

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Τεχνικές ποσοτικοποίησης στρες σε ιχθύες»

Όνομα: Γεωργία – Αθανασία Καματέρη

ΒΟΛΟΣ 2017

«Τεχνικές ποσοτικοποίησης στρες σε ιχθύες»

Διμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1) Γκολομάζου Ελένη, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων.*

2) Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής κα Γκολομάζου Ελένη για την πολύτιμη βοήθειά της και τη διαρκή υποστήριξή της, κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου και στη φίλη και συνάδελφο Αλεξάνδρα Χρυσόχου για την αμέριστη συμπαράσταση τους, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1. ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	9
1.1 Παγκόσμια ανάπτυξη υδατοκαλλιεργειών.....	9
1.2 Οι υδατοκαλλιέργειες στην Ευρώπη και στην Ελλάδα.....	11
2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΕΝΝΟΙΑΣ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ	14
2.1 Η έννοια του στρες στον ανθρώπινο οργανισμό.....	14
2.2 Η έννοια της καταπόνησης (στρες) στους ιχθύες	16
2.3 Φυσιολογική απόκριση ιχθύων στο στρες.....	17
3. ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΩΝ ΙΧΘΥΩΝ	20
3.1 Μεταβολές που παρατηρούνται στους ιχθύες.....	20
3.1.1 Φυσιολογικές μεταβολές	20
3.1.2 Εξωτερικές ενδείξεις καταπόνησης	25
3.2 Επιπτώσεις της καταπόνησης στους ιχθύες.....	25
3.2.1 Ευαισθησία σε ασθένειες.....	26
3.2.2 Διαταραχές της αναπαραγωγής.....	27
3.2.3 Επιδράσεις στην ανάπτυξη.....	28
3.3 Παράγοντες καταπόνησης στους ιχθύες.....	28
3.3.1 Αστία.....	31
3.3.2 Ακραίες θερμοκρασίες περιβάλλοντος.....	32
3.3.3 Χειρισμοί.....	33
3.3.4 Μεταφορά.....	33
3.3.5 Αυξημένη πυκνότητα.....	34
3.4 Πρόληψη της καταπόνησης των ιχθύων.....	34
3.4.1 Ποιότητα νερού.....	35
3.4.2 Χειρισμός και μεταφορά.....	35
3.4.3 Διατροφή.....	38
3.4.4 Εξυγίανση.....	38
4. ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ.....	39
4.1 Δειγματοληψία αίματος.....	39
4.2 Συγκέντρωση γλυκόζης.....	41
4.3 Συγκέντρωση κορτιζόλης.....	41
4.4 Άλλοι αιματολογικοί δείκτες.....	43
4.5 Προβλήματα στη χρήση αιματολογικών δεικτών.....	44
5. ΑΛΛΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ.....	47

5.1 Μη επεμβατικές μέθοδοι.....	47
5.2 Προσδιορισμός μεταβολών στο DNA (Μέθοδος κομήτη).....	49
5.3 Προσδιορισμός αντιβακτηριακών πεπτιδίων των ιχθύων (ανοσοχημική μέθοδος).....	54
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο τομέας των υδατοκαλλιεργειών παρουσιάζει παγκόσμια εξάπλωση τα τελευταία 30 χρόνια. Η παγκόσμια συνολική ζήτηση για τα ψάρια και τα προϊόντα αλιείας αναμένεται να αυξηθεί στα επόμενα χρόνια και το μεγαλύτερο ποσοστό αυτής της ποσότητας ψαριών θα το καλύψει η υδατοκαλλιέργεια. Εξαιτίας αυτής της ταχείας επέκτασης του τομέα, η καλή διαβίωση των εκτρεφόμενων ψαριών έχει λάβει αυξανόμενη προσοχή και αποτελεί ένα σημαντικό ζήτημα για τη βιομηχανία, όχι μόνο αναφορικά με την αντίληψη του κοινού, την εμπορία και την αποδοχή των προϊόντων, αλλά και από την άποψη της αποδοτικότητας της παραγωγής, της ποιότητας και της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων.

Με τη συνεχή ανάπτυξη του κλάδου της υδατοκαλλιέργειας έχει αυξηθεί και η επιστημονική συζήτηση σχετικά με τις επιπτώσεις που έχουν στην ευζωία των εκτρεφόμενων ψαριών οι πρακτικές που εφαρμόζονται στην υδατοκαλλιέργεια (Ashley, 2007).

Δεν υπάρχει, ωστόσο, κάποιο ενιαίο μέτρο μέτρησης της ευζωίας. Παρόλο που ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών, βιοχημικών και συμπεριφορικών μέτρων χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της, κανένα από αυτά δεν θεωρείται αξιόπιστο από μόνο του, καθώς τα μέτρα αυτά μπορεί να επηρεάζονται από ποικίλους άλλους παράγοντες, πέρα από την ευζωία. Για αυτό το λόγο και για να αξιολογηθεί ορθά η ευζωία, τα διάφορα μέτρα θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε κατάλληλο συνδυασμό (Ashley, 2007).

Η φυσιολογική καταπόνηση (στρες) και ο σωματικός τραυματισμός αποτελούν τους πρωταρχικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση ασθενειών στα ψάρια και στη θνησιμότητα στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών (Rottmann et al. 1992).

Πέρα από τις προαναφερόμενες επιπτώσεις, το στρες στα ψάρια το οποίο προκαλείται από φυσικές διαταραχές που αντιμετωπίζονται στον τομέα της υδατοκαλλιέργειας, όπως ο χειρισμός και οι μεταφορές, προκαλεί ποικίλες αντιδράσεις που μπορεί να είναι προσαρμοστικές ή δυσπροσαρμοστικές. Η συνολική επίδραση του στρες μπορεί να θεωρηθεί ως μια αλλαγή στην

βιολογική κατάσταση πέραν της κατάστασης ανάπαυσης που επηρεάζει αρνητικά την ομοιόσταση και κατά συνέπεια αποτελεί μια απειλή για την υγεία των ψαριών (Barton and Iwama, 1991).

1. ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

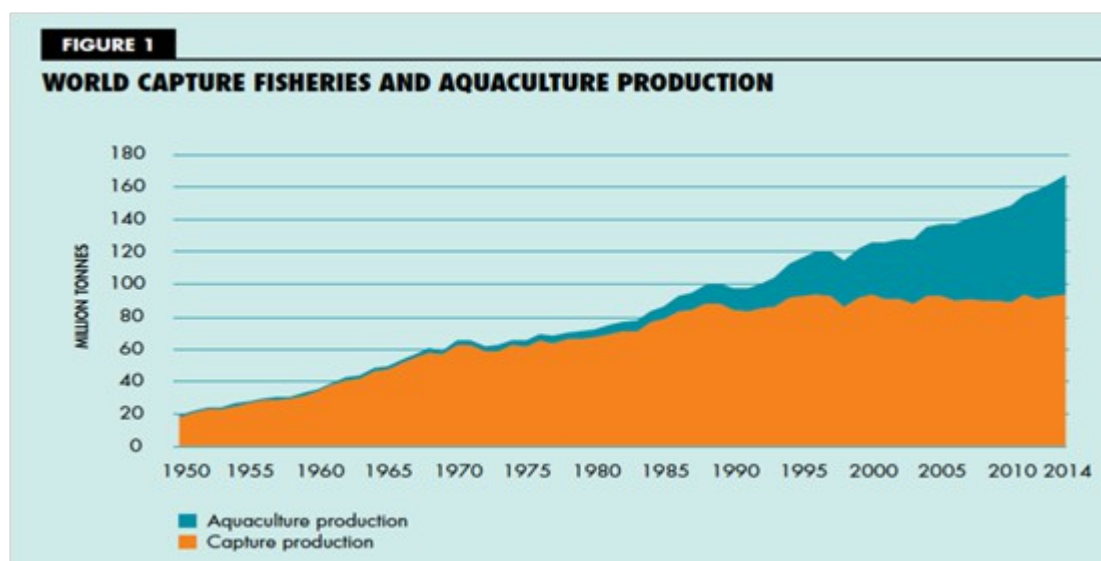
1.1 Παγκόσμια ανάπτυξη υδατοκαλλιεργειών

Ο συνεχώς αυξανόμενος ανθρώπινος πληθυσμός, με τις συνεπακόλουθες αυξημένες ανάγκες διατροφής, έχει συμβάλλει σε σημαντικό βαθμό στην ανάπτυξη του τομέα των υδατοκαλλιεργειών παγκοσμίως, καθώς η αλιεία δεν είναι σε θέση να καλύψει αυτές τις ανάγκες και οι συνέπειες της υπεραλίευσης για το οικολογικό περιβάλλον είναι ιδιαίτερα έντονες. Οι υδατοκαλλιέργειες παρέχουν τροφή πλούσια σε πρωτεΐνες χαμηλού κόστους και υψηλής βιολογικής αξίας, ενώ εκπληρώνουν και την απαίτηση των καταναλωτών για ποιοτικά προϊόντα.

Οι υδατοκαλλιέργειες έχουν αναπτυχθεί με τη μορφή συστημάτων υδρόβιας εκτροφής και καλλιέργειας υπερεντατικής εκμετάλλευσης, με δυνατότητα:

- συγχρονισμού της παραγωγής με τις απαιτήσεις της αγοράς,
- πλήρους ελέγχου της παραγωγικής διαδικασίας,
- και μικρό κύκλο εργασιών ανά περίοδο.

Εικόνα 1. Εξέλιξη της παγκόσμιας παραγωγής υδατοκαλλιεργειών την περίοδο 1950-2014 (FAO, 2016)



Σύμφωνα με στοιχεία του FAO, η παγκόσμια παραγωγή διαρκώς αυξάνεται, ιδιαίτερα στις ασιατικές χώρες. Έτσι, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1, η παγκόσμια παραγωγή προϊόντων των υδατοκαλλιεργειών αυξήθηκε από $\approx 20.000.000$ το 1950, σε $\approx 118.000.000$ τόννους το 2005, ενώ το 2014 έφτασε στους 167.200.000 τόννους. (FAO, 2016). Τα ψάρια (κυρίως των γλυκών νερών) αντιπροσωπεύουν την πλειοψηφία των παραγόμενων προϊόντων, και ακολουθούν τα μαλάκια, τα θαλάσσια μακροφύκη και τα καρκινοειδή.

Οι σημαντικότερες χώρες από άποψη παραγωγής προϊόντων υδατοκαλλιεργειών φαίνονται στον Πίνακα 1. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι 8 από τις 10 χώρες είναι ασιατικές.

Πίνακας 1. Οι 10 σημαντικότερες χώρες παραγωγής προϊόντων υδατοκαλλιεργειών (οστεϊχθείς, μαλάκια, καρκινοειδή) το έτος 2014 (FAO, 2016)

Χώρα	Παραγωγή (σε χιλιάδες τόννους)
Κίνα	45.468
Ινδία	4.881
Ινδονησία	4.253
Βιετνάμ	3.397
Μπαγκλαντές	1.956
Νορβηγία	1.332
Χιλή	1.214
Αίγυπτος	1.137
Λάος	962
Ταϊλάνδη	934

Όσον αφορά την παραγωγική διαδικασία, εντοπίζονται τόσο επιχειρήσεις μικρής κλίμακας, όσο και βιομηχανικές μονάδες μεγάλης κλίμακας, ενώ εφαρμόζονται τόσο οι παραδοσιακές όσο και πιο σύγχρονες μέθοδοι παραγωγής.

1.2 Οι υδατοκαλλιέργειες στην Ευρώπη και στην Ελλάδα

Αντίθετα με την πορεία του τομέα της υδατοκαλλιέργειας στις ασιατικές χώρες, στην Ευρώπη παρουσιάζει στασιμότητα. Η ευρωπαϊκή παραγωγή υδατοκαλλιέργειας ανήλθε στο υψηλότερο επίπεδό της το έτος 2000, με παραγωγή 1,4 εκατομμύρια τόννους, ενώ γενικότερα την περίοδο 1995 έως 2012 ήταν περίπου 1,2 εκατομμύρια τόννους, ποσότητα που αντιπροσωπεύει το 20% του συνόλου της αλιευτικής παραγωγής. Η εμπορική αξία της παραγωγής υδατοκαλλιέργειας στην Ευρώπη ανήλθε στα 3,6 δισεκατομμύρια ευρώ το 2011. Τα ψάρια αντιπροσωπεύουν το 50% της αξίας των προϊόντων υδατοκαλλιέργειών στην Ευρώπη, ενώ τα μαλάκια και τα καρκινοειδή καλύπτουν το υπόλοιπο 50%. Τα κύρια είδη όπου εστιάζεται η ευρωπαϊκή υδατοκαλλιέργεια είναι τα μύδια, που αντιπροσωπεύουν το 39% της συνολικής παραγόμενης ποσότητας, η πέστροφα (15%), ο σολομός (14%) και τα στρείδια (8%). Επίσης, σημαντικά είδη είναι το λαβράκι, η τσιπούρα και τα κυδώνια (Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, 2016).

Πίνακας 2. Οι 10 σημαντικότερες χώρες παραγωγής προϊόντων υδατοκαλλιέργειών (οστεϊχθείς, μαλάκια, καρκινοειδή) το έτος 2014 στην Ευρώπη (FAO, 2016)

Χώρα	Παραγωγή (σε τόννους)
Νορβηγία	1.332.497
Ισπανία	282.238
Ηνωμένο Βασίλειο	204.617
Γαλλία	204.000
Ιταλία	162.550
Ρωσία	161.214
Ελλάδα	104.514
Δανία	39.299
Ιρλανδία	31.100
Γερμανία	26.032

Οι σημαντικότερες ευρωπαϊκές χώρες ως προς την παραγωγή προϊόντων υδατοκαλλιέργειας είναι η Νορβηγία, η οποία όπως προκύπτει και από τον Πίνακα 1 ήταν έκτη στην παγκόσμια κατάταξη το 2014, καθώς και η Ισπανία (20^η), το Ηνωμένο Βασίλειο (23^η), η Γαλλία (24^η), η Ιταλία (26^η). Η Ελλάδα το έτος 2014 παρήγαγε ποσότητα προϊόντων υδατοκαλλιέργειας που ανήλθε σε 104.514 τόννους (FAO, 2016).

Τα είδη που παράγονται στην Ελλάδα είναι κατά κύριο λόγο το λαβράκι και η τσιπούρα. Η σημαντικότερη ποσότητα διθύρων μαλάκιων παράγεται στην Ισπανία, στη Γαλλία και την Ιταλία, ενώ στο Ηνωμένο Βασίλειο παράγεται σολομός. Η αξία της ελληνικής παραγωγής αντιστοιχούσε στο 13% της συνολικής αξίας της ευρωπαϊκής παραγωγής το 2011 (Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, 2016).



Εικόνα 2. Ελληνική μονάδα υδατοκαλλιέργειας

Οι υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα εμφανίστηκαν ουσιαστικά στη δεκαετία του 1950, αρχικά με τη σύλληψη ψαριών μεταναστευτικού χαρακτήρα (πχ. τσιπούρα, λαβράκι, κέφαλος) σε ημίκλειστες φυσικές θαλασσινές ή υφάλμυρες υδάτινες εκτάσεις και στη συνέχεια με την εκτροφή της πέστροφας με πιο οργανωμένη μορφή. Τη δεκαετία του 1980 εμφανίστηκαν οι πρώτοι ιχθυογεννητικοί σταθμοί όπου παράγονταν τσιπούρα και λαβράκι, καθώς και μονάδες πάχυνσης αυτών των ειδών. Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια για την εκτροφή διαφόρων νέων ειδών, όπως συναγρίδα, φαγκρί, λυθρίνι, γλώσσα, με εφαρμογή σύγχρονων μεθόδων εκτροφής (Παπουτσόγλου, 1997).

Η παγκόσμια οικονομική κρίση των τελευταίων ετών είχε αντίκτυπο στην υδατοκαλλιέργεια, τόσο στην αγορά όσο και στην παραγωγή. Ιδιαίτερα στην Ευρώπη, παρόλο το γεγονός ότι η Ευρωπαϊκή Επιτροπή εξέδωσε δύο ανακοινώσεις αναφορικά με στρατηγικές ανάπτυξης της ευρωπαϊκής υδατοκαλλιέργειας, μία το 2002 και μία το 2009 δεν επιτεύχθηκαν οι στόχοι για αύξηση της παραγωγής. Το 2013 η Ευρωπαϊκή Επιτροπή δημοσίευσε νέα ανακοίνωση που στοχεύει στην επίτευξη βιώσιμης ανάπτυξης της υδατοκαλλιέργειας στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, 2016).

