



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Διαχείριση αντιβιοτικών ουσιών σε ιχθυοκαλλιέργειες»

ΠΑΝΑΓΟΥ ΑΣΗΜΩ

ΒΟΛΟΣ 2009

«Διαχείριση αντιβιοτικών ουσιών σε ιχθυοκαλλιέργειες»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Παναγιωτάκη Παναγιώτα, Μόνιμη Επίκουρος Καθηγήτρια, «Υδατοκαλλιέργειες», Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα.

Γεωργουλάκης Ιωάννης, Ομότιμος Καθηγητής, «Προστασία Ζωϊκού Κεφαλαίου», Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής.

Ελένη Γκολομάζου, διδάσκουσα ως ΠΔ 407/80, «Ιχθυοπαθολογία», Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής.

Στην οικογένειά μου

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους που συντέλεσαν ουσιαστικά σ' αυτή την προσπάθεια.

Τον Καθηγητή κ. Χρήστο Νεοφύτου, Διευθυντή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την εμπιστοσύνη και τη συμπαράστασή του.

Την κα Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Μόνιμη Επίκουρο Καθηγήτρια, που ήταν η Επιβλέπουσα Καθηγήτρια, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου διατριβής, για την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και της συγγραφής της εργασίας.

Τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Ιωάννη Γεωργουλάκη και την κ. Ελένη Γκολομάζου (ΠΔ 407/80) για την συμμετοχή τους στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή, για τις χρήσιμες και εύστοχες επισημάνσεις τους τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη διόρθωση του κειμένου.

Τους καθηγητές της Γεωπονικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Νικόλαο Τσιρόπουλο και κ. Αθανάσιο Μαυρομάτη καθώς επίσης και τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Ευάγγελο Καρανάσιο για την πολύτιμη και αμέριστη βοήθειά τους.

Αισθάνομαι την έντονη ανάγκη να ευχαριστήσω τους φίλους μου, με τους οποίους μοιράστηκα το άγχος και τις ανησυχίες μου όλο αυτό το χρονικό διάστημα, Ελπινίκη Σκουφογιάννη, Σταυρούλα Κωστούλα, Ανέστη Τζανίδη και Αθανάσιο Κορκόβελο.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένεια μου για τη στήριξη, συμπαράσταση και υπομονή που έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Η αυξημένη παραγωγή εκτρεφόμενων ψαριών σε ιχθυοκλωβούς στη χώρα μας είναι η πλέον διαδεδομένη μέθοδος. Η υψηλή ιχθυοπυκνότητα ως απαραίτητη προϋπόθεση της εντατικής εκτροφής έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία προβλημάτων και την εξάπλωση των παθολογικών μολυσματικών ασθενειών. Ο έλεγχος των ασθενειών στις ιχθυοκαλλιέργειες θα πρέπει να αποσκοπεί κατά κύριο λόγο στην πρόληψη (ορθές πρακτικές διαχείρισης, εμβόλια, κλπ.) παρά στη θεραπεία. Ωστόσο, η χρήση αντιβιοτικών ουσιών είναι αναγκαία σε ορισμένες περιστάσεις.

Τα αντιβιοτικά είναι φάρμακα τα οποία παράγονται είτε από φυσικές είτε από συνθετικές ουσίες και έχουν την ικανότητα να σκοτώνουν ή να αποτρέπουν την εξέλιξη των μικροοργανισμών.

Στην παρούσα εργασία έγινε ο υπολογισμός της πραγματικής ποσότητας του αντιβιοτικού οξυτετρακυκλίνη που προσλαμβάνεται από τα ψάρια, μέσω της τροφής, ανάλογα με τη χρονική στιγμή πρόσληψης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής, μέσα στην υδάτινη στήλη.

Το πειραματικό πρωτόκολλο περιελάμβανε δύο τύπους φαρμακούχου ιχθυοτροφής, ιχθυοτροφή με 2ml ιχθυέλαιο και ιχθυοτροφή με 4ml ιχθυέλαιο, τέσσερις μεταχειρίσεις (1-2sec, ½min, 1min, 2min εμβάπτιση στο θαλασσινό νερό) και το μάρτυρα. Ο μάρτυρας ήταν επίσης φαρμακούχος ιχθυοτροφή, η οποία δεν εμβάπτισθηκε στο θαλασσινό νερό με δύο ποσότητες ιχθυελαίου (2ml και 4ml ιχθυέλαιο). Η κάθε μεταχείριση περιελάμβανε τρεις επαναλήψεις.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), HP-1100.

Από τη συγκεκριμένη έρευνα προέκυψε ότι η συγκέντρωση της οξυτετρακυκλίνης στη φαρμακούχο ιχθυοτροφή σχετίζεται με τη διαδικασία παρασκευής της. Συγκεκριμένα προέκυψε ότι η παρασκευή 50g φαρμακούχου ιχθυοτροφής χρησιμοποιώντας 2ml ιχθυέλαιο εξασφαλίζει σχεδόν διπλάσια συγκέντρωση οξυτετρακυκλίνης συγκριτικά με τη χρησιμοποίηση 4ml ιχθυελαίου.

Ωστόσο η ιχθυοτροφή με 4ml ιχθυέλαιο είχε καλύτερη συμπεριφορά στο νερό συγκριτικά με την ιχθυοτροφή με 2ml ιχθυέλαιο, μειώνοντας το ρυθμό απώλειας του φαρμάκου σ' αυτό.

Τέλος οι μεγαλύτερες απώλειες της οξυτετρακυκλίνης στο θαλασσινό νερό παρατηρούνται στη διάρκεια του 1^{ου} λεπτού, χρονικό διάστημα ικανό να εξασφαλίσει την πρόσληψη του μεγαλύτερου μέρους της τροφής από τα ψάρια, ακόμα και στην περίπτωση που έχουν μειωμένη όρεξη λόγω κάποιας ασθένειας.

Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη σύντομη διάρκεια ημιζώης της οξυτετρακυκλίνης στο νερό, την ικανότητα αποικοδόμησής της στο υδρόβιο περιβάλλον λόγω των φαινομένων της υδρόλυσης και φωτόλυσης (Peterson *et al.*, 1993), τις αυξημένες θερμοκρασίες των νερών της Ελληνικής Επικράτειας και τις μεγάλες περιόδους ηλιοφάνειας που συμπίπτουν με την έναρξη των παθολογικών προβλημάτων και την περίοδο χορήγησης της θεραπείας καθώς και της απώλειας της αντιβακτηριακής δραστηριότητάς της στο θαλασσινό νερό λόγω δημιουργίας συμπλόκων με κατιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} , οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο βαθμός επιβάρυνσης του υδάτινου περιβάλλοντος από την εφαρμογή της οξυτετρακυκλίνης είναι αμελητέος.

Λέξεις κλειδιά: αντιβιοτικά, ιχθυοκαλλιέργειες, οξυτετρακυκλίνη, υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης (HPLC).

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	10
1.1.1 Κατάσταση ασθενειών στην Ελλάδα	10
1.1.2 Έλεγχος των νόσων.....	12
1.2 Εισαγωγή στα αντιβιοτικά	14
1.2.1 Αντιβιοτικά	14
1.2.2 Τρόποι χορήγησης των αντιβιοτικών.....	17
1.2.3 Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών	19
1.3 Φαρμακοκινητική (Pharmacokinetics)	19
1.3.1 Παρουσία καταλοίπων στα ψάρια	21
1.3.2 Αντιβακτηριακή αντοχή.....	23
1.3.3 Αντιβιοτικά και περιβάλλον.....	25
1.4. Σκοπός της εργασίας.....	27
2. Υλικά και μέθοδοι	28
2.1 Φαρμακόςχος ιχθυοτροφή	28
2.1.1 Φαρμακόςχος ουσία.....	28
2.1.2 Ιχθυοτροφή.....	31
2.1.3 Ιχθυέλαιο	32
2.1.4 Προετοιμασία φαρμακόςχου ιχθυοτροφής.....	33
2.1.5 Πειραματικό πρωτόκολλο	35
2.2 Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Επίδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).....	36
2.2.1 Προετοιμασία δείγματος.....	39
2.2.2 Η συσκευή.....	40
2.2.3 Λογισμικό πρόγραμμα ελέγχου και επεξεργασίας δεδομένων	41
2.2.4 Επικουρικά όργανα	41
2.2.5 Χημικά αντιδραστήρια.....	41
2.2.6 Γυάλινα και πλαστικά υλικά	42
2.2.7 Παρασκευή πρότυπου διαλύματος οξυτετρακυκλίνης	42
2.3 Στατιστική ανάλυση.....	45
3. Αποτελέσματα	46
3.1.1 Μεταβολή της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης στην ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο	46

3.1.2 Μεταβολή της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης στην ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο	50
3.1.3 Σύγκριση της μεταβολής της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης στην ιχθυοτροφή για τις δύο ποσότητες ιχθυελαίου	54
3.2 Κορυφές ανάκτησης οξυτετρακυκλίνης	58
4. Συζήτηση	88
5. Βιβλιογραφία	96
Abstract	101
Παράρτημα.....	103

1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια έγιναν πολλές προσπάθειες σε παγκόσμια κλίμακα για την παραγωγή ζωικών πρωτεϊνών από το υδρόβιο περιβάλλον. Αυτό οφείλεται στην αυξανόμενη καθημερινά ζήτηση πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης από τον άνθρωπο και στις μεγάλες δυνατότητες που προσφέρει η σύγχρονη τεχνολογία.

Έτσι, σήμερα, παρατηρείται μια αλματώδης ανάπτυξη ενός παραγωγικού κλάδου, της Ιχθυοκαλλιέργειας, που μαζί με την οστρακοκαλλιέργεια και την εκτροφή μαλακοστράκων, αντιπροσωπεύει τη δραστηριότητα που ονομάζεται υδατοκαλλιέργεια. Η στροφή αυτή προς την Ιχθυοκαλλιέργεια, δηλαδή προς την ελεγχόμενη αλιευτική παραγωγή που στα περισσότερα κράτη βρίσκεται σε πλήρη ανάπτυξη, είναι αισθητή και στη χώρα μας, εξαιτίας των ευνοϊκών κλιματολογικών και υδροβιολογικών συνθηκών που επικρατούν και προσφέρει μεγάλες δυνατότητες για την ανάπτυξη αυτού του κλάδου.

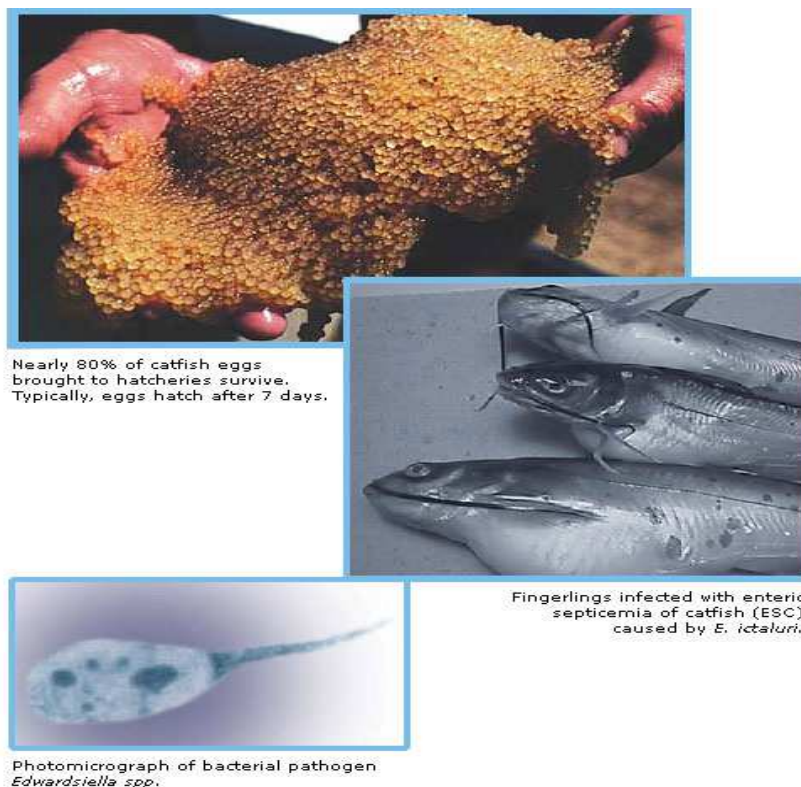
Απώτερος σκοπός της δραστηριότητας αυτής, είναι η παραγωγή προϊόντων ζωικής προέλευσης, υψηλής βιολογικής αξίας, σε όσο το δυνατό χαμηλότερο κόστος, με τη μετατροπή άλλων τροφίμων ζωικής ή φυτικής προέλευσης, κατώτερης όμως βιολογικής αξίας (Πνευματικός, 1996).

1.1.1 Κατάσταση ασθενειών στην Ελλάδα

Τα ψάρια είναι ζώα αρκετά ευπαθή, τόσο σε ασθένειες όσο και στις αλλαγές των περιβαλλοντικών τους συνθηκών. Η προσβολή μιας υδατοκαλλιέργειας από μια ασθένεια μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο των καλλιεργούμενων οργανισμών ή την αλλοίωση της ποιότητάς τους σε μικρό ή μεγάλο βαθμό, μεταβάλλοντας και την εμπορευσιμότητα του προϊόντος. Η διάγνωση από τα εξωτερικά εμφανή συμπτώματα

είναι δύσκολη εξαιτίας των παρόμοιων συμπτωμάτων που παρουσιάζουν οι περισσότερες από τις ασθένειες των ψαριών. Έτσι, πολλές φορές, όταν πλέον εκδηλωθεί η ασθένεια, είναι αργά για οποιαδήποτε ενέργεια (Φώτης, 1999).

