

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη τρόπων θανάτωσης εντατικά εκτρεφόμενων ψαριών»

Περγάνη Ελένη

ΒΟΛΟΣ 2012



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 10547/1

Ημερ. Εισ.: 30-05-2012

Δωρεά: Συγγραφέα

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΙΥΠ

2012

ΠΕΡ

«Μελέτη τρόπων θανάτωσης εντατικά εκτρεφόμενων ψαριών»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1) Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπουσα**,

2) Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Επίκουρος Καθηγητής, Γενετική Υδροβίων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**,

3) Ελένη Γκολομάζου, Λέκτορας, Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

Στη μητέρα μου Δέσποινα με πολύ αγάπη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ ειλικρινά την επιβλέπουσά κ. Παναγιώτα Παναγιωτάκη, για την αμέριστη και πολύτιμη βοήθεια της, για την υπομονή, το χρόνο και την καθοδήγηση της. Θερμές ευχαριστίες στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο και κ. Ελένη Γκολομάζου. Το σύζυγο μου Σωτήρη Τσιούνη και την κόρη μου Όλια. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στο γαμπρό μου Κωνσταντίνο Δόλγηρα, για την απεριόριστη συμπαράσταση όλα αυτά τα φοιτητικά χρόνια έως το τέλος της συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας. Τα αδέρφια μου Ματούλα Δόλγηρα, Νίκο και Μαρία Μούκα, τα ανίψια μου Ιωάννα, Γιάννη και Δέσποινα. για τη γόνιμη συνεισφορά τους και το χρόνο τους, καθώς την αγαπημένη μου φίλη Αγγελική Κουτσοπούλου για την ηθική στήριξη, και την φίλη μου Τζένη Παπά. Τέλος επιθυμώ να ευχαριστήσω θερμά, τον Ερντί Χασάν, Θοδωρή Πίκουλα και Μανόλη Μαλανδράκη. Τους εύχομαι κάθε επιστημονική και προσωπική καταξίωση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Για την εκπόνηση της έρευνας αυτής έγινε η εκτροφή των ιχθύων (τσιπούρας) σε δεξαμενές στο σταθμό έρευνας και η γενετική ανάλυση των δειγμάτων στο εργαστήριο. Κατά την εφαρμογή των δυο τρόπων θανάτωσης στα ψάρια, (θανάτωση με ασφυξία και θανάτωση σε παγόνερο), εκτιμήθηκαν τα επίπεδα καταπόνησης τα οποία καθορίστηκαν μέσω της ανίχνευσης του κατακερματισμένου DNA από κύτταρα ήπατος και αίματος ατόμων τσιπούρας, ενώ πραγματοποιήθηκε και εκτίμηση του βαθμού επιδιόρθωσης του DNA, με τη βοήθεια της μοριακής τεχνικής, Comet Assay. Μέρος των ηπατοκυττάρων που απομονώθηκαν εξετάστηκαν απευθείας για την εκτίμηση της γενετοξικότητας των τρόπων θανάτωσης (*ex vivo* εκτίμηση) ενώ τα υπόλοιπα επώαστηκαν σε υγρή καλλιέργεια, σε θρεπτικό υλικό, για την αναγνώριση βλάβης του DNA, που δεν εντοπίστηκε κατά το στάδιο της *ex vivo* εφαρμογής, από τα ένζυμα επιδιόρθωσης. Η θανάτωση με ασφυξία κατέγραψε το μεγαλύτερο ποσοστό γενετοξικότητας σε σχέση με θανάτωση σε παγόνερο. Πολλοί διαχειριστές ιχθυοκαλλιεργειών ενδιαφέρονται να μάθουν τι μπορεί να γίνει για να βελτιωθεί η ευζωία των ψαριών και πώς να μειώσουν ή να αλλάξουν τις δραστηριότητες που οδηγούν σε στρες, τον πόνο, ή ταλαιπωρία ώστε να αποδείξουν ότι λειτουργούν σε υψηλό επίπεδο φροντίδας εφόσον σήμερα οι καταναλωτές ενδιαφέρονται για την προέλευση και τον τρόπο παραγωγής του φαγητού που τρώνε και είναι διατεθειμένοι να πληρώσουν ένα ποσό επιπλέον, εάν αυτό τους επιτρέπει να αγοράσουν προϊόντα από αναγνωρισμένες πηγές, όπου η καλή διαβίωση των ζώων έχει ληφθεί υπόψη.

Λέξεις κλειδιά : «welfare», «stress», «comet assay ».

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Αλήθεια...πονούν τα ψάρια ;;.....	11
1.2 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ «STRESS» ΣΤΙΣ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ -- ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ “WELFARE” ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ.....	13
1.2.1 Χαρακτηριστικά του νερού.....	13
1.2.2 Ασθένειες & παράσιτα.....	13
1.2.3 Πυκνότητα εκτροφής.....	14
1.2.4 Εξαλίευση και μεταφορά.....	14
1.2.5 Θανάτωση.....	15
1.3 ΚΩΔΙΚΑΣ ΟΡΘΗΣ ΠΡΑΚΤΙΚΗΣ.....	16
1.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΡΙΟΤΕΡΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΤΡΟΠΩΝ ΘΑΝΑΤΩΣΗΣ	18
1.4.1 Θανάτωση με ασφυξία.....	18
1.4.2 Θανάτωση με παγόνερο.....	18
1.4.3 Θανάτωση με παροχή CO ₂ στο νερό.....	19
1.4.4 Θανάτωση με άμεση πρόκληση αιμορραγίας.....	19
1.4.5 Θανάτωση με χτύπημα στο κεφάλι.....	19
1.4.6 Θανάτωση με ηλεκτρισμό.....	20
1.4.7 Θανάτωση με χρήση αναισθητικών ουσιών.....	20
1.5 ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ («STRESS») ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ.....	21
1.5.1 Ορισμοί για το «stress».....	21
1.5.2 Οξύ («acute») και Χρόνιο («chronic») «stress».....	21
1.5.3 Οι παράγοντες καταπόνησης («stressors»).....	21

1.6 ΚΛΑΔΟΣ ΤΗΣ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	23
1.6.1 Θρεπτική αξία των ιχθύων.....	24
1.7 Σκοπός της παρούσας εργασίας.....	24
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
2.1 Εντατικά εκτρεφόμενα ψάρια και συνθήκες εκτροφής.....	25
2.2 Οι συνθήκες κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	25
2.3 Δειγματοληψία - ανάλυση διαδικασίας τρόπων θανάτωσης.....	26
2.4 Παγόνερο.....	27
2.5 Ασφυξία.....	27
2.6 Προετοιμασία αίματος – απομόνωση ερυθροκυττάρων.....	28
2.7 Απομόνωση ήπατος.....	28
2.8 Προετοιμασία για το στρώσιμο της αгарόζης σε αντικειμενοφόρο.....	32
2.9 Λύση και ηλεκτροφόρηση των ηπατοκυττάρων.....	33
2.10 Επιδιόρθωση.....	34
2.11 Μέτρηση – ανάλυση κομητών -Γενικά περί «Comet Assay».....	36
2.12 Στατιστική επεξεργασία.....	38
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	39
3.1 Εξέταση ερυθροκυττάρων.....	39
3.2 Εξέταση ηπατοκυττάρων.....	40
3.3 Επιδιόρθωση ηπατοκυττάρων.....	42
3.4 Στατιστικά χαρακτηριστικά των αποτελεσμάτων προερχόμενα από τους δύο διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης.....	44
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	46
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	54

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο Αριστοτέλης (384-322 π.Χ.) στην Αρχαία Ελλάδα ανέπτυξε κοσμοθεωρίες προωθώντας μια ιεραρχική εικόνα στην οποία τοποθετούσε τα ζώα σε μια σκάλα της ζωής *scala naturae* (Braithwaite 2010). Πίστευε ότι τα πλάσματα θα μπορούσαν να παρατάσσονται σε μια κλίμακα της τελειότητας, με τους εαυτούς μας, φυσικά, λαμβάνοντας προνομιακή θέση. Κάτω από εμάς ήταν θερμόαιμα θηλαστικά που γεννούν ζωντανά μικρά, ακολουθούμενη από τα πουλιά που γεννούν τα αυγά, και στη συνέχεια τα ποικιλόθερμα ζώα όπως ψάρια. Μετά από αυτά κατατάσσονται τα ασπόνδυλα, αλλά αυτά δεν αθροίζονται συνολικά. Υπήρχαν υποδιαιρέσεις μεταξύ αυτών με κέλυφος, όπως τα σαλιγκάρια και εκείνων που δεν έχουν, όπως χταπόδι και καλαμάρι. Κάτω από τα ζώα και τα φυτά τα άψυχα αντικείμενα. Αυτή η ιεραρχική άποψη προωθεί το νόημα της ζωής και του κόσμου γύρω μας, και τις απόψεις του σχετικά με το Βασίλειο των ζώων.

Ο Σοπενχάουερ (1788-1860), Γερμανός φιλόσοφος, γνωστός για τον αθεϊστικό πεσιμισμό του και την φιλοσοφική του διαύγεια στο σημαντικότερο έργο του "Ο Κόσμος ως Βούληση και ως Παράσταση", τόνιζε ότι ο άνθρωπος έχει δικαίωμα να εκμεταλλεύεται τα άλλα ζώα αλλά μέχρι ενός βαθμού. Ωστόσο, υποστήριξε ότι δεν πρέπει να πιέζουμε τα ζώα πάνω από ένα όριο χρήσης. Ως παραδείγματα υπερβολικής πίεσης ανέφερε τα ζώα που βοηθούν στις μετακινήσεις και τους κυνηγετικούς σκύλους. Η αιτιολόγηση της χρήσης των ζώων στηρίζονταν, κατά τον ίδιο στο γεγονός ότι τα άλλα ζώα υποφέρουν λιγότερο στη δουλειά απ' ότι ο άνθρωπος. Μάλιστα, υποφέρουν πολύ λιγότερο όταν πονούν ή όταν πεθαίνουν.

Έτσι, παρά το γεγονός ότι ο ίδιος συμπαθούσε την ινδική φιλοσοφία και επηρεάστηκε απ' αυτήν, κατηγόρησε τους Ινδούς ότι δε μπόρεσαν να κάνουν τη διάκριση του ανθρώπινου πόνου από τον πόνο των άλλων ζώων.

Ο Καραγεωργάκης (2006) αναφέρει ότι ακόμα κι αν θεωρήσουμε και αποδεχθούμε τα ζώα γύρω μας ως όντα κατώτερα του ανθρώπου, συμπλέοντας απόλυτα με την ανθρωποκεντρική αντίληψη του Αριστοτέλη, οφείλουμε να εφαρμόσουμε στις σχέσεις μας μαζί τους τους νόμους της ηθικής. Το ζήτημα λοιπόν που γεννάται από τα παραπάνω είναι το κατά πόσο θα πρέπει να αντιμετωπίσουμε ηθικά τα άλλα ζώα. Η ηθική αντιμετώπιση δεν προϋποθέτει απαραίτητα την ύπαρξη ηθικής από την πλευρά τους. Θέτει ως δεδομένο όμως ότι η ηθική κοινότητα, δηλαδή το σύνολο των ατόμων που έχουν ηθική, έχει υποχρεώσεις απέναντί τους, σύμφωνα με τον Kant (1724-1804), ο οποίος τον 19ο αιώνα έθεσε τα θεμέλια της μη κακομεταχείρισης των ζώων. Τα καθήκοντά μας και οι υποχρεώσεις μας προς αυτά τα όντα είναι έμμεσα καθήκοντα προς την ανθρωπότητα. Η φύση των ζώων έχει αναλογίες με την ανθρώπινη φύση, και πράττοντας τα καθήκοντά μας απέναντι στα ζώα πράττουμε εμμέσως τα καθήκοντα μας προς την ανθρωπότητα.

Η απόδοση δικαιωμάτων στη φύση και κατά συνέπεια η χρήση του όρου «δικαίωμα» στην περιοχή της περιβαλλοντικής ηθικής είναι εξαιρετικά διαδεδομένη στις μέρες μας. Να επισημανθεί όμως ότι η πιο διάσημη υποστήριξη της ηθικής αντιμετώπισης των άλλων ζώων έγινε από τον Φραγκίσκο της Ασίζης ο οποίος διέδιδε υπό μορφή κηρύγματος την ισότητα μεταξύ όλων των ειδών της πανίδας και της χλωρίδας.

Σύμφωνα με τον σύγχρονο φιλόσοφο P. Singer, τα όντα απέναντι στα οποία έχουμε υποχρεώσεις, είναι αυτά που έχουν τη δυνατότητα να υποφέρουν και να ικανοποιούνται ή να χαίρονται (enjoyment/happiness) και παρά το γεγονός ότι δεν πιστεύει ότι έχουμε άμεσες υποχρεώσεις στη φύση, υποστηρίζει ότι έχουμε έμμεσες υποχρεώσεις απέναντί της. Για την ακρίβεια υποστηρίζει ότι το δάσος, τα βουνά και τα νερά αποτελούν το σπιτικό των άλλων ζώων και οφείλουμε να τα προστατεύουμε προκειμένου να επιτευχθεί η ευημερία των τελευταίων. Η εξημέρωση των γνωστών μας αγροτικών ζώων αποτέλεσε το πρώτο βήμα για την εκτροφή τους. Ωστόσο, η εκτροφή των ψαριών αρχικά, δεν είχε σαν προϋπόθεση την εξημέρωση. Πολλές μορφές ιχθυοκαλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν και χρησιμοποιούνται μέχρι τις μέρες μας με μοναδικό σκοπό την εξασφάλιση υδροβίας ζωικής πρωτεΐνης για την ανθρώπινη διατροφή (Κλαουδάτος 2008).

Η θανάτωση των εκτρεφόμενων οργανισμών αποτελεί προϋπόθεση για τη διοχέτευση τους στην κατανάλωση. Τα ψάρια ως προϊόν συλλεκτικής αλιείας θανατώνονταν και θανατώνονται με την απομάκρυνση τους από το νερό με συνέπεια την ασφυξία. Οι τρόποι θανάτωσης των εκτρεφόμενων ψαριών αποτελεί αντικείμενο συζήτησης σε πρακτικό και φιλοσοφικό επίπεδο. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται ισοδύναμα οι αγγλικές λέξεις «welfare», «stress» και οι ελληνικές «ευζωία» και «καταπόνηση» αντίστοιχα.