Είναι γεγονός ότι η εγκατάσταση εντατικών και υπερ-εντατικών συστημάτων θαλάσσιας εκτροφής και καλλιέργειας, παρουσιάζει υψηλό κόστος, τόσο για την καθ' αυτό επένδυση, αλλά και για τη λειτουργία και συντήρηση του εξοπλισμού αυτής, την κάλυψη του κόστους της απαιτούμενης ενέργειας, του κόστους εκτροφής και της επάνδρωσης της με εκπαιδευμένο προσωπικό. Επιπλέον, ποικίλοι παράγοντες είναι δυνατόν να επηρεάσουν την ανάπτυξη και την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων, και να έχουν επιπτώσεις στην βιωσιμότητα των εκτρεφόμενων ειδών και κατ' επέκταση της ίδιας της μονάδας. Για παράδειγμα, χειρισμοί των ιχθύων κατά την παραγωγική διαδικασία, όπως μετακινήσεις, διαλογή, ασθένειες, είναι υπεύθυνες για την πρόκληση καταπόνησης, και έχουν ως συνέπεια την υποβάθμιση του παραγόμενου προϊόντος, την επιμήκυνση του παραγωγικού κύκλου και την αυξημένη θνησιμότητα των ιχθύων.

2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΕΝΝΟΙΑΣ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ

2.1 Η έννοια του στρες στον ανθρώπινο οργανισμό

Το στρες ορίζεται ως η αντίδραση ενός οργανισμού σε ένα ερέθισμα ή μία αλλαγή και χαρακτηρίζεται από τη δραστηριοποίηση τόσο του αυτόνομου νευρικού συστήματος, όσο και του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA) (Moynihan et al. 2014).

Η απόκριση προσαρμογής του οργανισμού σε κάθε τύπο στρεσογόνου ερεθίσματος συντονίζεται από το σύστημα του στρες που εντοπίζεται στον εγκέφαλο. Το κέντρο του συστήματος συνιστάται από τον υπο-θαλαμικό πυρήνα, από τον οποίο παράγεται η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH) και από τον υπομέλανα τόπο -πυρήνες νοραδρεναλίνης (LC/NE) του στελέχους του εγκεφάλου. Τα περιφερικά συστατικά του συστήματος αποτελούν ο άξονας υπόφυσης - επινεφριδίων και το αυτόνομο νευρικό σύστημα. Όταν ενεργοποιείται το σύστημα του στρες προκαλούνται περιφερικές μεταβολές, για παράδειγμα, αυξάνεται η καρδιαγγειακή λειτουργία και ο μεταβολισμός. Επιπλέον, παρατηρούνται αλλαγές στη συμπεριφορά, με σκοπό τη βελτίωση της προσαρμογής της ομοιόστασης και την αύξηση των πιθανοτήτων για επιβίωση.

Η κορτικοτροπίνη και το σύστημα LC/NE προκαλούν διέγερση της εγρήγορσης και την προσοχής, ερεθισμό του ντοπαμινεργικού συστήματος της αμυγγής, και ευόδωση του αναλγητικού συστήματος της β-ενδορφίνης του υποθαλάμου. Το σύστημα του στρες αλληλοεπιδρά με τις αμυγδαλές του εγκεφάλου, μέσω των οποίων ρυθμίζεται η αίσθηση του φόβου. Με την παραγωγή της κορτικοτροπίνης και διαμέσου του νοραδρενεργικού συστήματος καταστέλλεται η όρεξη και ενεργοποιείται η θερμογένεση κατά τη διάρκεια του στρες. Ο ρόλος της ορμόνης είναι σπουδαίος και στην αναστολή, μέσω της σωματοστατίνης, της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης (GH) και της εκλυτικής ορμόνης της θυρεοειδοτροπίνης (TRH). Έτσι καταστέλλει τόσο τις λειτουργίες της αναπαραγωγής και της αύξησης, όσο και τις καύσεις. Επιπλέον, η κορτικοτροπίνη αναστέλλει την έκκριση της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH). Αξιοσημείωτο θεωρείται το

γεγονός ότι στις γυναίκες το σύστημα CRH/LC-NE είναι περισσότερο δραστικό σε σύγκριση με τους άνδρες, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα οιστρογόνα ρυθμίζουν θετικά το γονίδιο της κορτικοτροπίνης. Κατά αυτόν τον τρόπο, η απόκριση του στρες παρουσιάζει φυλετικό διμορφισμό (Χρούσος, 2007).

Από την άλλη πλευρά, ο ρόλος της κορτιζόλης, της τελικής ορμόνης του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA) δηλαδή, είναι πολλαπλός. Η κορτιζόλη φαίνεται ότι είναι υπεύθυνη για την ταυτόχρονη αναστολή της κορτικοτροπίνης, του συστήματος LC/NE και του συστήματος της β-ενδορφίνης. Έτσι, ουσιαστικά καταστέλλει τη διέγερση του συστήματος στρες. Επιπλέον, προκαλεί διέγερση του ντοπαμινεργικού συστήματος της αμοιβής και του κεντρικού πυρήνα των αμυγδαλών του εγκεφάλου, από όπου παράγεται επίσης κορτιζόλη. Ακόμη, είναι υπεύθυνη για την άμεση αναστολή της έκκρισης της υποφυσιακής γοναδοτροπίνης, της αυξητικής ορμόνης (GH) και της θυρεοτροπίνης, καθώς και για την ανθεκτικότητα που εμφανίζουν σε αυτές τις ορμόνες οι ιστοί-στόχοι των στεροειδών του φύλου και οι αυξητικοί παράγοντες.

Επιπρόσθετα, η 5'-δεϊωδινάση, ο ρόλος της οποίας είναι η μετατροπή της τετραϊωδοθυρονίνης (T4) που είναι σχετικά αδρανής στην τριϊωδοθυρονίνη (T3), που είναι περισσότερο δραστική, καταστέλλεται από την κορτιζόλη. Έτσι λοιπόν καταστέλλεται η αναπαραγωγή, η αύξηση και οι καύσεις. Οι επιδράσεις της κορτιζόλης είναι σημαντικές και σε άλλα όργανα και λειτουργίες του οργανισμού. Για παράδειγμα, επιδρά άμεσα στα οστά και είναι υπεύθυνη για την πρόκληση οστεοπόρωσης. Έχει, ακόμη, τόσο άμεση επίδραση στον λιπώδη ιστό, όσο και έμμεση διαμέσου της ινσουλίνης, και προωθεί φαινόμενα όπως είναι η εναπόθεση λίπους στα σπλάχνα, η αντοχή στην ινσουλίνη, η δυσλιπιδαιμία, καθώς και η υπέρταση (μεταβολικό σύνδρομο X).

Η κορτικοτροπίνη είναι υπεύθυνη για την αναστολή κεντρικά της φλεγμονώδους αντίδρασης, διαμέσου της κορτιζόλης και των κατεχολαμινών. Ωστόσο, όταν εκκρίνεται άμεσα από τα περιφερικά νεύρα, προκαλεί διέγερση της φλεγμονής.

Η χρόνια υπερδραστηριότητα του συστήματος του στρες προκαλεί μεταβολές στη συμπεριφορά, στη νευρο-ενδοκρινική λειτουργία, στο μεταβολισμό και στην ανοσία. για την αντιμετώπιση τέτοιων καταστάσεων στον άνθρωπο θεωρείται ευεργετική η χορήγηση ανταγωνιστών του υποδοχέα της κορτικοτροπίνης τύπου 1, όπως είναι η ανταλαρμίνη, η οποία αφενός προκαλεί αναστολή όλων των φαινομένων που προκύπτουν ως αποτέλεσμα του στρες, και αφετέρου δρα κατασταλτικά και ως προς τη φλεγμονή, χωρίς να επιφέρει επινεφριδική ανεπάρκεια η μακροχρόνια χρήση της. Αντίθετα, σε περιπτώσεις όπου παρατηρείται περιορισμένη δραστηριότητα του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων και του συστήματος LC/NE, χορηγούνται ουσίες που διεγείρουν την έκκριση ή αγωνιστές δράσης της κορτικοτροπίνης (Χρούσος, 2007)

2.2 Η έννοια της καταπόνησης (στρες) στους ιχθύες

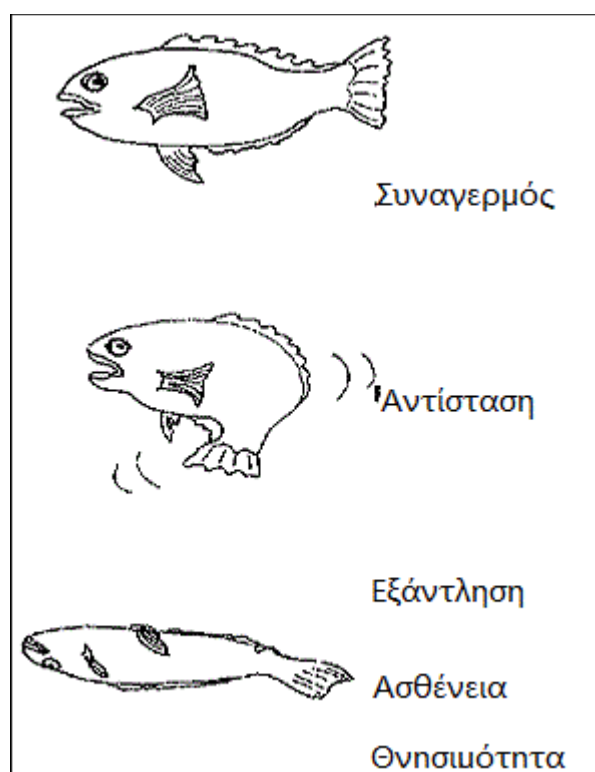
Η καταπόνηση (στρες) ορίζεται ως φυσικοί ή χημικοί παράγοντες που προκαλούν σωματικές αντιδράσεις, οι οποίες μπορεί να συμβάλλουν στην ασθένεια και το θάνατο (Rottmann et al. 1992). Υπάρχουν διάφοροι ορισμοί σχετικά με το τι συνιστά στρες για τα ψάρια, με κοινά αποδεκτό το γεγονός ότι το στρες αντιπροσωπεύει μία αντίδραση του ψαριού σε ένα ερέθισμα, η οποία με κάποιο τρόπο επηρεάζει την ομοιοστατική κατάσταση του (Barton and Iwama, 1991).

Το στρες επηρεάζει τα ψάρια με ποικίλους τρόπους και μπορεί να έχει επίδραση σε όλα τα επίπεδα της οργάνωσης, από τις βιοχημικές δράσεις μέχρι τους πληθυσμούς. Ο Adams (1990) θεώρησε ότι το στρες αποτελείται τόσο από άμεσα όσο και έμμεσα συστατικά, ανάλογα με το πώς αυτά επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία του ενός συγκεκριμένου επιπέδου οργάνωσης. Τα άμεσα συστατικά του στρες επηρεάζουν οργανικά τα ψάρια, μεταβάλλοντας για παράδειγμα τις φυσιολογικές λειτουργίες τους, τις ορμόνες ή τους κυτταρικούς μηχανισμούς. Τα έμμεσα συστατικά λειτουργούν σε επίπεδο πληθυσμού ή σε επίπεδο κοινότητας επηρεάζοντας τη διαθεσιμότητα της

ενέργειας στα ψάρια μεταβάλλοντας τις τροφικές σχέσεις [Adams (1990), όπως αναφέρεται από τους Barton and Iwama (1991)].

2.3 Φυσιολογική απόκριση ιχθύων στο στρες

Σύμφωνα με την έννοια του στρες που προτάθηκε από τον Hans Selye (1950), ένας οργανισμός διέρχεται από τρεις διακριτές φάσεις που τις ονόμασε Γενικό Σύνδρομο Προσαρμογής (ΓΣΠ - GAS) [Selye (1950), όπως αναφέρεται από τους Barton and Iwama (1991)]. Το ΓΣΠ περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:



Εικόνα 3. Στάδια Γενικού Συνδρόμου Προσαρμογής των ιχθύων στην καταπόνηση

α. στάδιο συναγερμού (Alarm stage), το οποίο μπορεί να διακριθεί σε δύο επιμέρους φάσεις, τη φάση της καταπληξίας (Shock) και τη φάση της αντι-

καταπληξίας (Counter shock). Το πρώτο στάδιο του ΓΣΠ είναι μια αντίδραση συναγερμού, η οποία συνήθως χαρακτηρίζεται από ταχεία φυσιολογική απόκριση, νευροενδοκρινικής φύσεως. Ο οργανισμός απελευθερώνει στο αίμα ορμόνες που προκαλούν στρες, όπως είναι οι κατεχολαμίνες (πχ. αδρεναλίνη) και τα κορτικοστεροειδή (πχ. κορτιζόλη) (Ντανταλή, 2008).

β. στάδιο αντίστασης (Resistance stage). Κατά το στάδιο αυτό ο οργανισμός προσαρμόζεται ή αντισταθμίζει τις μεταβλημένες συνθήκες που προκαλούν την καταπόνηση, προκειμένου να ανακτήσει την ομοιοστατική κατάσταση. Οι ορμόνες που απελευθερώθηκαν στο πρώτο στάδιο προκαλούν ποικίλες βιοχημικές και φυσιολογικές μεταβολές, όπως τροποποιήσεις σε διάφορες μεταβολικές οδούς, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της χημικής σύνθεσης του αίματος (Ντανταλή, 2008). Αυτό μπορεί να εμφανίζεται ως επαναφορά στις κατάσταση πριν την επίδραση του στρες ή σε μία τροποποιημένη κατάσταση ανάπαυσης (Barton and Iwama, 1991, Ντανταλή, 2008).

γ. στάδιο εξάντλησης (Exhaustive stage). Αν η καταπόνηση είναι υπερβολικά σοβαρή ή μεγάλης διάρκειας, η προσαρμογή μπορεί να μην είναι δυνατή και ο οργανισμός μπαίνει στο τελικό στάδιο της εξάντλησης. Η θνησιμότητα που προκαλείται από το στρες στα ψάρια πιθανόν να σχετίζεται με αυτή τη φάση. Η ανικανότητα του ψαριού για εγκλιματισμό ή προσαρμογή στον παράγοντα που προκάλεσε την καταπόνηση, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της αύξησης του και της ικανότητας του για αναπαραγωγή. Επιπλέον, εξαιτίας της μειωμένης παραγωγικότητας μπορεί να παρατηρηθούν μεταβολές στον αριθμό και στην ποικιλομορφία των ειδών στους φυσικούς πληθυσμούς (Barton, 2002, Barton and Iwama, 1991, Ντανταλή, 2008).

Η έννοια του ΓΣΠ που προαναφέρθηκε παρέχει μια χρήσιμη προσέγγιση για την αξιολόγηση των επιπτώσεων του στρες στα ψάρια, ωστόσο είναι ένα γενικευμένο μοντέλο που μπορεί να μην είναι κατάλληλο για όλους τους τύπους καταπόνησης. Επιπλέον, όλες οι φυσιολογικές αντιδράσεις δεν είναι κατάλληλες για την αξιολόγηση του στρες στα ψάρια επειδή, σε μερικές περιπτώσεις, ορισμένες αντιδράσεις είναι εξειδικευμένες για τον τύπο του στρεσογόνου παράγοντα. Ο Schreck (1981) κατέληξε στο

συμπέρασμα ότι μία αντίδραση τύπου ΓΣΠ στα ψάρια προκαλείται μόνο όταν αυτά αντιμετωπίζουν κάποια μορφή τρόμου, ενόχλησης ή πόνου. Με τη διασαφήνιση του ρόλου και του τρόπου ανταπόκρισης των κορτικοστεροειδών κατά τη διάρκεια διαφόρων τύπων στρες η γενική ισχύς του ΓΣΠ έχει αμφισβητηθεί. Οι Munck et al. (1984) πρότειναν ότι ο ρόλος της έκκρισης των κορτικοστεροειδών σε απόκριση στο στρες, είναι να προστατεύσουν το σώμα από τους δικούς του μηχανισμούς άμυνας κατά τη διάρκεια του στρες με την καταστολή αυτών των μηχανισμών [Schreck (1981) και Munck et al. (1984), όπως αναφέρονται από τους Barton and Iwama, (1991)].