Η γνώση της Ιχθυοπαθολογίας είναι απαραίτητη όχι μόνο για την αντιμετώπιση των παθολογικών προβλημάτων που παρατηρούνται στην ελεγχόμενη ιχθυοκαλλιέργεια αλλά και για τις καταστρεπτικές πολλές φορές συνέπειες στη δημόσια υγεία από τις ασθένειες των ψαριών που μεταδίδονται στον άνθρωπο.



Εικόνα 1: Ασθένειες ψαριών

Οι ασθένειες που είναι περισσότερο γνωστές και έχουν καλύτερα μελετηθεί, είναι αυτές που προσβάλλουν τα ψάρια εκτροφής αφού εξαιτίας της μεγάλης ιχθυοπυκνότητας, τα διάφορα νοσήματα εμφανίζονται σε μεγαλύτερη ένταση και μπορούν καλύτερα να μελετηθούν οι διάφορες φάσεις τους (εμφάνιση, αιτιολογία, πρόληψη).

Τα ψάρια που ζουν ελεύθερα στα γλυκά και αλμυρά νερά προσβάλλονται επίσης από διάφορες ασθένειες, πλην όμως είναι λιγότερο γνωστές, γιατί ξεφεύγουν από τον έλεγχο του ειδικού.

Η τελική διάγνωση πραγματοποιείται με τη λήψη δειγμάτων από τα ψάρια, την καλλιέργεια αυτών των δειγμάτων, τη χρώση και τη μικροσκοπική μελέτη των παθογόνων βακτηρίων, μυκήτων, κλπ. Αφού προσδιοριστεί το είδος του παθογόνου, ακολουθεί η θεραπεία.

1.1.2 Έλεγχος των νόσων

Ο έλεγχος των νόσων στην υδατοκαλλιέργεια θα πρέπει να αποσκοπεί κατά κύριο λόγο στην πρόληψη (ορθές πρακτικές διαχείρισης, εμβόλια, κλπ.) παρά στη θεραπεία. Η χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων είναι αναγκαία σε ορισμένες περιπτώσεις. Δεδομένου ότι τα κτηνιατρικά φαρμακευτικά προϊόντα μπορούν να λάβουν άδεια διάθεσής τους στην αγορά μετά από πλήρη αξιολόγηση της ποιότητας, επάρκειας και ασφάλειάς τους, οι σημαντικές επενδύσεις που χρειάζονται για την ανάπτυξη νέων κτηνιατρικών φαρμακευτικών προϊόντων, περιορίζουν τη διαθεσιμότητα των εν λόγω προϊόντων για ορισμένα ζωικά είδη ή νόσους. Η χρήση αντιβιοτικών στην Ευρωπαϊκή υδατοκαλλιέργεια μειώθηκε αξιοσημείωτα κατά την τελευταία δεκαετία, κυρίως λόγω της ανάπτυξης εμβολίων. Η τάση αυτή θα έπρεπε να ενθαρρυνθεί περαιτέρω και η ανάπτυξη νέων εμβολίων αποτελεί προτεραιότητα στον τομέα της έρευνας.

Όσον αφορά τον αριθμό των χημικών ουσιών, οι οποίες χρησιμοποιούνται διεθνώς στην εκτροφή των ψαριών, έχει υπολογισθεί ότι, αν και ανέρχονται σε 50 περίπου, μόνο λίγες από αυτές είναι επίσημα εγκεκριμένες για χρήση στα ψάρια των εντατικών εκτροφών, γιατί τα υπάρχοντα τοξικολογικά δεδομένα είναι ελάχιστα και

ελλειπή, ενώ απαιτούνται πολύ περισσότερα για την έγκριση της κυκλοφορίας τους (Ruitter *et al.*, 1996).

Αυτό οφείλεται στο ότι κάθε φαρμακευτική ουσία μαζί με όλους τους μεταβολίτες της πρέπει αρχικά να μελετηθεί φαρμακολογικά, τοξικολογικά, και βακτηριολογικά. Στη συνέχεια, αφού διαπιστωθεί ποια είναι η πλέον ασφαλής, σε συνδυασμό πάντα με την ποσοστιαία συμμετοχή της στα κατάλοιπα, καθορίζεται ως η ουσία κατάλοιπο δείκτης (marker residue). Είναι μια χρονοβόρα διαδικασία, στην οποία βασίζεται ο προσδιορισμός του Μέγιστου Ορίου Καταλοίπων (Gingerich *et al.*, 1998). Η διαδικασία αυτή συμπεριλαμβάνει τη μελέτη ασφάλειας (Safety File) και τη μελέτη καταλοίπων (Residue File). Στην πρώτη εμπεριέχονται όλα τα φαρμακολογικά, τοξικολογικά και λοιπά αποτελέσματα της υπό μελέτη ουσίας, μαζί με την προτεινόμενη Αποδεκτή Ημερήσια Πρόσληψη (ADI) για τον άνθρωπο. Στη δεύτερη μελέτη εμπεριέχονται όλα τα δεδομένα, τα οποία έχουν σχέση με την παρουσία και την παραμονή των καταλοίπων στους ιστούς, μαζί με όλα τα αποτελέσματα και τα προτεινόμενα για αυτούς MRL (Anonymous, 2001).

Τα κτηνιατρικά φάρμακα τα οποία είναι εγκεκριμένα στην Ελλάδα για χρήση κατά των νοσημάτων των ψαριών, είναι η υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη, ο συνδυασμός σουλφαδιαζίνης με τριμεθοπρίμη και δύο κινολόνες (το οξολινικό οξύ και η φλουμεκίνη) (ΕΟΦ, 2001).

1.2 Εισαγωγή στα αντιβιοτικά

1.2.1 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά είναι φάρμακα τα οποία παράγονται είτε από φυσικές είτε από συνθετικές ουσίες και έχουν την ικανότητα να σκοτώνουν ή να αποτρέπουν την εξέλιξη των μικροοργανισμών.

Η βελτίωση των αντιβιοτικών και εμβολίων οδήγησε σε ραγδαία βελτίωση της δημόσιας υγείας και της ποιότητας του νερού και ο αριθμός των θανάτων από μολυσματικές ασθένειες μειώθηκε ουσιαστικά. Η βελτίωση ήταν τόσο μεγάλη που κάποιοι προέβλεψαν το τέλος των μολυσματικών ασθενειών. Παρόλα αυτά η προσδοκία αυτή αποδείχθηκε λανθασμένη. Νέοι μολυσματικοί παράγοντες προέκυψαν αλλά και επανήλθαν παλαιότεροι, εξαιτίας της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών σε αντιβιοτικά. Έτσι το εύρος επιλογής για τη θεραπεία των πιο κοινών μολυσματικών ασθενειών περιορίζεται πολύ (FAO, 2005).

Πρέπει να ληφθούν υπόψη διάφοροι παράγοντες: η ασφάλεια των υδάτων, των προϊόντων που προέρχονται από τα ψάρια, η ακεραιότητα του περιβάλλοντος, η ασφάλεια των ζώων και η ασφάλεια του ατόμου που διαχειρίζεται τις ουσίες αυτές.

Για να είναι ορθολογική η χρησιμοποίηση των αντιβακτηριακών παραγόντων (αντιβιοτικών) στις εκτροφές ψαριών, γενικά πρέπει να ακολουθούνται οι παρακάτω αρχές (Volmer *et al.*, 1997):

- να χρησιμοποιούνται μόνο όταν η μόλυνση είναι επιβεβαιωμένη
- να αρχίζουμε τη θεραπεία όσο το δυνατόν πιο γρήγορα, έχοντας οπωσδήποτε πάρει δείγματα για βακτηριολογικό έλεγχο

- να χρησιμοποιούμε αντιβακτηριακό παράγοντα όσο το δυνατόν στενότερου αντιβακτηριακού φάσματος, για να μπορέσουμε να προστατέψουμε τη βακτηριακή χλωρίδα
- να αποφεύγουμε την προληπτική αντιβακτηριακή θεραπεία
- να χορηγούμε πάντα τη σωστή δόση με την ορθή διάρκεια αγωγής, ώστε να διασφαλίζονται τα επιτρεπτά όρια καταλοίπων στους ιστούς
- να υιοθετήσουμε την πολιτική της περιορισμένης και εκ περιτροπής χρήσης των αντιβακτηριακών ουσιών.

Η επιλογή του κατάλληλου αντιβακτηριακού εξαρτάται και από παράγοντες, οι οποίοι αφορούν την καλύτερη πρακτική, τη χρησιμοποίηση πάντα των εγκεκριμένων φαρμακευτικών ιδιοσκευασμάτων, αλλά και των παραγόντων, οι οποίοι συμβάλλουν στην ορθή επιλογή του, όπως (Volmer *et al.*, 1997):

- η εμπειρία για την συγκεκριμένη ασθένεια
- οι πληροφορίες για τον υπεύθυνο μικροοργανισμό
- η τυχόν προηγούμενη εμπειρία στην εκτροφή
- η τυχόν παλαιότερη χρησιμοποίηση του φαρμάκου
- η ευαισθησία
- η ανάγκη της εκ περιτροπής χρησιμοποίησης
- οι χρόνοι απομάκρυνσης, όταν τα ψάρια πρόκειται να καταναλωθούν
- το κόστος
- το νομικό καθεστώς της χρησιμοποίησης του φαρμάκου στα ψάρια

Στους παρακάτω πίνακες (Πίν. 1, Πίν. 2) παρουσιάζονται τα επίσημα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά στις ιχθυοκαλλιέργειες.

Πίνακας 1: Αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται επίσημα στις ιχθυοκαλλιέργειες
(Πηγή: EMEA,1999)

Αντιβιοτικό	Θεραπεία	Αναφορές
Oxytetracycline	<p>Furunculosis στα σολομό και την πέστροφα, εξαιτίας της <i>Aeromonas salmonicida</i></p> <p>Gafkemia στους αστακούς που προκαλείται από <i>Aeromonas viridans</i></p> <p>Hemorrhagic (αιμοραγική) septicæmia εξαιτίας του <i>Aeromonas hydrophila</i>, <i>A. Sobria</i>, <i>Pseudomonas</i></p> <p>Ασθένεια του κρύου νερού που προκαλείται στα σαλμονοειδή εξαιτίας του <i>Cytophaga psychrophilia</i></p> <p>Ασθένεια Columnaris που προκαλείται στα σαλμονοειδή εξαιτίας του <i>Chondrococcus</i></p> <p>Ασθένεια Enteric redmouth, που προκαλείται εξαιτίας του <i>Yersinia ruckeri</i>. Ενδείκνυται επίσης για τον έλεγχο της <i>Pseudomonas</i> στα γατόψαρα και σαλμονοειδή. Επίσης για τον έλεγχο του έλκους που προκαλείται από <i>Haemophilus pissium</i> στο σολομό και την πέστροφα.</p>	USP, 2000g
Florfenicol	Ενδείκνυται για τη θεραπεία της Furunculosis εξαιτίας της <i>Aeromonas salmonicida</i>	USP, 2000f
Sarafloxacin	Ενδείκνυται για τη θεραπεία της Furunculosis, vibriosis και enteric redmouth στα σαλμονοειδή.	EMEA, 1997
Erythromycin	Ενδείκνυται για τη θεραπεία των βακτηριακών ασθενειών των νεφρών και του <i>streptococcus</i> στα yellow tail στην Ιαπωνία	GESAMP, 1997
Sulphonamides με trimethoprim ή ormethoprim	Ενδείκνυται για τη θεραπεία της Furunculosis, vibriosis και enteric redmouth.	GESAMP, 1997

Πίνακας 2: Αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται επίσημα στις ιχθυοκαλλιέργειες στην Ελλάδα

ΘΕΡΑΠΕΙΑ	ΑΣΘΕΝΕΙΑ
Οξολονικό οξύ	<ul style="list-style-type: none"> ○ Δοθιήνωση σαλμονιδών (<i>Aeromonas salmonicida</i>) ○ Στηλώδης νόσος σαλμονιδών (<i>Chondrococcus (Flexibacter) columnaris</i>) ○ Ερυθρά στοματίτιδα σαλμονιδών (<i>Yersinia ruckeri</i>) ○ Σηψαιμικές λοιμώξεις κυπρίνου, γατόψαρου, χελιών κ.α ○ Δονακίωση ιχθύων & καρκινοειδών (<i>Vibrio</i>)
Οξυτετρακυκλίνη υδροχλωρική	<ul style="list-style-type: none"> ○ Δοθιήνωση σαλμονιδών (<i>Aeromonas salmonicida</i>) ○ Στηλώδης νόσος σαλμονιδών (<i>Chondrococcus (Flexibacter) columnaris</i>) ○ Ερυθρά στοματίτιδα σαλμονιδών (<i>Yersinia ruckeri</i>) ○ Σηψαιμικές λοιμώξεις κυπρίνου, γατόψαρου, χελιών κ.α. – Αιμορραγική σηψαιμία <i>Aeromonas hydrophila</i>, <i>Pseudomonas</i> ○ Δονακίωση ιχθύων & καρκινοειδών ○ Ελκωτική δερματίτιδα <i>Haemophilus piscium</i> (σαλμονιδών) ○ Νέκρωση των πτερυγίων και της ουράς – <i>Cytophaga psycrophilia</i> ○ Gafkemia in lobsters <i>Aerococcus viridans</i>
Φλουμεκίνη	<ul style="list-style-type: none"> ○ Δοθιήνωση σαλμονιδών
Σουλφαδιαζίνη +Τριμεθοπρίμη (5:1)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Δοθιήνωση σαλμονιδών ○ Στηλώδης νόσος σαλμονιδών ○ Ερυθρά στοματίτιδα σαλμονιδών ○ Δονακίωση ιχθύων & καρκινοειδών

1.2.2 Τρόποι χορήγησης των αντιβιοτικών

Η χορήγηση των φαρμάκων κατά τη θεραπευτική αγωγή στα εκτρεφόμενα ψάρια γίνεται με τρεις τρόπους: με ένεση, με φαρμακευτικά λουτρά και με φαρμακούχο ιχθυοτροφή.