1.1 ΑΛΗΘΕΙΑ...ΠΟΝΟΥΝ ΤΑ ΨΑΡΙΑ ;

Σήμερα πειραματικοί ψυχολόγοι έχουν αναπτύξει εξειδικευμένες μεθόδους με τις οποίες καταγράφουν τις περίπλοκες αντιδράσεις των ζώων όταν εκτίθενται σε επώδυνες καταστάσεις. Εμείς χρησιμοποιούμε «ετικέτες» που συνήθως συνδέονται με τα ανθρώπινα συναισθήματα, αλλά μπορούμε να αναγνωρίσουμε όταν τα ζώα έχουν θετικές και αρνητικές διαθέσεις από την εμπειρία και την αίσθηση της διαδικασίας πόνου. Η προσπάθεια των ερευνητών έγκειται στο να καθορίσουν αν το ζώο είναι ευτυχές ή δυστυχές (Braithwaite 2010).

Ο ανθρώπινος εγκέφαλος είναι ασυναγώνιστος στην πολυπλοκότητά του. Αποτελείται περίπου 100 δισεκατομμύρια νευρώνες, παρέχοντας τεράστιες δυνατότητες επεξεργασίας των πληροφοριών. Έρευνες που έχουν ως αντικείμενο τον εγκέφαλο των ψαριών απέδειξαν ότι έχουν λιγότερους νευρώνες, αλλά στην πραγματικότητα δεν γνωρίζουμε πόσοι λόγω της ποικιλομορφίας του. Αυτό είναι ένα κρίσιμο σημείο, διότι τα επιχειρήματα που έχουν τεθεί είναι ισχυρισμοί σε σχέση με την ικανότητα για το αν τα ψάρια υποφέρουν και ότι δεν μπορούν να αισθάνονται τον πόνο με τον τρόπο που τον βιώνουν οι άνθρωποι (Braithwaite 2010).

Στα ψάρια, όπως στα πτηνά και τα θηλαστικά, υπάρχουν δύο τύποι νευρικών ινών που έχουν απολήξεις στο επιδερμικό επιθήλιο και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη διάμετρο και την ταχύτητα διαβίβασης των «μηνυμάτων»: (α) οι νευρικές ίνες A-delta, που σχετίζονται με τον πρωτογενή πόνο (αντιδρούν κυρίως σε έντονα θερμικά ερεθίσματα) και (β) οι ίνες τύπου C, οι οποίες είναι μικρότερες, έχουν χαμηλότερο ρυθμό μετάδοσης της πληροφορίας και σχετίζονται με το δευτερογενή πόνο (τη δυσάρεστη αίσθηση διάρκειάς που οφείλεται, κυρίως σε ιστολογικές κακώσεις).

Έρευνες μελετούν την επίδραση διάφορων χειρισμών αναισθητοποίησης ή και θανάτωσης στα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών, ντοπαμίνη, (DA), νοραδρεναλίνη, (NA) και σεροτονίνη (5-HT) καθώς και των μεταβολιτών τους δι-υδροξυφαιουλακετικό όξύ (DOPAC) και ομοβανιλικό οξύ (HVA) για την ντοπαμίνη και 5-υδροξυϊνδολοξικό οξύ (5-HIAA) για τη σεροτονίνη. Οι χειρισμοί περιλαμβάνουν αναισθητοποίηση με γαριφαλέλαιο ή με φαινοξυαιθανόλη, χτύπημα στο κεφάλι, τοποθέτηση σε παγωμένο νερό. Τα αποτελέσματα μπορούν να συμβάλλουν στον εμπλουτισμό της γνώσης και τη θέσπιση κανόνων ευζωίας ή ευθανασίας κατά τις υδατοκαλλιεργητικές πρακτικές ή τον πειραματικό σχεδιασμό (Τσοπελάκος και συν. 2011). **Το γεγονός ότι τα ζώα προσπαθούν να προστατεύσουν μια κατεστραμμένη περιοχή σημαίνει ότι αισθάνονται πόνο;** Τα ψάρια εξακολουθούν να θεωρούνται ως «διαφορετικό», αλλά θα πρέπει να αναγνωρίζουμε και να εκτιμούμε πολλές ομοιότητες με τα πουλιά και τα θηλαστικά.

1.2 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ «STRESS» ΣΤΙΣ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ “WELFARE” ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ

Οι δυνητικά «στρεσογόνοι» παράγοντες στις ιχθυοκαλλιέργειες εντατικής μορφής, είναι πολλοί. Όμως, όπως χαρακτηριστικά γράφει ο Dawkins (2004) «εάν τα ψάρια είναι υγιή και έχουν ότι επιθυμούν τότε το «welfare» τους είναι καλό», δηλαδή η καταπόνηση μπορεί να περιοριστεί σημαντικά εάν κατά την εκτροφή τους λαμβάνεται μέριμνα ώστε οι συνθήκες στις οποίες υποβάλλονται (βιοτικές & αβιοτικές) να είναι σύμφωνες με τις βιολογικές τους ανάγκες.

1.2.1 Χαρακτηριστικά του νερού

Η απόδοση των συστημάτων εκτροφής ψαριών επηρεάζεται μέγιστα από τα χαρακτηριστικά του νερού που χρησιμοποιούν, ειδικότερα από την ποιότητα, την ποσότητα, την οξυγόνωση, την αλατότητα και τη θερμοκρασία. (FSBI 2002).

1.2.2 Ασθένειες & παράσιτα

Το stress αποτελεί σημαντικό παράγοντα εξασθένησης του ανοσοποιητικού συστήματος των εκτρεφόμενων ψαριών και οι ασθένειες είναι παράγοντες «stress». Η διατήρηση της καλής υγείας των εκτρεφόμενων ιχθυοπληθυσμών απαιτεί την τήρηση αυστηρών πρωτοκόλλων διαχείρισης και εμβολιασμών που δρουν προληπτικά αναστέλλοντας τη δράση παθογόνων, καθώς και τη λήψη κατάλληλων μέτρων στις περιπτώσεις που κάποια ασθένεια είναι σε εξέλιξη. Η συχνή χρήση αντιβιοτικών ή η επιστράτευση άλλων θεραπευτικών πρακτικών αποτελεί ένδειξη κακού διαχειριστικού σχεδιασμού.

1.2.3 Πυκνότητα εκτροφής

Η πυκνότητα εκτροφής, δηλαδή το βάρος των ατόμων στην μονάδα όγκου του νερού, συχνά ενοχοποιείται σαν παράγοντας «stress». Σύγχρονες μελέτες (Turnbull et al., in Branson, 2008) καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η πυκνότητα εκτροφής μπορεί να προκαλέσει «stress» αλλά πάντα σε συνδυασμό με άλλες παραμέτρους διότι, επηρεάζει το ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου και παραγωγής προϊόντων μεταβολισμού (π.χ. CO₂, αμμωνία).

1.2.4 Εξαλίευση και μεταφορά

Για τη σύλληψη των ψαριών (εξαλίευση) γίνεται χρήση «εργαλείων» τα οποία είναι πιθανό να προκαλέσουν, εκτός από «stress», τραυματισμούς, απώλεια βλέννας και απολέπιση, θέτοντας σε κίνδυνο την καλή κατάσταση (welfare) και υγεία τους. Για την αποφυγή πρόκλησης τραυματισμών το άγγιγμα των ψαριών πρέπει να γίνεται με βρεγμένα χέρια ή με γάντια (τα ψάρια πρέπει να παραμένουν υγρά) ενώ η εξαλίευση με τα κατάλληλα δίχτυα (μαλακά, χωρίς κόμβους), με την χρήση αντλιών και σωλήνων μεταφοράς, ή άλλων μη τραυματικών τεχνικών. Σε όλες τις περιπτώσεις, η εξαλίευση πρέπει να γίνεται όταν η θερμοκρασία δεν είναι πολύ υψηλή και οι κινήσεις πρέπει να είναι γρήγορες, ακριβείς και αποτελεσματικές.

1.2.5 Θανάτωση

Η βασική αρχή της βιοηθικής στην οποία στηρίζονται οι μέθοδοι θανάτωσης των εκτρεφόμενων ζώων προστάζει ακαριαίο θάνατο ώστε να προκληθεί η ελάχιστη δυνατή καταπόνηση. Επίσης, η διατήρηση του «welfare» των ψαριών, προστάζει την αναισθητοποίησή τους, στο μεσοδιάστημα μεταξύ της εξαλίευσης και της θανάτωσής τους, με μεθόδους που ελαχιστοποιούν το «stress» και συνεισφέρουν στη διατήρηση της καλής ποιότητάς τους και μετά τον θάνατο. Πολλές από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται σήμερα για τη θανάτωση των ψαριών δε συνάδουν με τη διατήρηση του «welfare».

Τέτοιες περιπτώσεις είναι :

Τα θανατηφόρα χτυπήματα στο κεφάλι (για ψάρια μεγάλου μεγέθους), η αφαίμαξη (επίσης για ψάρια μεγάλου μεγέθους), η πρόκληση ασφυξίας ή η θανάτωση μετά από εμβάπτιση σε παγωμένο νερό. Διάφορα είδη ψαριών θανατώνονται και με εμβάπτιση (μερικά λεπτά) σε νερό κορεσμένο σε CO₂ που προκαλεί νάρκωση και διακοπή της εγκεφαλικής λειτουργίας. Για τη θανάτωση της εκτρεφόμενης πέστροφας στην Αγγλία χρησιμοποιούν, κυρίως, τη μέθοδο του ηλεκτρικού σοκ η οποία είναι άμεσα θανατηφόρα και μπορεί να εφαρμοστεί μέσα ή έξω από το νερό (μέσα στις σωλήνες των αντλιών που μεταφέρουν τα ψάρια από τις εγκαταστάσεις πάχυνσης στις εγκαταστάσεις συσκευασίας) (Adams *et al.* 2007).

1.3 ΚΩΔΙΚΑΣ ΟΡΘΗΣ ΠΡΑΚΤΙΚΗΣ

Η Ορθή Πρακτική σε θέματα διαχείρισης ιχθυοπληθυσμών και περιβαλλοντικών θεμάτων θεωρείται απαραίτητη για την παραγωγή υψηλής ποιότητας τελικού προϊόντος (Ελληνική Αλιευτική Ποιοτική 2001).

Βασικά συστατικά ορθής πρακτικής διαχείρισης κατά το στάδιο της εξαλίευσης:

- Έλεγχοι πριν την εξαλίευση υποδεικνύουν πότε τα ψάρια είναι έτοιμα για εξαλίευση και πώληση.
- Όλες οι περίοδοι αναμονής φαρμακευτικών ουσιών θα πρέπει να έχουν ολοκληρωθεί.
- Η διατροφή του ιχθυοπληθυσμού θα πρέπει να διακοπεί πριν την εξαλίευση, ώστε ο πεπτικός τους σωλήνας να έχει εκκενωθεί ικανοποιητικά έως πλήρως. Ως χρόνος νηστείας (σε ημέρες) ορίζεται ο λόγος 40/T, όπου T η θερμοκρασία του θαλασσινού νερού.
- Με εξαίρεση έκτακτες συνθήκες κακοκαιρίας ή και βλάβη εξοπλισμού, θα πρέπει να αποφεύγονται παρατεταμένες περιοδοί νηστείας.
- Ο εξοπλισμός εξαλίευσης θα πρέπει να είναι καθαρός και σε καλή κατάσταση πριν την χρήση και θα πρέπει να καθαρίζεται, απολυμαίνεται και ξεπλένεται με εγκεκριμένη μέθοδο μετά την χρήση. Όποιος εξοπλισμός υποπτευόμαστε ότι δεν πληρεί τα παραπάνω κριτήρια δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται.
- Από τη στιγμή που θα αρχίσει η διαδικασία της εξαλίευσης θα πρέπει να ολοκληρώνεται με φροντίδα και προσοχή το ταχύτερο δυνατό χωρίς όμως να αυξηθεί το επίπεδο του stress του ιχθυοπληθυσμού που θα οδηγούσε σε πτώση της ποιότητας του τελικού προϊόντος.

- Η συγκέντρωση των ψαριών πριν την απομάκρυνσή τους δεν θα πρέπει να προκαλεί αυξημένα επίπεδα stress ούτε τα ψάρια να παραμένουν συγκεντρωμένα για παρατεταμένες χρονικές περιόδους.
- Όπου αυτό δεν είναι εφικτό τα ψάρια μεταφέρονται με ειδικές απόχες καθαρές δεξαμενές με πάγο/νερό όπου η θανάτωση επέρχεται από θερμικό shock.
- Η θανάτωση των ψαριών πρέπει να γίνεται σε νερό με πάγο υπό συνθήκες υγιεινής. Κατά τη θανάτωση η εσωτερική θερμοκρασία των ψαριών , πρέπει να μειωθεί το συντομότερο δυνατόν στους 4°C έως 0°C. Ο χρόνος θανάτωσης πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος.
- Ο πάγος ο οποίος απαιτείται για τη μείωση της εσωτερικής θερμοκρασίας των ψαριών στους 4°C πρέπει να προέρχεται από πόσιμο ή καθαρό θαλασσινό νερό και να βρίσκεται σε αναλογία προς το ψάρι 1/3. Παράλληλα πρέπει να προστίθεται ικανή ποσότητα νερού ώστε να δημιουργείται ένα πήγμα το οποίο θα προστατεύει τα ψάρια από τη σύνθλιψη και θα συμβάλλει στην διατήρηση του φυσικού τους σχήματος.
- Στη διαδικασία εξαλίευσης θα πρέπει να ακολουθούνται οι διατάξεις υγιεινής ώστε τα ψάρια να μην παρουσιάζουν εξωτερικές (αμυχές) ή εσωτερικές (αιμορραγίες) βλάβες.
- Η θανάτωση με χρήση παγόνερου (shock θερμοκρασίας) θεωρείται ανθρωπιστικά αποδεκτή μέθοδος (Ελληνική Αλιευτική Ποιοτική 2001).

Πρόσφατα, επιστημονική ομάδα για την υγεία και ευημερία των ζώων της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων εξέδωσε γνώμη που σχετίζεται με την καλή μεταχείριση των ζώων κατά τη διάρκεια της αναισθητοποίησης και

θανάτωσης τους συνιστώντας περαιτέρω έρευνες σχετικά με τους μηχανισμούς αναισθητοποίησης και θανάτωσης (EFSA Journal 2004).

