκτίμησης της ανάπτυξης, όπως το βάρος του σώματος, η μέση ημερήσια αύξησή του, το μήκος του σώματος, η μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής, ο δείκτης μετατρεψιμότητάς της και ο συντελεστής ευρωστίας, τους οποίους και εμείς χρησιμοποιήσαμε, να χρησιμοποιούνται ευρύτατα στους ιχθύς ως αξιόπιστοι δείκτες εκτίμησης του στρες. Ουσιαστικά, οι δείκτες αυτοί δίνουν στοιχεία για την επίδραση του στρες στην όρεξη και στην κατανάλωση της τροφής, στην απορρόφηση της τροφής από το έντερο, στο μεταβολικό ρυθμό καθώς και στους ορμονικούς μηχανισμούς ανάπτυξης των ιχθύων. Πάντως, έχουν παρατηρηθεί και εξαιρέσεις στον κανόνα ότι το στρες δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη, καθώς και διαφορές μεταξύ διαφορετικών ειδών ιχθύων. Έτσι, το στρες λόγω μεγάλης ιχθυοπυκνότητας συνοδεύτηκε από μείωση της κατανάλωσης τροφής και του ρυθμού ανάπτυξης σε είδη όπως η ιριδίζουσα πέστροφα, αλλά από αύξησή τους στο σαλβελίνο τον άλπειο (Alanära & Brännäs 1996).

Η εξαιτίας του στρες μειωμένη πρόσληψη τροφής (Pickering et al. 1982) και η μη αποτελεσματική χρησιμοποίησή της ίσως να είναι οι κύριες αιτίες μειωμένης ανάπτυξης (Pickering & Stewart 1984). Η χρόνια αύξηση της κορτιζόλης επηρέασε αρνητικά την όρεξη και την ανάπτυξη της ιριδίζουσας πέστροφας (Gregory & Wood 1999). Εξάλλου, η λόγω στρες προκαλούμενη, τουλάχιστον στο χέλι, ατροφία του στομάχου, λογικά, επίσης μειώνει την ανάπτυξη (Peters 1982). Ωστόσο, η μειωμένη ανάπτυξη μπορεί να οφείλεται και στην απευθείας επίδραση των κατεχολαμινών και της κορτιζόλης (Pickering 1990, Ross & Ross 2008), οι οποίες εκλύονται κατά το στρες. Πέστροφες, οι οποίες επιλέχθηκαν με βάση την έντονη ανταπόκρισή τους στο στρες με έκλυση μεγάλων ποσοτήτων κορτιζόλης, είχαν πιο αργή ανάπτυξη από άλλες με λιγότερο έντονη ανταπόκριση (Øverli et al. 2006). Επίσης, η μακροχρόνια διατροφή γατόψαρων (Davis et al. 1985) και ιριδίζουσας πέστροφας (Barton et al. 1987) με ιχθυοτροφή εμπλουτισμένη με κορτιζόλη, σε βαθμό τέτοιο ώστε η συγκέντρωσή της να είναι ανάλογη εκείνης που συνήθως παρατηρείται λόγω στρες, προκάλεσε σημαντική μείωση του σωματικού βάρους τους.



Έχει υποστηριχθεί ότι οι κατεχολαμίνες και η κορτιζόλη παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των ιχθύων διαμέσου διάφορων μηχανισμών όπως η αύξηση της κατανάλωσης ενέργειας, η επιτάχυνση της γλυκονεογένεσης και της λιπόλυσης και, πιθανώς, η μεταβολή της δράσης διαφόρων ορμονών και κυρίως της αυξητικής ορμόνης, οι οποίες ευνοούν την ανάπτυξη (Wendelaar Bonga 1997). Σίγουρα, ο μεταβολικός ρυθμός των ιχθύων μπορεί να αυξηθεί κατά την έκθεσή τους σε στρεσικούς παράγοντες (Barton et al. 1987, Barton 1988) και οι αυξήσεις του προκαλούν μείωση του ρυθμού ανάπτυξης (Vaughan et al. 1982, Rice 1990). Πάντως, η μεταβολή του μεταβολικού ρυθμού των ιχθύων από τους ίδιους στρεσικούς παράγοντες δεν είναι σταθερή, καθώς ορισμένα είδη ιχθύων αντιδρούν στο στρες, π.χ. λόγω υποξίας, στέρησης τροφής ή άλλων παραγόντων, μειώνοντας τη μεταβολική δραστηριότητά τους αρκετά κάτω του φυσιολογικού, μία προσαρμοστική αντίδραση η οποία ονομάζεται μεταβολική καταστολή (van Ginneken & van den Thillart 2009). Η μεταβολική καταστολή αποτρέπει την σπατάλη ενέργειας, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες επιβίωσης. Ο βαθμός της μεταβολικής καταστολής εξαρτάται από το είδος και την ένταση του στρεσικού παράγοντα αλλά και από το είδος των ιχθύων και κυμαίνεται από 0 έως 80 % (van Ginneken & van den Thillart 2009).

Η παρεμπόδιση της ανάπτυξης των ιχθύων λόγω μεταβολής της δράσης διάφορων ορμονών, και κυρίως της αυξητικής ορμόνης, από τις κατεχολαμίνες και την κορτιζόλη είναι υπό συζήτηση. Η ανάπτυξη των ζωικών οργανισμών βρίσκεται γενικά κάτω από πολλαπλό ορμονικό έλεγχο, με την αυξητική ορμόνη να παίζει πρωτεύοντα ρόλο. Ωστόσο, η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της αυξητικής ορμόνης στο πλάσμα και του ρυθμού ανάπτυξης δεν είναι ξεκάθαρη, ενώ αντικρουόμενα ευρήματα υπάρχουν και όσον αφορά την επίπτωση του στρες στη συγκέντρωσή της. Έτσι, αν και η χορήγηση αυξητικής ορμόνης ευνοεί γενικά την ανάπτυξη, όπως π.χ. στο σολομό του Ατλαντικού, στον οποίο διαπιστώθηκε ισχυρά θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσής της στο πλάσμα και του ρυθμού ανάπτυξής του (Björnsson et al. 1995), άλλοι ερευνητές διαπίστωσαν μια αντίστροφη σχέση στην ιριδίζουσα πέστροφα κατά τη διάρκεια νηστείας (Rand-Weaver et al. 1994). Εξάλλου, όταν ιριδίζουσες πέστροφες υποβλήθηκαν σε οξύ στρες η συγκέντρωση της αυξητικής ορμόνης μειώθηκε, ενώ όταν υποβλήθηκαν σε χρόνια στρες αυξήθηκε, ενώ ο ρυθμός ανάπτυξης μειώθηκε (Pickering 1990, Pickering et al. 1991). Η έκκριση αυξητικής ορμόνης από την υπόφυση της

τιλάπιας αυξάνεται *in vitro* από την κορτιζόλη (Nishioka et al. 1985), ωστόσο, η έκκριση παύει αμέσως μετά την έκθεση των ίδιων ιχθύων σε όξινο νερό, το οποίο αυξάνει απότομα τη συγκέντρωση της κορτιζόλης (Wendelaar Bonga 1997). Εξάλλου, η συγκέντρωση της αυξητικής ορμόνης στο πλάσμα μπορεί να είναι αυξημένη μετά από στρες λόγω εμβολιασμού σε χρυσόψαρο (Cook & Peter 1984) ή στρες λόγω μειωμένης περιεκτικότητας του νερού σε οξυγόνο σε ιριδίζουσα πέστροφα (Pickering et al. 1991), αμετάβλητη μετά από στρες λόγω χειρισμών σε σολομό του είδους *Oncorhynchus keta* (Wagner & McKeown 1986) ή μειωμένη μετά από στρες λόγω χειρισμών και περιορισμού σε ιριδίζουσα πέστροφα (Pickering et al. 1991).

Η ενδεχόμενη επίδραση της αναισθησίας, και ιδίως της επαναλαμβανόμενης σε τακτά χρονικά διαστήματα, στο ανοσοποιητικό σύστημα και κυρίως στην ανάπτυξη των ιχθύων απασχολεί ιδιαίτερα τους ιχθυοκαλλιεργητές (Ross & Ross 2008). Ωστόσο, το όλο θέμα έχει διερευνηθεί ελάχιστα.

Η χρονική στιγμή έναρξης επαναπρόσληψης της τροφής και η προσλαμβανόμενη ποσότητα αυτής μετά από μία και μόνο αναισθησία δεν παρέχει ουσιώδη στοιχεία όσον αφορά την μακροπρόθεσμη ανάπτυξη των ιχθύων, επιτρέποντας μόνο υποθέσεις. Εξάλλου, τα σχετικά ευρήματα είναι αντικρουόμενα. Οι Soto & Burhanuddin (1995) διαπίστωσαν ότι ιχθύες του είδους *Siganus lineatus* έτρωγαν φυσιολογικά λίγες ώρες μετά από αναισθησία με γαριφαλέλαιο. Ομοίως, οι Sørum & Damsgård (2004) διαπίστωσαν ότι η επαναπρόσληψη τροφής άρχισε σύντομα μετά από αναισθησία με βενζοκαΐνη σε σολομό του Ατλαντικού και ότι η ανάπτυξή του δεν επηρεάστηκε αρνητικά. Το αυτό διαπιστώθηκε και μετά από αναισθησία με τρικαΐνη ή γαριφαλέλαιο σε ιριδίζουσα πέστροφα (Keene et al. 1998). Οι Prince & Powell (2000) διαπίστωσαν ότι ιχθύες του ίδιου είδους έτρωγαν φυσιολογικά μία εβδομάδα μετά από αναισθησία με γαριφαλέλαιο, αλλά οι Pirhonen & Schreck (2003) παρατήρησαν ότι 4, 24 και 48 ώρες μετά από αναισθησία με τρικαΐνη ή γαριφαλέλαιο η πρόσληψη τροφής ήταν μειωμένη περίπου κατά 15-20% και υπέθεσαν ότι αυτό, αναπόφευκτα, θα είχε επιπτώσεις στην ανάπτυξη.