Μια πιο χρήσιμη προσέγγιση στο στρες διατυπώθηκε από τον Moberg (1985) ο οποίος πρότεινε ότι η απόκριση στο στρες διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες: (α) την αναγνώριση μίας απειλής για την ομοιόσταση, (β) την αντίδραση στο στρες, και (γ) τις συνέπειες του στρες. Κάθε κατηγορία αποτελείται από ξεχωριστά βιολογικά γεγονότα που ξεκινούν από την αντίληψη του στρεσογόνου παράγοντα από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Η απόκριση κορυφώνεται με την ανάπτυξη μιας παθολογικής κατάστασης, εάν η αλλαγή στη βιολογική λειτουργία που προκαλείται από το στρες είναι σοβαρή ή αρκετά μακροχρόνια. Σύμφωνα με τον Moberg, θεωρείται παθολογική κατάσταση εκείνη όπου οι συνθήκες απειλούν τη διατήρηση της ομοιόστασης και την ικανότητα της αναπαραγωγής. Έτσι, η ανάπτυξη νόσου αντιπροσωπεύει μόνο έναν τύπο παθολογίας που θα πρέπει να απασχολεί τους υδατοκαλλιεργητές. Σε αυτό το πλαίσιο, η απόκριση των ψαριών σε στρες έχει τόσο προσαρμοστικά, όσο και δυσπροσαρμοστικά συστατικά. Τα ψάρια έχουν μια φυσική ικανότητα να ανταποκρίνονται φυσιολογικά στο άγχος για να ξεπεράσουν την διαταραχή. Ωστόσο, όταν οι μηχανισμοί αντιμετώπισης υπερβούν τα φυσιολογικά όρια, οι αποκρίσεις γίνονται επιζήμιες για την υγεία των ψαριών, ή είναι δυσπροσαρμοστικές. Προσαρμοστικές και δυσπροσαρμοστικές πτυχές της απάντησης στο στρες μπορεί να συμβαίνουν διαδοχικά ή ταυτόχρονα στα ψάρια (Moberg, 1985).

Η χρησιμοποιούμενη ορολογία κατά τον καθορισμό του στρες έχει δημιουργήσει σύγχυση μεταξύ των ερευνητών. Κατά το παρελθόν, ο όρος «στρες» έχει εξομοιωθεί τόσο με το ερέθισμα, ή στρεσογόνο παράγοντα, όσο και με την απόκριση ή αντίδραση στο ερέθισμα. Οι αντιδράσεις στο στρες

έχουν διαχωριστεί ανάλογα με το αν είναι προσαρμοστικές ή δυσπροσαρμοστικές. Οι Deitinger and McCauley (1990) έχουν προτείνει οι βιοτικές αλλαγές στα ψάρια που εμφανίζονται ως αποτέλεσμα του στρες να χαρακτηρίζονται ως «αποκρίσεις/απαντήσεις», αν είναι προσαρμοστικές και μέρος της αντισταθμιστικής διαδικασίας, ή «επιπτώσεις» εάν είναι αρνητικές για την επιβίωση των ψαριών. Μια τέτοια προσέγγιση είναι χρήσιμη για τη διαφοροποίηση μεταξύ θετικών και αρνητικών αλλαγών για τον οργανισμό, που προκαλούνται από το στρες [Deitinger and McCauley (1990), όπως αναφέρονται από τους Barton and Iwama, (1991)].

3. ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΩΝ ΙΧΘΥΩΝ

3.1 Μεταβολές που παρατηρούνται στους ιχθύες

3.1.1 Φυσιολογικές μεταβολές

Η καταπόνηση και οι τραυματισμοί αρχικά προκαλούν μια αντίδραση συναγερμού, η οποία οδηγεί σε μια σειρά μεταβολών μέσα στο ψάρι.

- Η συγκέντρωση κορτικοστεροειδών στο πλάσμα είναι μία παράμετρος που επηρεάζεται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η διατροφή και η ώρα της ημέρας. Ωστόσο, πέρα από ορισμένες εξαιρέσεις, οι συνήθεις συγκεντρώσεις στα ψάρια δεν ξεπερνούν τα 30-40 ng/mL, ενώ ιδανικά θα έπρεπε να είναι μικρότερες από <5 ng/mL. Οι συγκεντρώσεις αυτές ανέρχονται σε επίπεδα 40-200 ng/mL ως αποτέλεσμα της καταπόνησης, ενώ συχνά παρατηρούνται και υψηλότερες τιμές σε ορισμένα ψάρια που δεν ανήκουν στα σολομονοειδή ή όταν τα ψάρια υπόκεινται σε πολλαπλούς στρεσογόνους παράγοντες.

Γενικά, το μέγεθος και η έκταση της κορτικοστεροειδούς απόκρισης αντανακλούν συνήθως τη σοβαρότητα και τη διάρκεια του στρεσογόνου παράγοντα. Η καταπόνηση οδηγεί σε μη ομαλή αύξηση των κορτικοστεροειδών στην κυκλοφορία του αίματος των ψαριών,

ωστόσο η έλλειψη απόκρισης δεν υποδεικνύει απαραίτητα την απουσία του στρες. Για παράδειγμα, η έκθεση των ψαριών σε ορισμένα είδη τοξικών ουσιών μπορεί να είναι επιζήμια και να προκαλεί άμεση θνησιμότητα ή να βλάπτει την υγεία των ψαριών, αλλά να μην προκαλείται αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης, ως αντίδραση στο στρες. Αυτό το φαινόμενο έχει αποδειχθεί σε ψάρια που εκτέθηκαν στις τοξικές ουσίες endrin και κάδμιο, όπως η ιριδίζουσα πέστροφα και ο ασημένιος σολωμός, αντίστοιχα. Επιπλέον, στην ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*, πρώην *Salmo gairdneri*) δεν προκάλεσε τη χαρακτηριστική απόκριση των κορτικοστεροειδών μια πειραματικά επαγόμενη παρασιτική λοίμωξη του αίματος (Barton and Iwama, 1991, Reddy, & Leatherland, 1998).

- Μια άλλη σημαντική ορμονική αντίδραση των ψαριών είναι η έκκριση κατεχολαμινών, κυρίως επινεφρίνης (αδρεναλίνη) στην κυκλοφορία ως απόκριση σε μια σειρά από στρεσογόνους παράγοντες. Η πηγή των κατεχολαμινών στα ψάρια μπορεί να είναι διάφορες περιοχές του σώματος, αλλά κυρίως τα χρωμόφιλα κύτταρα του κύριου νεφρικού ιστού. Η διασπορά των κατεχολαμινών στο αίμα είναι πολύ ταχύτερη σε σχέση με τη διασπορά των κορτικοστεροειδών, γι' αυτό και υπάρχουν περισσότερα προβλήματα στον προσδιορισμό τους (Barton and Iwama, 1991).

Στον Πίνακα 3 φαίνεται η επίδραση διαφόρων στρεσογόνων παραγόντων στην ανύψωση της συγκέντρωσης επινεφρίνης στο πλάσμα της ιριδίζουσας πέστροφας.

Πίνακας 3. Παραδείγματα συνθηκών που έχει βρεθεί ότι αυξάνουν τα επίπεδα επινεφρίνης στην ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*, πρώην *Salmo gairdneri*) (Barton and Iwama, 1991).

Παράγοντας καταπόνησης	Επινεφρίνη (nmoles/L) Πριν το στρες / Μετά το στρες
<i>Εξαντλητική άσκηση</i>	0,7
<i>Υποξικό νερό</i>	5
<i>Χειρισμός</i>	27,2
<i>Άσκηση</i>	16,7
<i>Αναισθησία</i>	1,6
<i>Βαθιά αναισθησία</i>	2,3

- Παρατηρείται αύξηση του σακχάρου στο αίμα ως αποτέλεσμα της απόκρισης για έκκριση ορμονών από τα επινεφρίδια, καθώς μεταβολίζεται το γλυκογόνο στο ήπαρ. Αυτή η αύξηση προκαλεί μία έκρηξη ενέργειας που προετοιμάζει το ζώο για μια κατάσταση έκτακτης ανάγκης.
- Επιπλέον, η αντιφλεγμονώδης δράση, μια άμυνα που χρησιμοποιείται από τα ψάρια κατά της εισβολής των οργανισμών που προκαλούν τη νόσο, καταστέλλεται από τις ορμόνες που απελευθερώνονται από τα επινεφρίδια.
- Η ισορροπία του νερού στα ψάρια (ωσμορύθμιση) διαταράσσεται εξαιτίας των αλλαγών στο μεταβολισμό των μετάλλων. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα ψάρια του γλυκού νερού απορροφούν υπερβολική ποσότητα νερού από το περιβάλλον (υπερ-ενυδάτωση), ενώ τα ψάρια του αλμυρού νερού χάνουν νερό στο περιβάλλον (αφυδάτωση). Αυτή η διαταραχή αυξάνει τις ενεργειακές απαιτήσεις για ωσμορύθμιση.
- Η αναπνοή αυξάνεται, καθώς και η πίεση του αίματος, και το απόθεμα ερυθρών αιμοσφαιρίων απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος (Rottmann et al. 1992).

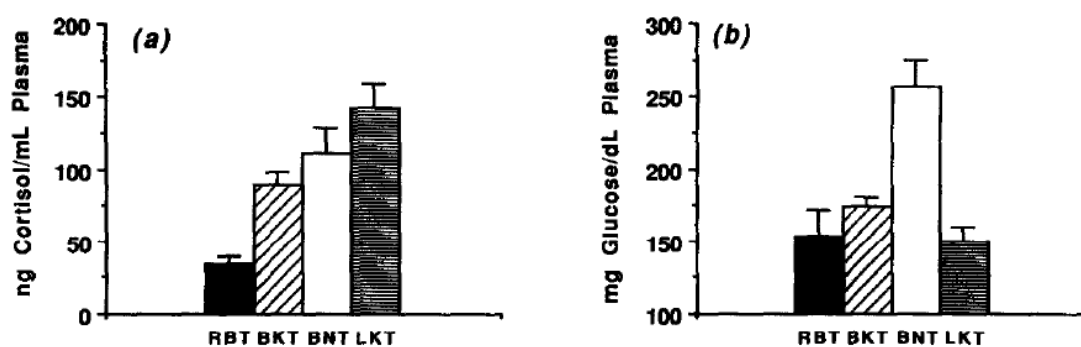
Πίνακας 4. Παραδείγματα πρωτογενών, δευτερογενών και τριτογενών παραμέτρων που έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες καταπόνησης στα ψάρια

	Παράμετροι
Πρωτογενείς	Κατεχολαμίνες πλάσματος Κορτικοστεροειδή πλάσματος Αδρενοκορτικοτροπική ορμόνη (ACTH) πλάσματος
Δευτερογενείς	
A) Μεταβολικοί	Γλυκόζη πλάσματος Γαλακτικό οξύ πλάσματος Γλυκογόνο ήπατος και μυών Αδενυλική ενέργεια ήπατος και μυών Χοληστερόλη πλάσματος
B) Αιματολογικοί	Αιματοκρίτης Λευκοκρίτης Αριθμός ερυθροκυττάρων (RBC) Αριθμός λευκοκυττάρων Αναλογία λεμφοκυττάρων : ερυθροκυττάρων Αριθμός θρομβοκυττάρων Χρόνος πήξης αίματος
Γ) Υδρομεταλλικοί	Αιμογλοβίνη Χλωριούχα ιόντα πλάσματος Νάτριο πλάσματος Κάλιο πλάσματος Πρωτεΐνη πλάσματος
Δ) Δομικοί	Ωσμωτικότητα πλάσματος Μέγεθος κυττάρων Interrenal cell size Διάμετρος πυρήνα Interrenal nuclear diameter Μορφολογία του γαστρικού ιστού Οργανοσωματικοί δείκτες Παράγοντας κατάστασης
Τριτογενείς	Ανάπτυξη Μεταβολικός ρυθμός Αντίσταση στις ασθένειες Αντίσταση στην υποξία Απόδοση στην κολύμβηση Ικανότητα αναπαραγωγής

Κατά την ερμηνεία της επίδρασης του στρες στις φυσιολογικές μεταβολές στα ψάρια, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι πολλοί μη – στρεσογόνοι παράγοντες μπορεί να τροποποιήσουν το μέγεθος των αποκρίσεων. Τέτοιοι παράγοντες περιλαμβάνουν, για παράδειγμα, εξωτερικούς παραγόντες, όπως εγκλιματισμό στη θερμοκρασία, αλατότητα, ποιότητα του νερού, και εσωτερικούς παράγοντες, όπως η θρεπτική κατάσταση ή ύπαρξη μόλυνσης.

Επιπλέον, οι πρωτοβάθμιες και δευτεροβάθμιες αποκρίσεις δεν συμβαίνουν απαραίτητα ταυτόχρονα. Για παράδειγμα, διαπιστώθηκε ότι η κορτιζόλη πλάσματος και το γαλακτικό οξύ σε πέστροφα (*Salmo trutta*) που υποβλήθηκε σε χειρισμό για 2 λεπτά επέστρεψε σε επίπεδα ανάπαυσης μέσα σε 4 ώρες, αλλά η γλυκόζη του πλάσματος παρουσίασε τη μέγιστη τιμή σε διάστημα 4 ωρών και τα κυκλοφορούντα λεμφοκύτταρα παρουσίασαν την κατώτατη τιμή σε 30 ώρες και χρειάστηκε να ανακάμψει σε 72 ώρες.

Διαφοροποιήσεις παρατηρούνται στις αποκρίσεις σε στρεσογόνους παράγοντες μεταξύ των διαφόρων ειδών και στελεχών, καθώς και μεταξύ άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών. Έχουν αναφερθεί διαφοροποιήσεις στις συγκεντρώσεις σε κορτικοστεροειδή στο πλάσμα μετά από χειρισμό και περιορισμό, καθώς και στην αντίσταση σε νόσους. Στην Εικόνα 4 φαίνονται τα επίπεδα κορτιζόλης (α) και γλυκόζης (β) μετά την πάροδο 3 ωρών από χειρισμό διάρκειας 30 sec σε διάφορα είδη πέστροφας. Για τα 4 είδη τα επίπεδα κορτιζόλης και γλυκόζης σε συνθήκες ανάπαυσης δεν διέφεραν ιδιαίτερα και κυμαίνονταν μεταξύ 0,9-4,0 mg/mL για την κορτιζόλη και 100-109 mg/dL για τη γλυκόζη (Barton and Iwama, 1991).



Εικόνα 4. Επίπεδα κορτιζόλης (α) και γλυκόζης (β) πλάσματος μετά από την πάροδο 3 ωρών από χειρισμό διάρκειας 30 sec στα είδη πέστροφας: ιριδίτσουσα (RBT), πέστροφα brook (BKT), καφέ πέστροφα (BNT), και λιμνοπέστροφα (Barton and Iwama, 1991).

3.1.2 Εξωτερικές ενδείξεις καταπόνησης

Η καταπόνηση που υφίστανται οι ιχθείς εκδηλώνεται με κάποιο από τα ακόλουθα συμπτώματα:

- ❖ Ασυνήθιστη συμπεριφορά των ιχθύων
- ❖ Αυθόρμητη μετανάστευση προς το ένα μέρος του κλωβού
- ❖ Αύξηση της αναπνευστικής δραστηριότητας
- ❖ Αυξημένη ευπάθεια στα παθογόνα
- ❖ Μειωμένη επιβίωση των νεαρών ιχθυδίων (Iwama et al. 1995).

Οι επιπτώσεις της καταπόνησης μπορεί να εκδηλωθούν σε επίπεδο πληθυσμού και κοινότητας. Σε αυτή την περίπτωση είναι αρκετά δύσκολο να διακριβωθούν, ωστόσο έχουν τη μεγαλύτερη οικολογική επίδραση.

Επιπλέον, η επίδραση των παραγόντων που προκαλούν καταπόνηση στα ψάρια είναι αθροιστική και μπορεί να εκδηλωθεί σε επίπεδο πληθυσμού ως σημαντική θνησιμότητα, γεγονός που έχει ιδιαίτερη σημασία για τους υδατοκαλλιεργητές. Διαταραχές που μεμονωμένα δεν είναι θανατηφόρες, εφόσον συνδυαστούν μέσα σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, χωρίς να δίνεται ενδιάμεσα στα ψάρια ο αναγκαίος χρόνος ανάκτησης της φυσιολογικής κατάστασης, μπορούν να αποβούν μοιραίες (Barton and Iwama, 1991).

3.2 Επιπτώσεις της καταπόνησης στους ιχθύες

Τα ψάρια είναι σε θέση να προσαρμοστούν στο στρες για μια ορισμένη χρονική περίοδο κατά την οποία μπορεί να εμφανίζονται και να ενεργούν φυσιολογικά. Ωστόσο, τα ενεργειακά αποθεματικά τελικά εξαντλούνται και εμφανίζεται ανισορροπία ορμονών, καταστολή του ανοσοποιητικού τους συστήματος και αύξηση της ευαισθησίας τους σε μολυσματικές ασθένειες (Rottmann et al. 1992).

Άλλες επιπτώσεις της καταπόνησης που αναφέρονται σε παραγωγικές μονάδες εκτροφής ιχθύων περιλαμβάνουν:

- επιβράδυνση της αύξησης/ανάπτυξης του σώματος,
- μείωση της παραγωγικότητας (κρέας),
- διαταραχές της αναπαραγωγής,
- αυξημένη ευαισθησία σε νοσογόνους παράγοντες,
- χαμηλή ποιότητα κρέατος [Iwama, (1974), όπως αναφέρεται από Χατζηπλή (2008)]

Τα διάφορα είδη ψαριών εμφανίζουν διαφορετική αντοχή σε στρεσογόνους παράγοντες. Το γληνί φαίνεται ότι είναι ένα ευαίσθητο είδος, σε αντίθεση με την τσιπούρα που εμφανίζει σημαντική αντοχή και είναι ικανή για ταχύτατη επάνοδο στους φυσιολογικούς ρυθμούς μετά από ένα επεισόδιο στρες (Ντανταλή, 2008).