1.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΡΙΟΤΕΡΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΤΡΟΠΩΝ ΘΑΝΑΤΩΣΗΣ

1.4.1 Θανάτωση με ασφυξία

Πρόκειται για εξαιρετικά βίαιη και επώδυνη μέθοδο κατά την οποία τα ψάρια, κατά την εξαγωγή τους από το νερό, στην προσπάθειά τους να ξεφύγουν, ασκούν μεγάλη πίεση στο σώμα τους με αποτέλεσμα τη μεγιστοποίηση της καταπόνησης. Η έξοδος από το νερό συνοδεύεται με «κατάρρευση - κλείσιμο» των βραγχίων αποτρέποντας την ανταλλαγή οξυγόνου με το περιβάλλον, κάτι που ουσιαστικά οδηγεί στην ανοξία (Robb & Kestin, 2002).

1.4.2 Θανάτωση με παγόνερο

Σχετικά έντονος αλλά αναμφισβήτητα γρήγορος τρόπο θανάτωσης γι' αυτό ίσως χαρακτηρίζεται και ως η πιο διαδεδομένη μέθοδος θανάτωσης. Η ψύξη γενικά και ειδικότερα η απότομη αλλαγή της θερμοκρασίας προκαλεί την παράλυση των μυών του ψαριού. Το ψάρι που θανατώνεται από τον υγρό πάγο πεθαίνει γρηγορότερα και παρουσιάζει μικρότερα επίπεδα καταπόνησης από το συμβατικό πάγο αν και έχει αποδειχθεί πως γενικά η ψύξη αποτελεί σοβαρό στρεσογόνο παράγοντα για τα ψάρια (Skjervold *et al.* 2001).

1.4.3 Θανάτωση με παροχή CO₂ στο νερό

Αποτελεί μέθοδο κατά την οποία, ο κορεσμός ύδατος με το διοξείδιο του άνθρακα δημιουργεί όξινο και ανοξικό περιβάλλον με αποτέλεσμα τη νάρκωση των εκτιθέμενων σε αυτό ψαριών. Ένα από τα κύρια μειονεκτήματα της μεθόδου είναι οι σπασμωδικές κινήσεις των ψαριών που παρατηρούνται κατά τα πρώτο με δεύτερο λεπτό της διαδικασίας οι οποίες αφήνουν ανοικτό το ενδεχόμενο ύπαρξης της καταπόνησης (Robb & Kestin, 2002 : Southgate & Wall 2001).

1.4.4 Θανάτωση με άμεση πρόκληση αιμορραγίας

Συνιστά μια αργή σχετικά μέθοδο, δεδομένου ότι τα ψάρια δεν καθίστανται αμέσως αναισθητα. Τις περισσότερες φορές αυτή πραγματοποιείται είτε με την άμεση αποκοπή των βραγχίων και ακριβώς λίγο πιο πάνω από αυτά προς το κεφάλι, ή ακόμη και τρύπημα στην καρδιά των ψαριών (EFSA 2004). Αν και αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται πλέον εμπορικά στο Ηνωμένο Βασίλειο και στη Νορβηγία, χαρακτηρίστηκε ως απάνθρωπη από την επιστημονική επιτροπή της υγείας των ζώων και της ευημερίας της ευρωπαϊκής αρχής, λόγω ότι δεν χρησιμοποιείται νάρκωση προηγουμένως (Van de Vis *et al.* 2003 : EFSA 2004).

1.4.5 Θανάτωση με χτύπημα στο κεφάλι

Με τη μέθοδο θανάτωσης αυτή τα ψάρια χτυπιούνται γρήγορα στο κεφάλι, με συνέπεια τη βίαια μετακίνηση του κρανίου προς τον εγκέφαλο, που προκαλεί διάσειση ή και εγκεφαλική δυσλειτουργία (Van de Vis *et al.* 2003). Αυτή η μέθοδος καθιστά τα ψάρια αναισθητα αμέσως και αμετάκλητα ενίοτε εάν η ικανοποιητική δύναμη εφαρμόζεται στο σωστό μέρος του κεφαλιού (HSA 2005).

1.4.6 Θανάτωση με ηλεκτρισμό

Ανάλογα με την τάση, τη συχνότητα και την διάρκεια που εφαρμόζεται ηλεκτρισμός μπορεί να επιτευχθεί απλή νάρκωση έως και ακαριαίος θάνατος. Η μικρή εφαρμογή τάσης, αφ' ενός, δύναται να ζαλίζει το ψάρι και αφ' ετέρου η εφαρμογή μεγαλύτερης τάσης (ηλεκτροπληξία) είναι ικανή να καταστρέψει τη λειτουργία του εγκεφάλου και επομένως να αφαιρέσει από το ζώο εκτός των άλλων την αίσθηση επιτέλεσης της λειτουργίας της αναπνοής (HAS 2005). Αποτελεί ουσιαστικά την πιο γρήγορη μέθοδο θανάτωσης των ζώων, αν και παρ' όλα αυτά πολλές φορές έχουν παρατηρηθεί διάφορες κηλίδες αίματος στην περιοχή των μυών των ψαριών καθώς και παραδείγματα σπασμένων σπονδύλων (Poli *et al.* 2005).

1.4.7 Θανάτωση με χρήση αναισθητικών ουσιών

Η νάρκωση ηρεμεί τα προς θανάτωση ψάρια και επομένως μειώνει ενδεχόμενα επίπεδα καταπόνησης. Αποτελεί ενδεδειγμένο τρόπο μεταφοράς των ψαριών εκτός του νερού με σκοπό να συνεχιστεί ήρεμα η διαδικασία θανάτωσης με οποιοδήποτε τρόπο. Εντούτοις, η νομοθεσία της ΕΕ απαγορεύει τη χρήση αναισθητικών πριν την θανάτωση των ψαριών (EFSA 2004).

1.5 ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ («STRESS») ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα των υδατοκαλλιεργειών είναι η καταπόνηση («stress») των ψαριών που προκαλείται από διάφορους παράγοντες («stressors») και έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της συμπεριφοράς και φυσιολογίας τους με ότι αυτό συνεπάγεται.

1.5.1 Ορισμοί για το «stress».

Ένας αρκετά αντιπροσωπευτικός είναι αυτός των (Schreck *et al.* 2001) οι οποίοι μιλούν για «**απόκριση του σώματος**» ή για «**μια φυσιολογική αλληλουχία γεγονότων που λαμβάνει χώρα όταν ο οργανισμός προσπαθεί να αντισταθεί στο θάνατο και να αποκαταστήσει την ομοιόστασή του**».

1.5.2 Οξύ («acute») και Χρόνιο («chronic») «stress».

Το Οξύ «stress» προκαλείται από παρενοχλήσεις μικρής διάρκειας (λεπτά - ώρες), όπως είναι η διαλογή κατά μέγεθος, το ψάρεμα, ο εμβολιασμός, διάφοροι άλλοι χειρισμοί.

Το Χρόνιο «stress» προκαλείται από παρενοχλήσεις μεγάλης διάρκειας (ημέρες-εβδομάδες), όπως είναι η έκθεση σε νέες περιβαλλοντικές συνθήκες, η παρατεταμένη διακύμανση της ποιότητας του νερού, η εγκαθίδρυση κοινωνικής ιεραρχίας.

1.5.3 Παράγοντες καταπόνησης («stressors»)

Οι παράγοντες καταπόνησης μπορεί να είναι:

Φυσικοί (θερμοκρασία, pH, οξυγόνο),

Βιολογικοί (κοινωνικοί, διατροφικοί) και

Χημικοί (τοξικά).

Η απόκριση των ψαριών στο «stress» ακολουθεί ένα γενικό σχήμα χαρακτηριζόμενο ως GAS (General Adaptation Syndrome) το οποίο περιλαμβάνει 3 επίπεδα απόκρισης, ενώ οι επιπτώσεις γίνονται διαδοχικά ορατές από αλλαγές στη συμπεριφορά, τη φυσιολογία και σε κυτταρικό επίπεδο.

Πρωτογενή (Alarm): Αμέσως μόλις το ψάρι εκτεθεί σε κάποιο παράγοντα καταπόνησης λαμβάνουν χώρα διάφορες νευροενδοκρινικές αλλαγές οι οποίες συνοδεύονται από έκλυση ορμονών στο αίμα χαρακτηριστικών της κατάστασης «stress».

Δευτερογενή (Resistance) : Τα αυξημένα επίπεδα κατεχολαμινών και κορτιζόλης επηρεάζουν τις βιοχημικές και φυσιολογικές λειτουργίες των ψαριών προκαλώντας διαφοροποίηση στους ρυθμούς έκκρισης ορμονών από την υπόφυση και τον θυρεοειδή αδένα. Τροποποιήσεις στους ρυθμούς ανανέωσης των νευροδιαβιβαστών όπως είναι η ντοπαμίνη και η σεροτονίνη επίσης, προκαλούν αυξημένη ροή αίματος προς τα βράγχια, καλλίτερη οξυγόνωση λόγω αύξησης του καρδιακού παλμού και βελτιωμένες κολυμβητικές επιδόσεις. Ενεργοποίηση του καταβολισμού (αντί του αναβολισμού) και κινητοποίηση ενέργειας λόγω αποδόμησης των αποθεμάτων. Αύξηση της γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία λόγω έντονης γλυκογενόλυσης και γλυκονεογένεσης) για ικανοποίηση των αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων.

Τριτογενή (Exhaustion) : Όταν η διάρκεια (ένταση) του «stress» αγγίζει ή υπερβαίνει τα όρια ανοχής των ψαριών δυσχεραίνοντας τον εγκλιματισμό τους, τότε παρατηρείται σειρά παρενεργειών σε επίπεδο πληθυσμού που επηρεάζουν την επιβίωση, την ανάπτυξη, την αναπαραγωγική ικανότητα, το ανοσοποιητικό σύστημα ,

1.6 Ο ΚΛΑΔΟΣ ΤΗΣ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η αλιεία, ως κλάδος οικονομικής δραστηριότητας εντάσσεται στον πρωτογενή τομέα και για τη χώρα μας υπήρξε παραδοσιακά κύρια δραστηριότητα και βασική πηγή εισοδήματος για τους κατοίκους πολλών παράκτιων περιοχών και κυρίως των νησιών μας. Τα αλιεύματα αποτελούν κύρια πηγή διατροφής του ανθρώπου λόγω της υψηλής βιολογικής αξίας των πρωτεϊνών τους, της πληθώρας των ιχνοστοιχείων και του υψηλού ποσοστού πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που περιέχονται στη σάρκα τους. Περισσότερα από τα 2/3 της παγκόσμιας παραγωγής κρέατος και γάλακτος καταναλώνονται από 700.000.000 ανθρώπους, ενώ περισσότεροι από 1.500.000.000 άνθρωποι καλύπτουν το 50% της ημερήσιας ανάγκης τους σε ζωικές πρωτεΐνες από την κατανάλωση αλιευμάτων. Γι' αυτό τα αλιεύματα και τα διάφορα προϊόντα τους καταλαμβάνουν ξεχωριστή θέση στη διεθνή αγορά τροφίμων (Βαρελτζής 1999).

Σύμφωνα με τον F.A.O. η παγκόσμια κατανάλωση ψαριών θα αυξηθεί κατά 25% έως το 2030, ανεβάζοντας την ζήτηση στους 150-160 εκατομμύρια τόνους. Ταυτοχρόνως το παγκόσμιο ετήσιο αλιευτικό αποτέλεσμα, προκειμένου η αλιεία να παραμένει βιώσιμη, δεν μπορεί να ξεπερνά τους 100 εκατομμύρια τόνους. (<http://www.fao.org./DOCREP/003>). Επιπλέον, υπάρχει τάση στη Μεσόγειο Θάλασσα, να αναπτυχθούν ιχθυοκαλλιέργειες φιλικές ως προς το περιβάλλον σε συνδυασμό με την ανάγκη βελτιστοποίησης των διατροφικών αγωγών της τσιπούρας, ώστε αυτή να επιτύχει το μέγιστο ανάπτυξης της. Σύγχρονες μελέτες μας παρέχουν επαρκή δεδομένα για τις απαιτήσεις σε ενέργεια και πρωτεΐνη του είδους, που επιτρέπουν την ανάπτυξη των σωστών προτύπων σίτισης (Lupatsch 2004).

1.6.1 Θρεπτική αξία των ψαριών

Η συστηματική έρευνα για τη διαπίστωση της θρεπτικής αξίας της σάρκας των ιχθύων άρχισε από το 1918. Διάφοροι πειραματισμοί με λευκώματα ιχθύων (ρέγκας, σολομού, μπακαλιάρου κτλ) απέδειξαν ότι αυτά έχουν την ίδια θρεπτική αξία με τα λευκώματα του κρέατος του μόσχου. Επίσης, ορισμένα ακόρεστα λιπαρά οξέα (λινολεϊκό, λινολενικό, αραχιδονικό) παίζουν σπουδαίο ρόλο στην καλή λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος (Βαρελτζής 2000).

Αποτελούν σημαντική πηγή πρωτεϊνών. Η περιεκτικότητά τους σε λιπίδια ποικίλει και η ενεργειακή τους αξία κυμαίνεται από 50-160 kcal/100g. Οι ιχθύες είναι πλούσια πηγή ιωδίου και καλή πηγή φθορίου. Οι μικροί ιχθύες, όπως οι μαρίδες, όταν τρώγονται ολόκληροι είναι καλή πηγή ασβεστίου. (Βαρελτζής 2000).

Η γευστικότητα του κρέατος των ιχθύων διαφέρει ανάλογα με το είδος και την διατροφή τους. Οι ιχθείς της θάλασσας είναι περισσότερο εύγεστα απ' ότι των γλυκών νερών. Η πεπτικότητα της σάρκας κυμαίνεται από 2 έως 3 για τα ισχνά και 3 έως 4 για τα λιπαρά ψάρια (Πανέστος 1978). Τέλος τα λευκώματα των ιχθύων πέπτονται σε αναλογία 96% από το ανθρώπινο οργανισμό (Βαρελτζής 2000).

1.7 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εκτίμηση της προκαλούμενης καταπόνησης που δέχονται τα ψάρια κατά τη θανάτωση με ασφυξία και με εμβάπτιση σε παγόνερο, ως τρόπων θανάτωσης χρησιμοποιούμενων από τη συλλεκτική αλιεία και την ιχθυοκαλλιέργεια αντίστοιχα.

Η τσιπούρα αποτελεί τον κύριο όγκο της παραγωγής της θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας στη Μεσόγειο Θάλασσα, όπως και στην Ελλάδα και για αυτόν ακριβώς τον λόγο επιλέχθηκε και το συγκεκριμένο ψάρι για αυτή την έρευνα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εντατικά εκτρεφόμενα ψάρια και συνθήκες εκτροφής.