Ωστόσο, οι McFarland & Klontz (1969) υποστήριξαν ότι η ορθή και προσεκτική επαναλαμβανόμενη χρήση τρικαΐνης, αλλά και άλλων αναισθητικών ουσιών, δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των ιχθύων. Όντως, η επαναλαμβανόμενη 5 φορές την εβδομάδα (καθημερινά με εξαίρεση το Σάββατο και την Κυριακή) και για 21 εβδομάδες

αναισθησία με τρικαΐνη δεν είχε επιπτώσεις στην ανάπτυξη της ιριδιζουσας πέστροφας (Nakatani 1962), ενώ η επαναλαμβανόμενη αναισθησία με βενζοκαΐνη δεν επηρέασε αρνητικά την ανάπτυξη της τιλάπιας (Ross & Geddes 1979) και άλλων ειδών ιχθύων (Ross & Ross 2008). Επίσης, οι Deacon et al. (1997) ανέφεραν ότι, σε ιχθύδια του είδους *Pomadasys commersonnii*, η εβδομαδιαίως και για 6 εβδομάδες επαναλαμβανόμενη αναισθησία με φαινοξυαιθανόλη όχι μόνο δεν επηρέασε αρνητικά, σε σχέση με ιχθύδια, τα οποία υποβλήθηκαν σε επαναλαμβανόμενους χειρισμούς χωρίς αναισθησία, το βάρος και το μήκος του σώματος, το συντελεστή ευρωστίας και το δείκτη μετατρεψιμότητας της τροφής, αλλά επιπλέον είχε ως αποτέλεσμα την πιο ομοιόμορφη ανάπτυξη όλων των ιχθυδίων. Τέλος, οι Hoskonen & Pirhonen (2006) διαπίστωσαν ότι, στην ιριδιζουσα πέστροφα, η εβδομαδιαίως και επί 8 εβδομάδες επαναλαμβανόμενη αναισθησία με τρικαΐνη ή γαριφαλέλαιο δεν επηρέασε την ποσότητα της προσλαμβανόμενης τροφής, αλλά η επαναλαμβανόμενη αναισθησία με γαριφαλέλαιο μείωσε στατιστικώς σημαντικά την ανάπτυξή της. Ωστόσο, οι μεταξύ των δύο αναισθητικών ουσιών διαφορές ως προς την ανάπτυξη δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές. Επίσης, η υποβολή των ιχθύων σε επαναλαμβανόμενους χειρισμούς χωρίς αναισθησία μείωσε στατιστικώς σημαντικά την ποσότητα της προσλαμβανόμενης τροφής και περιόρισε ομοίως την αύξηση του βάρους σε σχέση με ιχθύς, οι οποίοι δεν υποβλήθηκαν σε χειρισμούς, ενώ η επαναλαμβανόμενη αναισθησία με τρικαΐνη, αλλά όχι με γαριφαλέλαιο, αύξησε στατιστικώς σημαντικά την ποσότητα της προσλαμβανόμενης τροφής και επιτάχυνε ομοίως την αύξηση του βάρους σε σχέση με τους ιχθύς, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε επαναλαμβανόμενους χειρισμούς χωρίς αναισθησία (Hoskonen & Pirhonen 2006). Με βάση τα ευρήματά τους, οι Hoskonen & Pirhonen (2006) υπέθεσαν ότι η επαναλαμβανόμενη αναισθησία δεν προκάλεσε χρόνια στρες και συμπέραναν ότι και οι δύο αναισθητικές ουσίες συμβάλουν στον περιορισμό του στρες, δεν επιδρούν αρνητικά στην ανάπτυξη και προσφέρονται για επαναλαμβανόμενη αναισθησία, με την τρικαΐνη, ενδεχομένως, να υπερτερεί του γαριφαλέλαιου.

Τα παραπάνω ευρήματα συμφωνούν και αλληλοϋποστηρίζονται με τα δικά μας. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ιχθύδια, τα οποία είτε παρέμειναν στη δεξαμενή εκτροφής χωρίς να υποβληθούν σε κανέναν χειρισμό (Μάρτυρες 1), είτε μεταφέρθηκαν σε δεξαμενή, η οποία δεν περιείχε αναισθητική

ουσία, όπου και παρέμειναν για 61,5 min (Μάρτυρες 2). Η επανάληψη της αναισθησίας δεν επηρέασε αρνητικά την ανάπτυξη, καθώς δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ιχθυδίων που υποβλήθηκαν σε επαναλαμβανόμενη αναισθησία, των Μαρτύρων 1 και των Μαρτύρων 2, γεγονός το οποίο αποδεικνύει ότι η επαναλαμβανόμενη αναισθησία δεν επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη του λαβρακιού. Ωστόσο, θα μπορούσε να διερωτηθεί κανείς κατά πόσο, τελικώς, η επαναλαμβανόμενη αναισθησία επιδρά θετικά στην ανάπτυξη ή, αντιστρέφοντας το ερώτημα, κατά πόσο η μη εφαρμογή επαναλαμβανόμενης αναισθησίας επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη του λαβρακιού. Η απάντηση στο ερώτημα αυτό προϋποθέτει σύγκριση μεταξύ ιχθύων που υποβάλλονται κατ' επανάληψη στους συνήθεις, λιγότερο ή περισσότερο στρεσικούς, χειρισμούς των ιχθυοκαλλιέργειών με και χωρίς αναισθησία, όπως έγινε από τους Hoskonen & Pirhonen (2006) και τους Deacon et al. (1997). Η χρήση μιας τέτοιας ομάδας μαρτύρων κατά την παρούσα έρευνα κρίθηκε περιττή για δύο λόγους. Κατ' αρχήν, η αναγκαιότητα της χρήσης αναισθητικών ουσιών στις ιχθυοκαλλιέργειες είναι πέραν κάθε αμφισβήτησης, για λόγους οι οποίοι έχουν ήδη επανειλημμένα αναφερθεί, και, συνεπώς, ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσει εάν τυχόν υπάρχει αρνητική επίδραση της επαναλαμβανόμενης αναισθησίας στην ανάπτυξη του λαβρακιού και όχι να επιβεβαιώσει την ήδη δεδομένη χρησιμότητά της. Πέραν τούτου, η αποφυγή της χρήσης μιας τέτοιας ομάδας μαρτύρων κρίθηκε σκόπιμη και για λόγους ευζωΐας. Οπωσδήποτε, είναι πολύ πιθανό, αν και όχι απόλυτα βέβαιο, ότι, εάν μια τέτοια ομάδα μαρτύρων είχε υπάρξει, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης θα ήταν παρόμοια με εκείνα των Hoskonen & Pirhonen (2006), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι οι ιχθύες, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε επαναλαμβανόμενη αναισθησία με τρικαΐνη εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική αύξηση του βάρους τους σε σχέση με τους ιχθύς, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε επαναλαμβανόμενους χειρισμούς χωρίς αναισθησία.

Πέραν όλων των παραπάνω, τα ευρήματα του 4<sup>ου</sup> πειραματισμού της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν εκείνα του 3<sup>ου</sup> πειραματισμού σε ό,τι αφορά την επίδραση της αναισθησίας διάρκειας μίας ώρας στον περιορισμό του στρες και στο ανοσοποιητικό σύστημα, και μάλιστα σε ποικιλία ηλικιών και σωματικών βαρών. Υπενθυμίζεται ότι ο 3<sup>ος</sup> πειραματισμός πραγματοποιήθηκε σε ιχθύδια ηλικίας 6,5 μηνών και σωματικού βάρους  $27,2 \pm 1,5$  g, ενώ ο 4<sup>ος</sup> σε ιχθύδια των οποίων η ηλικία και το σωματικό βάρος μεταβλήθηκαν, κατά τη διάρκειά του, από 5 σε 16 μήνες και από  $19,2 \pm 1,6$  g σε περίπου

170 g, αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας ότι τα ευρήματά μας ισχύουν για ποικίλες ηλικίες και μεγέθη. Εξάλλου, από τους δύο αυτούς πειραματισμούς συνάγεται και το συμπέρασμα ότι η ανταπόκριση στο όποιο στρες προκαλεί η αναισθησία στο λαβράκι δεν επηρεάζεται από την ηλικία. Πάντως, ελάχιστα είναι γνωστά για τη σχέση μεταξύ ηλικίας και στρες στους ιχθύς. Ενδεχομένως, η έκλυση ορμονών, όπως οι κατεχολαμίνες και η κορτιζόλη, ως ανταπόκριση στο στρες, να επηρεάζεται από την ηλικία και το φύλο (Ross & Ross 2008.) Γενικώς, τα έμβρυα, οι προνύμφες και τα νεαρά άτομα θεωρούνται πιο ευαίσθητα από τους ενήλικους ιχθύς σε στρεσικούς παράγοντες, όπως η ρύπανση και οι μεταβολές της θερμοκρασίας, αλλά η μεταφορά και η συγκράτηση έχουν λιγότερο έντονη επίδραση σε αυτά, ενδεχομένως λόγω απουσίας ενός πλήρως λειτουργικού άξονα υποθάλαμου-υπόφυσης-επινεφριδίων κατά τις πρώτες 5 εβδομάδες της ζωής (Wendelaar Bonga 1997).

Ανακεφαλαιώνοντας, θα μπορούσε συμπερασματικά να αναφερθεί ότι αφού το στρες, το οποίο προκαλείται κατά τους συχνούς στις ιχθυοκαλλιέργειες χειρισμούς, επηρεάζει αρνητικά το ανοσοποιητικό σύστημα και την ανάπτυξη των ιχθύων, η μη διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος και της ανάπτυξης του λαβρακιού, λόγω της επαναλαμβανόμενης αναισθησίας κατά τους πειραματισμούς μας, υποδηλώνει ότι η αναισθησία όχι μόνο διευκολύνει τους χειρισμούς αυτούς, αλλά, επιπλέον, περιορίζει το στρες και αποτρέπει τις δυσμενείς επιπτώσεις του, εξασφαλίζοντας την ομαλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και την απρόσκοπτη ανάπτυξη του εκτρεφόμενου λαβρακιού.

#### IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας προκύπτουν τα εξής:

1. Η τρικαΐνη, η βενζοκαΐνη, η φαινοξυαιθανόλη και το γαριφαλέλαιο μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία και ασφάλεια για την αναισθησία του λαβρακιού.
2. Από τις δόσεις της κάθε μίας από τις παραπάνω αναισθητικές ουσίες, οι οποίες διερευνήθηκαν, και συγκεκριμένα από τις δόσεις 45, 55 και 65 mg/l για την τρικαΐνη, 20, 30 και 40 mg/l για τη βενζοκαΐνη, 219,2, 274 και 328,8 mg/l για τη φαινοξυαιθανόλη και 8,92, 13,38 και 17,85 mg/l για το γαριφαλέλαιο, τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της αναισθησίας παρείχαν οι ενδιάμεσες δόσεις. Οι δόσεις αυτές προτείνονται ως οι βέλτιστες για το λαβράκι.
3. Η τρικαΐνη (55 mg/l), συγκρινόμενη με τη βενζοκαΐνη (30 mg/l), τη φαινοξυαιθανόλη (274 mg/l) και το γαριφαλέλαιο (13,38 mg/l), εξασφάλισε τον καλύτερο συνδυασμό ταχείας εγκατάστασης της αναισθησίας και ταχείας ανάνηψης από την αναισθησία και θα μπορούσε να προταθεί ως η πλέον κατάλληλη αναισθητική ουσία για το εκτρεφόμενο λαβράκι.
4. Η παράταση της αναισθησίας κατά 5 min, με χρήση της κάθε μίας από τις παραπάνω αναισθητικές ουσίες στη βέλτιστη δόση της, δεν επηρέασε τον χρόνο ανάνηψης από την αναισθησία, αλλά η παράταση της αναισθησίας κατά 60 min αύξησε τον χρόνο ανάνηψης, αλλά δεν συνδυάστηκε με θνησιμότητα. Συνεπώς, η αναισθησία διάρκειας 60 min είναι απόλυτα ασφαλής στο λαβράκι με τις παραπάνω αναισθητικές ουσίες και δόσεις.
5. Η τρικαΐνη, συγκρινόμενη με τη βενζοκαΐνη, τη φαινοξυαιθανόλη και το γαριφαλέλαιο στις βέλτιστες δόσεις τους, εξασφάλισε και κατά την παρατεταμένη αναισθησία τον καλύτερο συνδυασμό ταχείας εγκατάστασης της αναισθησίας και ταχείας ανάνηψης και θα μπορούσε να προταθεί ως η πλέον κατάλληλη αναισθητική ουσία για αναισθησία διάρκειας 60 min για το εκτρεφόμενο λαβράκι.
6. Ακόμη και μια απλή διαδικασία, όπως είναι η μεταφορά και η ολιγόλεπτη παραμονή χωρίς αναισθησία σε μία δεξαμενή χωρίς την εκτέλεση κανενός άλλου χειρισμού, προκαλεί στο λαβράκι στρες, καθώς συνοδεύεται από σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης και της γλυκόζης, αν και δεν φαίνεται να επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημά του. Συνεπώς, πρέπει με κάθε τρόπο να