Η ανθεκτικότητα της τσιπούρας (*Sparus aurata* L.) διαπιστώθηκε και από τη Γιαγνίση (2011) σε πειράματα οξείας καταπόνησης ιχθύων για την αξιολόγηση της υγείας τους και της προσβολής του εντερικού τους σωλήνα από βακτήρια. Το συγκεκριμένο είδος ψαριού όταν υποβλήθηκε σε συνθήκες οξείας καταπόνησης δεν εμφάνισε αξιόλογη θνησιμότητα, ούτε εισβολή βακτηρίων σε εσωτερικά όργανα, σε αντίθεση με το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax* L.) (Γιαγνίση, 2011).

3.2.1 Ευαισθησία σε ασθένειες

Οι στρεσογόνοι παράγοντες επηρεάζουν σημαντικά το γαστρεντερικό σύστημα των θηλαστικών. Αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι μεταξύ των επιπτώσεων της καταπόνησης περιλαμβάνεται ο εκφυλισμός του εντερικού επιθηλίου των θηλαστικών και η διαταραχή της λειτουργίας του εντερικού φραγμού, καθώς και των μηχανισμών πρόσληψης στοιχείων. Συνέπεια αυτών αποτελεί η ενίσχυση της πρόσληψης πιθανών βλαβερών υλικών και η αύξηση

της μετανάστευσης των βακτηρίων αποτέλεσμα να αυξάνεται η πιθανότητα ανάπτυξης μολυσματικών ασθενειών.

Άλλες επιπτώσεις της καταπόνησης στα ψάρια είναι η μειωμένη παραγωγή αντισωμάτων, η καθυστερημένη ανταπόκριση του σώματος στους τραυματισμούς και τις μολύνσεις και η αυξημένη ευαισθησία στους παθογόνους μικροοργανισμούς, ιδιαίτερα τους ευκαιριακούς. Ο μειωμένος σχηματισμός βλέννας, η οποία αποτελεί ένα μηχανισμό άμυνας έναντι της διείσδυσης των παθογόνων στους ιχθείς, έχει επίσης συσχετιστεί με την καταπόνηση. Η βλέννα, και ειδικότερα το περίβλημα γλυκοπρωτεΐνης, καλύπτει τόσο την επιδερμίδα του ψαριού, όσο και τα βράγχια και τη γαστρεντερική οδό, και αποτελεί το πρώτο εμπόδιο που συναντά το παθογόνο.

Τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης του αίματος επηρεάζουν την ρευστότητα των μεμβρανών των μακροφάγων κυττάρων και περιορίζουν την ικανότητα φαγοκυττάρωσης των βακτηριακών εισβολέων (Γιαγνίση, 2011).

3.2.2 Διαταραχές της αναπαραγωγής

Έχει αναγνωριστεί ότι το στρες επηρεάζει αρνητικά την αναπαραγωγική ικανότητα των ανώτερων σπονδυλωτών. Έρευνες στα ψάρια καταδεικνύουν αναπαραγωγική αποτυχία όταν τα ψάρια έχουν εκτεθεί σε διάφορες μορφές επιβλαβών χημικών ερεθισμάτων, όπως το χαμηλό οξύγονο, τους ρύπους και ειδικά το μειωμένο pH. Ο σολομός του Ατλαντικού που λήφθηκε από ποταμό με pH 4,7 βρέθηκε ότι είχε μειωμένα επίπεδα τεστοστερόνης στο πλάσμα και 1 i-κετοτεστοστερόνης σε σύγκριση με ένα παρόμοιο πληθυσμό ψαριών από ποταμό με pH 5,6. Αντίστοιχα, έκθεση του είδους μυλοκόπι Ατλαντικού (*Microogonius undulates*) σε μόλυβδο, βενζοπυρένιο και Αροκλόρ 1254, ένα πολυχλωριωμένο διφαινύλιο (PCB), προκάλεσε σημαντική μείωση του γοναδοσωματικού δείκτη (GSI) και των επιπέδων τεστοστερόνης και οιστραδιόλης στο πλάσμα (Barton and Iwama, 1991).

Αναφέρεται ένα πιθανό φαινόμενο παροδικής αύξησης που ακολουθείται από μια μείωση στα στεροειδή του φύλου στα ψάρια, ως αποτέλεσμα της οξείας καταπόνησης. Άλλοι ερευνητές αναφέρουν καταστολή της τεστοστερόνης και της 1 α -κετοτεστοστερόνης σε ώριμες αρσενικές πέστροφες, αφού υποβλήθηκαν σε οξύ (διάρκειας 1 ώρας) ή χρόνιο (διάρκειας 1 μήνα) περιορισμό, ενώ τη μεγαλύτερη μεταβολή ως απόκριση στο στρες παρουσίασαν τα επίπεδα της τεστοστερόνης (Barton and Iwama, 1991, Pickering et al. 1987).

3.2.3 Επιδράσεις στην ανάπτυξη

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε νεαρά ψάρια του είδους *Oncorhynchus mykiss* προέκυψε ότι τα στρεσοσαρισμένα ψάρια παρουσίασαν διπλάσιο ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου, υπό το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο. Ακόμη και σε περιπτώσεις εφαρμογής σύντομων διαταραχών το ψάρι καταναλώνει το $\frac{1}{4}$ της ενέργειας που χρειαζόταν για τις δραστηριότητες του. Προκύπτει λοιπόν ότι αφού ένα μέρος της ενέργειας του ψαριού καταναλώνεται για να ανταπεξέλθει στο οξύ στρες που αντιμετωπίζει λόγω χειρισμών, μικρότερο μέρος της ενέργειας θα είναι διαθέσιμο για άλλες δραστηριότητες (Barton and Iwama, 1991).

3.3 Παράγοντες καταπόνησης στους ιχθύες

Τα ψάρια που εκτρέφονται υπό συνθήκες εμπορικής υδατοκαλλιέργειας περιορίζονται μέσα στα όρια της παραγωγικής μονάδας και είναι πιθανό να αποδυναμωθούν από συνθήκες καταπόνησης, συμπεριλαμβανομένων:

- ✓ της αυξημένης πυκνότητας των ψαριών στους κλωβούς που οδηγεί στην έλλειψη ζωτικού χώρου και στον περιορισμό της κίνησης
- ✓ της χαμηλής ποιότητας του νερού (δηλαδή, χαμηλό διαλυμένο οξυγόνο, ανεπιθύμητη θερμοκρασία ή επίπεδα pH, αυξημένα επίπεδα διοξειδίου

του άνθρακα, αμμωνίας, νιτρωδών, υδρόθειου, οργανικής ύλης στο νερό),

- ✓ του τραυματισμού τους κατά τον χειρισμό από το προσωπικό (δηλαδή κατά τη σύλληψη, διαλογή, μεταφορά),
- ✓ της ανεπαρκούς διατροφής και
- ✓ των κακών συνθηκών υγιεινής (Rottmann et al. 1992).

Αυτές οι συνθήκες μπορούν να οδηγήσουν σε μειωμένη αντίσταση από τα ψάρια, με αποτέλεσμα την εξάπλωση των νόσων και των παρασίτων που τα προσβάλλουν. Πολλά πιθανά παθογόνα των ιχθύων είναι συνεχώς παρόντα στο νερό, στο έδαφος, στον αέρα, ή στα ψάρια. Στη φύση, τα ψάρια είναι συχνά ανθεκτικά σε αυτά τα παθογόνα και είναι σε θέση να αναζητούν τις καλύτερες δυνατές διαθέσιμες συνθήκες διαβίωσης, σε αντίθεση με τα ψάρια που εκτρέφονται σε παραγωγικές μονάδες (Rottmann et al. 1992).

Αναφέρονται, επιπλέον, ότι συνθήκες όπως οι ακόλουθες έχουν επιπτώσεις στον οργανισμό των ψαριών:

- ✓ Η διαβίωση των ιχθύων σε κατάσταση αιχμαλωσίας.
- ✓ Οι απότομες μεταβολές της θερμοκρασίας του νερού, καθώς και η διατήρηση της θερμοκρασίας σε ακραίες τιμές για μεγάλο χρονικό διάστημα.
- ✓ Ο ανταγωνισμός μεταξύ ψαριών για τη διεκδίκηση της τροφής.
- ✓ Η επιθετικότητα των μεγαλύτερων σε μέγεθος ψαριών εις βάρος των μικρότερων (κανιβαλισμός), όταν παρατηρείται έντονη ανομοιομορφία στον πληθυσμό (Παπαφωτίου, 1997).

Στον Πίνακα 5 που ακολουθεί παρουσιάζονται μεταβολές στα επίπεδα της κορτιζόλης (ή των κορτικοστεροειδών) στο πλάσμα που καταγράφηκαν σε ψάρια που προέρχονται από το υδατοκαλλιέργειες. Οι τιμές καταγράφηκαν πριν και μετά την επίδραση στρεσογόνων παραγόντων, όπως χειρισμοί,

αιχμαλωσία (συμπεριλαμβανομένου του συνωστισμού), άσκηση, μεταφορά και διατήρηση.

Πίνακας 5. Αλλαγές των επιπέδων κορτιζόλης (ή κορτικοστεροειδών) στο πλάσμα στα ψάρια που προέρχονται από το υδατοκαλλιέργειες που σχετίζονται με στρεσογόνους παράγοντες (Barton and Iwama, 1991)

Οικογένεια και είδος	Κορτικοστεροειδή (ng/mL) Πριν το στρες / Μετά το στρες		Συνθήκες καταπόνησης
Polyodontidae <i>Polyodon spathula</i>	11	72	2 ώρες μεταφορά
Clupeidae <i>Dorosoma cepedianum</i>	42	265	2 ώρες μεταφορά
Amiidae <i>Amia calva</i>	7	21	2 ώρες μεταφορά
Lepisosteidae <i>Lepisosteus oculatus</i>	9	58	30 λεπτά περιορισμός
Salmonidae <i>Coregonus lavaretus</i>	37	539	Δίχτυα seine- και περιορισμός
Salmonidae <i>Coregonus lavaretus</i>	122	330	Δίχτυα gill και περιορισμός
Salmonidae <i>Oncorhynchus kisutch</i>	30	90	5 min χειρισμός
Salmonidae <i>Oncorhynchus kisutch</i>	10	130	4 h μεταφορά, σε χαμηλή πυκνότητα
	10	140	12 h μεταφορά, σε χαμηλή πυκνότητα
	10	160	4 h μεταφορά, σε μεγάλη πυκνότητα
Salmonidae <i>Oncorhynchus kisutch</i>	5	330	Συνεχής περιορισμός
	5	270	Συνεχής περιορισμός σε ισοτονικό διάλυμα
	20	474	Συνεχής περιορισμός σε θαλασσινό νερό
	8	189	30 min έντονος περιορισμός
Salmonidae <i>Oncorhynchus mykiss</i>	76	250	2 h κολύμβηση, 1 BL/s*
	72	300	2 h κολύμβηση, 2,6 BL/s*
	70	326	2 h κολύμβηση, 5 BL/s*
Salmonidae <i>Oncorhynchus mykiss</i>	<2	50	6 h μεταφορά
	3	65	8 h μεταφορά
	<2	35	8 h μεταφορά, αλάτι
	45	100	8 h μεταφορά, κρύο νερό
	45	85	8 h μεταφορά, κρύο νερό κα αλάτι

Οικογένεια και είδος	Κορτικοστεροειδή (ng/mL)		Συνθήκες καταπόνησης
	Πριν το στρες	Μετά το στρες	
	35 9 23	205 140 340	6 h περιορισμός 30 s χειρισμός, pH 6,6 30 s χειρισμός, pH 4,2
Salmonidae <i>Oncorhynchus mykiss</i>	2 10 3	155 480 9	12 h περιορισμός, ψάρι ιχθυοτροφείου 12 h περιορισμός, ψάρι στο φυσικό περιβάλλον Περιορισμός για 6 εβδομάδες
Cyprinidae <i>Cyprinus carpio</i>	10 10 43 46 55	250 583 260 315 340	15 min περιορισμός 30 min περιορισμός Μεταφορά από λίμνη στη δεξαμενή Χειρισμός 2 h μεταφορά
Catostomidae <i>Carpoides carpio</i>	31	165	2 h μεταφορά
Salmonidae <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	<10 5 5	100 75 50	Μεταφορά από δεξαμενή με κουβά Μεταφορά σε δεξαμενή Μεταφορά σε δεξαμενή με αναισθητοποίηση
Salmonidae <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	5 5 15	280 350 310	72 h περιορισμός, 7,5 °C 72 h περιορισμός, 12,5 °C 72 h περιορισμός, 21 °C
Salmonidae <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	61 30 32	182 264 476	30 s χειρισμός 2 χειρισμοί των 30 s 3 χειρισμοί των 30 s

*BL/s: μήκος σώματος ανά sec

Στη συνέχεια αναλύεται η επίδραση ορισμένων από τους παράγοντες που προαναφέρθηκαν.

3.3.1 Ασιτία

Σε περιόδους στήρησης τροφής παρατηρούνται μεταβολές στους νευροδιαβιβαστές, οι οποίες εξαρτώνται βέβαια και από το είδος του ψαριού. Έτσι, αναφέρεται ότι ενώ μέλη των κυπρινοειδών, όπως το γληνί (*Tinga tinga*) και το χρυσόψαρο (*Carassius auratus*) είχαν παρόμοιο περιεχόμενο

υποθαλάμου σε κατεχολαμίνες, υπήρξε διαφοροποίηση στις κατεχολαμίνες κατά την περίοδο ασιτίας, οι οποίες μειώθηκαν στο χρυσόψαρο ενώ αυξήθηκαν στο γληνί. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε αυξημένη περιεκτικότητα σε νορεπινεφρίνη και ντοπαμίνη στον υποθάλαμο στο γληνί, γεγονός που αποδίδεται τόσο στη μεγαλύτερη ευαισθησία που παρουσιάζει το συγκεκριμένο είδος σε παράγοντες καταπόνησης, όσο και στο μοτίβο σίτισης, το οποίο είναι νυχτερινό σε αντίθεση με το χρυσόψαρο που έχει ημερήσια δραστηριότητα διατροφής (Pedro et al., 2001).

3.3.2 Ακραίες θερμοκρασίες περιβάλλοντος

Η έκθεση ιχθύων σε χαμηλές θερμοκρασίες, ιδιαίτερα όταν συνδυάζονται με άλλους χειρισμούς που προκαλούν στρες έχει αναφερθεί ως αιτία θνησιμότητας. Σε σολωμούς που εκτέθηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες νερού δεξαμενής παρατηρήθηκαν λειτουργικές διαταραχές και ανωμαλίες στο πεπτικό σύστημα, με κυριότερες τη μειωμένη ή και πλήρη διακοπή της απορρόφησης νερού από τα έντερα. Ειδικότερα αναφέρθηκαν αυξημένα επίπεδα ώσμωσης στον ορό του αίματος, γλυκόζης στο αίμα, μειωμένη σωματική υγρασία, χαμηλά επίπεδα γλυκογόνου στο συκώτι και αυξημένη θνησιμότητα (Belkovskii, et al. 1991).

Σε εκτρεφόμενους ιχθείς του είδους *Oreochromis mossambicus* η σταδιακή πτώση της θερμοκρασίας από τους 20°C στους 10°C με ρυθμό 1 °C ανά ώρα είχε ως αποτέλεσμα σταδιακή μείωση της αναπνευστικής συχνότητας, με εμφάνιση αναπνευστικής ανεπάρκειας κάτω από θερμοκρασία 14°C (Huaying & Beocheng, 1987, όπως αναφέρεται από τον Παπαφωτίου, 1997).

Η παραμονή ενήλικων ατόμων ιριδιζουσας πέστροφας και σολωμού σε χαμηλές θερμοκρασίες είχε ως αποτέλεσμα την επιβράδυνση της σεξουαλικής ωρίμανσης, ενώ ελάχιστος αριθμός θηλυκών ατόμων εναπόθεσαν αβγά. Τόσο σε γλυκό, όσο και σε θαλασσινό νερό η θνησιμότητα που καταγράφηκε ήταν υψηλή, ενώ προσδιορίστηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις χλωρίου και γλυκόζης στο αίμα (Albrektsen & Torrissen. 1988).

Η παραμονή ιχθύων του είδους *Channa punctatus* σε θερμοκρασίες 30°C και 35 °C είχε ως αποτέλεσμα την καταπόνηση τους με συμπτώματα την απώλεια βάρους, ενώ η παραμονή τους σε θερμοκρασία 25°C δεν είχε επίδραση στην αύξηση παρόλο που η συνήθης θερμοκρασία παραμονής του είδους ήταν οι 14°C. Τα αποτελέσματα βιοχημικών αναλύσεων έδειξαν χαμηλά επίπεδα γλυκόζης του αίματος και εξαντλημένα αποθέματα γλυκογόνου στο ήπαρ και στους μύες μετά από παραμονή μίας εβδομάδας στους 35°C και τεσσάρων εβδομάδων στους 30 °C (Dheer, 1988).