Ένεση: Η ένεση αποτελεί την οδό χορήγησης του αντιβακτηριακού παράγοντα και των εμβολίων για τον έλεγχο των ασθενειών των γεννητόρων και για την ανοσοποίηση των νεαρών ψαριών. Όταν τα φάρμακα χορηγούνται με ένεση, το μεγαλύτερο ποσοστό τους παραμένει στον οργανισμό του ψαριού και έτσι η πιθανότητα να εισέλθουν στο περιβάλλον μειώνεται σημαντικά. Τα ψάρια στο στάδιο

αυτό της ζωής τους είναι πιθανόν είτε να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα πριν το μεταβολισμό και την πλήρη απέκκριση του αντιβακτηριακού παράγοντα ή να μη χρησιμοποιηθούν για ανθρώπινη κατανάλωση. Για τον λόγο αυτό, η ένεση είναι η πιο ελεγχόμενη μέθοδος χορήγησης των φαρμάκων στα ψάρια. Όμως, η χειρονακτική εργασία που απαιτείται και η καταπόνηση (στρες) των ψαριών περιορίζουν την εφαρμογή της.

Φαρμακευτικά λουτρά: χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία κυρίως των εξωτερικών παρασιτώσεων των ψαριών, των νοσημάτων τα οποία οφείλονται σε βακτήρια καθώς και σε ιώσεις για την αποτροπή των επιμολύνσεων.

Φαρμακούχος ιχθυοτροφή: Η φαρμακούχος ιχθυοτροφή είναι ο συνηθέστερος τρόπος χορήγησης φαρμάκων στα ψάρια. Πραγματοποιείται με την ενσωμάτωσή τους στην ιχθυοτροφή. Η από του στόματος χορήγηση των φαρμάκων στα ψάρια γίνεται πάντοτε λαμβάνοντας υπόψη την ποσότητα τροφής ανάλογα με τη βιομάζα και την ενσωμάτωση του φαρμάκου σ' αυτή σε ανάλογο ποσοστό. Το ποσοστό αυτό μπορεί να αλλάξει. Επειδή τα ψάρια είναι ψυχρόαιμα ζώα, η δραστηριότητα και η διατροφή τους εξαρτώνται άμεσα από τη θερμοκρασία του νερού. Γνωρίζοντας την ποσότητα της τροφής, η οποία πρέπει να καταναλωθεί ανά ημέρα και το ολικό βάρος των ψαριών (βιομάζα), μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα του φαρμάκου, η οποία πρέπει να προστεθεί ανά χιλιόγραμμο τροφής. Το φάρμακο μπορεί είτε να ενσωματωθεί στην τροφή σε ειδικές εγκαταστάσεις (feed mill) ή να επικαλύψει τα σύμπηκτα (pellets). Η χρονική διάρκεια της θεραπευτικής αγωγής, αν και ποικίλλει από χώρα σε χώρα, συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 5 και 14 ημερών (Schneider, 1994).

1.2.3 Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών

Τυπικοί τρόποι λειτουργίας των κοινών αντιβιοτικών

Μηχανισμοί

- Ζημιά στη μεμβράνη των κυττάρων που επιτρέπει τα συστατικά να βγαίνουν απ' έξω (βακτηριοκτόνο).
- Αναστολείς της σύνθεσης των τοιχωμάτων των βακτηριακών κυττάρων.
- Αναστολείς της σύνθεσης του φολικού οξέος. Βακτηριοστατικό. Το φολικό οξύ είναι απαραίτητο στην κατασκευή του DNA και RNA για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. Τα βακτήρια πρέπει να συνθέσουν φολικό οξύ.
- Αναστολείς της λειτουργίας του DNA (βακτηριοκτόνα). Το DNA είναι απαραίτητο στην αύξηση των κυττάρων και τη διαίρεση.

Αναστολείς της σύνθεσης των πρωτεϊνών (βακτηριοκτόνα ή βακτηριοστατικά). Οι πρωτεΐνες συντίθενται στις δομές των κυττάρων που ονομάζονται ριβοσώματα (Γαλανοπούλου και Λιάπη, 2000).

1.3 Φαρμακοκινητική (Pharmacokinetics)

Η φαρμακοκινητική αποτελεί έναν από τους σπουδαιότερους κλάδους της φαρμακολογίας, καθ' όσον ασχολείται με την τύχη του φαρμάκου στον οργανισμό από τη στιγμή της χορήγησης μέχρι την απομάκρυνσή του. Κατά τη διάρκεια της διαδρομής αυτής το φάρμακο διέρχεται από τα εξής βασικά στάδια: της απορρόφησης, της κατανομής, του μεταβολισμού και της απέκκρισης (Holford and Benet, 1995, Anonymou, 2001). Η διαδικασία, με την οποία ένα φάρμακο περνά από το σημείο χορήγησης στο κυκλοφορικό σύστημα και από εκεί στα σημεία δράσης, ονομάζεται απορρόφηση. Πρόκειται για τη μετακίνηση του φαρμάκου δια μέσου μιας

σειράς βιολογικών μεμβρανών, οι οποίες λειτουργούν ως ανατομικοί φραγμοί (τοιχώματα εντέρου, τοιχώματα αιμοφόρων αγγείων, κυτταρικές μεμβράνες). Πρέπει να τονισθεί, ότι η απορρόφηση των φαρμάκων από το γαστρεντερικό σύστημα των ψαριών δεν είναι ανάλογη με εκείνη των θηλαστικών (Schneider, 1994). Γίνεται με την παθητική διάχυση, μια διαδικασία, η οποία δεν απαιτεί κατανάλωση ενέργειας, αλλά προϋποθέτει την ύπαρξη διαφοράς στη συγκέντρωση της υπό διάχυση ουσίας στις δύο πλευρές της μεμβράνης.

Ο μεταβολισμός των φαρμάκων είναι σημαντικός παράγοντας, ο οποίος προσδιορίζει την κατανομή και την απέκκρισή τους. Το ήπαρ είναι το κυριότερο όργανο μεταβολισμού στα περισσότερα είδη ψαριών, ωστόσο μεταβολική δραστηριότητα αποδίδεται επίσης στα βράγχια, στους νεφρούς και στον εντερικό βλεννογόνο. Η απέκκριση γίνεται με το μηχανισμό της παθητικής διάχυσης δια μέσου των βραγχίων ή με άλλους μηχανισμούς δια μέσου της χολής και του ούρου (Ingebrigtsen, 1991).

Από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες η θερμοκρασία είναι η σημαντικότερη παράμετρος, η οποία επηρεάζει τη διάθεση των φαρμάκων στα ψάρια. Στα ψάρια που είναι ποικιλόθερμα ζώα, μία άνοδος της θερμοκρασίας κατά 1°C επιφέρει αύξηση της μεταβολικής συχνότητας κατά 10%. Το pH και η ιονική ισχύς του νερού είναι δύο ακόμα σημαντικοί παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την απορρόφηση και την απέκκριση των φαρμάκων. Από μελέτες που έχουν γίνει, διαπιστώθηκαν διαφορές ανάμεσα σε αλμυρά και γλυκά νερά. Τέλος, άλλη μια σημαντική παράμετρος είναι η συγκέντρωση του οξυγόνου. Όταν αυτή είναι χαμηλή, μεταβάλλεται η απορρόφηση και η απέκκριση των φαρμάκων λόγω της αύξησης της έκθεσης της επιφάνειας των βραγχίων στο νερό (Schwedler and Johnson, 1997). Το φάρμακο, μετά την είσοδο στον οργανισμό του ψαριού, κατανέμεται στο σώμα του με

το μηχανισμό της παθητικής διάχυσης. Εστιάζεται σε κάποιους αρχικούς ιστούς από τους οποίους στη συνέχεια ανακατανέμεται σε άλλους ιστούς με μεγαλύτερη συγγένεια-συνάφεια προς το φάρμακο.

Άλλοι παράγοντες, που επηρεάζουν την απορρόφηση ενός φαρμάκου, είναι ο τρόπος χορήγησης, το μέγεθος των τεμαχίων της τροφής, καθώς και τα κατιόντα μαγνησίου και ασβεστίου (Mg^{2+} & Ca^{2+}). Οι συγκεντρώσεις τους στο θαλασσινό νερό επιφέρουν μεγάλη μείωση της βιολογικής δράσης των αντιβακτηριακών παραγόντων έως και πάνω από το 90%, όπως π.χ. της οξυτετρακυκλίνης και των κινολονών. Η διαλυτότητά τους επηρεάζεται ουσιαστικά από το pH του νερού και μειώνεται με την αύξησή του. Ειδικά για το pH του θαλασσινού νερού, επειδή είναι αλκαλικό οι συγκεντρώσεις των μετάλλων σ' αυτό είναι μικρές (Smith *et al.*, 1994).

Ο χρόνος απομάκρυνσης είναι η τελική φάση της διαδικασίας απέκκρισης ενός φαρμάκου από τον οργανισμό μετά τη βιομετατροπή του. Η απέκκριση γίνεται με τον μηχανισμό της παθητικής διάχυσης δια μέσου των βραγχίων ή με άλλους μηχανισμούς δια μέσου της χολής και του ούρου. Εξωγενείς παράμετροι όπως π.χ. η θερμοκρασία του νερού, επηρεάζουν ουσιαστικά τον μεταβολισμό και την απέκκριση. Έχει δε αποδειχθεί ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής ενός φαρμάκου είναι μεγαλύτερος στις χαμηλές θερμοκρασίες (Schneider, 1994).

1.3.1 Παρουσία καταλοίπων στα ψάρια

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΟΚ) 2377/90, όπως τροποποιήθηκε, κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων είναι όλες οι φαρμακολογικά δραστικές ουσίες, έκδοχα ή προϊόντα αποδόμησης και μεταβολισμού, τα οποία ενδέχεται να παραμείνουν στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Όταν οι αντιβακτηριακοί παράγοντες χρησιμοποιούνται

κατά μη ορθολογικό τρόπο ή οι νομοθετημένοι χρόνοι απομάκρυνσης δε τηρούνται, τα κατάλοιπα στους εδώδιμους ιστούς αποτελούν κίνδυνο για τους καταναλωτές. Ειδικότερα ο κίνδυνος γίνεται μεγαλύτερος σε άτομα υπερευαίσθητα με αποτέλεσμα την εκδήλωση αλλεργικών αντιδράσεων και άλλων τοξικών φαινομένων. Ωστόσο, θα πρέπει να λάβουμε υπόψη μας ότι ο κίνδυνος, στον οποίο πιθανόν να εκτίθενται οι καταναλωτές από τα κατάλοιπα, δεν είναι ο ίδιος με εκείνο ο οποίος οφείλεται στη μητρική ουσία του φαρμάκου, επειδή η μητρική ουσία ενδέχεται να έχει υποστεί εκτενή μεταβολισμό στον οργανισμό του ζώου στο οποίο χορηγήθηκε. Έτσι, για την προστασία της Δημόσιας Υγείας, μετά την ολοκλήρωση των φαρμακολογικών, τοξικολογικών και λοιπών ελέγχων ασφάλειας του φαρμακευτικού προϊόντος, το επόμενο στάδιο που ακολουθεί είναι ο ορισμός της Ημερήσιας Αποδεκτής Πρόσληψης (ADI) (Anonymous, 2001).

Σύμφωνα με την Επιτροπή του Κώδικα για τα Κατάλοιπα των Κτηνιατρικών Φαρμάκων στα Τρόφιμα, το MRL αποτελεί τη μέγιστη εκείνη συγκέντρωση, η οποία είναι αποτέλεσμα της χρήσης ενός κτηνιατρικού φαρμάκου (σε mg/kg ή µg/kg του προϊόντος ως έχει). Προτείνεται από την Επιτροπή του Codex Alimentarius ως η νόμιμα επιτρεπόμενη ή αναγνωρισμένη ως αποδεκτή εντός ή επί του τροφίμου. Βασίζεται στην μορφή του καταλοίπου, το οποίο θεωρείται, ότι δεν ενέχει τοξικολογικούς κινδύνους για την υγεία του ανθρώπου, όπως αυτό εκφράζεται από την Αποδεκτή Ημερήσια Πρόσληψη (ADI). Η ADI είναι η ποσότητα του φαρμάκου, η οποία εκφράζεται σε σχέση με το σωματικό βάρος. Μπορεί να καταναλώνεται καθημερινά για όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου βάρους 60kg χωρίς να προκαλεί αξιόλογους κινδύνους.