Το πείραμα έγινε στις εγκαταστάσεις του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε δεξαμενές χωρητικότητας 500 περίπου λίτρων και με συνεχές σύστημα επανακυκλοφορίας νερού χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος. Τα ψάρια προήλθαν από μονάδα εντατικής εκτροφής στην περιοχή του Παγασητικού Κόλπου. Οκτώ (8) άτομα τσιπούρας μέσου βάρους 120g (± 30) και μέσου μήκους 20cm (± 2) χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες του πειράματος.

2.2 Συνθήκες κατά τη διάρκεια του πειράματος

Οι συνθήκες κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν οι ακόλουθες:

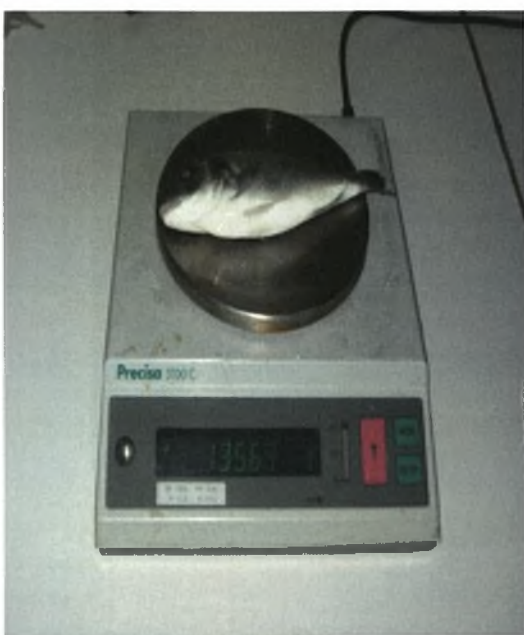
- Ιχθυοπυκνότητα 4kg/m³,
- θερμοκρασία 17-20 °C,
- οξύτητα pH 7,4,
- συγκέντρωση αμμωνίας (NH₃) 0,5-2ppm,
- αλατότητα 3,4g/l, και
- διαλυμένο οξυγόνο 5-7ml/l.

Οι συνθήκες διατηρήθηκαν σταθερές έως το πέρας διεξαγωγής του πειράματος. Ο μηχανισμός προσαρμογής στο περιβάλλον διήρκεσε μία εβδομάδα. Η χορήγηση τροφής γινόταν δύο φορές την ημέρα ανά δεξαμενή. Κάθε δεξαμενή περιείχε θαλασσινό νερό με σταθερή παροχή οξυγόνου. Το κλειστό κύκλωμα διαχείρισης του νερού περιελάμβανε μηχανικό, χημικό και βιολογικό φίλτρο τύπου Tetra Pond PF 10.000 και UV. Με τη χρήση απόχης και του βιολογικού φίλτρου, απομακρύνονταν τα διάφορα

στερεά σωματίδια καθώς και με την αντικατάσταση του θαλασσινού νερού σε τακτά χρονικά διαστήματα, πληρούνταν οι απαιτήσεις των εκτρεφόμενων οργανισμών.

2.3 Δειγματοληψία - ανάλυση διαδικασίας τρόπων θανάτωσης

Αρχικά μετρήθηκε το βάρος (Εικ. 3) και το μήκος των ψαριών (Εικ. 4), σε τελευταίο πλέον στάδιο πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και εκτομή για την αφαίρεση του ήπατος.



Εικόνα 3: Μέτρηση βάρους



Εικόνα 4: Μέτρηση μήκους

2.4 Παγόνερο

Κατά την διαδικασία θανάτωσης με παγόνερο (Εικόνα 5), το ψάρι αφού εξαλειύτηκε με απόχη από την δεξαμενή, τοποθετήθηκε σε δοχείο που περιείχε νερό και πάγο, περιεκτικότητας 1:1. Στη φάση αδράνειας πλέον των μυϊκών συσπάσεων και των βραγχιακών επικαλυμάτων, ακολούθησε η διαδικασία μέτρησης σωματομετρικών αναλογιών, αιμοληψία και αφαίρεση του ήπατος.



Εικόνα 5: Διαδικασία θανάτωσης με παγόνερο

2.5 Ασφυξία

Στη μέθοδο θανάτωσης με ασφυξία, το ψάρι παρέμεινε εκτός νερού στην απόχη, ώστε να χάσει πλήρως τις αισθήσεις του. Ο απαιτούμενος χρόνος κυμάνθηκε περίπου στα δέκα λεπτά. Το επόμενο βήμα περιελάμβανε μετρήσεις σωματομετρικών χαρακτηριστικών, αιμοληψία και αφαίρεση του ήπατος.

2.6 Προετοιμασία αίματος – απομόνωση ερυθροκυττάρων

Η διαδικασία απομόνωσης των ερυθροκυττάρων, περιελάμβανε δύο βασικά στάδια. Αρχικά πραγματοποιήθηκε άμεση λήψη αίματος μετά τη θανάτωση του ψαριού και κατά δεύτερον έγινε η περαιτέρω επεξεργασία αυτού στο εργαστήριο. Η ποσότητα αίματος που λαμβανόταν από το κάθε ψάρι ήταν 2ml, η οποία αμέσως τοποθετούνταν σε κυβέτα που περιείχε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) σε ποσότητα 1 ml. Μετέπειτα στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε η αραιώση του αίματος και στη συνέχεια η χρώση του σε αντικειμενοφόρους πλάκες, λύση και ηλεκτροφόρηση των ερυθροκυττάρων.

2.7 Απομόνωση ήπατος.

Χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένη λαβίδα και αποστειρωμένο ψαλίδι. Το κάθε ψάρι, αναισθητοποιήθηκε με φαινοξυαιθανόλη, συγκέντρωσης 5 ppm σε θαλασσινό νερό και έγινε τομή στην κοιλιακή του περιοχή για την αφαίρεση του ήπατος το οποίο τοποθετήθηκε σε πλαστικούς σωλήνες Falcon (50 ml) με ρυθμιστικό διάλυμα HBSS (Hanks Balanced Salt Solution).

Μέσω της τεχνικής της «Comet Assay», 100 ηπατικά κύτταρα από κάθε δείγμα απομονώθηκαν ώστε να μετρηθεί το κατεστραμμένο DNA.

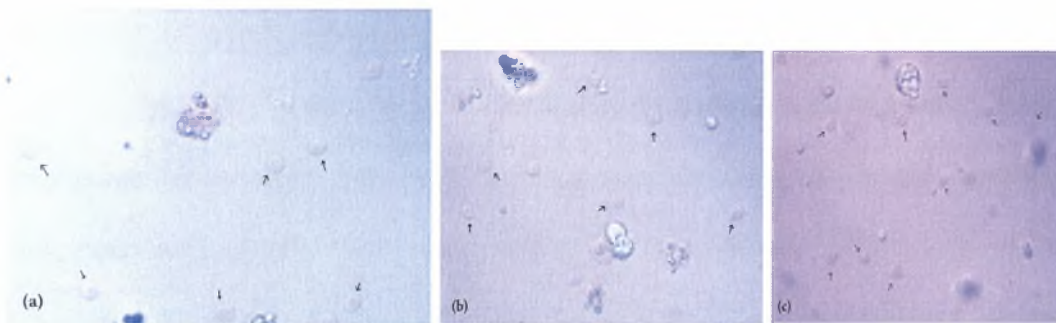
Η διαδικασία απομόνωσης κυττάρων που ακολουθήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα βασίζεται σε δύο φάσεις (Mitchelmore & Chipman, 1998, Devaux *et al.* 1997 και Baksie & Fazier, 1990).

Στην πρώτη φάση γίνεται ο καθαρισμός του ήπατος από το αίμα και στη δεύτερη φάση γίνεται η αφομοίωση του ήπατος. Αμέσως μετά την εξαγωγή του ήπατος από την τσιπούρα, το ίδιο τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου «Falcon», το οποίο περιείχε κρύο ρυθμιστικό διάλυμα HBSS (ή Hank's salt solution) χωρίς να περιέχει ασβέστιο ή μαγνήσιο (Ca ή Mg). Το ασβέστιο αφαιρείται από το διάλυμα, διότι δρα ανασταλτικά στο διαχωρισμό των ηπατικών κυττάρων. Το μαγνήσιο επίσης αφαιρείται από το διάλυμα, διότι εμποδίζει τη δράση του ενζύμου κολαγενάση, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί στη δεύτερη φάση του πειράματος (Baksie & Fazier, 1990). Με το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα το συκώτι καθαρίζεται από τυχόν αίμα που θα είχε συσσωρευθεί στην περιπλαχνική κοιλότητα. Στη συνέχεια, γίνεται μία δεύτερη πλύση του ήπατος και αμέσως μετά γίνονται ενέσεις κολαγενάσης συγκέντρωσης 0,04% (η κολαγενάση διαλύεται σε διάλυμα HBSS). Η κολαγενάση είναι ένα ένζυμο το οποίο βοηθάει στην αφομοίωση του ηπατικού ιστού. Αφού γίνει η «πέψη» του ιστού για 10 – 15 λεπτά, το ήπαρ μεταφέρεται σε “petri”, όπου και τεμαχίζεται σε πολύ μικρά τεμάχια πάνω σε τριμμένο πάγο.

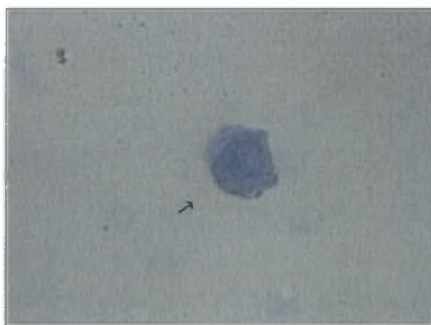
Όλο το τεμαχισμένο ήπαρ μαζί με το διάλυμα HBSS, το οποίο περιέχει και κολαγενάση, μεταφέρονται σε μικρό γυάλινο δοχείο ζέσεως και τοποθετείται πάνω σε μηχανήμα ανάδευσης. Εκεί με τη βοήθεια ενός μικρού μαγνήτη (ο οποίος έχει τοποθετηθεί μέσα στο δοχείο ζέσεως) το μίγμα αναδεύεται για περίπου μισή ώρα.

Μετά τη μισή ώρα, το εσωτερικό του δοχείου μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα «Falcon», αφού πρώτα φιλτραριστεί με αποστειρωμένη γάζα. Ακολουθεί φυγοκέντριση του «Falcon» στις 2,000 στροφές για πέντε λεπτά και μετά το υπερκείμενο χύνεται και προστίθεται φρέσκο και κρύο HBSS στην πελέτα που μένει. Στη συνέχεια, γίνονται δύο ακόμα τέτοιες πλύσεις με HBSS και φυγοκέντριση στις 2,000 στροφές για πέντε λεπτά και τέλος η πελέτα που μένει επαναδιαλύεται 7 – 10 ml από ρυθμιστικό διάλυμα PBS (phosphate buffered saline). Το διάλυμα αυτό περιέχει κύτταρα από το ήπαρ της τσιπούρας, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στην επόμενη φάση του πειράματος. Στη συνέχεια μεταφέρονται τα ηπατοκύτταρα σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Για να επιτευχθεί αυτό, η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε σε καθαρή αλκοόλη και στη συνέχεια στους -20°C μέχρι να παγώσει για χρονικό διάστημα τουλάχιστον δυο ωρών πριν. Στο διάστημα αυτό ετοιμάστηκε διάλυμα - πήκτωμα αγαρόζης (NMP Normal Melting Point) συγκέντρωσης 0,5% και αφού κρύωσε λίγο, έγινε κάλυψη με μία στρώση της αγαρόζης στην ειδική επιφάνεια της παγωμένης αντικειμενοφόρου. Σημαντικό είναι να ειπωθεί πως η αντικειμενοφόρος πλάκα από τη στιγμή που έβγαине από το διάλυμα αλκοόλης από τους -20°C παρέμεινε τοποθετημένη πάνω σε τριμμένο πάγο. Ωστόσο το μείγμα να «ζελατινοποιηθεί» πάνω στην αντικειμενοφόρο, προετοιμάστηκε ένα νέο μίγμα αγαρόζης LMP (Low Melting Point) συγκέντρωσης 0,5%. Μετά από λίγη ώρα και αφού η νέα αγαρόζη είχε κρυώσει προστέθηκαν 20ml από το κυτταρικό αιώρημα σε 80ml του διαλύματος της αγαρόζης (LMP), έγινε μια ανάδευση μέσα στην κυβέτα και αμέσως μετά όλο το μείγμα αγαρόζης με το κυτταρικό αιώρημα τοποθετήθηκε πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα, στο σημείο όπου η οποία ήταν ήδη καλυμμένη με την παλιά στρώση αγαρόζης που είχε ζελατινοποιηθεί (η διαδικασία πάνω σε πάγο).

Ακολούθησε η τοποθέτηση καλυπτρίδας πάνω ακριβώς από εκεί που βρίσκονταν τα ηπατικά κύτταρα. Μετά τη ζελατινοποίηση και της δεύτερης στρώσης αγαρόζης, η καλυπτρίδα απομακρύνθηκε με προσοχή έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι ενδεχόμενες απώλειες κυττάρων (Εικ. 6 και Εικ.7).



Εικόνα 6: Κύτταρα τα οποία έχουν χρωματιστεί με προσθήκη εωσίνης. (a) Τα ζωντανά κύτταρα τα οποία έχουν απομονωθεί χρωματίζονται με κόκκινο χρώμα και διακρίνεται η κυτταρική μεμβράνη και ο πυρήνας τους., (b) Λίγα λεπτά μετά την προσθήκη εωσίνης τα οποία έχει αρχίσει να διακρίνεται η χρώση του κόκκινου και (c) Τα κύτταρα έχουν χρωματιστεί εξ' ολοκλήρου κόκκινα.



Εικόνα 7: Κύτταρο το οποίο έχει χρωματιστεί με τη προσθήκη του «Trypan Blue» χρωματίζεται μπλε. Η χρωστική αυτή χρησιμοποιείται για να εντοπισθούν τα νεκρά κύτταρα.

2.8 Προετοιμασία για το στρώσιμο της αγαρόζης σε αντικειμενοφόρο.