3.3.3 Χειρισμοί

Οι χειρισμοί και η μεταφορά είναι εγγενώς στρεσογόνα γεγονότα. Απομάκρυνση του ψαριού από το νερό προκαλεί μια μέγιστη φυσιολογική ανταπόκριση και θα πρέπει να πραγματοποιείται μόνο όταν είναι απολύτως απαραίτητο. Για παράδειγμα, στην τσιπούρα (*S. aurata*), η έκθεση στον αέρα για 3 λεπτά είχε ως αποτέλεσμα μια αύξηση στα επίπεδα κορτιζόλης στο πλάσμα κατά πενήντα φορές μέσα σε διάστημα 30 λεπτών (Ashley, 2007).

3.3.4 Μεταφορά

Η μεταφορά εκθέτει τα ψάρια σε μια σειρά από στρεσογόνα ερεθίσματα κατά τις διάφορες φάσεις της, όπως:

- κατά τη διάρκεια των χειρισμών που προηγούνται της μεταφοράς (π.χ. αποστράγγιση των λιμνών, ασιτία προ της μεταφοράς για τον καθαρισμό του εντέρου)
- κατά τη φόρτωση (π.χ. από τη χρήση διχτυών) και
- κατά τη διάρκεια του ταξιδιού (π.χ. από ανεπαρκή συντήρηση της ποιότητας του νερού που οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου και τη δημιουργία CO₂ και προϊόντων απέκκρισης).

Όπως έχει προκύψει από αριθμό μελετών σε πολλά είδη ψαριών, η αρχική φόρτωση των ψαριών στα δοχεία μεταφοράς είναι η πιο στρεσογόνα φάση της διαδικασίας μεταφοράς (fishcount.org.uk, 2014).

Αποτέλεσμα της μεταφοράς είναι οι τραυματισμοί που ενδέχεται να υποστούν τα ψάρια, καθώς και η αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης.

3.3.5 Αυξημένη πυκνότητα

Η υπερβολική πυκνότητα των ψαριών στις δεξαμενές πριν από τις διαδικασίες διαχείρισης μπορεί να είναι στρεσογόνος, καθώς υπάρχει πιθανότητα πρόκλησης μείωσης του διαθέσιμου οξυγόνου και υποβάθμισης της ποιότητας του νερού, αυξημένες πιθανότητες τριβής, και ταχείες μεταβολές στην ένταση του φωτός. Ορισμένα είδη προσαρμόζονται καλά κατά τη διατήρηση σε υψηλές πυκνότητες, ωστόσο, άλλα είδη εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά τον περιορισμό τους υπό τέτοιες συνθήκες τοκετό. Έρευνες έχουν δείξει ότι η ικανότητα των ψαριών να ανταποκριθεί σε οξείς στρεσογόνους παράγοντες, όπως ο συνωστισμός, μπορεί να επηρεαστεί από την μακροχρόνια παραμονή σε συνθήκες αιχμαλωσίας. Για παράδειγμα, τσιπούρες (*S. aurata*) που διατηρήθηκαν υπό συνθήκες συνωστισμού για περισσότερες από 14 ημέρες εμφάνισαν καταστολή της απόκρισης της κορτιζόλης σε οξύ χειρισμό, πιθανόν ως αποτέλεσμα αρνητικής επίδρασης από χρόνια αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης (Barton et al . 2005). Το στρες κατά τη διάρκεια του συνωστισμού μπορεί επίσης να επηρεάσει την ανταπόκρισή των ιχθύων σε περαιτέρω στρεσογόνους παράγοντες, όπως η σύλληψη.

3.4 Πρόληψη της καταπόνησης των ιχθύων

Η εφαρμογή ορθών πρακτικών διαχείρισης, που συνεπάγεται τη διατήρηση καλής ποιότητας νερού, την πρόληψη των τραυματισμών και του

στρες κατά τη διάρκεια το χειρισμού, την παροχή καλής διατροφής και την εφαρμογή διαδικασιών εξυγίανσης αποτελεί το καλύτερο μέτρο ελέγχου για την ελαχιστοποίηση των ασθενειών και του θανάτου των ψαριών. Στη συνέχεια αναπτύσσονται πρακτικές διαχείρισης που συμβάλλουν στην πρόληψη του στρες και των θανάτων των ψαριών εξαιτίας αυτού (Rottmann et al. 1992).

3.4.1 Ποιότητα νερού

Πρακτικές που θα πρέπει να εφαρμόζονται σχετικά με τη διαχείριση του νερού είναι οι ακόλουθες:

- ❖ Να μην υπερβαίνεται η φέρουσα ικανότητα των ψαριών σε λίμνες και δεξαμενές.
- ❖ Να παρακολουθούνται οι ποιοτικοί παράμετροι του νερού.
- ❖ Να διατηρούνται τα επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου πάνω από 5 mg/L. Επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου μικρότερα από τα άριστα, ενώ δεν είναι άμεσα θανατηφόρα, μπορεί να προκαλέσουν στρες στα ψάρια, με αποτέλεσμα σε καθυστερημένη θνησιμότητα.
- ❖ Να παρεμποδίζεται η συσσώρευση οργανικών απορριμμάτων, αζωτούχων αποβλήτων (αμμωνία και νιτρικά), διοξειδίου του άνθρακα και υδρόθειου.
- ❖ Να διατηρούνται τα κατάλληλα επίπεδα pH, αλκαλικότητας και θερμοκρασίας για το είδος που εκτρέφεται (Rottmann et al. 1992).

3.4.2 Χειρισμός και μεταφορά

Πρακτικές που θα πρέπει να εφαρμόζονται σχετικά με τον χειρισμό και τη μεταφορά των ψαριών είναι οι ακόλουθες:

- ❖ Εφαρμογή μεθόδων σύλληψης που ελαχιστοποιούν τις σωματικές βλάβες και την καταπόνηση στα ψάρια. Είναι σημαντική η αποφυγή τραυματισμών των λεπιών και απομάκρυνσης της βλέννας, η οποία θα επιτρέψει την είσοδο παθογόνων.
- ❖ Όταν είναι δυνατόν, χρήση πλεκτών διχτυών αντί διχτυών με κόμπους για τη μείωση των τραυματισμών και την απώλεια λεπιών.
- ❖ Αποφυγή μεγάλου βάρους μέσα στα χρησιμοποιούμενα δίχτυα.
- ❖ Ο χειρισμός των ψαριών να γίνεται με ταχύτητα και ευγένεια.
- ❖ Ελαχιστοποίηση του αριθμού των εξόδων των ψαριών από το νερό και μεταφορά των ψαριών με τη μέγιστη δυνατή ταχύτητα.
- ❖ Ο χειρισμός των ψαριών να πραγματοποιείται με βρεγμένα χέρια γιατί είναι σημαντικό να διατηρείται το ψάρι υγρό.
- ❖ Η μεταφορά των ψαριών μέσα σε ποσότητα νερού φαίνεται ότι είναι η λιγότερο στρεσογόνος τεχνική και προκαλεί λιγότερους τραυματισμούς.
- ❖ Η συλλογή, ο χειρισμός και η μεταφορά των ψαριών θα πρέπει να γίνεται σε περιόδους που τα ψάρια είναι λιγότερο επιρρεπή στο στρες και τη μόλυνση.
- ❖ Οι δεξαμενές μεταφοράς και διατήρησης θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλες ώστε να επιτρέπουν στα ψάρια πλήρη ελευθερία κινήσεων και να μην έχουν αιχμηρές γωνίες ή ακμές που θα μπορούσαν να τραυματίσουν τα ψάρια.
- ❖ Διατήρηση βέλτιστων συνθηκών νερού κατά τη σύλληψη, μεταφορά και χειρισμό των ψαριών.
- ❖ Διατήρηση υψηλού επιπέδου διαλυτού οξυγόνου για την ταχεία ανάκαμψη των ψαριών από τον αγώνα της σύλληψης και του χειρισμού.

- ❖ Χρήση αλατιού, σε ποσοστό 0,3-1,0% στο νερό μεταφοράς για τον περιορισμό του υδατικού στρες και της βακτηριακής προσβολής για τα ψάρια του γλυκού νερού.
- ❖ Προσθήκη πάγου στο νερό κατά τη μεταφορά για την παρεμπόδιση της αύξησης της θερμοκρασίας του νερού, αφού απότομες μεταβολές θερμοκρασίας είναι στρεσογόνες για τα ψάρια. Άμεση συνέπεια αποτελεί η μείωση της ικανότητας συγκράτησης οξυγόνου του νερού και η αύξηση του μεταβολικού ρυθμού και του απαιτούμενου οξυγόνου από τα ψάρια (Ashley, 2006, Rottmann et al. 1992).

Οι στρεσογόνοι παράγοντες που σχετίζονται με τον συνωστισμό μπορεί να περιοριστούν στο ελάχιστο με την εφαρμογή των κατάλληλων τεχνικών διαχείρισης. Οι κατευθυντήριες γραμμές της HSA (2005) προτείνουν ότι η καλή διαχείριση περιλαμβάνει:

- την εφαρμογή αργής και ήπιας τεχνικής,
- την αξιολόγηση της ποιότητας των υδάτων,
- την προσθήκη οξυγόνου στο νερό εφόσον τα επίπεδα πέσουν κάτω από μία κρίσιμη τιμή 6 mg/l,
- τη στενή παρακολούθηση της συμπεριφοράς και της δραστηριότητας των ψαριών.

Η μεταφορά των ιχθύων σε χαμηλή θερμοκρασία αυξάνει την πυκνότητα πληθυσμού που είναι ανεκτή από τα ψάρια ως αποτέλεσμα της μείωσης του μεταβολισμού τους και κατά συνέπεια των απαιτήσεων τους σε οξυγόνο (fishcount.org.uk, 2014).

Η χρήση αναισθητικών ουσιών μπορεί να συμβάλλει στη μείωση της καταπόνησης, ωστόσο καμία τέτοια ουσία δεν έχει προς το παρόν άδεια κυκλοφορίας στην Ευρωπαϊκή Ένωση ως τροφή των ιχθύων, καθώς περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το καθεστώς αδειοδότησης των φαρμάκων (fishcount.org.uk, 2014). Αναισθητικά όπως η ισο-ευγενόλη διαλύονται στο νερό πριν τοποθετηθούν σε αυτό τα ψάρια που θα οδηγηθούν για σφαγή. Όταν

τα ψάρια πρόκειται να παραμείνουν στο νερό, χρησιμοποιείται ο κορεσμός του νερού με διοξείδιο του άνθρακα (HAS, 2014).

3.4.3 Διατροφή

Πρακτικές που θα πρέπει να εφαρμόζονται σχετικά με τη διατροφή των ψαριών είναι οι ακόλουθες:

- ❖ Παροχή υψηλής ποιότητας διατροφής που ικανοποιεί τις διατροφικές ανάγκες των ειδών.
- ❖ Εφαρμογή κατάλληλου ρυθμού τροφοδοσίας (θα πρέπει να αποφεύγεται η υπερβολική παροχή τροφής, όπως και η ασιτία).
- ❖ Αποθήκη ζωοτροφών σε δροσερό και ξηρό μέρος για να αποτραπεί η αλλοίωση των ιχθυοτροφών (Rottmann et al. 1992).

3.4.4 Εξυγίανση

Πρακτικές που θα πρέπει να εφαρμόζονται σχετικά με την εξυγίανση των δεξαμενών είναι οι ακόλουθες:

- ❖ Εφαρμογή πρακτικών καλής εξυγίανσης για τον καθαρισμό εξοπλισμού, λιμνών και δεξαμενών.
- ❖ Εφαρμογή απολύμανσης σε δίκτυα, δοχεία και εξοπλισμό για την αποφυγή μετάδοσης ασθενειών και παρασίτων από έναν πληθυσμό σε άλλον.
- ❖ Απομόνωση νέων ψαριών και παρατήρηση τους για σημάδια θνησιμότητας. Αποστολή δειγμάτων σε εργαστήριο για να αξιολογηθούν για ασθένειες, ιούς και παρασιτώσεις.
- ❖ Απομάκρυνση όλων των νεκρών ψαριών από ένα σύστημα παραγωγής μόλις παρατηρηθούν και απόρριψη με κατάλληλο τρόπο ώστε να αποφευχθεί πιθανή διάδοση ασθενειών (Rottmann et al. 1992).

4. ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων διαφόρων συστατικών στο αίμα χρησιμοποιείται συνήθως για τη μέτρηση του στρες και συγκεκριμένα της αντίδρασης των ψαριών στον παράγοντα καταπόνησης. Τέτοιοι δείκτες, που χρησιμοποιούνται ευρέως, είναι η συγκέντρωση γλυκόζης στο πλάσμα και η συγκέντρωση κορτικοστεροειδών στο πλάσμα, όπως για παράδειγμα της κορτιζόλης (Barton, 2002).

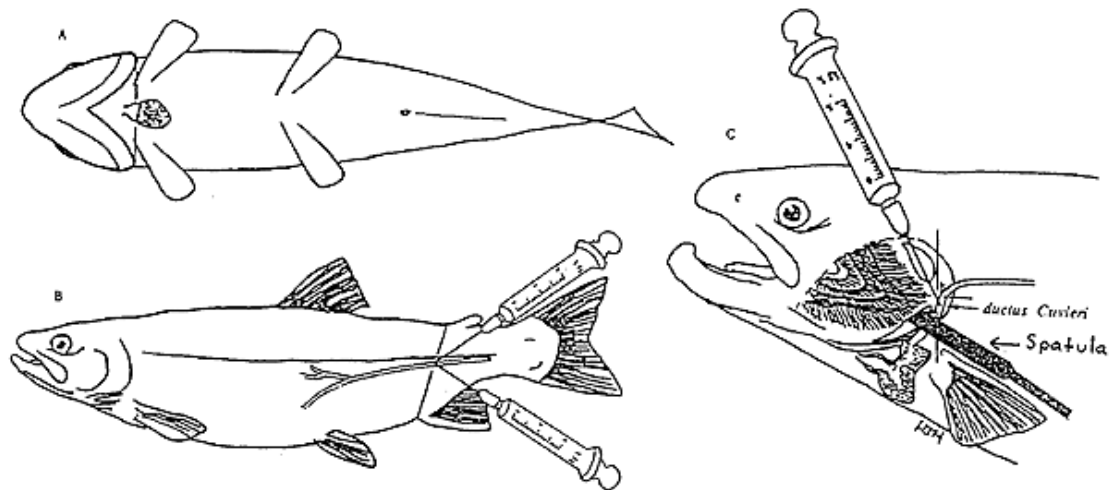
Στόχο της διεθνούς έρευνας αποτελεί η ανάπτυξη μεθόδων για την εκτίμηση της καταπόνησης σε εγκαταστάσεις εκτροφής (μετρήσεις πεδίου) με τη χρήση φορητών συσκευών, οι οποίες έχουν χαμηλότερο κόστος σε σύγκριση με τον συνήθως χρησιμοποιούμενο εργαστηριακό εξοπλισμό. Οι παράμετροι που είναι δυνατόν να υπολογιστούν με τέτοιες συσκευές είναι οι αιματολογικές (Iwama. et al. 1995). Ένας αριθμός αιματολογικών παραμέτρων έχει αποδειχτεί ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαπίστωση της κατάστασης της φυσιολογίας του ψαριού και τα επίπεδα της καταπόνησης αυτού. Για να πραγματοποιηθούν αυτές οι μετρήσεις θα πρέπει να ληφθεί και να αναλυθεί το αίμα του ψαριού, ενώ το δείγμα αίματος θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό.

4.1 Δειγματοληψία αίματος

Οι τεχνικές δειγματοληψίας που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι ακατάλληλες για την εφαρμογή σε νεαρά ιχθύδια, γι' αυτό μελετώνται κατά κύριο λόγο τα ενήλικα άτομα. Τα σημεία δειγματοληψίας και η τεχνική που εφαρμόζεται εξαρτάται από το είδος του ψαριού και την επιθυμητή ποσότητα δείγματος. Έτσι, κάποια από τα σημεία και οι τεχνικές δειγματοληψίας είναι τα εξής:

- Δειγματοληψία με διατομή του ουραίου μίσχου.
- Λήψη μεταβραγχιακών ή αρτηριακών δειγμάτων αίματος με διάτρηση της ραχιαίας αορτής

- Λήψη προβραγχιακών (φλεβικών) δειγμάτων αίματος από την κοιλιακή αορτή
- Λήψη προβραγχιακών δειγμάτων αίματος από διάτρηση της καρδιάς (η μέθοδος παρουσιάζει δυσκολίες)
- Λήψη δειγμάτων καρδιακού αίματος από το βολβό μετά από τομή της καρδιάς, από το φλεβώδες κοίλωμα ή τους αγωγούς του Cuvier.
- Λήψη δειγμάτων μίγματος αρτηριο - φλεβικού αίματος από τα ουριαία αγγεία
- Λήψη δειγμάτων αίματος από το κοινό θεμελιώδες αγγείο ή από τη γαστρική φλέβα
- Λήψη δειγμάτων αίματος με εφαρμογή κοκχικής τομής (Παπαφωτίου, 1997).