Το τελευταίο στάδιο είναι ο καθορισμός του χρόνου απομάκρυνσης (Withdrawal period), δηλαδή του χρόνου εκείνου ο οποίος παρέρχεται μεταξύ της

τελευταίας χορήγησης ενός φαρμάκου και της παραγωγής τροφίμων και με τη διαβεβαίωση ότι τα τρόφιμα αυτά δε περιέχουν κατάλοιπα σε συγκεντρώσεις οι οποίες να ξεπερνούν το επιτρεπόμενο MRL (Anonymous, 2001).

Ο χρόνος απομάκρυνσης μιας φαρμακευτικής ουσίας, αφ' ενός μεν διαφέρει μεταξύ των ειδών των ψαριών και αφ' ετέρου δε, εξαρτάται από τη θερμοκρασία του νερού. Για το λόγο αυτό έχει υιοθετηθεί ο όρος βαθμοημέρα (degree day), ο οποίος υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τη μέση θερμοκρασία του νερού κατά τη διάρκεια μιας ημέρας με τη διάρκεια σε ημέρες της θεραπευτικής αγωγής.

Οι θερμοκρασίες των νερών της ελληνικής επικράτειας ευνοούν τη γρήγορη αποβολή των φαρμάκων από τα ψάρια. Ο χρόνος απομάκρυνσης των φαρμάκων πρέπει να είναι σύντομος. Θεωρητικά, δε θα πρέπει να υπάρχει πρόβλημα καταλοίπων, επειδή ένας τέτοιος σύντομος χρόνος απομάκρυνσης διευκολύνει τους εκτροφείς να τον τηρήσουν. Κάθε χρήση φαρμακευτικού προϊόντος στα ψάρια των εντατικών εκτροφών πρέπει πάντα να αναφέρεται στις αρμόδιες αρχές.

1.3.2 Αντιβακτηριακή αντοχή

Η αντοχή των βακτηρίων στους αντιβακτηριακούς παράγοντες αναπτύχθηκε πολύ γρήγορα και έγινε αντιληπτή ιδιαίτερα μετά τη χρησιμοποίηση των αντιβακτηριακών ουσιών νέας γενιάς.

Η ανάπτυξη αντιβακτηριακής αντοχής (ενδογενής ή επίκτητη), είναι μια διαδικασία, η οποία μετά την είσοδο του αντιβακτηριακού παράγοντα σε ένα βακτήριο ακολουθεί τις παρακάτω οδούς: (Stamm, 1992, Levy, 1997, EMEA, 1999)

1. Αποβολή του αντιβακτηριακού παράγοντα από το σώμα του βακτηρίου με αλλαγή της διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος μέσω ειδικών σημείων αποβολής.

2. Μετατροπή του αντιβακτηριακού παράγοντα σε άλλη μη δραστική μορφή με τη επίδραση ειδικών ενζύμων.

3. Αποδόμηση του αντιβακτηριακού παράγοντα με τη δράση ενζύμων.

Η μεταβίβαση της αντιβακτηριακής αντοχής γίνεται με ειδικά γονίδια τα οποία μεταφέρονται από το ένα βακτηριακό κύτταρο στο άλλο με τους παρακάτω τρεις τρόπους (Stamm, 1992, Levy, 1997):

1. Με τη βοήθεια πλασμιδίων από ένα βακτήριο δότη (Plasmid Donor Bacterium).
2. Με τη βοήθεια ιών (Bacterium Infected by Virus).
3. Μέσω του DNA μετά το θάνατο και τη λύση του βακτηριακού σώματος (Dead Bacterium).

Όταν ένας αντιβακτηριακός παράγοντας επιδράσει σε μια ομάδα βακτηρίων, τότε τα πιο ευαίσθητα από αυτά καταστρέφονται, ενώ τα βακτήρια που παρουσιάζουν αντιβακτηριακή αντοχή ενδέχεται να επιβιώσουν, να πολλαπλασιασθούν και να αντιμετωπίσουν τη δράση του αντιβακτηριακού παράγοντα (Levy, 1997).

Υπάρχει κάποιος προβληματισμός όσον αφορά στην κατανάλωση των προϊόντων των εντατικών εκτροφών ψαριών, στα οποία περιέχονται μικρές συγκεντρώσεις αντιβακτηριακών ουσιών, για την επίδρασή τους στην υγεία του ανθρώπου.

Ειδικότερα η παρουσία ανθεκτικών βακτηρίων στον πεπτικό σωλήνα του ανθρώπου είναι μεγάλης σημασίας, όχι μόνο γιατί αποτελεί αποθήκη γονιδίων αντιβακτηριακής αντοχής, αλλά γιατί όταν μεταφερθούν σε άλλα σημεία του οργανισμού, μπορεί να προκαλέσουν ασθένειες οι οποίες δε θεραπεύονται. Ο κίνδυνος αυτός αποτελεί αφορμή για τη μελέτη σχεδιασμού των μοριακών μηχανισμών αντοχής με σκοπό την παραγωγή νέων αντιβακτηριακών παραγόντων.

Λίγα είναι τα επιδημιολογικά δεδομένα τα οποία δείχνουν, ότι η χρήση των αντιβακτηριακών παραγόντων στις εντατικές εκτροφές ψαριών έχει ως αποτέλεσμα

την μεταβίβαση της αντιβακτηριακής αντοχής από παθογόνα στελέχη των ψαριών σε παθογόνα στελέχη του ανθρώπου και στην τροφική αλυσίδα.

1.3.3 Αντιβιοτικά και περιβάλλον

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στις εκτροφές ψαριών έχουν κατά καιρούς ενοχοποιηθεί για την παρουσία καταλοίπων στα ψάρια, την ενδεχόμενη ανάπτυξη αντιβακτηριακής αντοχής, την πρόκληση δυσμενών επιπτώσεων στο περιβάλλον (Reilly and Käferstein, 1997).

Σε ορισμένες περιπτώσεις με την είσοδο της ιχθυοτροφής στο νερό τεμαχίδια της τροφής μαζί με τον αντιβακτηριακό παράγοντα, τον οποίο περιέχουν, καταβυθίζονται στον πυθμένα, ενώ μέρος του φαρμάκου διαλύεται στο νερό. Ανάλογα με την αντιβακτηριακή ουσία ενδέχεται αυτή να αποδομηθεί χημικά ή βακτηριολογικά. Με δεδομένη τη μη ικανοποιητική όρεξη των ψαριών, ένα μέρος του φαρμάκου μπορεί να μη φθάσει σ' αυτά.

Ενδέχεται ορισμένες ποσότητες του φαρμάκου, το οποίο εισέρχεται στο γαστρεντερικό σωλήνα του ψαριού, να μην απορροφάται και να απεκκρίνεται στον περιβάλλοντα χώρο μαζί με τα περιττώματα, επειδή η αποτελεσματική θεραπεία συχνά παρεμποδίζεται από τη μειωμένη όρεξη των ασθενών ψαριών, ενώ τεμαχίδια τροφής ή περιττωμάτων μαζί με το φάρμακο, το οποίο περιέχεται σ' αυτά, ενδέχεται να καταναλωθεί από πελαγικούς οργανισμούς.

Επίσης τα άγρια ψάρια και τα οστρακόδερμα, τα οποία ζούνε στη γύρω περιοχή, εκτίθενται στους αντιβακτηριακούς παράγοντες, καταναλώνοντας την περίσσεια της τροφής. Αν αυτά αλιευθούν, οι αντιβακτηριακοί παράγοντες μπορεί να φθάνουν στον καταναλωτή. Τεμαχίδια της τροφής με το φάρμακο μπορεί να καταναλωθούν από μαλάκια και αυτά στη συνέχεια να καταναλωθούν από πουλιά.

Τέλος τα φαρμακώχα τεμαχίδια της τροφής, τα οποία δε καταναλώθηκαν από τους διάφορους οργανισμούς, φθάνουν στον πυθμένα κάτω από την εγκατάσταση, όπου αποθηκεύονται. Ένα μέρος των αντιβακτηριακών ουσιών αποδομείται από τους μικροοργανισμούς, ενώ άλλες περισσότερο σταθερές αντιβακτηριακές ουσίες, διαχέονται στον περιβάλλοντα χώρο, όπου ενδέχεται να αδρανοποιηθούν με χημικές ή φωτοχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο νερό.

Έχει υπολογισθεί, ότι 1-5% της ιχθυοτροφής στις εκτροφές ξηράς του σολομού και 15-40% στις εκτροφές σε ιχθυοκλωβούς, χάνεται στο περιβάλλον με επακόλουθο την επιβάρυνση του υδάτινου οικοσυστήματος, το οποίο οπωσδήποτε θα πρέπει να ανανεωθεί, για να μπορέσουμε να έχουμε ξανά άριστες συνθήκες εκτροφής (Halling-Sorensen *et al.*, 1998).

Όμως έχει ήδη λεχθεί ότι οι συγκεντρώσεις των ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου που υπάρχουν στο θαλασσινό νερό επιφέρουν μεγάλη μείωση της βιολογικής δράσης των αντιβιοτικών έως και πάνω από το 90%, όπως π.χ. της οξυτετρακυκλίνης και των κινολονών. Επίσης ένα μέρος των αντιβακτηριακών ουσιών που φθάνουν στον πυθμένα αποδομείται από τους μικροοργανισμούς, ενώ άλλες περισσότερο σταθερές αντιβακτηριακές ουσίες, διαχέονται στον περιβάλλοντα χώρο, όπου ενδέχεται να αδρανοποιηθούν με χημικές ή φωτοχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο νερό. Έχει δε αποδειχθεί ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής ενός φαρμάκου είναι μεγαλύτερος στις χαμηλές θερμοκρασίες. Οι αυξημένες θερμοκρασίες των νερών της ελληνικής επικράτειας μειώνουν το χρόνο ημίσειας ζωής ενός φαρμάκου και ευνοούν τη γρήγορη αποβολή των φαρμάκων από τα ψάρια και τους άλλους υδρόβιους οργανισμούς και επομένως ο χρόνος αναμονής είναι σύντομος και δεν υπάρχει πρόβλημα καταλοίπων.

1.4. Σκοπός της εργασίας

Τα τελευταία χρόνια με την ανάπτυξη των ιχθυοκαλλιεργειών δημιουργήθηκε κάποιος προβληματισμός σχετικά με την κατανάλωση των προϊόντων των εντατικών εκτροφών ψαριών, τα οποία πιθανόν να περιέχουν σε μικρές συγκεντρώσεις αντιβακτηριακούς παράγοντες επιβλαβείς για την υγεία του καταναλωτή.

Η προσβολή των εκτρεφόμενων οργανισμών από μια ασθένεια μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο των εκτρεφόμενων οργανισμών ή την αλλοίωση της ποιότητάς τους σε μικρό ή μεγάλο βαθμό μεταβάλλοντας και την εμπορευσιμότητα του προϊόντος.

Ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος τρόπος ενσωμάτωσης της αντιβιοτικής ουσίας στην ιχθυοτροφή είναι η επίπαση με την ταυτόχρονη προσθήκη ιχθυελαίου ως συνδετικό μέσο. Συγκεκριμένα, εφαρμόζοντας αυτόν τον τρόπο ενσωμάτωσης του φαρμάκου στην ιχθυοτροφή, θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση του χρόνου εμφύπτισης, δηλαδή της παραμονής της φαρμακούχου ιχθυοτροφής στο θαλασσινό νερό, στη συγκέντρωση της οξυτετρακυκλίνης.

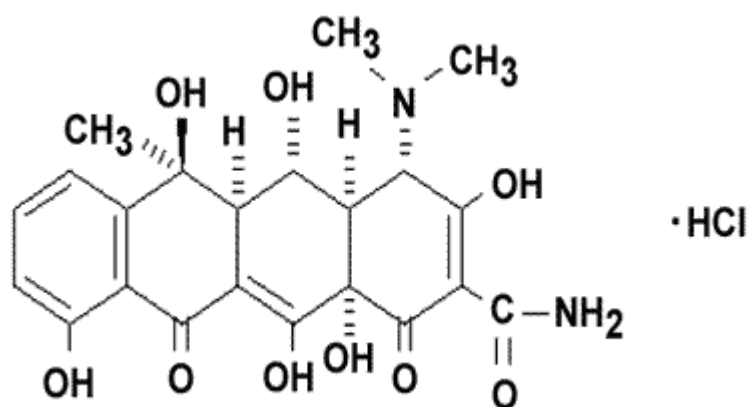
Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο υπολογισμός της πραγματικής ποσότητας ενός αντιβιοτικού (οξυτετρακυκλίνη) που προσλαμβάνεται από τα ψάρια, μέσω της τροφής, ανάλογα με τη χρονική στιγμή πρόσληψης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής, μέσα στην υδάτινη στήλη.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Φαρμακούχος ιχθυοτροφή

2.1.1 Φαρμακούχος ουσία

Οξυτετρακυκλίνη



Εικόνα 2: Στεreoχημική δομή οξυτετρακυκλίνης

Η φαρμακευτική ουσία η οποία χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν η υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη. Ανήκει στις τετρακυκλίνες και είναι ευρέως φάσματος φυσικός βακτηριοστατικός παράγοντας. Δρα μέσα στο κυτταρόπλασμα του βακτηριακού κυττάρου και διαταράσσει την ριβοσωματική λειτουργία αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση (π.χ. τη σύνθεση ενζύμων των βακτηρίων).