Τα ηπατικά κύτταρα απομονώθηκαν και η μεταφορά αυτών έγινε πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, η οποία είχε τοποθετηθεί σε καθαρή αλκοόλη και στη συνέχεια στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως να παγώσει. Ετοιμάστηκε 0,5% συγκέντρωσης αγαρόζης (η σκόνη της αγαρόζης διαλύονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS) και μία στρώση αγαρόζης κάλυψε την επιφάνεια της παγωμένης αντικειμενοφόρου πλάκας. Το μείγμα ζελατινοποιήθηκε πάνω στη πλάκα. Δημιουργήθηκε ένα νέο μίγμα αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS και σε συγκέντρωση 0,5%, σε χαμηλότερο σημείο τήξης από την κανονική αγαρόζη. Λίγο αργότερα προστέθηκε 20μl από το κυτταρικό αιώρημα σε 80μl της αγαρόζης (με το χαμηλότερο σημείο τήξης) και αμέσως μετά όλο το μείγμα αγαρόζης με το κυτταρικό αιώρημα τοποθετήθηκε στην αντικειμενοφόρο πλάκα, στην οποία η στρώση αγαρόζης είχε ζελατινοποιηθεί. Μετά τη ζελατινοποίηση και της δεύτερης στρώσης αγαρόζης, ακολούθησε η τοποθέτηση καλυπτρίδας πάνω από τα ηπατικά κύτταρα η οποία απομακρύνθηκε με προσοχή έτσι ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή του δείγματος.

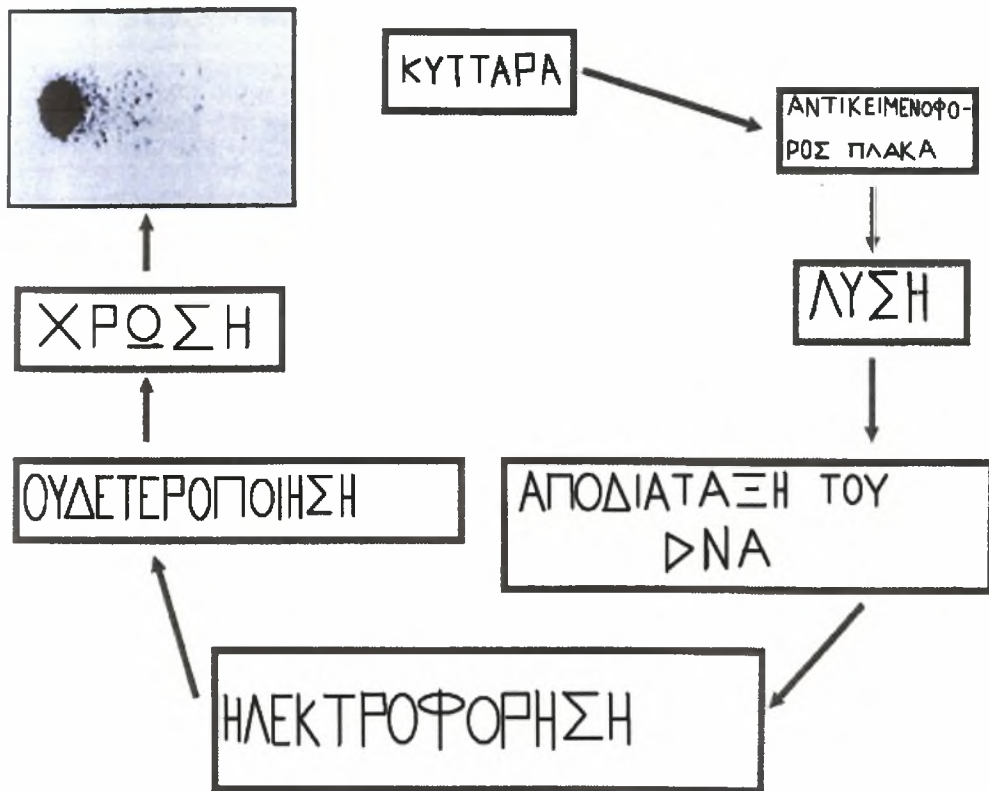
2.9 Λύση και ηλεκτροφόρηση των ηπατοκυττάρων

Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε σε κρύο διάλυμα, ώστε να διατηρηθεί η σταθερότητα της αγαρόζης (Tice *et al.* 2000), το οποίο περιείχε NaCl συγκέντρωσης 2.5 M, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) συγκέντρωσης 100 mM, Tris συγκέντρωσης 10 mM. Τέλος προστέθηκαν 1% Triton – X 100 και 10% DMSO (dimethyl sulfoxide). Ρυθμίστηκε το pH του διαλύματος ώστε να φτάσει στο 10 με συμπυκνωμένο διάλυμα HCl, και τοποθετήθηκε στους 4 °C, ώστε να παρεμποδιστεί η λειτουργία των μηχανισμών επιδιόρθωσης (Henderson *et al.* 1998) για τριάντα λεπτά έως ότου κρυώσει. Ακολούθησε το ξέπλυμα της αντικειμενοφόρου με αποσταγμένο νερό ώστε να απομακρυνθούν τα διάφορα χημικά όπως το EDTA και το αλάτι NaCl. Εν συνεχεία τοποθετήθηκε για 20 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, που περιείχε 0,075 M NaOH και 1 mM EDTA και το pH του ήταν πάνω από 12 (συνήθως 12,5 – 12,8). έτσι ώστε να επέλθει η αποπεριέλιξη του DNA και να δημιουργηθούν μονόκλωνες ρήξεις του DNA.

Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα βρισκόταν μέσα σε οριζόντιο «μπάνιο» ηλεκτροφόρησης. Μετά από 20 λεπτά ξεκίνησε η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης του μονόκλωνου DNA, η οποία διήρκεσε 10 λεπτά. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 25 V και 300 mA (Hartmann *et al.* 2003). Στη συνέχεια η αντικειμενοφόρος πλάκα ξεπλύθηκε με ουδέτερο διάλυμα που περιείχε Tris συγκέντρωσης 0,4 M και το pH του ήταν 7,5. σε τρεις πλύσεις (McKelvey-Martin *et al.* 2003) για να απομακρυνθεί αρχικά το EDTA, καθώς επίσης και για να επανέλθει το DNA στη δίκλωνη μορφή του, ώστε η χρωστική (SYBR Green I), να δράσει κατά τη διάρκεια της χρώσης.

2.10 Επιδιόρθωση

Τα κύτταρα που απομονώθηκαν καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε Leibovitz L-15, 10% βόειο ορό (Fetal Calf Serum, FCS) και 1% αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν στην υγρή καλλιέργεια στους 22°C για δύο ώρες. (Lawrence *et al.* 1991). Με το ειδικό λογισμικό CASP v.1.2.2 (Comet Assay Software Project), το οποίο σκοράρει τους κομήτες και μετρά το «Tail Moment» (TM), τα δεδομένα αναλύθηκαν δίνοντας στοιχεία για το μήκος ουράς και τα ποσοστά του γενετικού υλικού και το μήκος κεφαλής. Το TM ορίζεται ως το γινόμενο του μήκους της ουράς επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του TM τόσο μεγαλύτερη καταστροφή έχει υποστεί το DNA. Εξετάσθηκαν για κάθε ψάρι τρία δείγματα αντικειμενοφόρο με επαναλήψεις, από τις οποίες μία περιείχε κύτταρα αίματος, η άλλη κύτταρα ήπατος και η τελευταία κύτταρα ήπατος που είχαν υποστεί την διαδικασία «επιδιόρθωσης» (Εικ. 8).



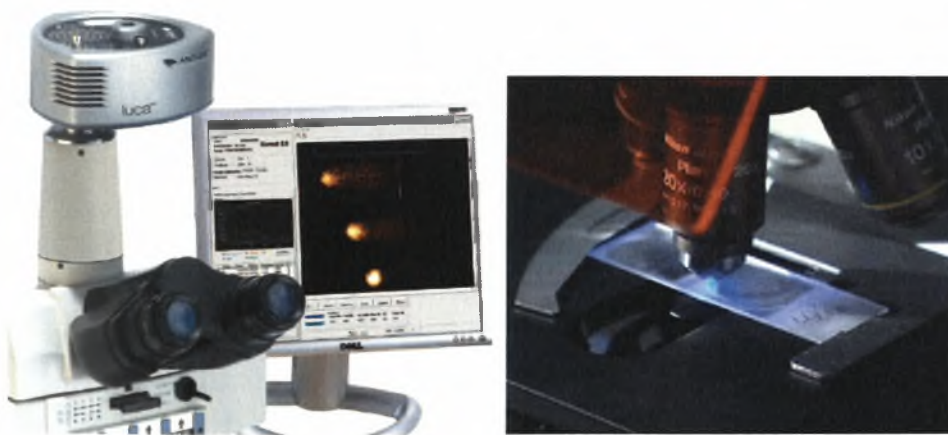
Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων σημείων στην Comet Assay, τα οποία είναι τα κύτταρα (cells), οι αντικειμενοφόρες πλάκες (slides), η λύση των κυττάρων (lysis), η αποδιάταξη του DNA (alkali unwinding), η ηλεκτροφόρηση (electrophoresis), η ουδετεροποίηση των κυττάρων (neutralization), και το «βάψιμο» του DNA με βρομιούχο εθίδιο (staining) (Tice *et al.* 2000).

2.11 Μέτρηση – ανάλυση κομητών «Comet Assay»

Η αλκαλική εκδοχή της μεθόδου “comet assay” εφαρμόστηκε πρώτη φορά από τους Singh *et al.* (1988), ενώ άλλες εκδοχές της μεθόδου αναπτύχθηκαν από τον Olive (1989) που περιλάμβανε τη λύση των κυττάρων σε αλκαλικό pH, και στη συνέχεια ηλεκτροφόρηση είτε σε ουδέτερο είτε σε ελαφρώς αλκαλικό περιβάλλον, για την ανίχνευση θραυσμάτων δίκλωνου ή μονόκλωνου DNA αντίστοιχα. Επειδή οι περισσότεροι τοξικοί παράγοντες που επηρεάζουν το DNA, προκαλούν περισσότερες και πιο εκτεταμένες βλάβες στα μονόκλιωνα μόρια απ’ ότι στα δίκλιωνα, η αλκαλική εκδοχή της μεθόδου (pH>13) θεωρείται πιο ευαίσθητη στην ανίχνευση της βλάβης του DNA. Ένα ευρύ φάσμα εξωγενών ή ενδογενών γενοτοξικών παραγόντων προκαλεί αύξηση της μετανάστευσης του DNA έξω από το κυτταρικό τοίχωμα, μέσα στο πήκτωμα της αγαρόζης. Εξωγενώς ένα πλήθος ουσιών μπορεί να προκαλέσει γενοτοξικές αλλοιώσεις, όπως βαρέα μέταλλα, χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες, φουράνια, διοξίνες κ.λ.π. Ενδογενώς οι ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα του μεταβολισμού (Rattan, 2006) και τα ιόντα Ca⁺, προκαλούν την ενεργοποίηση ενδονουκλεασών (McConkey *et al.* 1988), με αποτέλεσμα τον κερματισμό του DNA. Τα πλεονεκτήματα της comet ανάλυσης στην καταγραφή της βλάβης του DNA σε υδρόβιους οργανισμούς περιλαμβάνει:

- τη μέτρηση βλάβης του DNA σε μεμονωμένα κύτταρα
- μικρό αριθμό κυττάρων για την ανάλυση (<10000)
- την εφαρμογή της σε ευκαρυωτικά κύτταρα και
- την ευαισθησία σε ότι αφορά την ανίχνευση βλάβης του DNA (Lee & Steinert, 2003).

Στο συγκεκριμένο πείραμα ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση των πλακών, όπου διακρινόταν το γενετικό υλικό των πυρήνων. Η χρώση του DNA έγινε με τη χρωστική SYBR Green I, η οποία χρωματίζει τους πυρήνες με έντονο φωτεινό πράσινο χρώμα. Η ποσότητα που προστέθηκε σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα ήταν περίπου 20 μ l. Συγκεκριμένα, περίπου 100 πυρήνες φωτογραφήθηκαν τυχαία σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού και σε μεγέθυνση 100X (Zeiss, HBO 50/AC) ενώ η φωτογράφιση των πυρήνων έγινε με ειδικό πρόγραμμα του μικροσκοπίου (Eικ. 9) (ProgRes Capture Pro, rets.) τεχνική για την ανίχνευση των θραυσμάτων μονόκλωνου DNA, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης γενετοξικότητας στα ψάρια και σε άλλα υδρόβια είδη. Όπως αναφέρουν οι Mitchelmore και Chipman (1998), είναι μια ευαίσθητη, ταχεία και οικονομική μέθοδος.



Εικόνα 9: Progress Capture Pro, rets.

2.12 Στατιστική επεξεργασία

Για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το Γενικό Γραμμικό Μοντέλο (GLM - UniANOVA) με την παραμετροποίηση του μοντέλου σε συγκρίσεις μέσω των όρων ανά ζεύγη (main effects). Για τις πολλαπλές συγκρίσεις των μέσω των όρων χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Tukey HSD. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε $\alpha=0,05$. Για τον έλεγχο της ομοιογένειας των διασπορών χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο του Levene και για τον έλεγχο της κανονικότητας το κριτήριο των Kolmogorov-Smirnov. Επειδή στα δεδομένα οι μέσες τιμές ήταν ανάλογες των διακυμάνσεων και στις περιπτώσεις όπου οι τιμές ήταν πολύ κοντά στο 0, δηλ. πολύ μικρές, χρησιμοποιήθηκε ο τύπος $x+0,5$ για τη μετατροπή των δεδομένων (Zar 1984).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

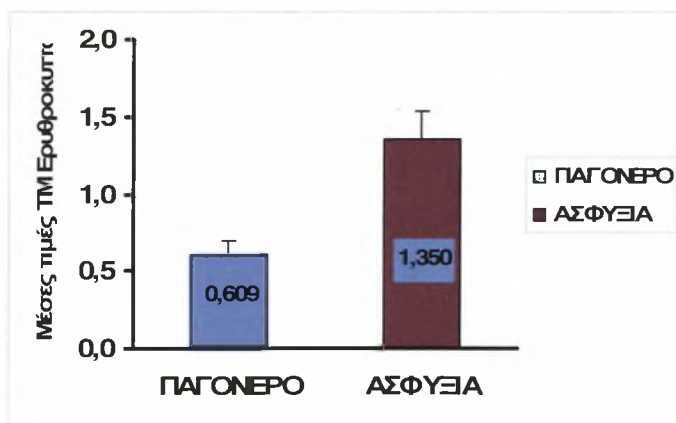
3.1 Εξέταση ερυθροκυττάρων

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται ο αριθμός (N) των ερυθροκυττάρων που συλλέχθηκαν για παρατήρηση τελικά από κάθε τρόπο θανάτωσης, καθώς επίσης και οι μέσοι όροι των τιμών του TM (υπό μορφή λογαρίθμου).