Εικόνα 5. Συνήθη σημεία δειγματοληψίας αίματος στα ψάρια

4.2 Συγκέντρωση γλυκόζης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα αποτελεί μία μέθοδο που χρησιμοποιείται συχνά. Έχει το πλεονέκτημα ότι δεν είναι απαραίτητη η χρήση ακριβού εξοπλισμού, καθώς μπορεί να πραγματοποιηθεί και με φορητούς μετρητές γλυκόζης, όπως είναι οι συσκευές που χρησιμοποιούν οι διαβητικοί (Παπαφωτίου, 1997).

Η γλυκόζη του αίματος αναφέρεται ότι μειώνεται σε πολλά είδη ιχθύων, υπό συνθήκες ασιτίας (παράγοντας στρες). Η μείωση της γλυκόζης στο αίμα οδηγεί στη γλυκόλυση προκειμένου να διατηρηθούν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, η οποία συνήθως δεν επαρκεί με αποτέλεσμα την πτώση των συγκεντρώσεων γλυκόζης στο αίμα αλλά και των συγκεντρώσεων γλυκογόνου στο ήπαρ μετά από μία εβδομάδα ασιτίας. Ωστόσο, όλα τα είδη ψαριών δεν παρουσιάζουν την ίδια αντίδραση στη στέρηση της τροφής. Ο βακαλάος, για παράδειγμα, αντιδρά στις συνθήκες αυτές μέσω της μείωσης χρησιμοποίησης της γλυκόζης, ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται η γλυκονεογένεση. Η διαφοροποίηση των ψαριών στην στέρηση της τροφής αποδίδεται σε ποικίλους παράγοντες που σχετίζονται με το είδος, αλλά και την ηλικία, το διατροφικό ιστορικό και την εποχή του έτους (Soengas et al., 1996).

Επιπλέον, άλλοι παράγοντες πέρα από την καταπόνηση επηρεάζουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα των ψαριών, όπως διατροφικοί, θερμοκρασιακοί, καθώς και παράγοντες που σχετίζονται άμεσα με την τεχνική, τη μέθοδο και τον εξοπλισμό δειγματοληψίας, καθώς και τη θερμοκρασία αποθήκευσης των δειγμάτων αίματος (Παπαφωτίου, 1997).

4.3 Συγκέντρωση κορτιζόλης

Η κορτιζόλη αποτελεί τον δείκτη στρες που προσδιορίζεται πιο συχνά, τόσο στα ψάρια, όσο και στον άνθρωπο. Τα επίπεδα της συγκέντρωσης κορτιζόλης στο πλάσμα θεωρούνται γενικότερα ένας βιοχημικός δείκτης καταπόνησης που δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα και μπορεί να ανιχνευτεί με

ευκολία. Χρησιμοποιείται από πολλούς ερευνητές (Reddy, & Leatherland, 1998). Το μειονέκτημα που παρουσιάζει οφείλεται στο γεγονός ότι διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τα επίπεδα του. Ενδεικτικά αναφέρονται οι εξής παράγοντες:

- Οι συνθήκες εκτροφής
- Η σύλληψη των ιχθύων και η αιμοληψία,
- Το είδος της καταπόνησης (οξύ ή χρόνιο)
- Φυσικοί παράγοντες, όπως η αναπαραγωγική ωρίμανση, οι ημερήσιοι, εποχιακοί και ετήσιοι κύκλοι και το τροφικό πρότυπο (Φανουράκη, 2010).

Για παράδειγμα, σε περιπτώσεις στρες εξαιτίας της στέρησης τροφής η συγκέντρωση της κορτιζόλης δεν θεωρείται αξιόπιστος δείκτης. Υπάρχουν αναφορές ότι η ασιτία δεν επέφερε σημαντικές μεταβολές από στατιστική άποψη στα επίπεδα κορτιζόλης του πλάσματος σε ιχθείς των ειδών *Stizostedion vitreum* και *Oncorhynchus mykiss* (ιριδίζουσα πέστροφα), ενώ προκάλεσε αύξηση αυτών σε γατόψαρα (*Ictalurus punctatus*). Αυξημένα επίπεδα παρατηρήθηκαν και σε σολωμούς που βρισκόταν υπό συνθήκες ασιτίας (Ντανταλή, 2008).

Ο προσδιορισμός της κορτιζόλης στο πλάσμα είναι μία ανάλυση που προτιμάται από τους ερευνητές για την αξιολόγηση του στρες στα ψάρια, λόγω της ανταπόκριση της κορτιζόλης σε οξείς στρεσογόνους παράγοντες, της σχετικής ευκολίας του προσδιορισμού και της λειτουργικής σημασίας της στις φυσιολογικές διαδικασίες που επηρεάζουν την υγεία των ψαριών. Η κορτιζόλη απελευθερώνεται στα ψάρια κυρίως από τα ενδονεφρικά κύτταρα του κύριου νεφρικού ιστού, μετά από διέγερση της αδρενοκορτικοτροφικής ορμόνης (ACTH). Η απελευθέρωση ελέγχεται από αρνητική ανάδραση της κορτιζόλης στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης. Ωστόσο, αυτή η απόκριση στα ψάρια ενδέχεται να διαμορφώνεται επίσης από οπιοειδή πεπτίδια ή γοναδοτροπίνες (Barton and Iwama, 1991).

Η κορτιζόλη μετράται στο πλάσμα είτε με ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA) ή με την ανοσοχημική μέθοδο (ELISA). Στην περίπτωση των αβγών,

προνυμφών ή μικρόσωμων ενήλικων ψαριών, η κορτιζόλη συνήθως εξάγεται από ομογενοποιημένα ολόκληρου του σώματος, χρησιμοποιώντας οργανικούς διαλύτες όπως οξικό αιθυλεστέρα ή διαιθυλαιθέρα, μεταξύ άλλων. Αυτή η τεχνική έχει εφαρμοστεί σε πολλά ψάρια είδη, από zebrafish μέχρι οξύρρυγχος (Gusto et al. 2015).

4.4 Άλλοι αιματολογικοί δείκτες

Οι εξετάσεις αίματος και η αντίστοιχη αναλυτική μεθοδολογία που έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό παραμέτρων του αίματος στον άνθρωπο μπορούν, στην πλειοψηφία τους και μετά από κατάλληλη προσαρμογή να εφαρμοστούν και στα ψάρια. Επειδή οι αιματολογικές παράμετροι συχνά δεν είναι αξιόπιστες για την αξιολόγηση του επιπέδου καταπόνησης έχουν αναπτυχθεί και εφαρμόζονται τεχνικές προσδιορισμού και υπολογισμού βιοχημικών παραμέτρων του αίματος, οι οποίες δίνουν εικόνα για την κατάσταση του οργανισμού και επηρεάζονται από την καταπόνηση, οπότε όταν συνδυαστούν με τα αποτελέσματα αιματολογικών αναλύσεων είναι δυνατό να παρέχουν μία ολοκληρωμένη εικόνα για την εκτίμηση της επίδρασης του στρεσογόνου παράγοντα (Iwama et al. 1995).

Οι σημαντικότεροι δείκτες του αίματος που προσδιορίζονται στους ιχθείς είναι οι ακόλουθοι:

1. Αριθμός των ερυθροκυττάρων.
2. Προσδιορισμός της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη.
3. Υπολογισμός όγκων αίματος.
4. Κατανομή μεγεθών των ερυθροκυττάρων.
5. Ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης.
6. Εξίσωση καμπύλης του οξυγόνου.
7. Δραστηριότητα των ενζύμων των ερυθροκυττάρων.

8. Προσδιορισμός και υπολογισμός των λευκοκυττάρων, μονοκυττάρων θρομβοκυττάρων, λεμφοκυττάρων, μακροφάγων, ετερόφιλων, βασεόφιλων και εοσινόφιλων.

9. Υπολογισμός επιπέδων ορμονών και βιοχημικών ουσιών.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται η χρήση ορισμένων από τους δείκτες που αναφέρθηκαν (προσδιορισμός αιματοκρίτη, αιμοσφαιρίνης), καθώς και μερικών ακόμη, όπως ο προσδιορισμός των επιπέδων λακτάσης, γλυκόζης, και χλωρίου στο πλάσμα για να εκτιμηθεί ποσοτικά η καταπόνηση σε εκτρεφόμενους σολωμούς. Η καταπόνηση προήλθε ως αποτέλεσμα συγκεκριμένων ανθρώπινων χειρισμών όπως η εφαρμογή αναισθησίας, η μεταφορά του ψαριού από τα γλυκά στα θαλάσσια νερά, η ταξινόμηση, η διαλογή, το ζύγισμα, καθώς και περιβαλλοντικές μεταβολές που αφορούσαν στη θερμοκρασία, το pH, το οξυγόνο κ.α. (Παπαφωτίου, 1997).

4.5 Προβλήματα στη χρήση αιματολογικών δεικτών

«Φυσιολογικές τιμές» παραμέτρων

Το προβληματικό σημείο στη χρήση των αιματολογικών παραμέτρων είναι ο καθορισμός των τιμών των παραμέτρων που θα θεωρηθούν «φυσιολογικές» και με βάση αυτές θα κριθούν οι υπόλοιπες μετρήσεις για να εκτιμηθούν οι συνθήκες καταπόνησης στις εκτροφές ιχθύων και να διαγνωστούν μολύνσεις από παθογόνα. Συχνά το εύρος τιμών των αιματολογικών παραμέτρων που θεωρούνται φυσιολογικές είναι πολύ μεγάλο στα ψάρια, εξαιτίας της ιδιαιτερότητας τους ως υδρόβια ποικιλόθερμα να παρουσιάζουν άμεση απόκριση στις αλλαγές του περιβάλλοντος τους.

Επίδραση χειρισμών στις τιμές παραμέτρων

Ένα επιπλέον πρόβλημα που παρουσιάζει ο προσδιορισμός παραμέτρων στο αίμα είναι η επίδραση των χειρισμών για τη σύλληψη, ακινητοποίηση, αναισθητοποίηση και αιμοληψία στο ίδιο το ψάρι και στις τιμές των παραμέτρων που θα προσδιοριστούν, καθώς οι χειρισμοί αποτελούν

στρεσογόνους παράγοντες. Η αναισθητοποίηση εφαρμόζεται ή όχι ανάλογα με την ανάγκη να διατηρηθεί εν ζωή το ψάρι μετά τη δειγματοληψία. Εφόσον αυτό δεν είναι απαραίτητο η αναισθητοποίηση μπορεί να αντικατασταθεί από την εφαρμογή συντριπτικού χτυπήματος του ψαριού μπροστά από το σημείο συμβολής του κρανίου και της σπονδυλικής στήλης, με το οποίο προκαλείται ανεπανόρθωτη ζημιά στο κεντρικό νευρικό σύστημα και ακαριαία ακινητοποίηση.

Διαχείριση δείγματος

Επιπλέον, η διαχείριση του δείγματος αίματος μετά τη δειγματοληψία φαίνεται ότι επιδρά στο αποτέλεσμα. Για παράδειγμα, η διατήρηση του δείγματος πριν την ανάλυση μπορεί να προκαλέσει πήξη του αίματος, ενώ η προσθήκη αντιπηκτικών παραγόντων έχει διάφορες επιδράσεις, ανάλογα με τον τύπο και τη δοσολογία της αντιπηκτικής ουσίας που θα χρησιμοποιηθεί (πχ. ηπαρίνη, EDTA, κλπ.) (Παπαφωτίου, 1997).

Επίδραση χρονικών μεταβολών

Σε αρκετά είδη ιχθύων αναφέρονται μεταβολές σε διάφορες παραμέτρους του αίματος με βάση την εποχή του έτους ή και την ώρα της ημέρας. Για παράδειγμα, στα είδη *Gadus morhua* και *Hippoglossoides platessoides*, διαπιστώθηκαν διακυμάνσεις σε παραμέτρους που μετρήθηκαν στο αίμα, όπως γλυκόζη, κορτιζόλη, αιμοσφαιρίνη, αιματοκρίτης, συγκέντρωση ιόντων νατρίου, χλωρίου και καλίου, παράμετροι ώσμωσης, ανάλογα με την εποχή του έτους (Audet et al. 1993). Στη μουρούνα διαπιστώθηκαν διακυμάνσεις στην αιμοσφαιρίνη ανάλογα με την ώρα της ημέρας. Στην πέστροφα, διατηρούμενη κάτω από φυσική φωτοπερίοδο και θερμοκρασία νερού, παρατηρήθηκαν εποχιακές διακυμάνσεις στα επίπεδα των παραμέτρων της ώσμωσης, στη συγκέντρωση χλωρίου, γλυκόζης, κορτιζόλης, θυροειδών ορμονών στο πλάσμα και αιματοκρίτης στο αίμα.

Στον κυπρίνο η μεταβολή των επιπέδων γλυκόζης και ελεύθερων λιπαρών οξέων στο αίμα παρουσιάζει συγκεκριμένο ημερήσιο ρυθμό

διακύμανσης, ενώ το ίδιο παρατηρήθηκε και στην πέστροφα αναφορικά με τα επίπεδα των παραμέτρων ώσμωσης, κορτιζόλης και θυροξίνης, ωστόσο οι διακυμάνσεις διέφεραν και βάσει εποχής. Εποχιακές μεταβολές παρατηρήθηκαν στις παραμέτρους της ώσμωσης, στη συγκέντρωση χλωρίου, γλυκόζης και θυροξίνης και σε είδη σολωμών (Audet and Claireaux, 1992).

5. ΑΛΛΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ

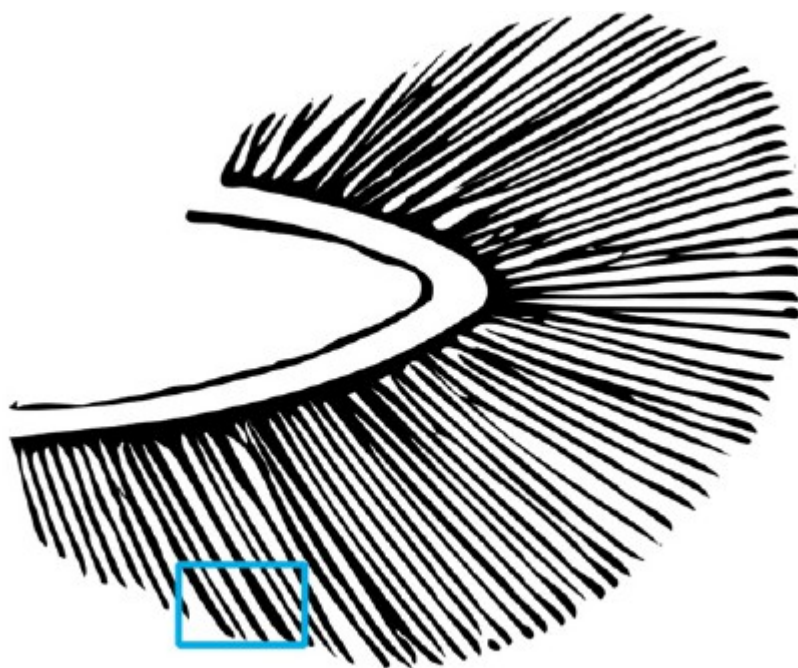
5.1 Μη επεμβατικές μέθοδοι

Τα τελευταία χρόνια ερευνάται η δυνατότητα αξιολόγησης τη καταπόνησης των ιχθύων με την εφαρμογή μη-επεμβατικών μεθόδων και την ανάπτυξη μη-επεμβατικών δεικτών.

Οι μη-επεμβατικές μέθοδοι δεν διαταράσσουν τα ψάρια, καθώς δεν απαιτείται η εφαρμογή αναισθησίας, αιμοληψία ή άλλου είδους χειρισμών, γεγονός που αποτελεί και το σημαντικότερο πλεονέκτημα αυτών των μεθόδων. Επιπλέον, είναι δυνατή η επανάληψη τη δειγματοληψίας νερού από τον ίδιο πληθυσμό ιχθύων, καθώς και η ηθολογική και φυσιολογική παρακολούθηση. Ακόμη, είναι δυνατός ο προσδιορισμός της καταπόνησης μικρών σε ηλικία ψαριών ή και σπάνιων ειδών (Φανουράκη, 2010).