Οι τετρακυκλίνες αθροίζονται μέσα στα κύτταρα των οργανισμών και γι' αυτό χρησιμοποιούνται σε ενδοκυτταρικές λοιμώξεις. Απεκκρίνονται κυρίως από τους νεφρούς. Χορηγούνται συνήθως από το στόμα, αν και υπάρχουν διαθέσιμα ενδοφλέβια σκευάσματα. Από τις έξι τετρακυκλίνες που κυκλοφορούν στις ΗΠΑ, μόνο τρεις χρησιμοποιούνται συχνά. Αυτές είναι οι τετρακυκλίνη, η δοξυκυκλίνη, και η μινοκυκλίνη.

Οι τετρακυκλίνες δεσμεύονται στην 30S ριβοσωμική υπομονάδα, με τρόπο ο οποίος αποκλείει τη δέσμευση του tRNA στο σύμπλεγμα mRNA-ριβοσώματος, εμποδίζοντας έτσι την προσθήκη νέων αμινοξέων στην επιμηκνυόμενη πεπτιδική αλυσίδα. Η επίκτητη αντοχή στις τετρακυκλίνες οφείλεται συνήθως σε μεταβολές του μηχανισμού μεταφοράς, που έχουν ως αποτέλεσμα την ανεπαρκή άθροιση της τετρακυκλίνης στο βακτηριακό κύτταρο.

Οι τετρακυκλίνες σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με δισθενή και τρισθενή κατιόντα. Για το λόγο αυτό η απορρόφησή τους μειώνεται σημαντικά όταν λαμβάνονται από το στόμα σε συνδυασμό με αντιόξινα που περιέχουν ασβέστιο, μαγνήσιο και αργίλιο, με γαλακτοκομικά προϊόντα, με συμπληρώματα ασβεστίου ή με σουκραλάτη (Γαλανοπούλου και Λιάπη, 2000).

Το αντιμικροβιακό φάσμα τους είναι ευρύ αλλά οι μικροοργανισμοί κατά των οποίων είναι ιδιαίτερα δραστικές περιλαμβάνουν γλαμύδια, μυκοπλάσματα, σπειροχαίτες, ρικέτσιες, είδη *Legionella* και είδη *Brucella*.

Η υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη είναι δραστική εναντίον των λοιμώξεων που οφείλονται σε αρνητικά και θετικά κατά Gram βακτήρια (π.χ. *Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.*, *Photobacterium spp.*, *Yersinia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, κλπ.), γλαμύδια και ρικέτσιες. Είναι κατάλληλη για τη θεραπεία συστηματικών βακτηριακών λοιμώξεων των ψαριών εντατικής εκτροφής. Στον παρακάτω Πίνακα 3 αναφέρονται ασθένειες που θεραπεύει η υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη.

Πίνακας 3: Ασθένειες που θεραπεύει η υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη

<p>Οξυτετρακυκλίνη υδροχλωρική</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Δοθιήνωση σαλμονιδών (<i>Aeromonas salmonicida</i>) ○ Στηλώδης νόσος σαλμονιδών (<i>Chondrococcus</i> (<i>Flexibacter columnaris</i>) ○ Ερυθρά στοματίτιδα σαλμονιδών (<i>Yersinia ruckeri</i>) ○ Σηψαιμικές λοιμώξεις κυπρίνου, γατόψαρου, χελιών κ.α. – Αιμορραγική σηψαιμία <i>Aeromonas hydrophila</i>, <i>Pseudomonas</i> ○ Δονακίωση ιχθύων & καρκινοειδών ○ Ελκωτική δερματίτιδα <i>Haemophilus piscium</i> (σαλμονιδών) ○ Νέκρωση των πτερυγίων και της ουράς – <i>Cytophaga</i> <i>psycrophilia</i> ○ Gafkemia in lobsters <i>Aerococcus viridans</i>
--	---

Η υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμά μας ήταν το φαρμακώχο πρόμιγμα (premix) OXYVET 50% της εταιρείας VETERIN. Η μορφή του συγκεκριμένου φαρμακώχου προμίγματος ήταν υδατοδιαλυτή σκόνη χρώματος ανοικτού κιτρίνου σε μεταλλική συσκευασία των 5kg. Η συντήρηση της υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης απαιτεί σκιερό και δροσερό μέρος μέχρι 25⁰C.

Η χορήγηση της υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης στα ψάρια έγινε από το στόμα με την τροφή μετά από ενσωμάτωση της φαρμακευτικής ουσίας στην ιχθυοτροφή με τη βοήθεια ελαίου (ιχθυελαίου).

2.1.2 Ιχθυοτροφή

Η ιχθυοτροφή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Ecolife 64 της εταιρείας Biomar.

Η ιχθυοτροφή ήταν διαμέτρου 4 mm και παρασκευάστηκε με τη μέθοδο της ξηρής πελλετοποίησης εξώθησης. Αυτή η τεχνολογική καινοτομία αποσκοπεί στην καλύτερη απορρόφηση της τροφής από τον οργανισμό του ψαριού αλλά και στην άριστη συμπεριφορά της στο νερό.

Τα εξωθημένα σύμπηκτα κατασκευάζονται με τον ίδιο τρόπο όπως τα συμπηκνωμένα σύμπηκτα, αλλά η χρήση διαφορετικών καλουπιών και φυσικών συνθηκών οδηγεί σε ένα πολύ διαφορετικό προϊόν. Η εν λόγω διαδικασία είναι πιο πολύπλευρη, επιτρέπει τον έλεγχο της πυκνότητας των συμπήκτων, επηρεάζει την πλευστότητα στο νερό, και την προσθήκη πολύ υψηλών επιπέδων λιπιδίων. Η αύξηση της θερμοκρασίας του μείγματος τροφών στους 120-150°C σε έναν θάλαμο προεπεξεργασίας διατηρημένο σε σταθερή ατμοσφαιρική πίεση και η αύξηση της υγρασίας στο 20-24% ζελατινοποιεί το άμυλο. Το ζελατοποιημένο άμυλο αντιστέκεται στην αποσύνθεση στο νερό, συνεπώς τα εξωθημένα σύμπηκτα είναι πιο σταθερά στο νερό καθιστώντας τα πιο κατάλληλα για χρήση με είδη που διατρέφονται αργά σε συστήματα ανακυκλοφορίας νερού. Τα εξωθημένα σύμπηκτα είναι πολύ σκληρά και αυτό μειώνει το ποσοστό μικρών σωματιδίων που παράγονται από αυτά κατά τη διάρκεια της αποστολής και του χειρισμού. Ο ψεκασμός λαδιού πάνω στην επιφάνεια των συμπήκτων, π.χ. επιφανειακή διασπορά, είναι πιο κατάλληλος για εξωθημένα σύμπηκτα.

Η συγκεκριμένη ιχθυοτροφή ενδείκνυται για ψάρια πάχυνσης βάρους περίπου 250 g. Η μεσαίας ενέργειας τροφή, Ecolife 64, είναι το πιο δημοφιλές προϊόν για την παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού. Είναι εύχρηστη και δίνει εξαιρετικά χαρακτηριστικά απόδοσης σε μια ποικιλία συνθηκών εκτροφής.



Εικόνα 3: Ιχθυοτροφή Ecolife 64

Επίσης η συγκεκριμένη ιχθυοτροφή που χρησιμοποιήθηκε δεν περιείχε κανένα προϊόν από χερσαία ζώα καθώς και προσμίξεις γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (G.M.O free, έλεγχος PCR < 1%). Επιπλέον είναι εναρμονισμένη με τους ευρωπαϊκούς στόχους σε ότι αφορά την περιεκτικότητα σε διοξίνες.

2.1.3 Ιχθυέλαιο

Το ιχθυέλαιο που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν μουρουνέλαιο της εταιρείας Pazeril. Το μουρουνέλαιο παράγεται από το ήπαρ του ψαριού μουρούνα που είναι ένα είδος μπακαλιάρου. Το συγκεκριμένο μουρουνέλαιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν συμπυκνωμένο ιχθυέλαιο με υψηλή περιεκτικότητα σε απαραίτητα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της σειράς των ω-3 και συγκεκριμένα σε εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA) και εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA).



Εικόνα 4: Ιχθυέλαια

Η περιεκτικότητά του σε eicosapentaenoic acid & docosahexaenoic acid ήταν (791mg + 527mg)/5ml και σε έκδοχα ήταν tocopherylacetate, dodecylgallate, citric acid, essence orange.

Το ιχθυέλαιο ήταν ανοικτού κιτρίνου χρώματος συσκευασμένο σε γυάλινο σκουρόχρωμο φιαλίδιο περιεχομένου 150ml. Απαραίτητη ήταν η προφύλαξή του από το φως και η διατήρησή του σε θερμοκρασία κάτω των 25°C.

2.1.4 Προετοιμασία φαρμακούχου ιχθυοτροφής

Η φαρμακούχος ιχθυοτροφή παρασκευάστηκε με ενσωμάτωση του φαρμακούχου προμίγματος (premix) OXYVET 50% της εταιρείας VETERIN στην εμπορική ιχθυοτροφή Ecolife 64 της εταιρείας Biomar με τη βοήθεια ιχθυέλαιου το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως συνδετικό μέσο. Συγκεκριμένη ποσότητα συμπύκτων τοποθετήθηκε σε καθαρή επιφάνεια και στη συνέχεια έγινε ψεκασμός με το ιχθυέλαιο, με παράλληλη ανακίνηση. Το φάρμακο ενσωματώθηκε στα εμποτισμένα με ιχθυέλαιο σύμπηκτα, με επίπαση και παράλληλη ανακίνηση, έτσι ώστε η

φαρμακούχος σκόνη να προσκολληθεί στην ιχθυοτροφή και να μη μείνει στην επιφάνεια παρασκευής της.

Η ποσότητα της οξυτετρακυκλίνης που χρησιμοποιήθηκε υπολογίστηκε με βάση την προτεινόμενη δοσολογία για τη συγκεκριμένη φαρμακευτική ουσία. Σύμφωνα, με τον ΕΟΦ η δόση της οξυτετρακυκλίνης είναι 100 ppm και η χορήγηση γίνεται είτε από το στόμα με την τροφή, είτε μετά από διάλυση σε νερό και εμφύσηση των ψαριών. Στο συγκεκριμένο πείραμα, σε 50 g ιχθυοτροφής προστέθηκαν 2 g οξυτετρακυκλίνης. Η ενσωμάτωση της παραπάνω ποσότητας φαρμάκου έγινε με δύο διαφορετικές ποσότητες ιχθυελαίου και παρασκευάστηκαν δύο τύποι φαρμακούχων ιχθυοτροφών. Στη μια παρασκευή τα 50 g ιχθυοτροφής ψεκάστηκαν με 2 ml ιχθυέλαιο και στη συνέχεια ακολούθησε επίταση της φαρμακούχου σκόνης ενώ στην άλλη παρασκευή, χρησιμοποιήθηκε η διπλάσια ποσότητα ιχθυελαίου, δηλαδή 4 ml. Στον Πίνακα 4 φαίνονται αναλυτικά οι δύο τρόποι παρασκευής των φαρμακούχων ιχθυοτροφών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 4: Παρασκευή φαρμακούχων ιχθυοτροφών με 2 ml και 4 ml ιχθυέλαιο

ΦΑΡΜΑΚΟΥΧΟΣ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΗ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΗΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΙΧΘΥΕΛΑΙΟΥ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΦΑΡΜΑΚΟΥ
Φαρμακούχος ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο	50 g	2 ml	2 g
Φαρμακούχος ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο	50 g	4 ml	2 g

2.1.5 Πειραματικό πρωτόκολλο

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε θαλασσινό νερό, το οποίο περιέχονταν σε γυάλινη κυλινδρική επιφάνεια μήκους 30 cm στη βάση της οποίας τοποθετήθηκε αερόπετρα με παροχή αέρα. Το διαλυμένο οξυγόνο ήταν 7 ppm, το pH 7,9 και η θερμοκρασία 21°C.

Αφού παρασκευάστηκαν οι δύο τύποι φαρμακούχου ιχθυοτροφής, ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο και ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο, ζυγίστηκαν δείγματα του ενός 1 g και από τις δύο ιχθυοτροφές.

Στη συνέχεια τα δείγματα του ενός 1 g τοποθετήθηκαν σε διάτρητο πλέγμα, το οποίο επέτρεπε την ελεύθερη είσοδο του νερού και εμπόδιζε τη βύθιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής και βυθίστηκαν στο θαλασσινό νερό σταθερά για χρόνους 1-2 sec, ½ min, 1 min και 2 min όπως φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Μεταχειρίσεις

	Ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο	Ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο
Μάρτυρας	1g ιχθυοτροφής x 3 επαναλήψεις	1g ιχθυοτροφής x 3 επαναλήψεις
1-2 sec	1g ιχθυοτροφής x 3 επαναλήψεις	1g ιχθυοτροφής x 3 επαναλήψεις
½ min	1g ιχθυοτροφής x 3 επαναλήψεις	1g ιχθυοτροφής x 3 επαναλήψεις
1 min	1g ιχθυοτροφής x 3 επαναλήψεις	1g ιχθυοτροφής x 3 επαναλήψεις
2 min	1g ιχθυοτροφής x 3 επαναλήψεις	1g ιχθυοτροφής x 3 επαναλήψεις

Δείγμα του ενός 1g από την κάθε μεταχείριση θρυμματίστηκε σε μορφή σκόνης σε γουδί πορσελάνης.