Πίνακας 1. Τρόποι θανάτωσης και λογαριθμικοί μέσοι όροι των τιμών TM από τα ερυθροκύτταρα των εξεταζόμενων ψαριών.

Μέθοδος θανάτωσης	N	Subset	
		1	2
Παγόνερο	373	1267	
Ασφυξία	400		1934

Όπως φαίνεται στον πίνακα 1 ο τρόπος θανάτωσης με ασφυξία καταγράφει αφενός το μεγαλύτερο μέσο όρο τιμών TM και αφετέρου οι τιμές αυτού διαφέρουν στατιστικά ($P < 0,05$) από τις τιμές θανάτωσης με το παγόνερο. Οι μικρότερες τιμές TM που καταγράφηκαν ήταν στη μέθοδο θανάτωσης με «παγόνερο» (Σχ. 1).



Σχήμα 1. Γραφική απεικόνιση των μέσων τιμών TM. Οι κάθετες μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα .

3.2 Εξέταση ηπατοκυττάρων

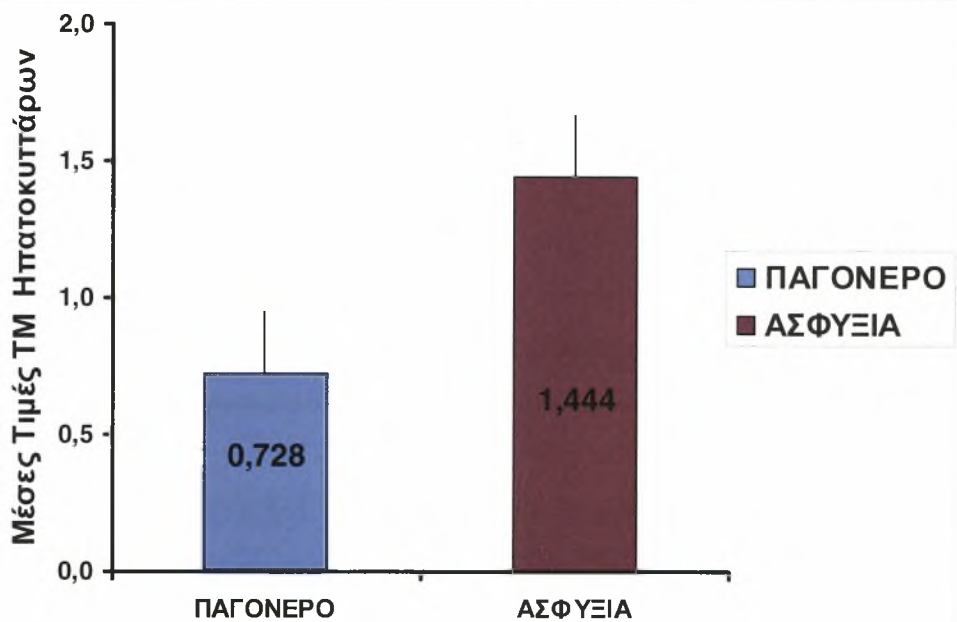
Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται ο αριθμός (N) των ηπατοκυττάρων που συλλέχθηκαν για παρατήρηση τελικά από τους δύο τρόπους θανάτωσης, καθώς επίσης και οι μέσοι όροι των τιμών του TM (υπό μορφή λογαρίθμου).

Πίνακας 2. Τρόποι θανάτωσης και λογαριθμικοί μέσοι όροι των τιμών TM από τα ηπατοκύτταρα των εξεταζόμενων ψαριών

Μέθοδος θανάτωσης	N	Subset	
		1	2
Παγόνερο	386	1164	
Ασφυξία	398		1832

Όπως διακρίνεται, ο τρόπος θανάτωσης με ασφυξία καταγράφει το μεγαλύτερο μέσο όρο τιμών TM και επιπλέον οι τιμές του, διαφέρουν στατιστικά ($P < 0,05$) από τιμές θανάτωσης με παγόνερο.

Οι μικρότερες τιμές ΤΜ που καταγράφηκαν ήταν στη μέθοδο θανάτωσης με παγόνερο (Σχ.2). Χαρακτηριστικό επίσης είναι ότι η εξέταση της ενδεχόμενης γενοτοξικότητας μέσω των ηπατοκυττάρων έδειξε οριακά μεγαλύτερες μέσες τιμές ΤΜ από αυτές που ελήφθησαν από την εξέταση των ερυθροκυττάρων, με τη διαφορά όμως ότι και στους δύο ελέγχους η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων παρέμεινε η ίδια. Δηλαδή οι τιμές και των δύο μεθόδων κατέδειξαν τα ίδια στατιστικά αποτελέσματα και στις δύο εξεταζόμενες περιπτώσεις.



Σχήμα 2. Γραφική απεικόνιση των μέσων τιμών ΤΜ που καταγράφηκαν από τους δύο διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης. Οι κάθετες μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα.

3.3 Επιδιόρθωση ηπατοκυττάρων

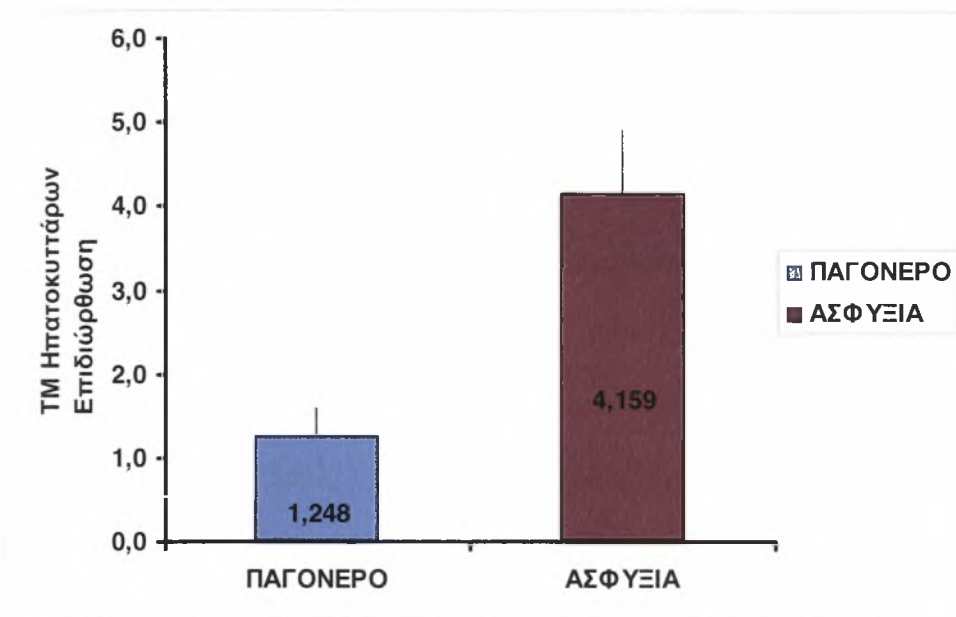
Στον Πίνακα 3 παρουσιάζεται ο αριθμός (N) των ηπατοκυττάρων που συλλέχθηκαν για παρατήρηση τελικά από τους δύο διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης, καθώς επίσης και οι μέσοι όροι του TM (υπό μορφή λογαρίθμου).

Πίνακας 3. Τρόποι θανάτωσης και λογαριθμικοί μέσοι όροι των τιμών TM από τη διαδικασία επιδιόρθωσης των ηπατοκυττάρων των εξεταζόμενων ψαριών.

Μέθοδος θανάτωσης	N	Subset	
		1	2
Παγόνερο	366	1460	
Ασφυξία	376		2767

Διακρίνεται άμεσα από τον παραπάνω πίνακα ότι τα αποτελέσματα από τον τρόπο θανάτωσης με ασφυξία και από τον τρόπο θανάτωσης με παγόνερο, δεν εμφανίζουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά ($P > 0,05$).

Ως προς την επιδιόρθωση των ηπατοκυττάρων, οι τιμές της μεθόδου θανάτωσης με «ασφυξία» κατέγραψαν τις μεγαλύτερες τιμές (Σχ. 3).



Σχήμα 3. Γραφική απεικόνιση των μέσων τιμών TM επιδιόρθωσης ηπατοκυττάρων που καταγράφηκαν. Οι κάθετες μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα.

3.4 Στατιστικά χαρακτηριστικά των αποτελεσμάτων προερχόμενα από τους δύο διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης

Στον επόμενο πίνακα (Πίν. 4) δίνονται δεδομένα από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για δύο διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης και συγκεκριμένα, ο αριθμός (N) των κυττάρων που εξετάστηκαν, η μέση τιμή του Tail Moment (TM) που προέκυψε από τον κάθε τρόπο θανάτωσης χωριστά, καθώς και το τυπικό σφάλμα.

Όπως παρατηρούμε στον παρακάτω πίνακα, αλλά και από τα γραφήματα που παρουσιάστηκαν προηγουμένως, οι μέσες τιμές του TM κατά την θανάτωση με ασφυξία καταγράφονται αρκετά μεγαλύτερες, από τις μέσες τιμές του άλλου τρόπου θανάτωσης και στις τρεις διαδικασίες ελέγχου που πραγματοποιήθηκαν (ερυθροκύτταρα, ηπατοκύτταρα και επιδιόρθωση ηπατοκυττάρων).

Επιπλέον η αποτύπωση της ενδεχόμενης γενοτοξικότητας στο αίμα και στο ήπαρ δείχνει να κυμαίνεται σχεδόν στα ίδια επίπεδα (βάσει των μέσω τιμών TM). Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό και πιθανώς να ενισχύει την άποψη ότι, τόσο στο αίμα όσο και στα ηπατικά κύτταρα η ένδειξη πιθανής γενοτοξικότητας είναι εξίσου ορατή χωρίς να υπάρχουν ουσιαστικά μεγάλες διαφορές – αποκλίσεις ανάμεσα στις δυο μεθόδους.

Επίσης καθίσταται απόλυτα εμφανές πως κατά την διαδικασία επιδιόρθωσης των ηπατοκυττάρων οι μέσες τιμές των TM και από τους δύο τρόπους θανάτωσης είναι αρκετά μεγαλύτερες, σε σχέση με τις άλλες διαδικασίες ελέγχου.

Άξιο σχολιασμού είναι και το γεγονός ότι η ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος θανάτωσης με παγόνηρο, προκαλεί επιθυμητό, χαμηλό ποσοστό γενοτοξικότητας στα ψάρια που εξετάστηκαν.

Πίνακας 4. Στατιστικά στοιχεία των μέσων τιμών ΤΜ (\pm Τυπικό Σφάλμα)

TAIL MOMENT	ΤΡΟΠΟΙ ΘΑΝΑΤΩΣΗΣ	N	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ (\pm ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ)
ΤΜ ΗΠΑΤΟΚΥΤ.			
	ΠΑΓΟΝΕΡΟ	386	0,728 \pm 0,22
	ΑΣΦΥΕΙΑ	398	1,444 \pm 0,24
ΤΜ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΗΠΑΤΟΚΥΤ.			
	ΠΑΓΟΝΕΡΟ	366	1,248 \pm 0,33
	ΑΣΦΥΕΙΑ	376	4,159 \pm 0,74
ΤΜ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤ.			
	ΠΑΓΟΝΕΡΟ	373	0,609 \pm 0,09
	ΑΣΦΥΕΙΑ	400	1,350 \pm 0,19

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εκτροφή υδρόβιων οργανισμών (κυρίως ψαριών) έχει αυξηθεί σε ποσοστό περίπου 8% ετησίως από τα μέσα της δεκαετίας του 1980 (FAO 2006). Συνολικά η μέση ετήσια κατά κεφαλήν κατανάλωση προϊόντων ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας και αλιείας ήταν 16,4 kg από το 2003 έως το 2005 (FAO 2008) και πολύ εύκολα θα μπορούσε να αυξηθεί σε τουλάχιστον 22,5 kg έως το 2030 (FAO 2002). Έτσι δεδομένου ότι η αύξηση κατανάλωσης ψαριών έχει ξεπεράσει από κάθε πλευρά την ικανότητα διάθεσης στην αγορά προϊόντων από την παγκόσμια αλιεία, έχει δοθεί κίνητρο στην παραγωγή ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας με σχεδόν «βιομηχανικούς» ρυθμούς. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχουν υπάρξει προσπάθειες που αποσκοπούν σε μια πιο συνειδητοποιημένη αντιμετώπιση ως προς την ευζωία των οργανισμών (welfare) σε θέματα που αφορούν τόσο στη γενικότερη διαχείριση κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας όσο και κατά τις μεθόδους θανάτωσης.

Υπάρχουν διάφορα αναισθητικά καθώς και τρόποι θανάτωσης που χρησιμοποιούνται συνήθως στο τομέα της αλιείας ή υδατοκαλλιέργειας σε Ευρωπαϊκό επίπεδο για μερικά από τα πιο σημαντικά εκτρεφόμενα είδη, όπως είναι η περικοπή βραγχίων, η παροχή CO₂, η νάρκωση, η ηλεκτροπληξία, η ασφυξία, το παγόνερο ή τον πάγο μόνο. (Poli *et al.*, 2005)

Ένα διόλου ευκαταφρόνητο βήμα για την εξεύρεση μεθόδων αναισθητοποίησης ώστε να προάγεται η ευζωία των ψαριών, έχει γίνει πρόσφατα, λόγω και του ενδιαφέροντος που επιδεικνύει και ο τομέας της υδατοκαλλιέργειας, με το μεγαλύτερο ποσοστό να προτείνει διάφορες μεθόδους αναισθητοποίησης (Savenije *et al.* 2002). Από την άλλη πλευρά όμως οι μέθοδοι αυτοί που βασίζονται σε χρήση χημικών ουσιών

ως αναισθητικά, καθιστούν τα ψάρια ακατάλληλα για κατανάλωση από τον άνθρωπο, λόγω των τυχόν υπολειμμάτων που παραμένουν στο μυϊκό ιστό των ψαριών. Καινοτομία θα αποτελούσε και το ενδεχόμενο της συνδυαστικής χρήσης των τρόπων θανάτωσης, με την αιτιολογία για παράδειγμα της πρόκλησης νάρκωσης πριν από οποιαδήποτε μετέπειτα διαδικασία θανάτωσης. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα με το Σολομό της Νορβηγίας, όπου πριν πραγματοποιηθεί αποκοπή των βραγχίων, έχει προηγηθεί μικρή εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης με αποτέλεσμα το ψάρι να θανατώνεται σε συνθήκες σχετικής νάρκωσης (Stevenson 2007).