- αποφεύγεται η εκτέλεση ακόμη και, θεωρητικώς, ήπιων και μικρής διάρκειας χειρισμών χωρίς τη χορήγηση αναισθησίας.
7. Η αναισθησία, ιδίως με γαριφαλέλαιο, αλλά και με τρικαΐνη ή φαινοξυαιθανόλη, περιορίζει το στρες και δεν επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημα του λαβρακιού, αν και η παράταση του χρόνου αναισθησίας συνιστά στρεσικό παράγοντα, αυξάνοντας την κορτιζόλη.
  8. Η αναισθησία με βενζοκαΐνη αποτελεί σοβαρό παράγοντα πρόκλησης στρες, καθώς συνοδεύεται από σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης και της γλυκόζης, ενώ φαίνεται να έχει βλαπτική επίδραση και στο ανοσοποιητικό σύστημα του λαβρακιού, καθώς μειώνει τη συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου. Η χρήση της στο λαβράκι είναι προτιμότερο να αποφεύγεται.
  9. Η επαναλαμβανόμενη αναισθησία με τρικαΐνη, βενζοκαΐνη, φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο δεν προκαλεί, με την πάροδο του χρόνου, στο λαβράκι πιο έντονο ή παρατεταμένο στρες, δεν επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξή του και δεν έχει βλαπτική ή, στην περίπτωση της βενζοκαΐνης, πρόσθετη βλαπτική επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημά του.
  10. Με εξαίρεση τη συγκριτική δοκιμή των δόσεων, η οποία πραγματοποιήθηκε σε λαβράκι συγκεκριμένης ηλικίας και σωματικού βάρους, όλα τα παραπάνω ευρήματα βρίσκουν εφαρμογή σε λαβράκι ποικίλων ηλικιών και σωματικών βαρών.
  11. Η ανταπόκριση στο όποιο στρες προκαλεί η αναισθησία στο λαβράκι δεν επηρεάζεται από την ηλικία του.
  12. Καθώς το στρες, το οποίο προκαλείται κατά τους συχνούς στις ιχθυοκαλλιέργειες χειρισμούς, ακόμη και όταν αυτοί είναι ήπιοι και μικρής διάρκειας, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το ανοσοποιητικό σύστημα και την ανάπτυξη των ιχθύων, η μη διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος και της ανάπτυξης του λαβρακιού λόγω της επαναλαμβανόμενης αναισθησίας, κατά τους πειραματισμούς της παρούσας μελέτης, υποδηλώνει ότι η αναισθησία, με τις παραπάνω αναισθητικές ουσίες στις βέλτιστες δόσεις τους, όχι μόνο διευκολύνει τους χειρισμούς αυτούς, αλλά, επιπλέον, περιορίζει το στρες και αποτρέπει τις δυσμενείς επιπτώσεις του, εξασφαλίζοντας την ομαλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και την απρόσκοπτη ανάπτυξη του εκτρεφόμενου λαβρακιού και, συνεπώς η εφαρμογή της είναι ασφαλής και επωφελής.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εντατική εκτροφή λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) και άλλων ιχθύων απαιτεί μεγάλο αριθμό παρεμβάσεων, με αποτέλεσμα την πρόκληση στους ιχθύς έντονου στρες, το οποίο μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην ανάπτυξη, στην αναπαραγωγή και στο ανοσοποιητικό σύστημά τους. Η χρήση αναισθητικών ουσιών είναι συνηθισμένη πρακτική στις ιχθυοκαλλιέργειες, αναγκαία όχι μόνο για να αποφευχθεί το στρες και να διευκολυνθούν οι διάφορες παρεμβάσεις, αλλά και για να αποτραπούν οι βίαιες αντιδράσεις και η έντονη κινητική δραστηριότητα, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε τραυματισμούς ή ακόμη και θάνατο των ιχθύων. Ωστόσο, η χρήση αναισθητικών ουσιών, ενδέχεται, υπό ορισμένες συνθήκες, να προκαλεί και η ίδια στρες.

Σήμερα, μόνο ένας μικρός αριθμός αναισθητικών ουσιών χρησιμοποιείται στις ιχθυοκαλλιέργειες των ευρύαλων ιχθύων, όπως το λαβράκι, και μάλιστα εμπειρικά, καθώς τα επιστημονικά δεδομένα για την αποτελεσματικότητα, την ασφάλεια και τη συμβολή τους στον περιορισμό του στρες σε αυτούς είναι ελάχιστα. Εξάλλου, είναι άγνωστο ποια είναι η επίδρασή της χρήσης τους στο ανοσοποιητικό σύστημα και στην ανάπτυξη των ιχθύων αυτών.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε προκειμένου: α) να διερευνηθούν η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια των πιο διαδεδομένων στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες αναισθητικών ουσιών, δηλαδή της τρικαΐνης, της βενζοκαΐνης, της φαινοξυαιθανόλης και του γαριφαλέλαιου, και να προσδιοριστεί η βέλτιστη δόση της κάθε μίας από αυτές στο εκτρεφόμενο λαβράκι, β) να διερευνηθεί η επίδραση της διάρκειας της αναισθησίας με τη βέλτιστη δόση στην αποτελεσματικότητα και στην ασφάλεια των παραπάνω αναισθητικών ουσιών, γ) να διερευνηθούν η συμβολή της αναισθησίας με τις παραπάνω ουσίες, καθώς και της διάρκειάς της, στον περιορισμό του στρες και η επίδρασή τους στο ανοσοποιητικό σύστημα του εκτρεφόμενου λαβρακιού και δ) να διερευνηθούν η συμβολή της επαναλαμβανόμενης αναισθησίας με τις ουσίες αυτές στον περιορισμό του στρες και η επίδρασή της στο ανοσοποιητικό σύστημα και στην ανάπτυξη του εκτρεφόμενου λαβρακιού.

Για το σκοπό αυτό διενεργήθηκαν τέσσερις συνολικά πειραματισμοί στις εγκαταστάσεις του Ιχθυογεννητικού Σταθμού του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης



και Τροφίμων, στην Πωγωνίτσα Πρέβεζας. Ως δείκτες εκτίμησης του στρες των ιχθύων χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης, της γλυκόζης και των πρωτεϊνών του πλάσματος, ως δείκτης εκτίμησης της κατάστασης του ανοσοποιητικού συστήματος χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου στα λευκοκύτταρα του πρόσθιου τμήματος των νεφρών και ως δείκτες εκτίμησης της ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν το βάρος του σώματος, η μέση ημερήσια αύξηση του βάρους του σώματος ανά ιχθύδιο, το συνολικό μήκος του σώματος, η μέση ημερήσια κατανάλωση τροφής ανά ιχθύδιο, ο δείκτης μετατρεψιμότητας της τροφής και ο συντελεστής ευρωστίας.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας προκύπτουν τα εξής:

1. Η τρικαΐνη, η βενζοκαΐνη, η φαινοξυαιθανόλη και το γαριφαλέλαιο μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία και ασφάλεια για την αναισθησία του λαβρακιού.
2. Από τις δόσεις της κάθε μίας από τις παραπάνω αναισθητικές ουσίες, οι οποίες διερευνήθηκαν, και συγκεκριμένα από τις δόσεις 45, 55 και 65 mg/l για την τρικαΐνη, 20, 30 και 40 mg/l για τη βενζοκαΐνη, 219,2, 274 και 328,8 mg/l για τη φαινοξυαιθανόλη και 8,92, 13,38 και 17,85 mg/l για το γαριφαλέλαιο, τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της αναισθησίας παρείχαν οι ενδιάμεσες δόσεις. Οι δόσεις αυτές προτείνονται ως οι βέλτιστες για το λαβράκι.
3. Η τρικαΐνη (55 mg/l), συγκρινόμενη με τη βενζοκαΐνη (30 mg/l), τη φαινοξυαιθανόλη (274 mg/l) και το γαριφαλέλαιο (13,38 mg/l) εξασφάλισε τον καλύτερο συνδυασμό ταχείας εγκατάστασης της αναισθησίας και ταχείας ανάνηψης από την αναισθησία και θα μπορούσε να προταθεί ως η πλέον κατάλληλη αναισθητική ουσία για το εκτρεφόμενο λαβράκι.
4. Η παράταση της αναισθησίας κατά 5 min, με χρήση της κάθε μίας από τις παραπάνω αναισθητικές ουσίες στη βέλτιστη δόση της, δεν επηρέασε τον χρόνο ανάνηψης από την αναισθησία, αλλά η παράταση της αναισθησίας κατά 60 min αύξησε τον χρόνο ανάνηψης, αλλά δεν συνδυάστηκε με θνησιμότητα. Συνεπώς, η αναισθησία διάρκειας 60 min είναι απόλυτα ασφαλής στο λαβράκι με τις παραπάνω αναισθητικές ουσίες και δόσεις.
5. Η τρικαΐνη, συγκρινόμενη με τη βενζοκαΐνη, τη φαινοξυαιθανόλη και το γαριφαλέλαιο στις βέλτιστες δόσεις τους, εξασφάλισε και κατά την παρατεταμένη

- αναισθησία τον καλύτερο συνδυασμό ταχείας εγκατάστασης της αναισθησίας και ταχείας ανάνηψης και θα μπορούσε να προταθεί ως η πλέον κατάλληλη αναισθητική ουσία για αναισθησία διάρκειας 60 min για το εκτρεφόμενο λαβράκι.
6. Ακόμη και μια απλή διαδικασία, όπως είναι η μεταφορά και η ολιγόλεπτη παραμονή χωρίς αναισθησία σε μια δεξαμενή χωρίς την εκτέλεση κανενός άλλου χειρισμού, προκαλεί στο λαβράκι στρες, καθώς συνοδεύεται από σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης και της γλυκόζης, αν και δεν φαίνεται να επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημά του. Συνεπώς, πρέπει με κάθε τρόπο να αποφεύγεται η εκτέλεση ακόμη και, θεωρητικώς, ήπιων και μικρής διάρκειας χειρισμών χωρίς τη χορήγηση αναισθησίας.
  7. Η αναισθησία, ιδίως με γαριφαλέλαιο, αλλά και με τρικαΐνη ή φαινοξυαιθανόλη, περιορίζει το στρες και δεν επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημα του λαβρακιού, αν και η παράταση του χρόνου αναισθησίας συνιστά στρεσικό παράγοντα, αυξάνοντας την κορτιζόλη.
  8. Η αναισθησία με βενζοκαΐνη αποτελεί σοβαρό παράγοντα πρόκλησης στρες, καθώς συνοδεύεται από σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων της κορτιζόλης και της γλυκόζης, ενώ φαίνεται να έχει βλαπτική επίδραση και στο ανοσοποιητικό σύστημα του λαβρακιού, καθώς μειώνει τη συγκέντρωση των ριζών σουπεροξειδίου. Η χρήση της στο λαβράκι είναι προτιμότερο να αποφεύγεται.
  9. Η επαναλαμβανόμενη αναισθησία με τρικαΐνη, βενζοκαΐνη, φαινοξυαιθανόλη ή γαριφαλέλαιο δεν προκαλεί, με την πάροδο του χρόνου, στο λαβράκι πιο έντονο ή παρατεταμένο στρες, δεν επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξή του και δεν έχει βλαπτική ή, στην περίπτωση της βενζοκαΐνης, πρόσθετη βλαπτική επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημά του.
  10. Με εξαίρεση τη συγκριτική δοκιμή των δόσεων, η οποία πραγματοποιήθηκε σε λαβράκι συγκεκριμένης ηλικίας και σωματικού βάρους, όλα τα παραπάνω ευρήματα βρίσκουν εφαρμογή σε λαβράκι ποικίλων ηλικιών και σωματικών βαρών.
  11. Η ανταπόκριση στο όποιο στρες προκαλεί η αναισθησία στο λαβράκι δεν επηρεάζεται από την ηλικία του.
  12. Καθώς το στρες, το οποίο προκαλείται κατά τους συχνούς στις ιχθυοκαλλιέργειες χειρισμούς, ακόμη και όταν αυτοί είναι ήπιοι και μικρής διάρκειας, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το ανοσοποιητικό σύστημα και την ανάπτυξη των ιχθύων, η μη

διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος και της ανάπτυξης του λαβρακιού λόγω της επαναλαμβανόμενης αναισθησίας, κατά τους πειραματισμούς της παρούσας μελέτης, υποδηλώνει ότι η αναισθησία, με τις παραπάνω αναισθητικές ουσίες στις βέλτιστες δόσεις τους, όχι μόνο διευκολύνει τους χειρισμούς αυτούς, αλλά, επιπλέον, περιορίζει το στρες και αποτρέπει τις δυσμενείς επιπτώσεις του, εξασφαλίζοντας την ομαλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και την απρόσκοπτη ανάπτυξη του εκτρεφόμενου λαβρακιού και, συνεπώς η εφαρμογή της είναι ασφαλής και επωφελής.



**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE  
DEPARTMENT OF SURGERY**

**USE OF ANAESTHETIC AGENTS  
IN EUROPEAN SEA BASS (*Dicentrarchus labrax* L.),  
THEIR ABILITY TO MINIMIZE STRESS,  
AND THEIR EFFECT ON THE IMMUNE SYSTEM  
AND GROWTH**

by

**ILIAS D. TSANTILAS, DVM**

**PhD THESIS**

**Karditsa 2011**

**ABSTRACT**

The aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and other fish species requires a large number of interventions, which can induce stress, with potentially detrimental effects on growth, reproduction and immune system function. Anaesthetic agents are routinely used in aquaculture to ease handling, quieten violent reactions and intense muscular activity which could cause injury or even death, permit the performance of painful procedures and reduce stress. However, on certain occasions, anaesthesia may itself evoke a stress response or immunodepression.

At present only a handful of anaesthetics are used in aquaculture of euraline species, as the sea bass. However, their use is largely empirical, as scientific data on their efficacy and safety and on their ability to minimize stress is limited. Furthermore, their potential effect on the immune system and growth is unknown.

The present study was performed in order to: a) evaluate the efficacy and safety of the anaesthetics most commonly used in greek fisheries, i.e. tricaine, benzocaine, phenoxyethanol and clove oil, and establish their optimum dose for sea bass, b) investigate the effect of the duration of anaesthesia using the optimum dose of the mentioned anaesthetics on their effectiveness and safety, c) investigate their ability to minimize stress and their potential effect on the immune system, when used for anaesthesia of short or long duration, and d) investigate their ability to minimize stress and their potential effect on the immune system and growth, when used repeatedly during long periods of time.

The present study was performed in the installations of Hatchery Station of Ministry of Rural Growth and Food, in Pogonitsa, Preveza, Greece. Cortisol, glucose and protein plasma concentrations were used as stress indicators, while the superoxide anion concentration in the head kidney leukocytes was used as an immune system indicator. Body weight, average daily increase of body weight, body length, average daily food intake, food efficiency ratio and condition factor were used as growth indicators.

According to the results of the study, the following conclusions can be drawn:

1. Tricaine, benzocaine, phenoxyethanol and clove oil are effective and safe anaesthetics for the sea bass, when used at optimum doses.
2. Doses of 45, 55 and 65 mg/l for tricaine, 20, 30 and 40 mg/l for benzocaine, 219.2, 274 and 328.8 mg/l for phenoxyethanol and 8.92, 13.38 and 17.85 mg/l for clove oil

were used. The optimum doses, i.e. the most safe and effective for sea bass anaesthesia, were 55 mg/l for tricaine, 30 mg/l for benzocaine, 274 mg/l for phenoxyethanol and 13.38 mg/l for clove oil.

3. Tricaine (55 mg/l), when compared to benzocaine (30 mg/l), phenoxyethanol (274 mg/l) or clove oil (13.38 mg/l), combined the most rapid induction and recovery, and should be considered the most suitable anaesthetic for the sea bass.
4. Following induction of anaesthesia, a 5-min exposure period to the optimum dose of the mentioned anaesthetics did not influence recovery time; however, a 60-min exposure period prolonged recovery time, but mortality was not observed. Therefore, a 60-min exposure period of the sea bass to the optimum dose of the mentioned anaesthetics should be considered safe.
5. Following a 60-min exposure period, tricaine (55 mg/l), when compared to benzocaine (30 mg/l), phenoxyethanol (274 mg/l) or clove oil (13.38 mg/l), also combined the most rapid induction and recovery, and should be considered the most suitable anaesthetic for the sea bass.
6. Even the simplest intervention, such as the transfer from one tank to another, when performed without anaesthesia can induce stress indicated by the significant increase in cortisol and glucose concentrations, although it has no effect on the immune system of the sea bass. Therefore, anaesthesia should be considered mandatory for even the simplest interventions performed in fisheries.
7. Anaesthesia with clove oil, but also with tricaine or phenoxyethanol, minimizes stress and has no effect on the immune system of the sea bass, although a 60-min exposure period is accompanied by an increase in cortisol concentration.
8. Anaesthesia with benzocaine is accompanied by significant increase in cortisol and glucose concentrations and decrease in superoxide anion concentrations. Therefore, it seems that it evokes a stress response and has a detrimental effect on the immune system of the sea bass, and its use should be avoided.
9. Tricaine, phenoxyethanol or clove oil do not evoke a stress response and have no detrimental effects on the immune system or growth when used repeatedly for sea bass anaesthesia during long periods of time. Benzocaine acts in the same manner when used repeatedly and its detrimental effect on the immune system is not augmented.

10. With the exception of the comparative doses trial, which was performed in sea bass of a particular age and size, all the above mentioned results are applicable in different age and size classes of sea bass.
11. The response to any stress may be evoked by anaesthesia does not seem to be age-dependent.
12. Stress is induced by even the simplest and shortest interventions commonly performed in fisheries and may have detrimental effects on growth and immune system function. In the present study repeatedly performed anaesthesia had no detrimental effects on the immune system or growth of sea bass indicating that anaesthesia not only eases handling, quietens violent reactions and intense muscular activity, and permits the performance of painful procedures, but also minimizes stress and its potentially hazardous effects. Therefore, anaesthesia should be considered advantageous, safe and mandatory for even the simplest interventions performed in fisheries.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbas AK, Lichtman AH (2004).** Βασική ανοσολογία. Λειτουργίες και Δυσλειτουργίες του Ανοσοποιητικού Συστήματος (Μετάφραση: Μ Σαμάρκος). Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα.
- Ackerman PA, Morgan JD, Iwama GK (2001).** Anaesthetics. Canadian Council on Animal Care Guidelines for Use of Fish in Research, pp. 1-22. [[http://ccac.ca/en/alternatives/species-resources\\_ressources-especes/fish\\_poissons.htm](http://ccac.ca/en/alternatives/species-resources_ressources-especes/fish_poissons.htm)]
- Acton RT, Weinheimer PF, Hall SJ, Niedermeier W, Shelton E, Bennet JC (1971).** Tetrameric immune macroglobulins in three orders of bony fishes. Proceedings of the National Academy of Science, 68: 107-111.
- Ainsworth AJ, Dexiang C, Waterstrat PR (1991).** Changes in peripheral blood leukocyte percentages and function of neutrophils in stressed channel catfish. Journal of Aquatic Animal Health, 3: 41-47.
- Alanära A, Brännäs E (1996).** Dominance in demand-feeding behaviour in Arctic charr and rainbow trout: the effect of stocking density. Journal of Fish Biology, 48: 242-254.
- Alliot E, Pastoureaud A, Thebault H (1983).** Influence de la température et de la salinité sur la croissance et la composition corporelle d'alevins de *Dicentrarchus labrax*. [Influence of temperature and salinity on growth and body composition of sea bass fingerlings, *Dicentrarchus labrax*.] Aquaculture, 31: 181-194.
- Amend DF, Goven BA, Elliot DG (1982).** Etomidate: effective dosages for a new fish anesthetic. Transactions of the American Fisheries Society, 111: 337-341.
- Andersen DE, Reid SD, Moon TW, Perry SF (1991)** Metabolic effects associated with chronically elevated cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 48: 1811-1817.
- Anderson WG, McKinley RS, Colavecchia M (1997).** The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effect on swimming performance. North American Journal of Fisheries Management, 17: 301-307.
- Angelidis P, Baudin-Laurencin F, Youinou P (1987).** Stress in rainbow trout, *Salmo gairdneri*: effects upon phagocyte chemiluminescence, circulating leucocytes and susceptibility to *Aeromonas salmonicida*. Journal of Fish Biology, 31 (Supplement

A): 113-122.

- Austin B, Austin DA (2007)** Bacterial Fish Pathogens, Diseases of Farmed and Wild Fish, 4<sup>th</sup> ed. Praxis Publishing, Chichester, UK, pp. 185-236.
- Bandeem J, Leatherland JF (1997).** Transportation and handling stress of white suckers raised in cages. *Aquaculture International*, 5: 385-396.
- Barham WT, Caiger KH, Visser JGJ (1979).** The use of benzocaine hydrochloride as fish tranquilizer and anaesthetic in saline waters. *Journal of the Limnological Society of Southern Africa*, 5: 94-96.
- Barker D, Allan GL, Rowland SJ, Pickles JM (2002).** A Guide to Acceptable Procedures and Practices for Aquaculture and Fisheries Research, 2<sup>nd</sup> ed. NSW Fisheries Animal Care and Ethics Committee, Nelson Bay, Australia.
- Barnabé G (1989).** *Aquaculture* 2<sup>nd</sup> ed., Lavoisier, Paris.
- Barnabé G (1990).** *Aquaculture*, Vol I & II. Ellis Horwood. New York.
- Barnabé G, Paris J (1984).** Ponte avancée et ponte normale du Loup *Dicentrarchus labrax* (L) à la Station de Biologie Marine et Lagunaire de Sète. In: Actes du Colloque, L' Aquaculture du Bar et des Sparidés. Barnabé G, Billard R (eds), Publ INRA, Paris, pp. 63-72.
- Barnett CW, Pankhurst NW (1998).** The effects of common laboratory and husbandry practices on the stress response of greenback flounder (*Rhombosolea tapirinia*, Günther, 1862). *Aquaculture*, 162: 313-329.
- Barton BA (1988).** Endocrine and metabolic responses of fish to stress. *International Association of Aquatic Animal Medicine Proceedings*, 19: 41-55.
- Barton BA, Iwama GK (1991).** Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*: 3-26.
- Barton BA, Schreck CB, Barton LD (1987).** Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2: 173-185.
- Barton BA, Schreck CB, Sigismondi LA (1986).** Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress responses in juvenile chinook salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115: 245-251.
- Barton BA, Weirter GS, Schreck CB (1985).** Effect of prior acid exposure on