Η ίδια διαδικασία τηρήθηκε και για τις δύο φαρμακούχες ιχθυοτροφές καθώς και για τους μάρτυρες. Οι μάρτυρες ήταν φαρμακούχος ιχθυοτροφή η οποία δεν εμβαπτίσθηκε στο θαλασσινό νερό. Και στην περίπτωση των μαρτύρων χρησιμοποιήθηκαν επίσης δύο ποσότητες ιχθυελαίου. Έτσι προέκυψε μάρτυρας με 2ml ιχθυέλαιο και μάρτυρας με 4ml ιχθυέλαιο.

Επί πλέον ελέγχθηκαν δύο δείγματα τροφής-ιχθυελαίου για τυχόν περιεκτικότητα οξυτετρακυκλίνης και διαπιστώθηκε μηδενική περιεκτικότητα οξυτετρακυκλίνης.

2.2 Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας υψηλής επίδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Η χρήση φαρμάκων στις εντατικές εκτροφές ψαριών, οι έντονες ανησυχίες του επιστημονικού κόσμου και των καταναλωτών για την παρουσία καταλοίπων στα ψάρια της εκτροφής, αλλά και η ταυτόχρονη εκδήλωση φαινομένων βακτηριακής αντοχής κατά των ουσιών αυτών, οδήγησαν την έρευνα στη μελέτη του κύκλου, τον οποίο ακολουθούν τα φάρμακα μέσα στην εκτροφή και στον περιβάλλοντα αυτή χώρο. Επίσης οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων ευαίσθητων, τεκμηριωμένων και αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των καταλοίπων τους.

Πολλές είναι οι μέθοδοι για τον προσδιορισμό των αντιβακτηριακών ουσιών. Οι περισσότερες μέθοδοι είναι χημικές και βασίζονται στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και στην υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης (CAMAG, 1995).



Εικόνα 5: Υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης

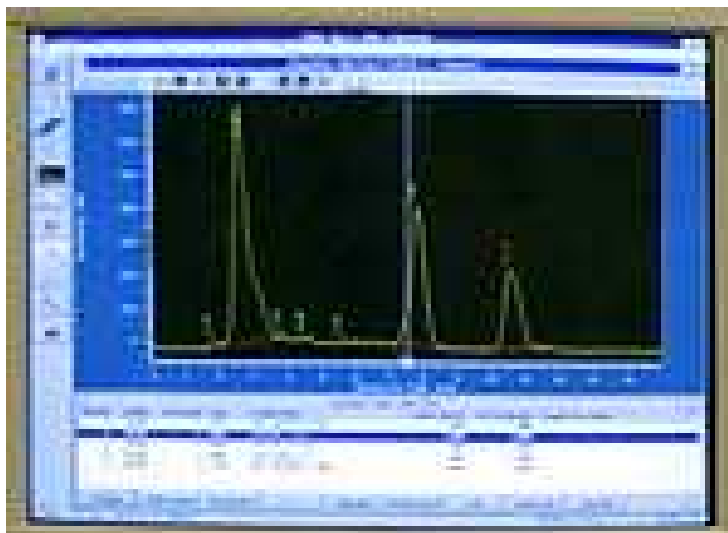
Η χρωματογραφία βρίσκει όλο και περισσότερες εφαρμογές μια και πληθαίνουν οι μέθοδοι ανίχνευσης και προσδιορισμού ενώσεων με μεγάλη χημική συγγένεια μεταξύ τους (στεροειδή, αμινοξέα, υδατάνθρακες). Γενικά ο διαχωρισμός ενός μίγματος ενώσεων με τη μέθοδο της χρωματογραφίας στηρίζεται στις διαφορές που παρουσιάζουν τα συστατικά ενός μίγματος ουσιών στο ρυθμό μετανάστευσης επάνω ή διαμέσου κάποιου πορώδους υλικού. Η μετανάστευση αυτή πετυχαίνεται με τη ροή κάποιου υγρού ή αερίου (κινητή φάση) διαμέσου του πορώδους υλικού (σταθερή φάση) και σε ορισμένες περιπτώσεις διαμέσου μιας δεύτερης υγρής φάσης. Ο φυσικοχημικός μηχανισμός, με τον οποίο διαχωρίζονται τα συστατικά ενός μίγματος ποικίλλει. Μπορεί δηλαδή να λειτουργεί το φαινόμενο της προσρόφησης, ή της μοριακής διήθησης. Οι χρωματογραφικές μέθοδοι κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες είτε ανάλογα με το μηχανιστικό τους μέρος, δηλ. χρωματογραφία στήλης, λεπτής στιβάδας, χάρτου και αεριοχρωματογραφία, είτε με βάση το φυσικοχημικό

φαινόμενο με το οποίο πετυχαίνεται ο διαχωρισμός, δηλαδή χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, ιονικής ανταλλαγής και μοριακής διήθησης.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται ολοένα και πιο αισθητή η ανάγκη χρησιμοποίησης HPLC. Αυτό αφορά κυρίως την ανάλυση ορμονών και παραγώγων τους, φαρμάκων, βιταμινών και τοξικών ουσιών.

Το δείγμα που προορίζεται για ανάλυση εγχύεται μέσω της βαλβίδας και προστίθεται σε μια σταθερή ροή κινητής φάσης που γίνεται δυνατή χάρη σε μια ειδική αντλία. Η στήλη ανάλογα με τη σύστασή της (στερεά φάση) έχει την ιδιότητα να κατακρατά τις ενώσεις που υπάρχουν στο δείγμα, άλλες περισσότερο και άλλες λιγότερο. Μετά την έξοδο από τη στήλη οι ενώσεις ανιχνεύονται με βάση κάποια ιδιότητά τους (π.χ. απορρόφηση στο υπεριώδες, οξειδοαναγωγική ικανότητα, φθορισμός) από ειδικό ανιχνευτή που μέσω ενός επεξεργαστή στέλνει το σήμα σε ειδικό καταγραφικό όργανο από όπου παίρνουμε το χαρακτηριστικό προφίλ.

Κάθε ένωση χαρακτηρίζεται από τον χρόνο κατακράτησης κι έτσι γίνεται δυνατή η ταυτοποίηση των κορυφών. Η επιφάνεια που αναλογεί σε κάθε ένωση είναι ανάλογη της ποσότητας που υπάρχει στο δείγμα. Έτσι αν συγκρίνουμε την επιφάνεια της υπό εξέταση ουσίας με την αντίστοιχη επιφάνεια που δίνει γνωστή συγκέντρωση της ίδιας με την υπό εξέταση ουσία μπορούμε να έχουμε τον ποσοτικό προσδιορισμό της. Η μέτρηση μπορεί να γίνει με το χέρι σε απλές περιπτώσεις, αλλά συνιστάται γενικά η χρήση ενός ολοκληρωτή που επεξεργάζεται το αναλυτικό σήμα και μπορεί ακόμη να μετατρέψει απευθείας την επιφάνεια της κορυφής σε ποσότητα.



Εικόνα 6: Χρωματογράφημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής επίδοσης

Σε ορισμένες περιπτώσεις πρέπει να γίνεται προκατεργασία του δείγματος με στόχο να διαχωρίζονται, κατά το δυνατόν οι ενώσεις που ενδιαφέρουν από συστατικά που δεν ενδιαφέρουν. Μ' αυτόν τον τρόπο αποφεύγονται και οι όποιες αλλοιώσεις του αποτελέσματος μπορούν να προκύψουν από τις παρεμβολές σημάτων που οφείλονται σε ομοειδείς ενώσεις, ή απλούστερα ενώσεις με ίδιο χρόνο κατακράτησης.

2.2.1 Προετοιμασία δείγματος

Η ανάλυση της οξυτετρακυκλίνης έγινε σε 100 mg (0,1g) δείγματος τροφής σύμφωνα με τους Rigos *et al.*, (1999), με ορισμένες τροποποιήσεις. Για τον εντοπισμό της οξυτετρακυκλίνης, τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με 10 ml buffer (0,1M κιτρικό οξύ, 0,1M EDTA 2 Na και 0,1M Na₂HPO₄·2H₂O). Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στις 4.000 στροφές το λεπτό σε φυγόκεντρο model Hettich UNIVERSAL. 100 μl από το υπερκείμενο υγρό διαλύθηκαν σε 2 ml buffer (0,1M oxalic acid, acetonitrile HPLC σε αναλογία 80:20). Στη συνέχεια τα δείγματα περάστηκαν από φιλτράκια σύριγγας για HPLC 25 mm και τοποθετήθηκαν για 1 min

σε μηχανικό αναδευτήρα BIBBY Stuart. Ακολούθως 20 μl από το κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν με σύριγγα στην HPLC.

2.2.2 Η συσκευή

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία υψηλής επίδοσης ενιαίου αναλυτικού συστήματος διαχείρισης διαλυτών και δείγματος, HP-1100 αποτελούμενη από:

- Προγραμματιζόμενη αντλία βαθμιαίας έκλουσης τριών διαλυτών
- Ενσωματωμένο δειγματολήπτη αυτόματης διαχείρισης δειγμάτων με κλειστό και θερμοστατούμενο θάλαμο προστατευόμενο από την έκθεση στο φως
- Ενσωματωμένο σύστημα απαέρωσης με κενό τριών διαλυτών
- Φθορισμομετρικό ανιχνευτή σάρωσης (Scanning Fluorescence Detector-SFD), model 474 με μικροκυψελίδα των 16 μL για μέγιστη ευαισθησία, Waters, USA
- Φασματοφωτομετρικό ανιχνευτή υπεριώδους/ορατού πολλαπλών φωτοδιόδων (UV/vis Photodiode Array-PDA), model M996, με εύρος μήκους κύματος 190–800 nm, 512 φωτοδιόδων και με μέγιστη διαχωριστική ικανότητα φάσματος 1,2 nm / diode και μικροκυψελίδα (TaperBeam flow cell) 10 mm / 8 μL, Waters, USA
- Ηλεκτρονικό υπολογιστή Pentium II στα 333 MHz
- Έγχρωμο εκτυπωτή ψεκασμού μελάνης, Deskjet Printer 815 C, Hewlett-Packard, Germany
- Χρωματογραφική στήλη HYPURITY AQUASTAR 150 mm x 4 mm id x 3 μm Thermo Electron Corporation

2.2.3 Λογισμικό πρόγραμμα ελέγχου και επεξεργασίας δεδομένων

Το λογισμικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της λειτουργίας του χρωματογράφου ήταν το HP Chem Station LC/MSD A. 06.01

Οι χρωματογραφικές συνθήκες, οι οποίες τυποποιήθηκαν, φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Χρωματογραφικές συνθήκες

➤ Λειτουργία αντλίας	ισοκρατική
➤ Τύπος απαέρωσης	κανονικός
➤ Μονάδες κλίμακας	mAU
➤ Μήκος κύματος (υπεριώδες)	$\lambda_{\max} \sim 360 \text{ nm}$
➤ Αναλυτική στήλη	HYPURITY AQUASTAR 150 mm x 4 mm id x 3 μm Thermo Electron Corporation
➤ Θερμοκρασία στήλης	25 °C
➤ Κινητή φάση	Οξαλικό οξύ : Ακετονιτρίλιο σε αναλογία 80 : 20
➤ Ροή κινητής φάσης	1 ml/min
➤ Όγκος έγχυσης δείγματος	20 μL

2.2.4 Επικουρικά όργανα

- Μηχανικός αναδευτήρας, BIBBY Stuart
- Φυγόκεντρος, model Hettich UNIVERSAL
- Αναλυτικός ζυγός 4 δεκαδικών, τύπου Precisa 205 A SCS
- Αυτόματα σιφώνια Pipetman eppendorf P20 P100, P1000 μL

2.2.5 Χημικά αντιδραστήρια

- Μεθανόλη (Methanol HPLC)
- Ακετονιτρίλιο (Acetonitrile HPLC)
- Οξαλικό οξύ (Oxalic acid, 2 H₂O)
- Υπερ-καθαρό νερό (Water HPLC)

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Citric acid, $2\text{H}_2\text{O}$
- EDTA άλας Na- $2\text{H}_2\text{O}$
- Φιλτράκια σύριγγας για HPLC (0,45), 25 mm
- Υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη (Oxytetracycline hydrochloride, $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{O}_9$, $M=496,89 \text{ g/Mol}$)

2.2.6 Γυάλινα και πλαστικά υλικά

- Γυάλινα φιαλίδια εκχύλισης 20 ml με βιδωτό πώμα
- Γυάλινα ποτήρια 100 ml
- Γυάλινοι κύλινδροι 50 ml και 100 ml
- Γυάλινα χωνιά Duran διαμέτρου 5 cm
- Ογκομετρικές φιάλες 50 ml, 100 ml και 1000 ml, Germany
- Γυάλινες σύριγγες των 10 ml
- Διηθητικά φίλτρα διαμέτρου 0,45 μm
- Ρύγχη όγκου 20 μl , 100 μl και 1000 μl μιας χρήσεως
- Γουδιά πορσελάνης

2.2.7 Παρασκευή πρότυπου διαλύματος οξυτετρακυκλίνης

Με την πρότυπη καμπύλη αναφοράς της υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης συσχετίζουμε τη συγκέντρωση της υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης με την τιμή του σήματος, δηλαδή το εμβαδόν κορυφής, της υγρής χρωματογραφίας.