Οι Ribas *et al.* (2007) συνέκριναν τρεις διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης στη γλώσσα (*Solea senegalensis*) χρησιμοποιώντας αρχικά γαρυφαλέλαιο ως αναισθητικό, ασφυξία και πρόκληση υποθερμίας (σε παγόνερο) με στόχο τη μείωση του στρες αρχικά και δευτερευόντως την αύξηση της ποιότητας του τελικού προϊόντος. Η εκτίμηση της καταπόνησης έγινε με τη μέτρηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης στο αίμα, όπου τις μεγαλύτερες τιμές κατέγραφε η μέθοδος της ασφυξίας, έπειτα πιο μικρές τιμές κατέγραφε η πρόκληση υποθερμίας, ενώ τέλος τις μικρότερες τιμές κορτιζόλης κατέγραφε το γαρυφαλέλαιο (σχεδόν τόσο μικρές, όσο του μάρτυρα).

Οι Marques *et al.* (2003) απέδειξαν ότι η κακομεταχείριση που συμβαίνει σε ιχθείς μετά από το χειρισμό της αναισθησίας δεν προκαλεί καταπόνηση στους οργανισμούς. Αυτό συνάγεται από τα αποτελέσματα που δεν έδειξαν σημαντική διαφορά στην καταπόνηση μέσα σε 48 ώρες από την αναισθησία. Οι Lambooij *et al.* (2002) σε μια μελέτη όσων αφορά την ευζωία των υδρόβιων οργανισμών, διαπίστωσαν ότι τουλάχιστον 5% των ψαριών που μεταφέρονταν από το οικείο περιβάλλον τους με θερμοκρασία νερού 18 °C σε παγόνερο με μέση θερμοκρασία 0,2 °C για να

αναισθητοποιηθούν, δεν ήταν επαρκώς αναισθητοποιημένα, έως ότου μεταφέρονταν αργότερα και κατέληγαν σε ψυχρή άλμη στους -18°C περίπου.

Σύμφωνα με τους Ottera *et al.* (2001) οι διάφοροι εφαρμοζόμενοι τρόποι θανάτωσης θα πρέπει να οδηγούν σε μια ταχύτατη και αμετάκλητη απώλεια συνείδησης. Έτσι όταν τα ψάρια θανατώνονται γρήγορα η καταπόνηση να μπορεί να μειωθεί, ενώ παράλληλα να βελτιστοποιείται αντίστοιχα ο παράγοντας ευζωία καθώς και η ποιότητα της σάρκας του ψαριού. Είναι γεγονός πως πρωταρχικό στοιχείο για την ύπαρξη ενός ικανοποιητικού συστήματος θανάτωσης των ψαριών θα πρέπει να είναι η διαδικασία που οδηγεί σε μεθόδους οι οποίες δεν θα απομακρύνουν τα ψάρια από το υδάτινο περιβάλλον, ή τουλάχιστον για διάστημα όχι μεγαλύτερο των 15 δευτερολέπτων (HAS 2005). Συνήθως μετά από αυτό το χρονικό διάστημα τα ψάρια υιοθετούν «απωθητική συμπεριφορά» (HAS 2008).

Μια γενικότερη αρχή που διέπει τον ορθό τρόπο θανάτωσης των ψαριών αλλά και των ζώων γενικότερα, πρέπει να περιλαμβάνει δύο στάδια. Αρχικά σε πρώτο στάδιο το ζώο θα πρέπει να καταστεί αναίσθητο, με σκοπό να μην αντιλαμβάνεται τον πόνο, έτσι ώστε σε δεύτερο στάδιο ο θάνατος του ζώου να μπορεί να επιτευχθεί, είτε με άμεση πρόκληση αιμορραγίας, είτε με την παύση λειτουργίας της καρδιάς, είτε τέλος με την παρεμπόδιση της αναπνοής δηλαδή τη διαδικασία πρόσληψης οξυγόνου. Τα στάδια αυτά μπορούν άνετα να εφαρμοστούν και να αλληλοενεργήσουν αρκεί όμως να πραγματοποιηθούν τόσο σύντομα, ώστε να αποτραπεί οποιαδήποτε αποκατάσταση της συνείδησης του οργανισμού έως ότου θανατωθεί (Lines *et al.* 2003). Οι Roth *et al.* (2006) έπειτα από παρατήρηση σε ψάρια που είχαν υποστεί αναισθησία μετά από αρκετή ώρα παραμονής σε παγόνερο, κατέληξαν στο συμπέρασμα πως ακόμη και αν μερικά από αυτά είχαν παραμείνει ακίνητα, κάποια άλλα παρουσίαζαν μια βαθμιαία

κινητική δραστηριότητα, καθώς επίσης και σημάδια όπως η μετακίνηση του ματιού (eye – rolling) που υποδεικνυαν πως είχαν τις αισθήσεις τους όταν πραγματοποιούνταν η διαδικασία αποκοπής των βραγχίων και η αφαίμαξη.

Σύμφωνα με τους Kestin *et al.* (2002) υπάρχουν διάφοροι δείκτες οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας αλλά και του επιπέδου αναισθησίας των προς θανάτωση ψαριών. Μερικοί απ' αυτούς σε πρώτη φάση έγκεινται σε μακροσκοπική παρατήρηση όπου το ψάρι δεν μπορεί να κολυμπήσει κανονικά χάνοντας την ισορροπία του, έπειτα στον τρόπο απόκρισης εξωτερικών ερεθισμάτων όπως στην απόπειρα διαφυγής ενδεχόμενης σύλληψης ή και στην απόκριση μετά από τσίμπημα με αιχμηρό αντικείμενο ή ηλεκτρικά ερεθίσματα, καθώς επίσης και στο ρυθμό επιτέλεσης της αναπνοής.

Η ασφυξία θεωρείται ως ένας από τον πλέον στρεσογόνο τρόπο θανάτωσης κατόπιν συγκρίσεων αποτελεσμάτων κατά την διεξαγωγή πειραμάτων που σχετίζονται με μεθόδους θανάτωσης των ψαριών σε σύγκριση για παράδειγμα, με την αναισθητοποίηση, την αφαίμαξη (Erikson *et al.*, 1997) τη ψύξη, το CO₂ (Ottera *et al.* 2001).

Η ανάλυση των κομητών «**comet assay**» βρίσκει ευρεία εφαρμογή ως μια απλή και ευαίσθητη τεχνική εκτίμησης της *ex vivo*, καθώς και της *in vitro* βλάβης του DNA σε διαφορετικούς ιστούς (βράγχια, συκώτι, αίμα) ψαριών εκτεθειμένων σε ποικίλους παράγοντες στο υδρόβιο περιβάλλον (Winter *et al.* 2004). Η τεχνική αυτή έχει πολλές εφαρμογές αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε φυτικά και σε ανθρώπινα δείγματα (υδρόβια και γήινα), όπως επίσης και σε μια πληθώρα από οργανισμούς, ιστούς και κύτταρα (Dhawan *et al.* 2008). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, έδειξαν ποσοστά γενοτοξικότητας και στους δυο τρόπους θανάτωσης (ασφυξία, παγόνερο) γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι η «ανάλυση κομητών» είναι μια πρακτική τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της καταπόνησης μέσω της εξέτασης των ιστών ή του αίματος ενός οργανισμού. Επίσης σημαντικό είναι και το γεγονός, ότι τα αποτελέσματα από τους δυο διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης, αποτυπώθηκαν εξ ίσου στον έλεγχο των ηπατοκυττάρων όσο και στον έλεγχο των ερυθροκυττάρων κατά την *ex vivo* διαδικασία. Ωστόσο στην *in vitro* διαδικασία της επιδιόρθωσης των ηπατοκυττάρων παρατηρήθηκε διαφοροποίηση. Ουσιαστικά η μέθοδος της θανάτωσης με ασφυξία θα μπορούσε άνετα να ειπωθεί πως λειτούργησε και σαν «μάρτυρας» στο πείραμα. Τα αποτελέσματα από τα ψάρια που θανατώθηκαν με ασφυξία έδειξαν τα μεγαλύτερα επίπεδα γενοτοξικότητας και στους τρεις ελέγχους που πραγματοποιήθηκαν (ερυθροκύτταρα, ηπατοκύτταρα, επιδιόρθωση ηπατοκυττάρων) σε σχέση με τον τρόπο θανάτωσης με παγόνερο.

Χαμηλή δραστηριότητα των μυών, έχει αναφερθεί να προκύπτει από την εφαρμογή μεθόδων θανάτωσης που αφήνουν τα ψάρια αμέσως αναίσθητα, όπως το χτύπημα με αιχμηρό αντικείμενο στο σημείο του εγκεφάλου (Boyd *et al.* 1984), ένα

χτύπημα στο κεφάλι (Ottera *et al.* 2001), και την καταστροφή του νωτιαίου της χορδής (Mochizuki & Sato 1994).

Η πρωτογενής αντίδραση του οργανισμού σε στρεσογόνους παράγοντες περιλαμβάνει την απελευθέρωση κατεχολαμινών και την ενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος – υπόφυση – ενδονεφρικός ιστός (Wedemeyer 1996). Οι εκλυτικοί παράγοντες κορτικοτροπινών από τον υποθάλαμο, δρουν στην υπόφυση, που συνθέτει και απελευθερώνει κορτικοτροπίνες, με τελικό αποδέκτη τον ενδονεφρικό ιστό και την παραγωγή κορτιζόλης (Schreck 1981). Τόσο η κορτιζόλη όσο και η γλυκόζη χρησιμοποιούνται σε πλήθος ερευνών για την εκτίμηση του stress (Ashley 2007). Επιπλέον η έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με το stress, μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για την ευζωία των ψαριών (Gornati *et al.* 2004). Αιματολογικές παράμετροι (Montero *et al.* 2001), μεταβολικές (Mommsen *et al.* 1999), νευροενδοκρινικές (DiBattista *et al.* 2005) και οσμορυθμιστικές διεργασίες (Bonga 1997), έχουν διερευνηθεί για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την ευζωία των ιχθύων.

Πρόσφατα σχόλια για τη θανάτωση των μεθόδων για τα ψάρια (Robb *et al.* 2000) δημιουργεί ερωτήματα σχετικά με τη δυνατότητα κάλυψης σε ηθικά ζητήματα στις διαδικασίες της βιομηχανίας για τον τρόπο θανάτωσης.(Lambooij *et al.* 2002). Διάφοροι μέθοδοι αναισθητικών έχουν ικανοποιήσει τη ζήτηση αυτή και, εκτός αυτού, δεν επηρεάζουν αρνητικά την τελική ποιότητα των ψαριών (Ribas *et al.* 2007).

Φυσικά, εκείνες που βασίζονται στη χρήση των χημικών ουσιών, θα πρέπει να απορρίπτονται ως εξέταση του πιθανού κινδύνου για την ανθρώπινη κατανάλωση. Εκτός από τα ηθικά ζητήματα και ως εκ τούτου να αποφύγουν τα ψάρια την

ταλαιπωρία, υπάρχουν επίσης οικονομικά θέματα και εμπορικοί λόγοι, αφού η ποιότητα της σάρκας μειώνεται σε συνθήκες κακομεταχείρισης των ψαριών (Paris *et al.* 2002 & Lougonois *et al.* 2003.).

Οι καταναλωτές είναι περισσότερο εξοικειωμένοι με την καλή διαβίωση των εκτρεφόμενων ψαριών, ιδίως όσον αφορά την παραγωγή και μεταποίηση των ειδών στο πλαίσιο των ανθρωπίνων συνθηκών. Τόσο η θανάτωση όσο και η πριν από τη θανάτωση διαδικασία αποτελούν τα πιο κρίσιμα σημεία της διαχείρισης των ιχθυοπληθυσμών (Wall 2001).

Παρ' όλα αυτά, για τα είδη της Μεσόγειου μόνο ένα σχετικά μικρό ποσοστό εργασιών έχει πραγματοποιηθεί σχετικά με τους δείκτες κακών συνθηκών κατά την διαδικασία μεθόδων θανάτωσης των ιχθύων. Το 1996 στην έκθεση του FAWC αναφέρονται όλα τα σχετικά με τις συνθήκες διαβίωσης των ψαριών, παρέχει μια σειρά από συστάσεις για τις διαδικασίες θανάτωσης.

Όσο για τα περισσότερα από τα είδη που εκτρέφονται, προκειμένου να διασφαλιστεί η υψηλή πρότυπα καλής μεταχείρισης, πριν από τη θανάτωση, οι διαδικασίες πρέπει να πραγματοποιούνται με τρόπο που να μην προκαλούν περιττή διέγερση, πόνο, φόβο ή άγχος.

Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις, σε σολομό του Ατλαντικού, η ασφυξία (Skjervoldt *et al.* 1999) οδήγησε σε μια πολύ πιο παρατεταμένη δραστηριότητα σε σύγκριση με ασφυξία σε παγωμένο νερό, επιφέροντας αρνητικές συνέπειες ως προς την ευζωία και την ποιότητα του τελικού προϊόντος.

Ως αποτέλεσμα, η θρεπτική αξία του φιλέτου μετά την θανάτωση είναι μειωμένη, λόγω της επιδείνωσης υφής και γεύσης του προϊόντος από την υποβάθμιση και την απώλεια των PUFAs (Waagbø *et al.* 1993).

Εκείνοι που διαχειρίζονται τα ερευνητικά προγράμματα πρέπει να λάβουν επιπλέον εκπαίδευση σε θέματα δεοντολογίας, πειραματικό σχεδιασμό και στατιστικές. Οι προτάσεις ελέγχονται διεξοδικά από επιτροπές αξιολόγησης περί ηθικής, αποτελούμενες από επιστήμονες, διαχειριστές, μέλη κοινού και κυβερνητικούς εκπροσώπους. Μια χρονοβόρα διαδικασία η οποία πρέπει να επικυρώνει την πρόταση του έργου ακόμη και αν αυτό σημαίνει πως πρέπει να αναθεωρήσει τους κανονισμούς που απαγορεύουν τα ζώα να βιώσουν πόνο. Αυτό έχει σαν στόχο να ανακουφίσει στο μέλλον την καταπόνηση και το πόνο που υποβάλλονται οι οργανισμοί. Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις που η αιτιολόγηση του πειράματος θεωρείται απαράδεκτη και σε αυτές τις καταστάσεις οι επιστήμονες στερούνται την άδεια για την έρευνα (Braithwaite 2010).