- physiological responses of juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to acute handling stress. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 42: 710-717.
- Beitinger TL, McCauley RW (1990).** Whole-animal physiological processes for the assessment of stress in fishes. Journal of Great Lakes Research, 16: 542-575.
- Bell G (1987).** An outline of anesthetic and anesthesia for salmonids, a guide for fish culturists in British Columbia. Canadian Technical Report of Fisheries Aquatic Sciences No. 1534.
- Björnsson BT, Stefansson SO, Hansen T (1995).** Photoperiod regulation of plasma growth hormone levels during parr-smolt transformation of Atlantic salmon: implications for hypoosmoregulatory ability and growth. General and Comparative Endocrinology, 100: 73-82.
- Blasiola GC (1977).** Quinaldine sulphate, a new anaesthetic formulation for tropical marine fishes. Journal of Fish Biology, 10: 113-119.
- Bolasina SN (2006).** Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. Aquaculture International, 14: 569-575.
- Bonath K (1977).** Narkose der Reptilien, Amphibien und Fische. Paul Parey Verlag, Berlin (cited by Weyl et al. 1996).
- Botsoglou NA, Fletouris DJ (2001).** Drug Residues in Foods. Pharmacology, Food Safety, and Analysis. Marcel Dekker Inc, New York.
- Bowser PR (2001).** Anesthetic options for fish. In: Recent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia: Companion Animals. Gleed RD, Ludders JW (eds). International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), New York. [<http://docentes.esa.ipcb.pt/amrodrig/anestesia.pdf>]
- Brandenburger Brown EA, Franklin JE, Pratt E, Trams EG (1972).** Contributions to the pharmacology of quinaldine (uptake and distribution in the shark and comparative studies). Comparative Biochemistry and Physiology A, 42: 223-231.
- Bressler K, Ron B (2004).** The effect of anesthetics on stress and the innate immune system of gilthead seabream, *Sparus aurata*. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 56: 5-13.
- Brett JR (1979).** Environmental factors and growth. In: Fish Physiology, Vol. VIII, Bioenergetics and Growth. Hoar WS, Randall DJ, Brett JR (eds). Academic Press,

New York, pp. 599-675.

- Brown S, Fedoruk K, Eales JG (1978).** Physical injury due to injection or blood removal causes transitory elevations of plasma thyroxine in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Canadian Journal of Zoology, 56: 1998-2003.
- Caipang CMA, Berg I, Brinchmann MF, Kiron V (2009).** Short-term crowding stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. modulates the humoral immune response. Aquaculture, 295: 110-115.
- Carprenier P (1984).** Elevage extensif du bar en marais. In: Actes du Colloque, L' Aquaculture du Bar et des Sparidés. Barnabé G, Billard R (eds), Publ INRA, Paris, pp. 419-422.
- Carrillo M, Zanuy S, Herrera E (1982).** Growth and diurnal variations in metabolic parameters in the starved bass, *Dicentrarchus labrax*, after experimental feeding. Comparative Biochemistry and Physiology A, 72: 11-16.
- Cerdá-Reverter JM, Zanuy S, Carrillo M, Madrid JA (1998).** Time-course studies on plasma glucose, insulin, and cortisol in Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) held under different photoperiodic regimes. Physiology and Behavior, 64: 245-250.
- Chanseau M, Bosc S, Galiay E, Oules G (2002).** L'utilisation de l'huile de clou de girofle comme anesthésique pour les smolts de saumon atlantique (*Salmo salar* L.) et comparaison de ses effets avec ceux du 2-Phenoxyethanol. [The use of clove oil as an anesthetic for atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.) and comparison of its effects with those of 2-phenoxyethanol.] Bulletin Francais de la Pêche et de la Pisciculture, 365/366: 579-589.
- Chapman DC, Jackson UT, Hubert WA (1988).** Method for separating normal striped bass larvae from those with uninflated gas bladders. The Progressive Fish-Culturist, 50: 166-169.
- Chatain B, Corrao D (1992).** A sorting method for eliminating fish larvae without functional swimbladders. Aquaculture, 107: 81-88.
- Cheng CA, John JAC, Wu MS, Lee CY, Lin CH, Lin CH, Chang CY (2006).** Characterization of serum immunoglobulin M of grouper and cDNA cloning of its heavy chain. Veterinary Immunology and Immunopathology, 109: 255-265.
- Cho GK, Heath DD (2000).** Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon

- Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 31: 537-546.
- Chung S, Secombes CJ (1988).** Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 89: 539-544.
- Colombo L, Pickering AD, Belvedere P, Shreck CB (1990).** Stress inducing factors and stress reaction in aquaculture. In: *Business Joins Science*. De Pauw N, Billard R (eds), European Aquaculture Society, Bredene, pp. 93-121.
- Conte H (1984).** Elevage en bassin de terre; experience professionnelle. In: *Actes du Colloque, L' Aquaculture du Bar et des Sparidés*. Barnabé G, Billard R (eds), Publ INRA, Paris, pp. 373-380.
- Cook AF, Peter RE (1984).** The effects of somatostatin on serum growth hormone levels in the goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 54: 109-113.
- Covès D (1999).** Welfare assessment in reared fish. COST 827-5<sup>th</sup> FP meetings, La Rochelle, CREMA de l'Houmeau (France), 4-6<sup>th</sup> June 99.
- Cowx IG, Lamarque P (1990).** Fishing with Electricity - Applications in Freshwater Fisheries Management. Fishing News Books, Oxford.
- Coyle SD, Durborow RM, Tidwell JH (2004).** Anesthetics in Aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center, Publication No 3900.
- Dalmo RA, Ingebrigtsen K, Bøgwald J (1997).** Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases*, 20: 241-273.
- Davidson GW, Davie PS, Young G, Fowler RT (2000).** Physiological responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with AQUI-S. *Journal of World Aquaculture Society*, 31: 105-114.
- Davis KB, Griffin BR (2004).** Physiological responses of hybrid striped bass under sedation by several anesthetics. *Aquaculture*, 233: 531-548.
- Davis KB, Parker NC (1986).** Plasma corticosteroid stress response of fourteen species of warmwater fish to transportation. *Transaction of the American Fisheries Society*, 115: 495-499.
- Davis KB, Torrance P, Parker NC, Suttle MA (1985).** Growth, body composition, and hepatic tyrosine aminotransferase activity in cortisol-fed channel catfish,

- Ictalurus punctatus* Rafinesque. *Journal of Fish Biology*, 27: 177-184.
- Davis SA, Schwedler TE, Tomasso JR, Collier JA (1991).** Production characteristics of pansize channel catfish in cages and open ponds. *Journal of the World Aquaculture Society*, 22: 183-186.
- Deacon N, White H, Hecht T (1997).** Isolation of the effective concentration of 2-phenoxyethanol for anaesthesia in the spotted grunter, *Pomadasys commersonii*, and its effect on growth. *Aquarium Sciences and Conservation*, 1: 19-27.
- Dendrinios P, Thorpe JP (1985).** Effects of reduced salinity on growth and body composition in the european bass *Dicentrarchus labrax* (L). *Aquaculture*, 49: 333-358.
- Do Vale A, Afonso A, Silva MT (2002).** The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish and Shellfish Immunology*, 13: 183-198.
- Droy BF, Goodrich MS, Lech JJ, Kleinow KM (1990).** Bioavailability, disposition and pharmacokinetics of 14 C-ormetoprim in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Xenobiotica*, 20: 147-157.
- Ebbing DE, Gammon SD (2002).** Γενική Χημεία, 6<sup>η</sup> έκδοση (Μετάφραση: ΝΔ Κλούρας). Εκδοτικός Οίκος Τραυλός, Αθήνα, σελ. 975.
- Ellis AE (1999).** Immunity to bacteria in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 9: 291-308.
- Ellis AE (2001).** Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 827-839.
- Endo T, Ogishima K, Tanaka H, Ohshima S (1972).** Studies on the anesthetic effect of eugenol in some fresh water fishes. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 38: 761-767.
- Evans DH (1987).** The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 71: 47-58.
- FAO (2008).** The State of World Fisheries and Aquaculture, Rome.
- FAWC (1996).** Report on the Welfare of Farmed Fish. Farm Animal Welfare Council, Surrey. [<http://www.fawc.org.uk/reports/fish/fishrtoc.htm>]
- Federation of European Aquaculture Producers (FEAP)** [<http://www.feap.info/feap>]

(Accessed: 11/10/2010)

- Ferreira JT, Schoonbee HJ, Smit GL (1984).** The use of benzocaine-hydrochloride as an aid in the transport of fish. *Aquaculture*, 42: 169-174.
- Flik G, Klaren PHM, Schoenmakers TJM, Bijvelds MJC, Verboost PM, Wendelaar Bonga SE (1996).** Symposium papers: Calcium regulation: Mechanisms and control in crustaceans and lower vertebrates. Cellular calcium transport in fish: Unique and universal mechanisms. *Physiological Zoology*, 69: 403-417.
- Flodmark LEW, Urke HA, Halleraker JH, Arnekleiv JV, Vøllestad LA, Poléo ABS (2002)** Cortisol and glucose responses in juvenile brown trout subjected to a fluctuating flow regime in an artificial stream. *Journal of Fish Biology*, 60: 238-248.
- Fromm PO (1980).** A review of some physiological and toxicological responses of freshwater fish to acid stress. *Environmental Biology of Fishes*, 5: 79-93.
- Gerwick L, Demers NE, Bayne CJ (1999).** Modulation of stress hormones in rainbow trout by means of anesthesia, sensory deprivation and receptor blockade. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 124: 329-334.
- Ghion F (1975).** First promising results in the use of Fluothane as general anesthetic for fish. *Italian Review of Fish Culture and Fish Pathology*, 10: 111-112.
- Gilderhus PA (1990).** Benzocaine as a fish anesthetic: Efficacy and safety for spawning-phase salmon. *The Progressive Fish-Culturist*, 52: 189-191.
- Gilderhus PA, Lemm CA, Woods III LC (1991).** Benzocaine as an anesthetic for striped bass. *The Progressive Fish-Culturist*, 53: 105-107.
- Gilderhus PA, Marking LL (1987).** Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals in rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management*, 7: 288-292.
- Gomes LC, Chiparri-Gomes AR, Lopes NP, Roubach R, Araujo-Lima CARM (2001).** Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32: 426-431.
- Green CJ (1979).** *Animal Anaesthesia*. Laboratory Animals Ltd, London.
- Gregory TR, Wood CM (1999).** The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology*, 72: 286-295.
- Hadj Kacem N, Aldrin JF, Romestand B (1986).** Influence immédiate du brossage

des bacs sur certains paramètres sanguins du loup d'élevage, *Dicentrarchus labrax* L.: effet de stress. [Immediate influence of tank scrubbing on some blood parameters of cultured European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: effect of stress]. *Aquaculture*, 59: 53–59.

**Hadj Kacem N, Aldrin JF, Romestand B (1987).** Effets immédiats d'une augmentation rapide de température sur certains paramètres sanguins du "loup" *Dicentrarchus labrax* (Linne, 1758). [Immediate effects of a rapid temperature increase on some blood parameters of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linne, 1758)]. *Aquaculture*, 64: 325–331.