Παράδειγμα μη-επεμβατικής μεθόδου αποτελεί ο προσδιορισμός της ελεύθερης κορτιζόλης στο νερό της δεξαμενής όπου διατηρούνται τα ψάρια. Τα διαθέσιμα πρωτόκολλα για τον προσδιορισμό της κορτιζόλης έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα το καθένα. Η Φανουράκη (2010) εφάρμοσε ένα τέτοιο πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό της ελεύθερης κορτιζόλης στο νερό της δεξαμενής που περιέχει τα ψάρια. Η ελεύθερη κορτιζόλη απελευθερώνεται παθητικά από τα βράγχια των ιχθύων, ως αποτέλεσμα της διαφορετικής συγκέντρωσης της ουσίας στο πλάσμα και στο νερό της δεξαμενής. Ωστόσο, η απελευθερωμένη κορτιζόλη που προσδιορίζεται, προέρχεται από όλα τα μέλη που αποτελούν τον πληθυσμό της δεξαμενής και ο ρυθμός με τον οποίο απελευθερώνεται διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα είδη ψαριών, αλλά και στα ψάρια διαφόρων μεγεθών, ενώ επηρεάζεται και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα τη θερμοκρασία του νερού της δεξαμενής. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την απελευθέρωση της κορτιζόλης από κάθε ψάρι φαίνεται ότι σχετίζονται με τα βράγχια των ιχθύων, και ειδικότερα με την επιφάνεια και τη διαπερατότητα αυτών, καθώς και με τη βραγχιακή ροή αίματος και νερού (Φανουράκη, 2010).

Έχουν αναπτυχθεί ακόμη μέθοδοι για την ανίχνευση της κορτιζόλης στη βλέννα και στα λέπια των ιχθύων, ενώ οι Gesto et al (2015) μελέτησαν τη δυνατότητα προσδιορισμού της κορτιζόλης στις ίνες των βραγχίων ως αποτελεσματική μέθοδο εκτίμηση της καταπόνησης που προέρχεται από την καταδίωξη των ιχθύων (εφαρμογή πρωτοκόλλου καταδίωξης διάρκειας 3 λεπτών). Διαπίστωσαν ότι υπάρχει η δυνατότητα μέτρησης της κορτιζόλης στα βράγχια σε μεγάλα ψάρια βάρους περισσότερο από 30g *in vivo*.



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση σημείου δειγματοληψίας 3-5 νηματίων από τα βράγχια ψαριού (Gesto et al. 2015)

Η δειγματοληψία ιστών από τα βράγχια (Εικόνα 6) είναι πολύ γρήγορη και εύκολη, και η διαδικασία δεν προκαλεί στρες στα ψάρια, αν εκτελεστεί σωστά, γεγονός που το καθιστά ιδανική επιλογή για την *in vivo* αξιολόγηση του στρες. Σε μικρά ψάρια, η χρήση ιστού των βραγχίων για τη μέτρηση της κορτιζόλης έχει σημαντικά τεχνικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις τρέχουσες μεθόδους που χρησιμοποιούν ομογενοποιημένα ολόκληρου του σώματος των ψαριών, ενώ η μέθοδος είναι ευκολότερη, ταχύτερη και πιο οικονομική. Ομογενοποιημένα δείγματα από τα βράγχια θα μπορούσαν να

χρησιμοποιηθούν απ' ευθείας για την ανάλυση της κορτιζόλης με την τεχνική ELISA, αποφεύγοντας την επίπονη και δαπανηρή διαδικασία εκχύλισης κορτιζόλης, ενώ η αναλυτική μέθοδος είναι περισσότερο φιλική προς το περιβάλλον δεδομένου ότι δεν απαιτείται οργανικός διαλύτης (Gesto et al. 2015).

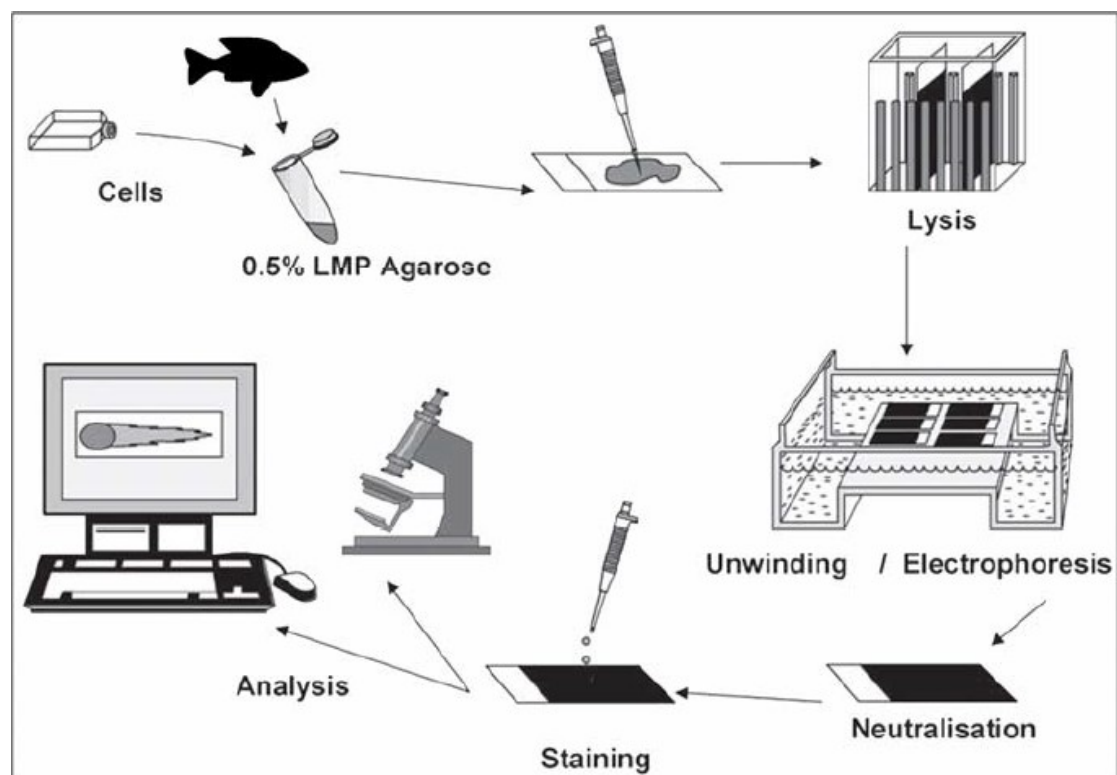
5.2 Προσδιορισμός μεταβολών στο DNA (Μέθοδος κομήτη)

Το στρες στους ιχθύες που εκτρέφονται εντατικά σε υδατοεκτροφές είναι ιδιαίτερα σημαντικό και αναζητούνται διεθνώς μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση του. Η καταπόνηση των ιχθύων έχει ως αποτέλεσμα να αυξηθούν τα επίπεδα ενδογενών ενώσεων, όπως τα υπεροξειδία, οι ελεύθερες ρίζες και το μονοξειδίο του αζώτου. Επακόλουθο αυτής της αύξησης είναι να ενεργοποιηθούν ένζυμα, όπως οι ενδονουκλεάσες και οι τοποϊσομεράσες (μέσω της αύξησης του ενδοκυτταρικού Ca^{++}), οι οποίες αυξάνουν το ποσοστό κερματισμού του DNA.

Τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της θραύσης αλυσίδων του DNA υδρόβιων οργανισμών περιλαμβάνουν την αλκαλική έκλουση, την αλκαλική εκδίπλωση, την αλκαλική συσσωμάτωση/καταβύθιση και την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται η τεχνική της ηλεκτροφόρησης ενός κυττάρου σε πηκτή αγαρόζης ή μέθοδος του κομήτη. Η μέθοδος του κομήτη πλεονεκτεί σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους, καθώς είναι ευαίσθητη, απαιτεί μικρά δείγματα οποιουδήποτε πληθυσμού ευκαρυωτικών κυττάρων και περιλαμβάνει την ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η μελέτη διαφοροποιήσεων ανάμεσα στα κύτταρα. Πιθανοί περιορισμοί υπάρχουν για τη χρήση της τεχνικής για την ανίχνευση γενοτοξικότητας που οφείλεται σε χημικές ουσίες. Η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μία αρχική μέθοδος ανίχνευσης βλάβης στο DNA οργανισμών, ενώ η φύση της βλάβης μπορεί να μελετηθεί στην πορεία με άλλες τεχνικές (Mitchelmore, & Chipman, 1998).

Η τεχνική του κομήτη είναι επίσης γνωστή και ως SCG. Αυτή η τεχνική εφαρμόζεται με σκοπό να ανιχνευτεί και να ποσοτικοποιηθεί η βλάβη του DNA σε μεμονωμένα κύτταρα. Η εφαρμογή της συγκεκριμένης τεχνικής περιλαμβάνει εν συντομία τα ακόλουθα στάδια, τα οποία απεικονίζονται και στην Εικόνα 7:

- ❖ Αρχικά προετοιμάζεται το κυτταρικό αιώρημα
- ❖ Στη συνέχεια επικαλύπτεται η αντικειμενοφόρος πλάκα με πηκτή αγαρόζης
- ❖ Ακολουθεί η λύση των κυττάρων
- ❖ Στη συνέχεια επέρχεται η αποπερίελιξη του DNA
- ❖ Τέλος, η εικόνα αναλύεται με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού (Malandrakis et al. 2014).



Εικόνα 7. Στάδια εφαρμογής της τεχνικής του κομήτη (Malandrakis et al. 2014)

Η ανάλυση του κομήτη χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της βλάβης του DNA σε διάφορους τύπους κυττάρων υπό συνθήκες καταπόνησης (Malandrakis et al. 2014). Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η αποτύπωση της πρωτογενούς αντίδρασης του οργανισμού στο στρες, όπου προκαλείται γενοτοξικότητα στα κύτταρα του ήπατος ως αποτέλεσμα του στιγμιαίου και έντονου στρες, η οποία θα μειωθεί στη συνέχεια εξαιτίας της δράσης των μηχανισμών επιδιόρθωσης.

Με την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου κατά τη διεξαγωγή της ηλεκτροφόρησης, το DNA, που είναι φορτισμένο αρνητικά θα κινηθεί προς την κάθοδο. Τα μη κατεστραμμένα (άθικτα) σκέλη του DNA εξαιτίας του μεγέθους τους δεν μετακινούνται, ενώ τα μικρότερα (κατεστραμμένα) τεμάχια διαθέτουν μεγαλύτερη κινητικότητα. Έτσι, η ποσότητα του DNA που μετακινείται αποτελεί ποσοτική ένδειξη της βλάβης του DNA στο κύτταρο. Επειδή η δομή αποτελείται από μία κυκλική κεφαλή που αντιστοιχεί στο άθικτο DNA που παραμένει στην κοιλότητα και μια ουρά που αντιστοιχεί στο κατεστραμμένο DNA, παρομοιάζεται με κομήτη. Το μήκος της ουράς και η φωτεινότητα αποτελούν ένδειξη υψηλής βλάβης στο DNA (Ντανταλή, 2008).

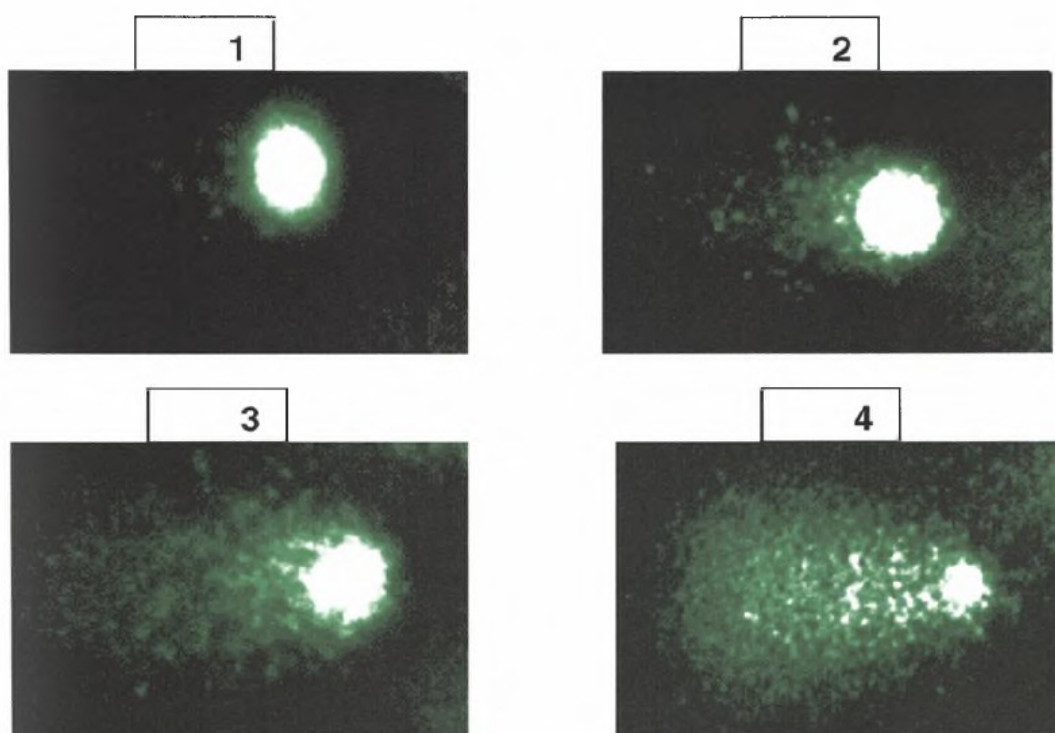
Η τεχνική επιτρέπει την ποσοτικοποίηση της βλάβης του DNA με τον προσδιορισμό της παραμέτρου Tail Moment (TM), η οποία ορίζεται ως το προϊόν του DNA στην ουρά και για τον οποίο συνυπολογίζονται τόσο το μήκος της ουράς, όσο και το κλάσμα του DNA στην ουρά του κομήτη.

Η σχέση που εφαρμόζεται για τον υπολογισμό είναι η εξής:

$$TM = (\text{ένταση ουράς/ολική ένταση του κομήτη}) \times (\text{κέντρο βαρύτητας της ουράς-κέντρο της κεφαλής})$$

Στην παραπάνω σχέση, το ποσοστό του DNA που έχει μετακινηθεί στην ουρά (δηλαδή ένταση ουράς/ολική ένταση του κομήτη) πολλαπλασιάζεται με τη μέση απόσταση της μετακίνησης στην ουρά (δηλαδή την απόσταση μεταξύ του κέντρου βαρύτητας της ουράς, το οποίο αντιστοιχεί στο σύνολο των θέσεων της ουράς διαιρεμένο με τον αριθμό των σημείων, και το κέντρο της κεφαλής (Malandrakis et al. 2014).

Στην Εικόνα 8 απεικονίζονται διαφορετικές εικόνες κομητών, με ποικίλους βαθμούς βλάβης του DNA.

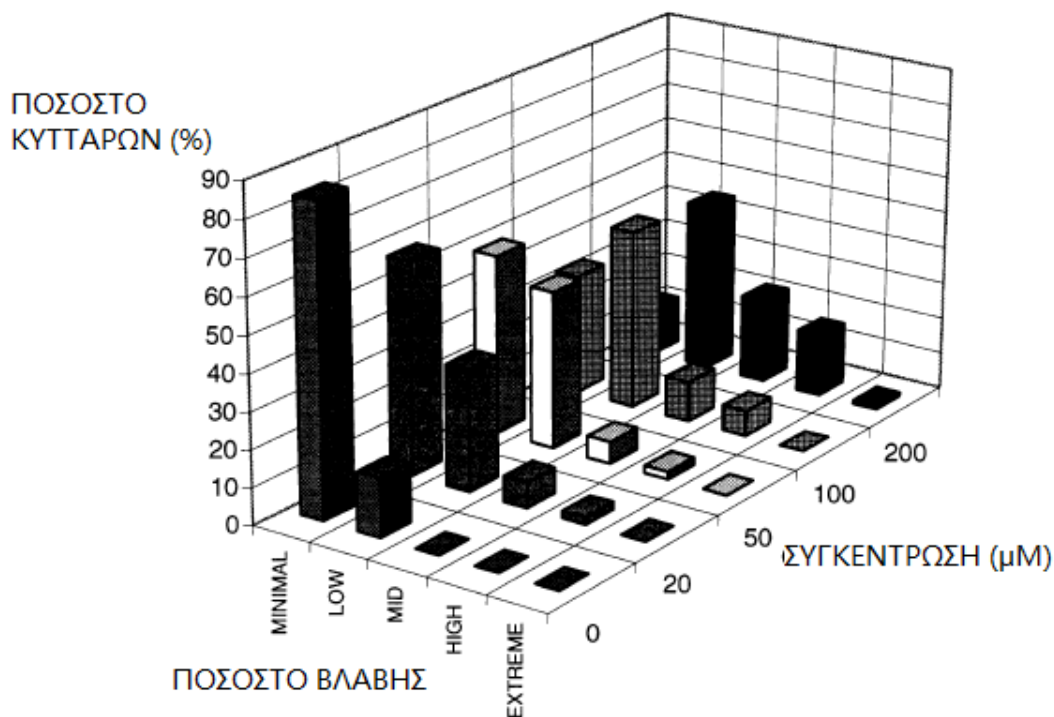


Εικόνα 8. Απεικόνιση κομητών, με ποικίλους βαθμούς βλάβης του DNA (1-2 μικρή βλάβη, 3-4 μεγάλη βλάβη) (Ντανταλή, 2008)

Η τεχνική θεωρείται απλή και ευαίσθητη, αν και σε συνθήκες υψηλής μεταβλητότητας μεταξύ των ατόμων μπορεί να περιοριστεί η ευαισθησία της. Έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για την ανίχνευση τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro* πιθανής ζημιάς στο DNA διαφόρων ιστών (βράγχια, συκώτι, αίμα) ιχθύων που έχουν εκτεθεί σε ποικίλες ουσίες στο υδρόβιο περιβάλλον τους. Διάφοροι παράγοντες, όπως είναι η ηλικία και το φύλο στο είδος *Limanda limanda*, ή η θερμοκρασία του νερού στον κέφαλο (*Mugil cephalus*) φαίνεται ότι επηρεάζουν το επίπεδο της ζημιάς του DNA στους ιχθείς, και κατά συνέπεια θα πρέπει να συνυπολογίζονται κατά τη διεξαγωγή μελετών επίδρασης των περιβαλλοντικών συνθηκών και πρόκλησης γενετοξικότητας στα ψάρια. Επιπλέον, υπάρχει περίπτωση πρόκλησης ζημιάς στο DNA κατά την εφαρμογή διαδικασιών χημικής και μηχανικής φύσεως για την παραλαβή των κυττάρων (Ντανταλή, 2008).