Λόγω της φωτοευαισθησίας της υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης η διαδικασία της παρασκευής των προτύπων διαλυμάτων έγινε αποφεύγοντας την άμεση έκθεση στο φυσικό ή τεχνητό φωτισμό.

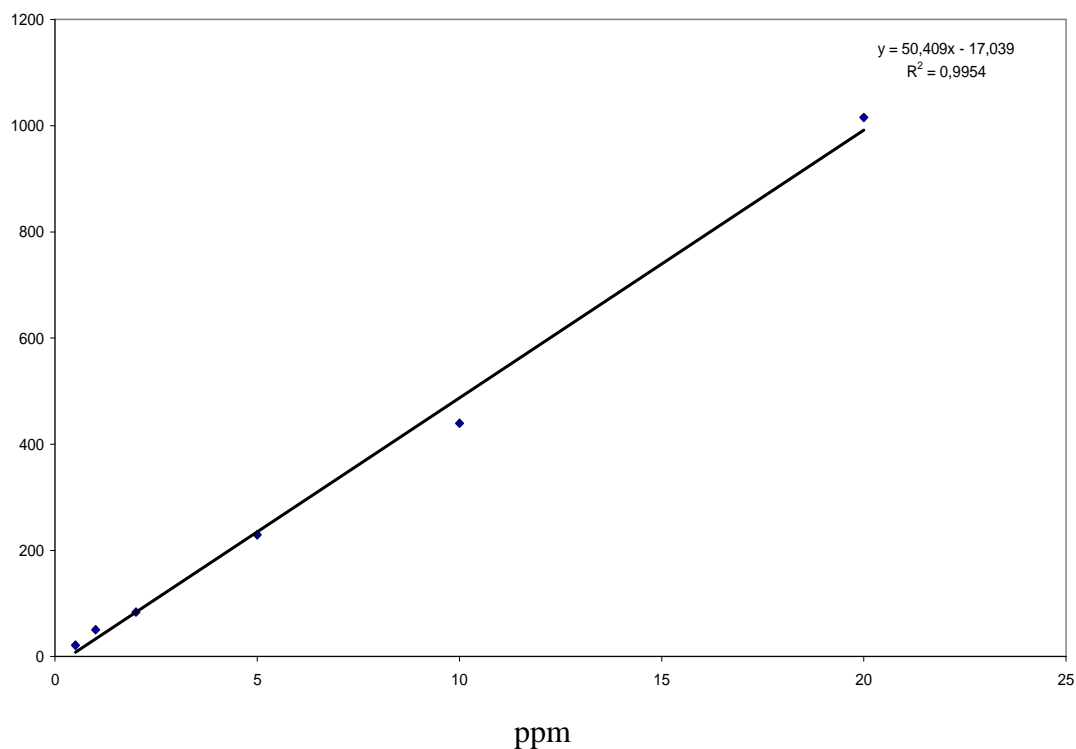
Για την παρασκευή του διαλύματος πρότυπης ουσίας 500 ppm (500 µg/ml) σε μεθανόλη ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0,0051 g υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης, διαλύθηκαν σε 10 ml μεθανόλης και τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι

Στη συνέχεια έγιναν αραιώσεις σε συγκεντρώσεις 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 5 ppm, 10 ppm, και 20 ppm και παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης. Από κάθε πρότυπο διάλυμα έγινε έγχυση στον υγρό χρωματογράφο 20 µL και σχηματίστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς (Πίν. 7, Σχ. 1). Οι χρόνοι ανάκτησης του φαρμάκου ήταν για 0,5 ppm (2,928 min), για 1 ppm (2,802 min), για 2 ppm (2,796 min), για 5 ppm (2,792 min), για 10 ppm (2,786 min), για 20 ppm (2,783 min).

Πίνακας 7: Αραιώσεις πρότυπων διαλυμάτων οξυτετρακυκλίνης με τα αντίστοιχα εμβαδά κορυφής

Αραιώσεις πρότυπων διαλυμάτων οξυτετρακυκλίνης σε ppm	Εμβαδόν κορυφής που αντιστοιχεί στις συγκεκριμένες αραιώσεις
0,5 ppm	21 (εμβαδόν κορυφής)
1 ppm	50,2 (εμβαδόν κορυφής)
2 ppm	83,5 (εμβαδόν κορυφής)
5 ppm	229,1 (εμβαδόν κορυφής)
10 ppm	439,4 (εμβαδόν κορυφής)
20 ppm	1015,3 (εμβαδόν κορυφής)

Area



Σχήμα 1: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς της οξυτετρακυκλίνης

Η καμπύλη αναφοράς με έξι σημεία (0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm), μη συμπεριλαμβανομένου του μηδενός, ήταν γραμμική. Σχεδιάζοντας την ποσότητα της οξυτετρακυκλίνης προς την επιφάνεια της κορυφής της, το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης $R^2=0,9954$.

Η μεγάλη τιμή του R^2 ($R^2 > 0,9$) δείχνει τη μεγάλη ικανότητα προσαρμογής της εξίσωσης παλινδρόμησης στα πειραματικά δεδομένα. Επί πλέον, η γραμμικότητα της επιφάνειας της κορυφής και της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης επέτρεψε τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό της στα δείγματα που αναλύθηκαν.

2.3 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση έγινε ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) με τη χρήση του στατιστικού πακέτου «SPSS 12,0 for Windows» και οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων συγκρίθηκαν με βάση τα κριτήρια Duncan-test και της LSD, για επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$. Οι γραφικές παραστάσεις δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας το «Microsoft Excel».

3. Αποτελέσματα

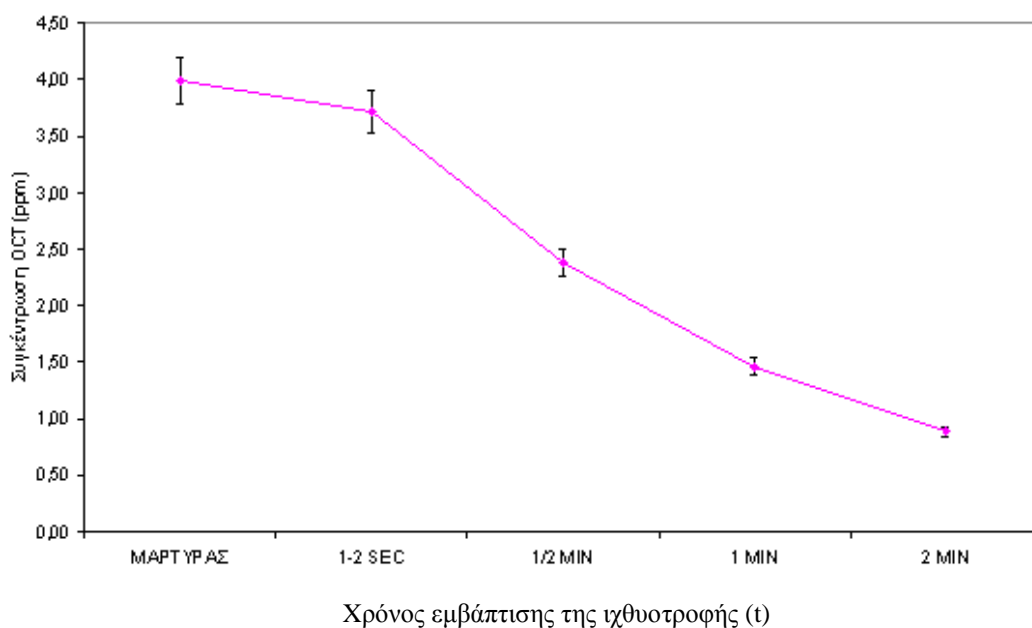
3.1.1 Μεταβολή της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης στην ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο

Οι συγκεντρώσεις της οξυτετρακυκλίνης που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Επίδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), στην περίπτωση της ιχθυοτροφής με 2 ml ιχθυέλαιο για όλες τις μεταχειρίσεις (1-2 sec, ½ min, 1 min, 2 min) και του μάρτυρα, φαίνονται στον Πίνακα 8.

Συγκεκριμένα, σε κάθε μεταχείριση παρουσιάζονται αναλυτικά οι τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυτετρακυκλίνης που περιέχονται σε 20 μl δείγματος που τοποθετήθηκαν στην HPLC.

Πίνακας 8: Συγκεντρώσεις οξυτετρακυκλίνης για την ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο για όλες τις μεταχειρίσεις: 1-2 sec, ½ min, 1 min, 2 min και του μάρτυρα.

	Ιχθυοτροφή με 2ml ιχθυέλαιο (συγκέντρωση οξυτετρακυκλίνης σε ppm σε τρία δείγματα)
Μάρτυρας	3,00 4,76 4,21
1-2 sec	4,49 3,57 3,08
½ min	2,48 2,18 2,50
1 min	1,11 1,65 1,62
2 min	0,68 0,97 1,01



Σχήμα 2: Μεταβολή συγκέντρωσης οξυτετρακυκλίνης η οποία ενσωματώθηκε με 2 ml ιχθυέλαιο σε ιχθυοτροφή.

Σύμφωνα με το Σχήμα 2 και τον Πίνακα 9 παρατηρούμε ότι η ποσότητα της φαρμακούχου ουσίας στο μάρτυρα με 2 ml ιχθυέλαιο, ήταν $3,99 \pm 0,5$ ppm.

Μετά την εμβάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής στο θαλασσινό νερό για χρόνο 1-2 sec, η περιεχόμενη ποσότητα της φαρμακούχου ουσίας μειώθηκε σε $3,71 \pm 0,4$ ppm, δηλαδή παρατηρήθηκε μια μείωση κατά 0,28 ppm συγκριτικά με το μάρτυρα.

Στη συνέχεια μετά από εμβάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής στο θαλασσινό νερό για χρόνο ½ min, η συγκέντρωση της φαρμακούχου ουσίας μειώθηκε σε $2,39 \pm 0,1$ ppm, δηλαδή παρατηρήθηκαν σημαντικές μειώσεις κατά 1,6 ppm σε σχέση με το μάρτυρα και κατά 1,32 ppm σε σχέση με την εμβάπτιση για 1-2 sec.

Η εμβάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής στο θαλασσινό νερό για 1 min μείωσε την ποσότητα της φαρμακούχου ουσίας σε $1,46 \pm 0,1$ ppm, δηλαδή παρατηρήθηκαν σημαντικές μειώσεις κατά 2,53 ppm σε σχέση με το μάρτυρα, κατά

2,25 ppm σε σχέση με την εμβάπτιση για 1-2 sec και κατά 0,93 ppm σε σχέση με την εμβάπτιση ½ min.

Τέλος η εμβάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής στο θαλασσινό νερό για χρόνο 2 min προκάλεσε μείωση της ποσότητας της φαρμακούχου ουσίας σε $0,88 \pm 0,1$ ppm, δηλαδή παρατηρήθηκαν σημαντικές μειώσεις κατά 3,11 ppm σε σχέση με το μάρτυρα, κατά 2,83 ppm σε σχέση με την εμβάπτιση για 1-2 sec, κατά 1,51 ppm σε σχέση με την εμβάπτιση ½ min και 0,58 ppm σε σχέση με την εμβάπτιση για 1 min.

Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις οξυτετρακυκλίνης σε ppm της ιχθυοτροφής με 2 ml ιχθυέλαιο στις διάφορες εμβαπτίσεις.

Με το ίδιο γράμμα (a, b, c) συμβολίζονται οι στατιστικώς μη σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το κριτήριο Duncan για επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$.

Μεταχειρίσεις MO±TA	Μάρτυρας	1-2 sec	½ min	1 min	2 min
Συγκέντρωση οξυτετρακυκλίνης (ppm)	3,99±0,5a	3,71±0,4a	2,39±0,1b	1,46±0,1c	0,88±0,1c

Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι για την ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις της οξυτετρακυκλίνης στο μάρτυρα και στην εμβάπτιση για 1-2 sec. Ωστόσο οι συγκεντρώσεις και στις δύο περιπτώσεις (μάρτυρας και 1-2 sec) διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά με τις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων διαφορετικών χρονικά εμβαπτίσεων. Επίσης δεν υπήρξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων στις εμβαπτίσεις για 1 min και 2 min. Η συγκέντρωση της οξυτετρακυκλίνης κατά την εμβάπτιση για ½ min διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τις συγκεντρώσεις των εμβαπτίσεων για 1 min και 2 min.