**Hadj Kacem N, Aldrin JF, Romestand B (1988).** Modifications de certaines réponses secondaires de stress chez *Dicentrarchus labrax* sous l'effet d'un  $\beta$ -bloquant à base de Carazolol. Application au transport. [Modifications of some secondary stress responses in *Dicentrarchus labrax*, by the use of a  $\beta$ -blocker with a Carazolol base. Application to transport]. *Aquaculture*, 68: 277-285.

**Hanke W, Hegab SA, Assem H, Berkowsky B, Gerhard A, Gupta O, Reiter S (1991).** Mechanisms of hormonal action on osmotic adaptation in teleost fish. In: *Fish Ecotoxicology and Ecophysiology*. Braunbeck T, Hanke W, Segner H (eds), VCH, Weinheim, pp. 315–326. (cited by Marino et al. 2001)

**Heard DJ, Stetter MD (2007).** Reptiles, amphibians, and fish. In: *Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia*, 4<sup>th</sup> ed. Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA, (eds), Blackwell, Ames, pp. 869–887.

**Heming TA (1989).** Clinical studies of fish blood: importance of sample collection and measurement techniques. *American Journal of Veterinary Research*, 50: 93-97.

**Henderson-Arzapalo A, Lemm C, Hawkinson J, Keyes P (1992).** Tricaine used to separate phase-i striped bass with uninflated gas bladders from normal fish. *The Progressive Fish-Culturist* 1992, 54: 133-135.

**Hoskonen P, Pirhonen J (2004).** Brief communications: Temperature effects on anaesthesia with clove oil in sex temperate-zone fishes. *Journal of Fish Biology*, 64: 1136-1142.

**Hoskonen P, Pirhonen J (2006).** Effects of repeated handling, with or without anaesthesia, on feed intake and growth in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 37: 409-415.



- Hseu JR, Yeh SL, Chu YT, Ting YY (1994).** The anesthetic effect of 2-phenoxyethanol in goldlined sea bream (*Sparus sarba*). Journal of Taiwan Fisheries Research, 2: 41-49.
- Hseu JR, Yeh SL, Chu YT, Ting YY (1997).** Different anesthetic effects of 2-phenoxyethanol on four species of teleost. Journal of the Fisheries Society of Taiwan, 24: 185-191.
- Hseu JR, Yeh SL, Chu YT, Ting YY (1998).** Comparison of efficacy of five anesthetics in goldlined sea bream, *Sparus sarba*. Acta Zoologica Taiwanica, 9: 35-41.
- Huguenin JE, Colt J (1989).** Design and Operating Guide for Aquaculture Seawater Systems. Elsevier, Amsterdam.
- Iversen M, Finstad B, McKinley RS, Eliassen RA (2003).** The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S<sup>TM</sup> and Benzoak<sup>®</sup> as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. Aquaculture, 221: 549–566.
- Iwama GK, Ackerman PA (1994).** Anesthetics. In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Volume 3. Hochachka PW, Mommsen TP (eds), Elsevier, Amsterdam, pp. 1-15.
- Iwama GK, McGeer JC, Pawluk MP (1989).** The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. Canadian Journal of Zoology, 67: 2065-2073.
- Jensen GL (1990).** Transportation of Warmwater Fish, Procedures and Loading Rates. Southern Regional Aquaculture Center, Publication No 392.
- Jolly DW, Mawdesley-Thomas LE, Bucke D (1972).** Anaesthesia of fish. Veterinary Record, 91: 424-426.
- Josa A, Espinosa E, Cruz JI, Gil L, Falceto MV, Lozano R (1992).** Use of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic agent in goldfish (*Cyprinus carpio*). Veterinary Record, 131: 468.
- Kaattari SL, Tripp RA (1987).** Cellular mechanisms of glucocorticoid immunosuppression in salmon. Journal of Fish Biology, 31: 129-132.

- Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT (2001).** Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *Journal of Fish Biology*, 59: 515-523.
- Kamiński R, Myszkowski L, Wolnicki J (2001).** Response to 2-phenoxyethanol in juvenile *Vimba vimba* (L). *Archives of Polish Fisheries*, 9: 71-78.
- Keene JL, Noakes DLG, Moccia RD, Soto CG (1998).** The efficacy of clove as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29: 89-101.
- King V, Hooper B, Hillsgrove S, Benton C, Berlinsky DL (2005).** The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate 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.
- Kreiberg H, Powell J (1991).** Metomidate sedation reduces handling stress in chinook salmon. *World Aquaculture*, 22: 58-59.
- Kumlu M, Yanar M (1999).** Effects of the anesthetic quinaldine sulphate and muscle relaxant diazepam on sea bream juveniles (*Sparus aurata*). *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 51: 143-147.
- Laidley CW, Leatherland JF (1988).** Cohort sampling, anaesthesia and stocking-density effects on plasma cortisol, thyroid hormone, metabolite and ion levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 33: 73-88.
- Lamarque P (1990).** Electrophysiology of fish in electric fields. In: *Developments in Electric Fishing*. Cowx IG (ed), Fishing News Books, Oxford, pp. 4-33.
- Laurent P (1994).** Gill internal morphology. In: *Fish Physiology vol XIV*. Hoar WS Randall DJ (eds), Academic, New York, pp. 73-183.
- Leatherland JF, Copeland P, Sumpter JP, Sonstegard RA (1982).** Hormonal control of gonadal maturation and development of secondary sexual characteristics in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, from Lakes Ontario, Erie, and Michigan. *General and Comparative Endocrinology*, 48: 196-204.
- Le Bras YM (1982).** Effects of anaesthesia and surgery on levels of adrenaline and noradrenaline in blood plasma of the eel (*Anguilla anguilla* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 72: 141-144.
- Li HW, Brocksen RW (1977).** Approaches to the analysis of energetic cost of

- intraspecific competition for space in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fish Biology*, 11: 329-341.
- Limsuwan C, Grizzle JM, Plumb JA (1983)**. Etomidate as an anesthetic for fish: Its toxicity and efficacy. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112: 544-550.
- Madden JA, Houston AH (1976)**. Use of electroanaesthesia with freshwater teleost: some physiological consequences in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 9: 457-462.
- Magnadóttir B, Jónsdóttir H, Helgason S, Björnsson B, Jørgensen TØ, Pilström L (1999a)**. Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) I. The effects of environmental temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 122: 173-180.
- Magnadóttir B, Jónsdóttir H, Helgason S, Björnsson B, Jørgensen TØ, Pilström L (1999b)**. Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) II. The effects of size and gender under different environmental conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 122: 181-188.
- Malmstrøm T, Salte R, GjØen HM, Linseth A (1993)**. A practical evaluation of metomidate and MS-222 as anaesthetics for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 113: 331-338.
- Marino G, Di Marco P, Mandich A, Finoia MG, Cataudella S (2001)**. Changes in serum cortisol, metabolites, osmotic pressure and electrolytes in response to different blood sampling procedures in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Applied Ichthyology*, 17: 115-120.
- Marino G, Porrello S, Vivona P, Laudi O, Saroglia M (1989)**. Studi preliminari per la minimizzazione delle perdite da stress in spigola (*Dicentrarchus labrax*) durante la fase di cattura e di trasporto. *SISVET XLIII*, 649-655. (cited by Marino et al. 2001)
- Marking LL, Meyer FP (1985)**. Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries*, 10, 2-5.
- Maršić-Lučić J, Mladineo I, Tudor M (2005)**. Comparative effectiveness of 2-phenoxyethanol and Propiscin as anesthetics for juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture International*, 13: 543-553.

- Massee KC, Rust MB, Hardy RW, Stickney RR (1995).** The effectiveness of tricaine, quinaldine sulfate and metomidate as anesthetics for larval fish. *Aquaculture*, 134: 351-359.
- Mattson NS, Riple TH (1989).** Metomidate, a better anesthetic for cod (*Gadus morhua*) in comparison with benzocaine, MS-222, chlorobutanol, and phenoxyethanol. *Aquaculture*, 83: 89-94.
- Maule AG, Schreck CB, Bradford CS, Barton BA (1988).** Physiological effects of collecting and transporting emigrating juvenile chinook salmon past dams on the Columbia River. *Transactions of the American Fisheries Society*, 117: 245-261.
- Mazeaud MM, Mazeaud F, Donaldson EM (1977).** Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106: 201-212.
- McCormick SD (1995).** Hormonal control of gill  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and chloride cell function. In: *Fish Physiology XIV, Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation*. Wood CM, Shuttleworth TJ (eds), Academic, San Diego, pp. 285-315.
- McDonald DG, Cavdek V, Ellis R (1991).** Symposium-Related Research Papers: Gill design in freshwater fishes: Interrelationships among gas exchange, ion regulation and acid-base regulation. *Physiological Zoology*, 64: 103-123.
- McFarland WN, Klontz GW (1969).** Anaesthesia in fishes. *Federation Proceedings*, 28: 1535-1540.
- McLeay DJ (1973).** Effects of cortisol and dexamethasone on the pituitary-interrenal axis and abundance of white blood cell types in juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology*, 21: 441-450.
- Midtlyng PJ (1997).** Vaccinated fish welfare: protection versus side-effects. *Developments in Biological Standardization*, 90: 371-379.
- Miller NW, Tripp MR (1982).** The effect of captivity on the immune response of the killifish, *Fundulus heteroclitus* L. *Journal of Fish Biology*, 20: 301-308.
- Milton P, Dixon RN (1980).** Further studies of the effects of the anaesthetic quinaldine on the physiology of the intertidal teleost *Blennius pholis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 60: 1043-1051.
- Moe MA (1992).** *The Marine Aquarium Reference: Systems and Invertebrates*. Green

Turtle Publications, Plantation, USA.

- Molinero A, Gonzalez J (1995).** Comparative effects of MS 222 and 2-phenoxyethanol on gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) during confinement. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 111: 405-414.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW (1999)** Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9: 211–268.
- Morton WE (1990).** Occupational phenoxyethanol neurotoxicity: A report of three cases. *Journal of Occupational Medicine*, 32: 42-45.
- Mourente G, Good JE, Bell JG (2005).** Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2a</sub>, immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquaculture Nutrition*, 11: 25–40.
- Munday PL, Wilson SK (1997).** Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *Journal of Fish Biology*, 51: 931-938.
- Muñoz P, Álvarez-Pellitero AP, Sitjà-Bobadilla A (2000).** Modulation of the *in vitro* activity of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) phagocytes by the myxosporean parasite *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida). *Fish and Shellfish Immunology*, 10: 567-581.
- Muñoz P, Calduch-Giner JA, Sitjà-Bobadilla A, Álvarez-Pellitero AP, Pérez-Sánchez J (1998).** Modulation of the respiratory burst activity of Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) phagocytes by growth hormone and parasitic status. *Fish and Shellfish Immunology*, 8: 25-36.
- Mylonas CC, 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.
- Myszkowski L, Kamiński R, Wolnicki J (2003).** Response of juvenile tench *Tinca tinca* (L.) to the anaesthetic 2-phenoxyethanol. *Journal of Applied Ichthyology*, 19: 142-145.