Σύμφωνα με τη Braithwaite (2010) φαίνεται να βρισκόμαστε σε ένα σταυροδρόμι, και μια σειρά από επιλογές βρίσκονται μπροστά μας. Πρέπει να αντιμετωπίσουμε την ηθική υποκειμενικά με τις αλληλεπιδράσεις των ψαριών. Το πιο σημαντικό, πρέπει να προχωρήσουμε προσεκτικά στη δημιουργία των νόμων και τις κατευθυντήριες γραμμές, με τεκμηριωμένο τρόπο. Αποδεχόμενοι ότι τα ψάρια βιώνουν το αίσθημα του πόνου και την εμπειρία της καταπόνησης, μας αναγκάζει να σκεφτόμαστε διαφορετικά και βέβαια να δράσουμε με διαφορετικό τρόπο σε πολλά επίπεδα.

Τι γίνεται όμως όταν η δράση ως επί το πλείστον εξακολουθεί να είναι ασαφής;

Η γνώση, η εκπαίδευση και το ανοιχτό μυαλό είναι σίγουρα οι καλύτεροι οδηγοί μας μέσα από αυτό το άγνωστο έδαφος.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ashley P.J. (2007) Fish welfare: Current is suew in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104 (3-4) : 199-235.
2. Adams, C., Huntingford, F., Turnbull, J., Arnott, S., Bell, A., (2006) Size heterogeneity can reduce aggression and promote growth in Atlantic salmon parr. *Aquaculture Int.* 8, 543–549
3. Baksi S.M. & Frazier J.M. (1990) Review. Isolated fish hepatocytes- model system for toxicology research. *Aquatic Toxicology*, 16 : 229-256.
4. Boyd, N.S., Wilson, N.D., Jerret, A.R., Hall, B.I., (1984) Effects of brain destruction on post-harvest muscle metabolism in the fish kahawai (*Arripis trutta*) J. *Food Sci.* 49, 177–179.
5. Bonga Wendelaar, S.E., (1997) The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.
6. Braithwaite V. (2010) Do fish feel pain?Oxford university pressGreat Clarendon Street, Oxford ox2 6dp *Animals (Scientifi c Procedures) Act 1986*,
7. Dhawan A., Bajpayee M. & Parmar D. (2008) Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol.*
8. Dawkins, M.S. (2004) using animal behaviour to assess animal welfare. *Animal welfare*, 13, 363-73
9. DiBattista, J. D., Anisman, H., Whitehead, M. and Gilmour, K. M., (2005) The effects of cortisol administration on social status and brain monoaminergic activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal Of Experimental Biology* 208 (14): 2707-2718.

10. Erikson, U., Sigholt, T., Seland, A., (1997) Handling stress and water quality during live transportation and slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 149,243–252.
11. EFSA Journal, (2004) Welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals 45, 1-29.
12. FAWC (Farmed Animal Welfare Council), (1996) Report on the Welfare of Farmed Fish. Surbiton, Surrey.
13. FSBI (Fisheries Society of the British Isles), (2002). Fish Welfare. Breifing Report 2. Granta Information systems.
14. Food and Agriculture Organization (FAO) (2002) Agriculture: towards 2015/2030. FAO, Rome. Website: www.fao.org/es/esd/gstudies.htm (accessed on 23 September 2001).
15. Food and Agriculture Organization (FAO) (2002) The state of food and agriculture 2002: agriculture and global public goods ten years after the Earth Summit. FAO, Rome.
16. Food and Agriculture Organization (FAO) (2002) The state of world fisheries and aquaculture 2002. FAO, Rome
17. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2006) Nearly half of all fish eaten today farmed, not caught.
18. FAONewsroom. www.fao.org/newsroom/en/news/2006/1000383/index.html. Accessed August 20, 2008.

19. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2008) Appendix I - Fish and fishery products – apparent consumption.

<ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summary/appIybc.pdf>. Accessed September 18, 2008.

20. FAO. (2002) World agriculture: towards 2015/2030. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

www.fao.org/docrep/004/y3557e/y3557e10.htm#q. Accessed August 20, 2008.

21. World Health Organization. (2007) Global and regional food consumption patterns and trends, section 3.5, availability and consumption of fish.

www.who.int/nutrition/topics/3_foodconsumption/en/index5.html. Accessed August 20, 2008.

22. Hans Van De Vis, Steve Kestin, David Robb, Jörg Oehlenschläger, Bert Lambooij, Werner Münkner, Holmer Kuhlmann, Karin Kloosterboer, Margarita Tejada, Almudena Huidobro, Håkon Otterå, Bjørn Roth, Nils Kristian Sørensen, Leif Akse, Hazel Byrne, Paul Nesvadba (2003) Is humane slaughter of fish possible for industry? *Aquaculture Research*, 34:211-20.

23. Henderson I., Wolfreys A., Fedyk J., Bourner C., Windebank S. (1998) The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, 13:89-94.

24. HSA. (2005) Humane harvesting of salmon and trout: Guidance notes No. 5. (Wheathamstead, U.K.: Humane Slaughter Association).

25. Kant, Immanuel, “Duties to Animals”, στο R.G. Botzler, & S.J. Armstrong, (eds.), *Environmental Ethics, Divergence and Convergence*, McGraw-

- Hill, New York, (1993) σ.σ. 312-313, αναδημοσίευση από το I. Kant, Lectures on Ethics (μετάφραση L. Infield), London, Methuen & Co, (1963) 239-241.
26. Kestin S.C., Van De Vis J.W., Robb D.H.F., (2002) Protocol for assessing brain function in fish and the effectiveness of methods used to stun and kill them. *The Veterinary Record*, 150:302-7.
27. Lee R.F. & Steinert S. (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544 : 43-64.
28. Lupatsch I. (2004) Gilthead Seabream. *Aqua Feeds: Formulation & Beyond*, 1 (1) : 16-18.
29. Lambooij E., Van De Vis J.W., Kloosterboer R.J., Pieterse C. (2002) Welfare aspects of live chilling and freezing of farmed eels (*Anguilla anguilla*): neurological and behavioural assessment. *Aquaculture*, 210:159-69.
30. Lawrence J.N., Foster B., Benford D.J. (1991) The application of a wedge perfusion technique to the in vivo-in vitro rat hepatocyte DNA-repair assay. *Mutation Research*, 252:129-137.
31. Lines J.A., Robb D.H., Kestin S.C., Crook S.C., Benson T. (2003) Electric stunning: a humane slaughter method for trout. *Aquacultural Engineering*, 28:141-54.
32. McKelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Meo M.P. & Collins A. (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*, 288 : 47-63.
33. Mommsen, T.P., Vijayan, M.M. and Moon, T.W., (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish* 9, 211-268.

34. Mitchelmore C.L. & Chipman J.K. (1998) DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*, 339 : 135-147.
35. Mochizuki, S., Sato, A., (1994) Effects of various killing procedures and storage temperatures on post-mortem changes in the muscle of horse mackerel. *Nippon Suisan Gakkaishi* 60 (1), 125–130.
36. Morzel, M., Sohier, D., Van de Vis, H., (2002) Evaluation of slaughtering methods for turbot with respect to animal welfare and flesh quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 19–28.
37. McKelvey-Martin VJ, Melia N, Walsh IK, Johnston SR, Hughes CM, Lewis SE, (1997) Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1). Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2). Human sperm and male infertility. *Mutat Res.* 375(2):93–104.
38. Montero, D., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., Izquierdo, M.S., (2001) Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 473–490.

39. Ottera H., Roth B., Torrissen O.J. (2001) Do killing methods affect the quality of Atlantic Salmon? In: Kestin, S.C., Warriss P.D. (Eds.), *Farmed Fish Quality*. Blackwell Science Ltd, Oxford, pp. 398-399.
40. Olive P., Wlodek D., Durand R.E. & Banath J.P. (1992) Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gell electrophoresis. *Experimental Cell Research*, 198 : 259-267.
41. Poli B.M., Parisi G., Scappini F., Zampacavallo G. (2005) Fish welfare and quality as affected by preslaughter and slaughter management. *Aquaculture International*, 13:29-49.
42. Parisi, G., Franci, O., Poli, B.M., (2002) Application of multivariate analysis to sensorial and instrumental parameters of freshness in refrigerated sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during shelf life. *Aquaculture* 214 (1–4), 153–167.
43. Parisi, G., Mecatti, M., Lupi, P., Scappini, F., Poli, B.M. (2002) Comparison of five slaughter methods for European sea bass. Changes of isometric contraction force and pH during the first 24 hours post mortem. In: *Proceedings of the “Aquaculture Europe 2002: Sea Farming Today and Tomorrow”*. Special Publication n. 32, pp.417–418.

44. Ribas L., Flos R., Reig L., MacKenzie S., Barton B.A., Tort L. (2007) Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. *Aquaculture*, 269:250-258.
45. Robb D.H.F., Wotton S.B., McKinstry J.L., Sørensen N.K., Kestin S.C. (2000) Commercial slaughter methods used on Atlantic salmon: determination of the onset of brain failure by electroencephalography. *The Veterinary Record*, 147:298-303.
46. Robb, D.H.F., Kestin, S.C., Warris, P.D., (2000) Muscle activity at slaughter: I. Changes in flesh colour and gaping in rainbow trout. *Aquaculture* 182, 261–269
47. Roth B., Slinde E., Robb D.H.F. (2006) Field evaluation of live chilling with CO₂ on stunning Atlantic salmon (*Salmo salar*) and the subsequent effect on quality. *Aquaculture Research*, 37:799-804.
48. Singer, P.(1975) *Animal Liberation: A New Ethics for our Treatment of Animals*, New York πρώτη έκδοση
49. Savenije, B., Schreurs, F.J., Winkelman-Goedhart, H.A., Gerritzen, M.A., Korf, J., Lambooij, E., (2002) Effects of feed deprivation and electrical, gas, and captive needle stunning on early postmortem muscle metabolism and subsequent meat quality. *Poultry Science* 81 (4), 561–571.

50. Skjervold, P.O., Rørå, A.M.B., Fjæra, S.O., Vegusdal, A., Vorre, A., Einen, O., (2001) Effects of pre-, in- or post-rigor filleting of live chilled Atlantic salmon. *Aquaculture* 194, 315–326.
51. Skjervold, P.O., Fjæra, S.O., Østby, P.B., 1999. Rigor in Atlantic salmon as affected by crowding stress prior to chilling before slaughter. *Aquaculture* 175, 93–101.
52. Sebastio, P., Ambroggi, F., Baldrati, G., (1996) Influence of slaughtering method on rainbow trout bred in captivity. 1. Biochemical considerations. *Ind. Conserve* 71, 37–49.
53. Stevenson, P. (2007) *Closed Waters: the Welfare of Farmed Atlantic Salmon, Rainbow Trout, Atlantic Cod and Atlantic Halibut*. Godalming, Compassion in World Farming and World Society for the Protection of Animals. pp 1-80
54. Schreck, C.B., Contreras-Sanchez W. & Filtzpatrick, M.S., (2001) Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, 197. 3-24
55. Schreck, C.B., (1981) Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. In: Pickering, A.D. (Ed.), *Stress and Fish*. Academic Press, New York, pp. 295–321.
56. Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., MIYAMAE Y., Rojas E., Ryu J.C. & Sasaki Y.F. (2000) Single cell gel/comet

assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35 : 206-221.

57. Van de Vis, J.W., Kestin, S.C., Robb, D.F.H., Oehlenschläger, J., Lambooij, E., Münkner, W., Kuhlmann, H., Münkner, W., Kloosterboer, R.J., Tejada, M., Huidobro, A., Tejada, M., Otterå, H., Roth, B., Sørensen, N.K., Aske, L., Byrne, H., Nesvadba, P., (2003) Is humane slaughter of fish possible for industry? *Aquaculture Research* 34, 211–220.
58. Waagbø, R., Sandnes, K., Torrissen, O.J., Sandvin, A., Lie, Ø., (1993) Chemical and sensory evaluation of fillets from Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed three different levels of N-3 polyunsaturated fatty acids at two levels of vitamin E. *Food Chem.* 46, 361–366.
59. Winter M, Day N, Hayes RA, Taylor EW, Butler PJ, Chipman JK. (2004) DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. *Mutat Res* 552:163-75.
60. Wall A.J. (2001) Ethical considerations in the handling and slaughter of farmed fish. In: Kestin S., Wariss P. (Eds.), *Farmed Fish Quality*. Blackwell Science Oxford, pp: 108-115.
61. Wendelaar bonga, S.E., (1997) The stress response in fish. *physiology review*, 77, 591-625.

62. Zar, J.H. (1984) *Biostatistical Analysis*, 3rd Edn. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 619 pp.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Βαρελτζής Κ. (2000) Ποιοτικός έλεγχος και τεχνολογία αλευμάτων
2. Ελληνική αλιευτική ποιοτική Απρίλιος (2001) Εγχειρίδιο ποιοτικών προδιαγραφών (Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργιών)
3. Καραγεωργάκης Σ (2006) Περιβαλλοντική Ηθική και Πολιτική Οικολογία, Οι υποχρεώσεις μιας οικολογικής κοινωνίας απέναντι στον μη ανθρώπινο κόσμο. Διδακτορική Διατριβή. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών σελ. 275
4. Κλαουδάτος Σ. (2008). Εντατική μέθοδος ευρύαλων ειδών ιχθύων
5. Παπουτσόγλου Σ.Ε. (1998). Ενδοκρινολογία Ιχθύων. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα, σελ. 179, 517-518.
6. Πανέστος Α. Υγιεινή Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως. Τόμος Β (1978) 434-435
7. Τσοπελάκος Α., Μήλιου Ε., Δάλλα Χ. & Παπαδοπούλου-Νταϊφώτη Ζ. (2011) Επίδραση διαφορετικών χειρισμών αναισθητοποίησης η/και θανάτωσης στους νευροδιαβιβαστές του κεντρικού νευρικού συστήματος του λαβρακίου, *Dicentrarchus labrax* L. Πρακτικά 4^{ου} Συνεδρίου Υδροβιολογίας Αλιείας.

Πηγές

1. [http:// www.chemistry.uoc.gr](http://www.chemistry.uoc.gr) (27.3.09)
2. <http://www.ajcn.org/cgi/contect/abstract>
3. <http://www.facebook.com/Veganism> Animal friendly WayOflife
4. <http://www.omhros.gr/kat/history/Txt/cl/Aristo/Aristotelis.htm>
5. <http://www.filosofia.gr/aristotelis.htm>
6. <http://el.wikipedia.org/wiki/>
7. <http://www.iht.com/articles/2003/10/03>
8. <http://www.serdi-fr.com/jnha/page2>
9. <http://www.le.ac.uk/biology/fsbi/welfare.pdf>



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000110331