Η Ντανταλή (2008) που εφάρμοσε την τεχνική για την ποσοτικοποίηση της βλάβης του DNA που προκλήθηκε σε πέστροφες, οι οποίες υποβλήθηκαν σε αστία (στρεσογόνος παράγοντας) για διάστημα έξι εβδομάδων διαπίστωσε κλιμάκωση του μεταβολικού στρες σε διάστημα περίπου τριών βδομάδων αστίας, ενώ στη συνέχεια μείωση αυτού. Κατά τις πρώτες εβδομάδες αστίας παράγονται ελεύθερες ρίζες από τα μιτοχόνδρια, οι οποίες είναι προκαλούν βλάβες στο DNA, ενώ στο χρονικό διάστημα η βλάβη καταστέλλεται μέσω της δράσης μηχανισμών επιδιόρθωσης. Βέβαια, η κατάλληλη ανταπόκριση των μηχανισμών αυτών είναι καίριας σημασίας και σε περίπτωση αποτυχίας προκαλείται συσσώρευση της βλάβης στον πυρήνα των κυττάρων που μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στην καρκινογένεση (Ντανταλή, 2008).

Οι Mitchelmore, & Chipman, (1998) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο για να αριστοποιήσουν τις συνθήκες εφαρμογής της και να ελέγξουν την ευαισθησία της στην ανίχνευση χημικών ουσιών γενotoξικών για τα κύτταρα ψαριών in vitro. Στην Εικόνα 9 φαίνεται η επίδραση στην ακεραιότητα του DNA κυττάρων πέστροφας παρουσίας αυξανόμενων συγκεντρώσεων υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂).

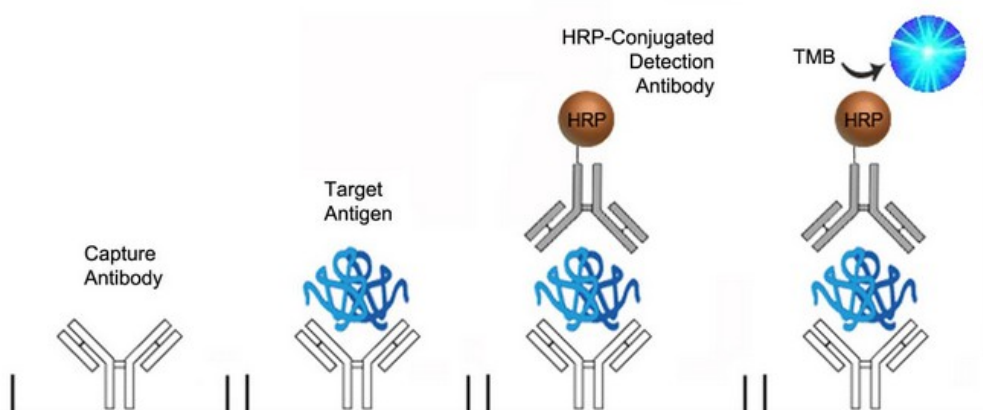


Εικόνα 9. Αντίδραση του πληθυσμού των ηπατοκυττάρων πέστροφας σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις H₂O₂ (Mitchelmore, & Chipman, 1998)

5.3 Προσδιορισμός αντιβακτηριακών πεπτιδίων των ιχθύων (ανοσοχημική μέθοδος)

Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMP) συντελούν στην έμφυτη ανοσία. Τα πεπτίδια πισκιδίνες είναι από τα πιο διαδεδομένα AMP στα ψάρια και διαθέτουν ισχυρή, ευρέως φάσματος δραστηριότητα κατά των ιών, βακτηρίων, μυκήτων και παρασίτων, οπότε μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του πολλών ψαριών έναντι των εισβολών. Οι Corrales et al. (2009) ανέπτυξαν μία ανοσοχημική μέθοδο sandwich ELISA για την ποσοτικοποίηση τους χρησιμοποιώντας ένα νέο πεπτίδιο πισκιδίνης (πισκιδίνη-4), το οποίο απομόνωσαν από εμπορικά καλλιεργούμενο λαβράκι (υβρίδιο λευκού λαβρακιού με γραμμωτό λαβράκι).

Η μέθοδος sandwich ELISA που ανέπτυξαν βασίστηκε στη χρήση ενός αντισώματος «σύλληψης» (πρωτογενές, αντι-FFHH), το οποίο έχει εξειδικευμένη δράση και δεσμεύεται από το τελικό αμινοξύ όλων των πισκιδινών, και ενός αντισώματος «ανίχνευσης» (δευτερογενές), που δεσμεύεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο αντισώματος σύλληψης- πισκιδίνης 4.



Εικόνα 10. Πρωτόκολλο sandwich ELISA (www.lsbio.com)

Εφαρμόζοντας τη μέθοδο διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα του πεπτιδίου πισκιδίνη-4 στα βράγχια υγιών γραμμωτών λαβρακιών βρισκόταν σε επίπεδα θανατηφόρα για γνωστά παθογόνα βακτήρια και τα μέσα επίπεδα του πεπτιδίου που ανιχνεύτηκαν σε υγιή ψάρια ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με παρασιτωμένα ψάρια ή με καταπονημένα ψάρια του ίδιου είδους, γεγονός που υποδεικνύει ότι το πεπτίδιο πισκιδίνη-4 μπορεί να μειωθεί σημαντικά υπό συνθήκες καταπόνησης ή ασθένειας και η μέθοδος να αποτελέσει έναν χρήσιμο και ταχύτατο δείκτη για την αξιολόγηση της υγείας ενός πληθυσμού (Corrales et al. 2009).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή έγινε προσπάθεια για να παρουσιαστούν διάφορες τεχνικές ποσοτικοποίησης του στρες στους ιχθείς, τα προβλήματα που προκύπτουν και οι τρόποι πιθανού επηρεασμού των αποτελεσμάτων.

Συνεπώς, δύναται να προσδιορίσουμε το στρες με αιματολογικούς δείκτες καταπόνησης, έπειτα από δειγματοληψία. Οι σημαντικότεροι δείκτες καταμέτρησης είναι η γλυκόζη και η κορτιζόλη στο πλάσμα του αίματος και χρησιμοποιούνται ευρέως από τους επιστήμονες, καθώς και άλλοι αιματολογικοί δείκτες όπως ο προσδιορισμός αριθμού ερυθροκυττάρων, αιμοσφαιρίνης, αιματοκρίτη, όγκου αίματος κ.λ.π. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται είτε με φορητές συσκευές αιματολογικής ανάλυσης είτε σε εργαστήριο, με την πρώτη μέθοδο να είναι οικονομικότερη και να προτιμάται από τους εκτροφείς. Όπως είναι φανερό, οι τεχνικές μέτρησης

καταπόνησης με αιματολογικούς δείκτες, εμπίπτει κινδύνους ως προς την σωστή μέτρηση λόγω λανθασμένου χειρισμού κατά τη διάρκεια, πριν και μετά την δειγματοληψία.

Αξίζει να αναφερθεί ότι για την περίπτωση του στρες που προκύπτει από αστιτία η κορτιζόλη δεν είναι ο κατάλληλος δείκτης μέτρησης καθώς σύμφωνα με έρευνες σε κάποια είδη όπως στην πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) δεν προκλήθηκαν σημαντικές μεταβολές, ενώ στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*) προκλήθηκε σημαντική αύξηση της κορτιζόλης.

Επιπλέον, υπάρχουν και άλλοι δείκτες καταπόνησης, με μεθόδους μη επεμβατικές, με σημαντικότερο πλεονέκτημα ότι δεν διαταράσσουν τους ιχθείς. Σημαντικότερες είναι η μέθοδος του κομήτη με προσδιορισμό μεταβολών στο DNA και η ανοσοχημική μέθοδος με προσδιορισμό αντιβακτηριακών πεπτιδίων των ιχθύων. Η πρώτη είναι μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδος η οποία ανιχνεύει και ποσοτικοποιεί το ποσοστό βλάβης του DNA σε μεμονωμένα κύτταρα, αποτυπώνοντας έτσι την γονοτοξικότητα των κυττάρων του ήπατος εξαιτίας του στρες. Όσον αφορά τη δεύτερη μέθοδο, πρόκειται για την ανοσοχημική μέθοδο sandwich ELISA. Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση της πισκιδίνης -4 που προέκυψε από απομόνωση της από καλλιεργούμενο λαβράκι.

Συμπερασματικά, καθώς προκύπτει η ανάγκη για μέτρηση της καταπόνησης στους ιχθείς έχει οδηγήσει τους ερευνητές σε πληθώρα ερευνών για εύρεση οικονομικών και αποτελεσματικών μεθόδων καταμέτρησης. Τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά και υποσχόμενα, αλλά υπάρχει ανάγκη περαιτέρω έρευνας καθώς αρκετοί δείκτες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στους ανθρώπινους χειρισμούς, θέτοντας αρκετά αποτελέσματα προς αμφισβήτηση. Επομένως είναι ιδιαίτερα σημαντική η σωστή επεξεργασία και προστασία των δειγμάτων, ώστε να εξασφαλιστεί η μικρότερη θνησιμότητα, με το μεγαλύτερο κέρδος για την κάθε επιχείρηση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική

- Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο (2016). Ευρωπαϊκή υδατοκαλλιέργεια.
http://www.europarl.europa.eu/atyourservice/el/displayFtu.html?ftuId=FTU_5.3.7.html
- Ντανταλή, Ο. (2008). Η επίδραση της αστίας στη διαμόρφωση των επιπέδων καταπόνησης (stress) στην τσιπούρα *Sparus aurata*. Προπτυχιακή διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Παπουτσόγλου, Σ. (1997). Εισαγωγή στις υδατοκαλλιέργειες. Αθήνα : Εκδόσεις Α. Σταμούλης
- Παπαφωτίου, Π. (1997). Μέθοδοι Υπολογισμού της Καταπόνησης (stress) στα Εκτρεφόμενα Ψάρια μέσω Αιματολογικών Αναλύσεων. Διπλωματική διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Φανουράκη, Ε. (2010). Μελέτη της καταπόνησης και ανάπτυξη μη-επεμβατικής μεθόδου προσδιορισμού της ελεύθερης κορτιζόλης στο θαλασσινό νερό σε μεσογειακά είδη ιχθύων, με έμφαση στο λαβράκι, *Dicentrarchus labrax*. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Χατζηπλή, Α. Δ. (2008). Η επίδραση της κακομεταχείρισης στη διαμόρφωση των επιπέδων καταπόνησης (stress) στην τσιπούρα *Sparus aurata*. Διπλωματική διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Χρούσος, Γ. Π. (2007). Στρες, εγκέφαλος και υγεία, Κοινωνία και υγεία, τομ. VI, σελ. 31-33.

Ξενόγλωσση

- Albrektsen, S., & Torrissen, O. (1988). Physiological changes in blood and seminal plasma during the spawning period of maturing rainbow trout held under different temperature and salinity regimes, and the effect on survival of the broodstock and the eyed eggs. International Council for the Exploration of the Sea (ICES), Institute of Marine Research. Norway.
- Ashley, P. J. (2006). Fish welfare: current issues in aquaculture. Applied Animal Behaviour Science, 104(3), 199-235.

- Audet, C., Besner, M., Munro, J., & Dutil, J. D. (1993). Seasonal and diel variations of various blood parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and American plaice (*Hippoglossoides platessoides*). *Canadian journal of zoology*, 71(3), 611-618.
- Audet, C., & Claireaux, G. (1992). Diel and seasonal changes in resting levels of various blood parameters in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(5), 870-877.
- Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and comparative biology*, 42(3), 517-525.
- Barton, B. A., & Iwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1, 3-26.
- Barton, B.A., Ribas, L., Acerete, L., Tort, L., 2005. Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. *Aquacult. Res.* 36, 172–179.
- Belkovskii, N. M., Chernitskii, A. G., & Lega, Y. V. (1991). Effect of drinking fresh or sea-water on physiological condition of salmon kept in sea-water. *Journal of evolutionary biochemistry and physiology*, 27(3), 259-262.
- Bonga, S. W. (1997). The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77(3), 591-625.
- Corrales, J., Gordon, W. L., & Noga, E. J. (2009). Development of an ELISA for quantification of the antimicrobial peptide piscidin 4 and its application to assess stress in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(2), 154-163.
- Dheer, J.M.S. (1988). Haematological, haematopoietic and biochemical responses to thermal stress in an air-breathing freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Journal of fish biology*, 32(2), 197-206.

- Food and Agriculture Organization of the United nations – FAO (2016). Global Aquaculture Production.
- Gesto, M., Hernández, J., López-Patiño, M. A., Soengas, J. L., & Míguez, J. M. (2015). Is gill cortisol concentration a good acute stress indicator in fish? A study in rainbow trout and zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 188, 65-69.
- Moynihan, J. A., Brenner, G. J., Cocke, R., Karp, J. D., Breneman, S. M., Dopp, J. M., ... & Felten, S. Y. (1994). Stress-induced modulation of immune function in mice. In *Handbook of human stress and immunity* (pp. 1-22). Academic Press San Diego.
- HSA (2005). *Humane Harvesting of Salmon and Trout*. Humane Slaughter Association, Wheathampstead.UK.
- HSA (2014). *Humane Harvesting of Fish*. Humane Slaughter Association, Wheathampstead. UK.
- Iwama, G. K., Morgan, J. D., & Barton, B. A. (1995). Simple field methods for monitoring stress and general condition of fish. *Aquaculture Research*, 26(4), 273-282.
- Malandrakis, E. E., Kavouras, M., Kassimatis, D., Dadali, O., Chatzipli, C., Golomazou, E., ... & Panagiotaki, P. (2014). Fish welfare: Stress evaluation using alkaline comet assay.
- Mitchelmore, C. L., & Chipman, J. K. (1998). Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Aquatic toxicology*, 41(1), 161-182.
- Moberg, G.P. (1985). Biological response to stress: Key to assessment of well-being? In: Moberg, G.P. (ed.) *Animal stress*. American Physiological Society, Bethesda, MD, pp. 27-49.
- Pedro, N., Delgado, M. J., & Alonso-Bedate, M. (2001). Fasting and hypothalamic catecholamines in goldfish. *Journal of Fish Biology*, 58(5), 1404-1413.

- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Carragher, J., Sumpter, J.P. (1987). The effects of acute and chronic stress on the levels of reproductive hormones in the plasma of mature male brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68: 249-259.
- Reddy, P. K., & Leatherland, J. F. (1998). *Stress physiology.*
- Rottmann, R. W., Francis-Floyd, R., & Durborow, R. (1992). *The role of stress in fish disease* (p. 474). Southern Regional Aquaculture Center.
- Soengas, J. L., Strong, E. F., Fuentes, J., Veira, J. A. R., & Andrés, M. D. (1996). Food deprivation and refeeding in Atlantic salmon, *Salmo salar*: effects on brain and liver carbohydrate and ketone bodies metabolism. *Fish physiology and biochemistry*, 15(6), 491-511.

Διαδίκτυο

- fishcount.org.uk (2014). Live transport of farmed fish (Πρόσβαση 25/8/2016).
<http://fishcount.org.uk/farmed-fish-welfare/farmed-fish-transport>