- Nakatani RE (1962).** A method for force-feeding radioisotopes to yearling trout. *The Progressive Fish-Culturist*, 24: 56-59.
- Neiffer D (2007).** Boney fish (lungfish, sturgeon, and teleosts). In: *Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia*. G West, D Heard, N Caulkett (eds), Blackwell, Ames, pp. 159-196.
- Neumann NF, Belosevic M (1996).** Deactivation of primed respiratory burst response of goldfish macrophages by leucocyte-derived macrophage activating factor(s). *Developmental and Comparative Immunology*, 20: 427–439.
- Neumann NF, Fagan D, Belosevic M (1995).** Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leucocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, 19: 473–482.
- Nilsson S (1984).** Adrenergic control systems in fish. *Marine Biology Letters*, 5: 127-146.
- Nishioka RS, Grau EG, Bern HA (1985).** *In vitro* release of growth hormone from the pituitary gland of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 60: 90-94.
- Ohr EA (1976).** Tricaine methanesulfonate-I. pH and its effects on anesthetic potency. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 54: 13-17.
- Oikawa S, Takeda T, Itazawa Y (1994).** Scale effects of MS-222 on a marine teleost, porgy *Pagrus major*. *Aquaculture*, 121: 369–379.
- Okawara Y, Ko D, Morely SD, Richter D, Lederis KP (1992).** In situ hybridisation of corticotropin-releasing factor-encoding messenger RNA in the hypothalamus of the white sucker (*Catostamus commersoni*). *Cell and Tissue Research*, 267: 545-549.
- Olsen YA, Einarsdottir IE, Nilssen KJ (1995).** Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. *Aquaculture*, 134: 155–168.
- Ortuño J, Esteban MA, Meseguer J (2001).** Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish and Shellfish Immunology*, 11: 187–197.
- Ortuño J, Esteban MA, Meseguer J (2002a).** Effects of four anaesthetics on the innate

- immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 12: 49-59.
- Ortuño J, Esteban MA, Meseguer J (2002b).** Lack of effect of combining different stressors on innate immune responses of seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 84: 17–27.
- Ortuño J, Esteban MA, Meseguer J (2002c).** Effects of phenoxyethanol on the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) exposed to crowding stress. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 89: 29-36.
- Øverli Ø, Sørensen C, Kiessling A, Pottinger TG, Gjøen HM (2006).** Selection for improved stress tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leads to reduced feed waste. *Aquaculture*, 261: 776–781.
- Palić D, Herolt DM, Andreassen CB, Menzel BW, Roth JA (2006).** Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Aquaculture*, 254: 675-685.
- Pankhurst NW, Wells RMG, Carragher JF (1992).** Effects of stress on plasma cortisol levels and blood viscosity in blue mao mao, *Scorpius violaceus* (Hutton), a marine teleost. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 101: 335–339.
- Park MO, Im SY, Seol DW, Park IS (2009).** Efficacy and physiological responses of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* to anesthetization with clove oil. *Aquaculture*, 287: 427-430.
- Park MO, Ji L, Gil HW, Kim DS, Park IS (2009)** Physiological responses of dark-banded rockfish *Sebastes inermis* to anesthetization with clove oil. *Journal of Aquaculture*, 22: 63-67.
- Partula S, de Guerra A, Fellah JS, Charlemagne J (1995)** Structure and diversity of the T cell antigen receptor  $\beta$ -chain in a teleost fish. *The American Association of Immunologists*, 155: 699-706.
- Patiño R, Redding JM, Schreck CB (1987).** Interrenal secretion of corticosteroids and plasma cortisol and cortisone concentrations after acute stress and during seawater acclimation in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *General and Comparative Endocrinology*, 68: 431-439.
- Pavlidis M, Berry M, Divanach P, Kentouri M (1997).** Diel pattern of haematocrit,

serum metabolites, osmotic pressure, electrolytes and thyroid hormones in sea bass and sea bream. *Aquaculture International*, 5: 237–247.

**Peake S (1998).** Sodium bicarbonate and clove oil as potential anesthetics for nonsalmonid fishes. *North American Journal of Fisheries Management*, 18: 919-924.

**Perez J, Zanuy S, Carrillo M (1988).** Effects of diet and feeding time on daily variations in plasma insulin, hepatic c-AMP and other metabolites in a teleost fish, *Dicentrarchus labrax* L. *Fish Physiology and Biochemistry*, 5: 191-197.

**Peters G (1982).** The effect of stress on the stomach of the European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Biology*, 21: 497-512.

**Pickering AD (1981).** *Stress and Fish*. Academic Press, London.

**Pickering AD (1984).** Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. *General and Comparative Endocrinology*, 53: 252-259.

**Pickering AD (1990).** Stress and the suppression of somatic growth in teleost fish. In: *Progress in Comparative Endocrinology*. Epple A, Scanes CG, Stetson MH (eds), Wiley-Liss, New York, pp. 473-479.

**Pickering AD (1993).** Husbandry and stress. In: *Recent Advances in Aquaculture*, Vol IV. Muir JF, Roberts RJ (eds), Blackwell, Oxford, pp. 156-169.

**Pickering AD (1998).** Stress response of farmed fish. In: *Biology of Farmed Fish*. Black KD, Pickering AD (eds), Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 222–255.

**Pickering AD, Pottinger TG (1987).** Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite interrenal acclimation. *Journal of Fish Biology*, 30: 701-712.

**Pickering AD, Pottinger TG (1989).** Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7: 253-258.

**Pickering AD, Pottinger TG (1995).** Biochemical effects of stress. In: *Environmental and Ecological Biochemistry*. Hochachka PW, Mommsen TP (eds), Elsevier, Amsterdam, pp. 349-379.

**Pickering AD, Pottinger TG, Carragher JF (1989).** Differences in the sensitivity of brown trout, *Salmo trutta* L., and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to physiological doses of cortisol. *Journal of Fish Biology*, 34: 757-768.

**Pickering AD, Pottinger TG, Christie P (1982).** Recovery of the brown trout, *Salmo*



*trutta* L., from acute handling stress: a time-course study. *Journal of Fish Biology*, 20: 229-244.

**Pickering AD, Pottinger TG, Sumpter JP, Carragher JF, Le Bail PY (1991).** Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 83: 86-93.

**Pickering AD, Stewart A (1984).** Acclimation of the interrenal tissue of the brown trout, *Salmo trutta* L., to chronic crowding stress. *Journal of Fish Biology*, 24: 731-740.

**Pilström L, Bengtén E (1996).** Immunoglobulin in fish-genes, expression and structure. *Fish and Shellfish Immunology*, 6: 243-262.

**Pirhonen J, Schreck CB (2003).** Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO<sub>2</sub> on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 220: 507-514.

**Planas J, Gutierrez J, Fernandez J, Carrillo M, Canals P (1990).** Annual and daily variations of serum cortisol in sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, 91: 171-178.

**Plumb JA, Schwedler TE, Limsuwan C (1983).** Experimental anesthesia of three species of freshwater fish with etomidate. *The Progressive Fish-Culturist*, 45: 30-33.

**Pottinger TG, Knudsen FR, Wilson J (1994).** Stress-induced changes in the affinity and abundance of cytosolic cortisol-binding sites in the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), are not accompanied by changes in measurable nuclear binding. *Fish Physiology and Biochemistry*, 12: 499-511.

**Pottinger TG, Moran TA (1993).** Differences in plasma cortisol and cortisone dynamics during stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Biology*, 43: 121-130.

**Prince A, Powell C (2000).** Clove oil as an anesthetic for invasive field procedures on adult rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management*, 20: 1029-1032.

**Querellou J (1984).** Modeles de production en pisciculture intensive: application a l'elevage du Loup *Dicentrarchus labrax* (L). In: *Actes du Colloque, L' Aquaculture*

- du Bar et des Sparidés. Barnabé G, Billard R (eds), Publ INRA, Paris, pp. 483-494.
- Raidal SR, Shearer PL, Stephens F, Richardson J (2006).** Surgical removal of an ovarian tumour in a koi carp (*Cyprinus carpio*). Australian Veterinary Journal, 84: 178-181.
- Randall DJ, Perry SF (1992).** Catecholamines. In: Fish Physiology, vol XII. Hoar WS, Randall DJ, Farell AP (eds), Academic, San Diego, pp. 255-300.
- Rand-Weaver M, Pottinger TG, Guest A, Martin P, Smal J, Sumpter JP (1994).** Somatolactin and growth hormone are differentially correlated to various metabolic parameters in trout. Netherlands Journal of Zoology, 45: 129-131.
- Reinitz GL, Rix J (1977).** Effect of tricaine methanesulfonate (MS-222) on hematocrit values in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comparative Biochemistry and Physiology C, 56: 115-116.
- Rice JA (1990).** Bioenergetics modeling approaches to evaluation of stress in fishes. American Fisheries Society Symposium, 8: 80-92.
- Roberts RJ, Snail DA (2001).** Laboratory methods. In: Fish Pathology. Roberts RJ (ed). WB Saunders, Philadelphia, pp. 380-412.
- Robertsen B (1999).** Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. Fish and Shellfish Immunology, 9: 269-290.
- Roche H, Chaar K, Pérès G (1989).** The effect of a gradual decrease in salinity on the significant constituents of tissue in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* pisces). Comparative Biochemistry and Physiology A, 93: 785-789.
- Roitt I, Brostoff J, Male D (1987).** Immunology. Gower Medical Publishing, London.
- Roncarati A, Melotti P, Dees A, Mordenti O, Angellotti L (2006).** Welfare status of cultured seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) and seabream (*Sparus aurata* L.) assessed by blood parameters and tissue characteristics. Journal of Applied Ichthyology, 22: 225-234.
- Rook GAW, Steele J, Umar S, Dockrell HM (1985).** A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by  $\gamma$ -interferon. Journal of Immunological Methods, 82: 161-167.
- Ross LG, Geddes JA (1979).** Sedation of warm-water fish species in aquaculture research, Aquaculture, 16: 183-186.

- Ross LG, Ross B (2008).** Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals, 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell, Oxford.
- Rothwell SA, Black SE, Jerrett AR, Forster ME (2005).** Cardiovascular changes and catecholamine release following anaesthesia in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and snapper (*Pagrus auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 140: 289-298.
- Rotllant J, Balmb PHM, Pérez-Sánchez J, Wendelaar-Bonga SE, Tort L (2001).** Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *General and Comparative Endocrinology*, 121: 333–342.
- Roubach R, Gomes LC, Fonseca FAL, Val AL (2005).** Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research*, 36: 1056-1061.
- Sandodden R, Finstad B, Iversen M (2001).** Transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): anaesthesia and recovery. *Aquaculture Research*, 32: 87–90.
- Sarmiento A, Guilhermino L, Afonso A (2004a).** Mercury chloride effects on the function and cellular integrity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head kidney macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*, 17: 489-498.
- Sarmiento A, Marques F, Ellis AE, Afonso A (2004b).** Modulation of the activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head-kidney macrophages by macrophage activating factor(s) and lipopolysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*, 16: 79–92.
- Schreck CB (2000).** Accumulation and long-term effects of stress in fish. In: *The Biology of Animal Stress*. Moberg GP, Mench JA (eds) CABI Publishing, pp.147-158.
- Schwedler TE, Johnson SK (2000).** Responsible care and health maintenance of fish in commercial aquaculture. *Animal Welfare Information Center Bulletin*, 10 (3-4)
- Sladky KK, Swanson CR, Stoskopf MK, Loomis MR, Lewbart GA (2001).** Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *American Journal of Veterinary Research*, 62: 337-342.
- Small BC (2003).** Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol

- responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 218: 177-185.
- Smit GL, Hattingh J (1979).** Anaesthetic potency of MS 222 and neutralized MS 222 as studied in three freshwater fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 62: 237-241.
- Smit GL, Hattingh J, Burger AP (1979).** Haematological assessment of the effects of the anaesthetic MS 222 in natural and neutralized form in three freshwater fish species: interspecies differences. *Journal of Fish Biology*, 15: 633-643.
- Smith DA, Smith SA, Holladay SD (1999).** Effect of previous exposure to tricaine methanesulfonate on time to anesthesia in hybrid tilapias. *Journal of Aquatic Animal Health*, 11: 183-186.
- Snieszko SF (1974).** The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology*, 6: 197-208.
- Sørum U, Damsgård B (2004).** Effects of anaesthetisation and vaccination on feed intake and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 232: 333–341.
- Soto CG, Burhanuddin (1995)** Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*, 136: 149-152.
- Spieler RE, Meier AH (1976).** Short-term serum prolactin concentrations in goldfish (*Carassius auratus*) subjected to serial sampling and restraint. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 33: 183-186.
- Squibb KS, Michel CM, Zelikoff JT, O'Connor JM (1988).** Sulphadimethoxine pharmacokinetics and metabolism in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Veterinary and Human Toxicology*, 30: 31–35.
- Stave JW, Roberson BS (1985).** Hydrocortisone suppresses the chemiluminescent response of striped bass phagocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 9: 77-84.
- Stehly GR, Gingerich WH (1999).** Evaluation of AQUI-S™ (efficacy and minimum toxic concentration) as a fish anaesthetic/sedative for public aquaculture in the United States. *Aquaculture Research*, 30: 365-372.
- Stoskopf M (1993).** Anaesthesia. In: *Aquaculture for Veterinarians, Fish Husbandry and Medicine*. Brown L (ed), Pergamon Press, Oxford, pp. 161-167.
- Strange RJ, Schreck CB (1978).** Anesthetic and handling stress on survival and

- cortisol concentrations in yearling chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 35: 345-349.
- Strange RJ, Schreck CB, Golden JT (1977).** Corticoid stress responses to handling and temperature in salmonids. Transactions of the American Fisheries Society, 106: 213-218.
- Summerfelt RC, Smith LS (1990).** Anesthesia, surgery, and related techniques. In: Methods for Fish Biology. Schreck CB, Moyle PB (eds). American Fisheries Society Press, Bethesda, pp. 213-272.
- Sumpter JP (1997).** The endocrinology of stress. In: Fish Stress and Health in Aquaculture. Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP, Schreck CB (eds), Society for Experimental Biology seminar series 62, pp. 95-118.
- Sumpter JP, Donaldson EM (1986).** The development and validation of a radioimmunoassay to measure plasma ACTH levels in salmonid fishes. General and Comparative Endocrinology, 62: 367-376.
- Sumpter JP, Pickering AD, Pottinger TG (1985).** Stress-induced elevation of plasma  $\alpha$ -MSH and endorphin in brown trout, *Salmo trutta* L. General and Comparative Endocrinology, 59: 257-265.
- Sutanto W, de Kloet ER (1994).** The use of various animals in the study of stress and stress-related phenomena. Laboratory Animals, 28: 293-306.
- Sylvester JR (1975).** Factors influencing the efficacy of MS-222 to striped mullet (*Mugil cephalus*). Aquaculture, 6: 163-169.
- Sylvester JR, Holland LE (1982).** Influence of temperature, water hardness and stocking density on MS-222 response in three species of fish. The Progressive Fish-Culturist, 44: 138-141.
- Takashima Y, Wan Z, Kasai H, Asakawa O (1983).** Sustained anesthesia with 2-phenoxyethanol in yearling rainbow trout. Journal of the Tokyo University of Fisheries. Tokyo Suisandai Kempo, 69: 93-96.
- Taylor PW, Roberts SD (1999).** Clove oil: an alternative anaesthetic for aquaculture. North American Journal of Aquaculture, 61: 150-155.
- Tesseyre C (1979).** Etude des conditions d' élevage intensif du loup (*Dicentrarchus labrax*). Thèse de doctorat spécialité. Montpellier.
- Thomas P, Robertson L (1991).** Plasma cortisol and glucose stress responses of red

drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. *Aquaculture*, 96: 69-86.

**Thompson I, White A, Fletcher TC, Houlihan DF, Secombes CJ (1993).** The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture*, 114: 1-18.

**Tort L, Gómez E, Montero D, Sunyer JO (1996).** Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocompetence: their suitability in stress and dietary studies. *Aquaculture International*, 4: 31-41.

**Tort L, Puigcerver M, Crespo S, Padrós 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.

**Treves-Brown KM (2000).** *Applied Fish Pharmacology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

**Tripp RA, Maule AG, Schreck CB, Kaattari SL (1987).** Cortisol mediated suppression of salmonid lymphocyte responses *in vitro*. *Developmental and Comparative Immunology*, 11: 565-576.

**Tsantilas H, Galatos AD, Athanassopoulou F, Prassinis NN, Kousoulaki K (2006).** Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. *Aquaculture*, 253: 64-70.

**Tsigos C, Chrousos GP (1994).** Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 23: 451-466.

**Tucker CS (1993).** Water analysis. In: *Fish Medicine*. Stoskopf MK (ed), WB Saunders, Philadelphia, pp. 166-197.

**van Ginneken V, van den Thillart G (2009).** Metabolic depression in fish measured by direct calorimetry: A review. *Thermochimica Acta* 483: 1-7.

**Varvarigos P (1999).** Immersion or injection? Practical considerations of vaccination strategies. *Fish Farming International*, 26: 34-35.

**Vaughan DS, Yoshiyama RM, Breck JE, Angelis DL (1982).** Review and analysis of existing modelling approaches for assessing population-level effects of multiple stresses on fish and shellfish. Oak Ridge National Laboratory Publication, Oak

Ridge, pp. 1-36

- Vazzana M, Cammarata M, Cooper EL, Parrinello N (2002).** Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture*, 210: 231-243.
- Vijayan MM, Pereira C, Grau EG, Iwama GK (1997).** Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 116: 89–95.
- Wagner E, Arndt R, Hilton B (2002).** Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture*, 211: 353-366.
- Wagner GF, McKeown BA (1986).** Development of a salmon growth hormone radioimmunoassay. *General and Comparative Endocrinology*, 62: 452-458.
- Wagner GN, Singer TD, McKinley RS (2003).** The ability of clove oil and MS-222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*, 34: 1139-1146.
- Walker MK, Yanke EA, Gingerich WH (1994).** Use of electronarcosis to immobilize juvenile and adult northern pike. *The Progressive Fish-Culturist*, 56: 237-243.
- Walsh CT, Pease BC (2002).** The use of clove oil as an anaesthetic for the longfinned eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). *Aquaculture Research*, 33: 627-635.
- Waring CP, Stagg RM, Poxton MG (1992).** The effects of handling on flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Fish Biology*, 41: 131-144.
- Waring CP, Stagg RM, Poxton MG (1996).** Physiological responses to handling in the turbot. *Journal of Fish Biology*, 48: 161-173.
- Waterstrat PR (1999).** Induction and recovery from anesthesia in channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings exposed to clove oil. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30: 250-255.
- Weber EPS, Weisse C, Schwarz T, Innis C, Klide AM (2009a).** Anesthesia, diagnostic imaging, and surgery of fish. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians*, 31: 1-9
- Weber RA, Peleteiro JB, García Martín LO, Aldegunde M (2009b).** The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the

- Senegalese sole (*Sole senegalensis* Kaup 1858). *Aquaculture*, 288: 147-150.
- Wedemeyer G (1970)**. The role of stress in the disease resistance of fishes. *American Fisheries Society Special Publication*, 5: 30-35.
- Wedemeyer GA, Barton BA, McLeay DJ (1990)**. Stress and acclimation. In: *Methods for Fish Biology*. Schreck CB, Moyle PB (eds), American Fisheries Society, Bethesda, pp. 451-489.
- Weld MM, Fryer JN, Rivier J, Lederis K (1987)**. Inhibition of CRF-and urotensin I-stimulated ACTH release from goldfish pituitary cell columns by the CRF analogue  $\alpha$ -helical CRF-(9-41). *Regulatory Peptides*, 19: 273-280.
- Wells RMG, McIntyre RH, Morgan AK, Davie PS (1986)**. Physiological stress responses in big gamefish after capture: observations on plasma chemistry and blood factors. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 84: 565-571.
- Wells RMG, Pankhurst NW (1999)**. Evaluation of simple instruments for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein as stress indicators in fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30: 276-284.
- Wendelaar Bonga SE (1997)**. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77: 591-625.
- Weyl O, Kaiser H, Hecht T (1996)**. On the efficacy and mode of action of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for goldfish, *Carassius auratus* (L.), at different temperatures and concentrations. *Aquaculture Research*, 27: 757-764.
- Wood CM, Turner JD, Graham MS (1983)**. Why do fish die after severe exercise? *Journal of Fish Biology*, 22: 189-201.
- Woody CA, Nelson J, Ramstad K (2002)**. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. *Journal of Fish Biology*, 60: 340-347.
- Yanar M, Kumlu M (2001)**. The anaesthetics effects of quinaldine sulphate and/or diazepam on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25: 185-189.
- Zahl IH, Kiessling A, Samuelsen OB, Hansen KM (2010)**. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) - Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. *Aquaculture*, 295: 52-59.
- Zampogna F (2009)**. *Aquaculture Statistics—2007*. Eurostat, Statistics in focus 83/2009, Luxemburg.



- Γαλάτος ΑΔ, Ραπτόπουλος Δ (1995).** Αναισθησία εξωτικών ζώων 1. Ασπόνδυλα, ψάρια, αμφίβια, ερπετά. Δελτίον Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας, 46: 250-262.
- ΕΚ (2003).** Οδηγία 2003/65/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22ας Ιουλίου 2003 (L 230 32 16.9.2003), από την οποία τροποποιείται η Οδηγία του Συμβουλίου της 24ης Νοεμβρίου 1986 για την προσέγγιση των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων των κρατών μελών σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς (86/609/ΕΟΚ).
- Νεοφύτου Χ (1997).** Ιχθυολογία. University Studio Press, Θεσσαλονίκη
- Παπουτσόγλου ΣΕ (1998).** Ενδοκρινολογία Ιχθύων. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα.
- Παπουτσόγλου ΣΕ (2008).** Διατροφή ιχθύων. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα.
- Πετρίδης Δ (2000).** Εφαρμοσμένη Στατιστική με έμφαση στην επιστήμη των Τροφίμων, Εκδόσεις Όμηρος, Θεσσαλονίκη.
- Τσαντήλας Η, Γαλάτος ΑΔ, Αθανασοπούλου Φ (2005).** Χρήση αναισθητικών ουσιών σε ψάρια ιχθυοκαλλιέργειών. Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας, 56: 130-137.
- Τσαντήλας Η, Αθανασοπούλου Φ, Γαλάτος ΑΔ, Μπιτσαβά Κ (2006).** Ευζωία των ψαριών. Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας, 57: 140-148.
- Φώτης Γ (1999).** Εκτροφή και Παθολογία Ιχθύων, Τόμος Α. Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.
- Χώτος ΓΝ, Ρογδάκης ΙΓ (1992).** Υδατοκαλλιέργειες Ευρύαλων Ψαριών, Λαβράκι & Τσιπούρα. Τεχνικές της Αναπαραγωγής και Πάχυνσης,. Εκδόσεις «Ίων», Αθήνα.