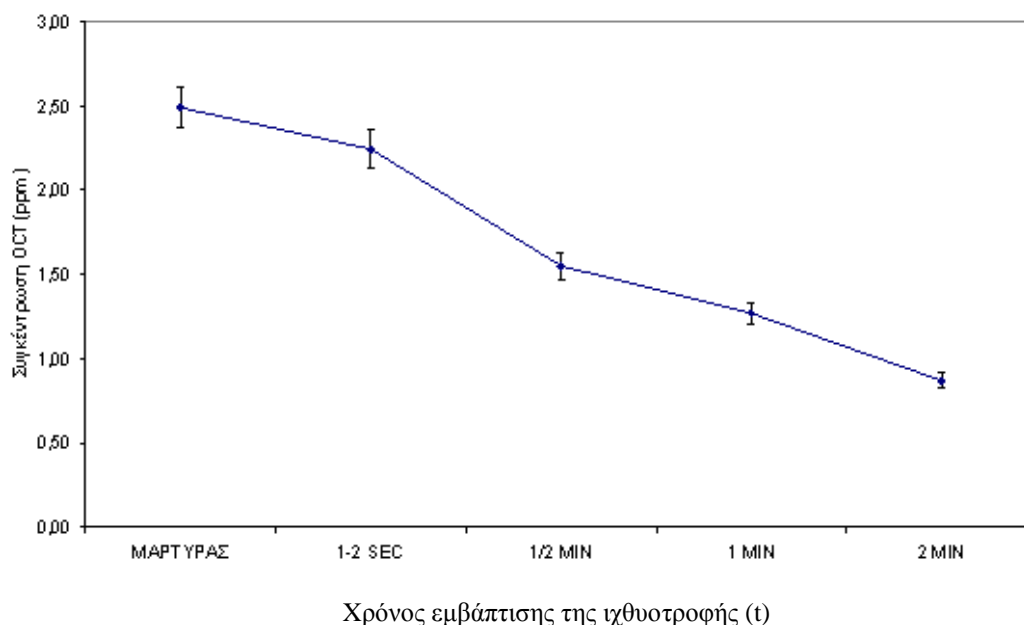
3.1.2 Μεταβολή της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης στην ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο

Οι συγκεντρώσεις της οξυτετρακυκλίνης που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Επίδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), στην περίπτωση της ιχθυοτροφής με 4ml ιχθυέλαιο και για όλες τις μεταχειρίσεις, μάρτυρας, 1-2 sec, ½ min, 1 min, 2 min, φαίνονται στον Πίνακα 10.

Συγκεκριμένα, σε κάθε μεταχείριση φαίνονται αναλυτικά οι τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυτετρακυκλίνης που περιέχονται σε 20 μl δείγματος που τοποθετήθηκαν στην HPLC.

Πίνακας 10: Συγκεντρώσεις οξυτετρακυκλίνης για την ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο για όλες τις μεταχειρίσεις: 1-2 sec, ½ min, 1 min, 2 min και του μάρτυρα.

	Ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο (συγκέντρωση οξυτετρακυκλίνης σε ppm σε τρία δείγματα)
Μάρτυρας	2,29 2,75 2,43
1-2 sec	3,45 1,54 1,74
½ min	1,39 1,68 1,58
1 min	1,75 1,44 0,82
2 min	1,16 0,70 0,75



Σχήμα 3: Μεταβολή συγκέντρωσης οξυτετρακυκλίνης η οποία ενσωματώθηκε με 2 ml ιχθυέλαιο σε ιχθυοτροφή.

Σύμφωνα με το Σχήμα 3 και τον Πίνακα 11 παρατηρούμε ότι η ποσότητα της φαρμακούχου ουσίας στο μάρτυρα με 4 ml ιχθυέλαιο, ήταν $2,49 \pm 0,1$ ppm.

Μετά την εμφάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής στο θαλασσινό νερό για χρόνο 1-2 sec, η περιεχόμενη ποσότητα της φαρμακούχου ουσίας μειώθηκε σε $2,24 \pm 0,6$ ppm, δηλαδή παρατηρήθηκε μια μείωση κατά 0,25 ppm συγκριτικά με το μάρτυρα.

Στη συνέχεια μετά από εμφάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής στο θαλασσινό νερό για χρόνο ½ min, η συγκέντρωση της φαρμακούχου ουσίας μειώθηκε σε $1,55 \pm 0,08$ ppm, δηλαδή παρατηρήθηκαν σημαντικές μειώσεις κατά 0,94 ppm σε σχέση με το μάρτυρα και κατά 0,69 ppm σε σχέση με την εμφάπτιση για 1-2 sec.

Η εμφάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής στο θαλασσινό νερό για 1 min μείωσε την ποσότητα της φαρμακούχου ουσίας σε $1,34 \pm 0,2$ ppm, δηλαδή παρατηρήθηκαν σημαντικές μειώσεις κατά 1,15 ppm σε σχέση με το μάρτυρα, κατά

0,9 ppm σε σχέση με την εμβάπτιση για 1-2 sec και κατά 0,21 ppm σε σχέση με την εμβάπτιση ½ min.

Τέλος η εμβάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής στο θαλασσινό νερό για χρόνο 2 min προκάλεσε μείωση της ποσότητας της φαρμακούχου ουσίας σε $0,87 \pm 0,1$ ppm, δηλαδή παρατηρήθηκαν σημαντικές μειώσεις κατά 1,62 ppm σε σχέση με το μάρτυρα, κατά 1,37 ppm σε σχέση με την εμβάπτιση για 1-2 sec, κατά 0,68 ppm σε σχέση με την εμβάπτιση ½ min και 0,47 ppm σε σχέση με την εμβάπτιση για 1 min.

Πίνακας 11: Συγκεντρώσεις οξυτετρακυκλίνης σε ppm της ιχθυοτροφής με 4 ml ιχθυέλαιο στις διάφορες εμβαπτίσεις.

Μεταχειρίσεις MO±TA	Μάρτυρας	1-2 sec	½ min	1 min	2 min
Συγκέντρωση οξυτετρακυκλίνης (ppm)	2,49±0,1a	2,24±0,6a	1,55±0,08b	1,34±0,2 bc	0,87±0,1c

Με το ίδιο γράμμα (a, b, c) συμβολίζονται οι στατιστικώς μη σημαντικές διαφορές σύμφωνα με το κριτήριο Duncan για επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$.

Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι για την ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο δεν υπήρξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις της οξυτετρακυκλίνης στο μάρτυρα και στην εμβάπτιση για 1-2 sec, καθώς επίσης και στις συγκεντρώσεις για τις εμβαπτίσεις για ½ min και 1 min. Στατιστικώς μη σημαντικές διαφορές προέκυψαν και μεταξύ των συγκεντρώσεων για τις εμβαπτίσεις 1 min και 2 min. Οι συγκεντρώσεις του μάρτυρα και της εμβάπτισης για 1-2 sec είχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές με τις συγκεντρώσεις των άλλων τριών εμβαπτίσεων (½ min, 1 min, 2 min). Στατιστικώς σημαντικές διαφορές υπήρξαν και μεταξύ των συγκεντρώσεων για τις εμβαπτίσεις για ½ min και 2 min.

3.1.3 Σύγκριση της μεταβολής της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης στην ιχθυοτροφή για τις δύο ποσότητες ιχθυελαίου

Στον Πίνακα 12 φαίνεται η μέση συγκέντρωση οξυτετρακυκλίνης στα 20 μl δείγματος στα οποία έγινε Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Επίδοσης (HPLC), για τις δύο ιχθυοτροφές με 2 ml και 4 ml ιχθυέλαιο για όλες τις μεταχειρίσεις: 1-2 sec, ½ min, 1 min, 2 min και του μάρτυρα.

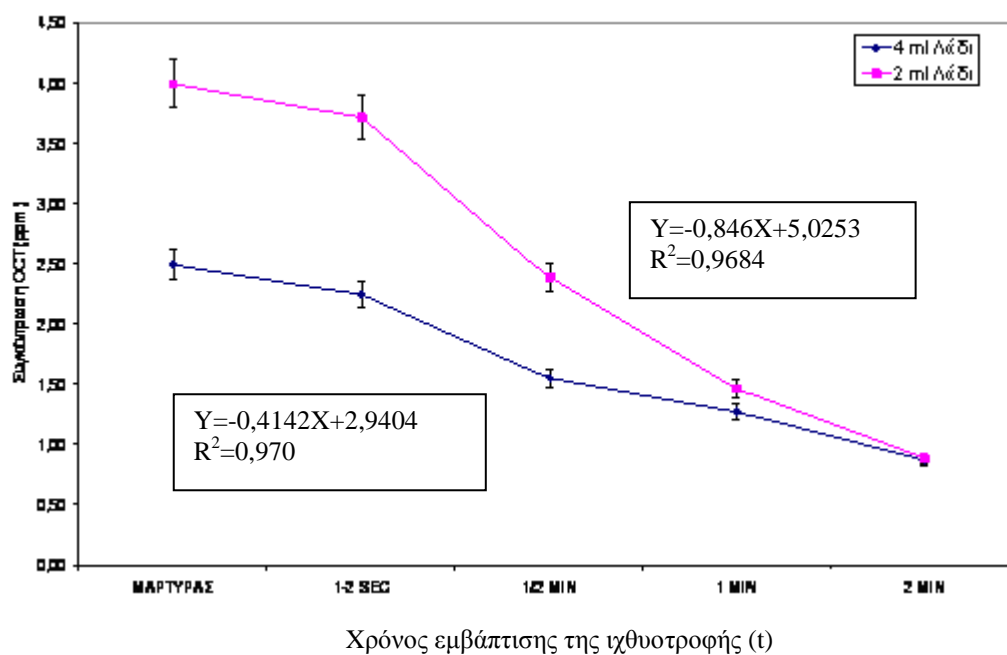
Πίνακας 12: Μέση συγκέντρωση οξυτετρακυκλίνης σε ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο και ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο για όλες τις μεταχειρίσεις: 1-2 sec, ½ min, 1 min, 2 min και του μάρτυρα.

Μεταχειρίσεις	Ιχθυοτροφή με 2ml ιχθυέλαιο MO±TA	Ιχθυοτροφή με 4ml ιχθυέλαιο MO±TA	F test
Μάρτυρας	3,99±0,5	2,49±0,1	*
1-2 sec	3,71±0,4	2,24±0,6	†
½ min	2,39±0,1	1,55±0,08	**
1 min	1,46±0,1	1,34±0,2	ns
2 min	0,88±0,1	0,87±0,1	ns

** Σημαντικές διαφορές για $p < 0,05$

* Σημαντικές διαφορές για $p < 0,05$

† Σημαντικές διαφορές για $p < 0,05$



Σχήμα 4: Μεταβολή συγκέντρωσης οξυτετρακυκλίνης για τις δύο ιχθυοτροφές με ποσότητες 2 ml ιχθυέλαιο και 4 ml ιχθυέλαιο.

Η σχέση συγκέντρωσης οξυτετρακυκλίνης και χρόνου εμφύπτισης περιγράφηκε με γραμμική συνάρτηση της μορφής $Y=a-bX$, όπου Y η συγκέντρωση της οξυτετρακυκλίνης και X ο χρόνος εμφύπτισης. Η κλίση της ευθείας b , αποδίδει το μέσο ρυθμό μείωσης της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης. Οι γραμμικές εξισώσεις δίνονται παρακάτω

Ιχθυοτροφή με 2ml ιχθυέλαιο: $Y=-0,846X+5,0253$

$R^2=0,9684$, όπου R^2 συντελεστής συσχέτισης

Ιχθυοτροφή με 4ml ιχθυέλαιο: $Y=-0,4142X+2,9404$

$R^2=0,970$, όπου R^2 συντελεστής συσχέτισης

Σύμφωνα με το Σχήμα 4 και τον Πίνακα 12 παρατηρούμε ότι:

Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε φαρμακούχος ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο η ποσότητα της φαρμακούχου ουσίας στο μάρτυρα, ο οποίος δεν εμβάπτιστηκε στο θαλασσινό νερό, ήταν $3,99 \pm 0,5$ ppm, ενώ όταν χρησιμοποιήθηκε φαρμακούχος ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο η ποσότητα της φαρμακούχου ουσίας στο μάρτυρα ήταν $2,49 \pm 0,1$ ppm. Μεταξύ των δύο μαρτύρων, υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά της τάξης των 1,5 ppm για $p < 0,05$.

Μετά την εμβάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής με 2 ml ιχθυέλαιο στο θαλασσινό νερό για χρόνο 1-2 sec η περιεχόμενη ποσότητα της φαρμακούχου ουσίας ήταν $3,71 \pm 0,4$ ppm, ενώ μετά την εμβάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής με 4 ml ιχθυέλαιο στο θαλασσινό νερό για χρόνο 1-2 sec, η περιεχόμενη ποσότητα της φαρμακούχου ουσίας ήταν $2,24 \pm 0,6$ ppm. Επομένως μεταξύ της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης στη φαρμακούχο ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο και στη φαρμακούχο ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά της τάξης των 1,47 ppm για $p < 0,05$.

Στη συνέχεια μετά την εμβάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής με 2 ml ιχθυέλαιο στο θαλασσινό νερό για χρόνο $\frac{1}{2}$ min, η περιεχόμενη ποσότητα της φαρμακούχου ουσίας ήταν $2,39 \pm 0,1$ ppm, ενώ μετά την εμβάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής με 4 ml ιχθυέλαιο στο θαλασσινό νερό για χρόνο $\frac{1}{2}$ min η περιεχόμενη ποσότητα της φαρμακούχου ουσίας ήταν $1,55 \pm 0,08$ ppm. Έτσι μεταξύ της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης στη φαρμακούχο ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο και στη φαρμακούχο ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά της τάξης των 0,84 ppm για $p < 0,05$.

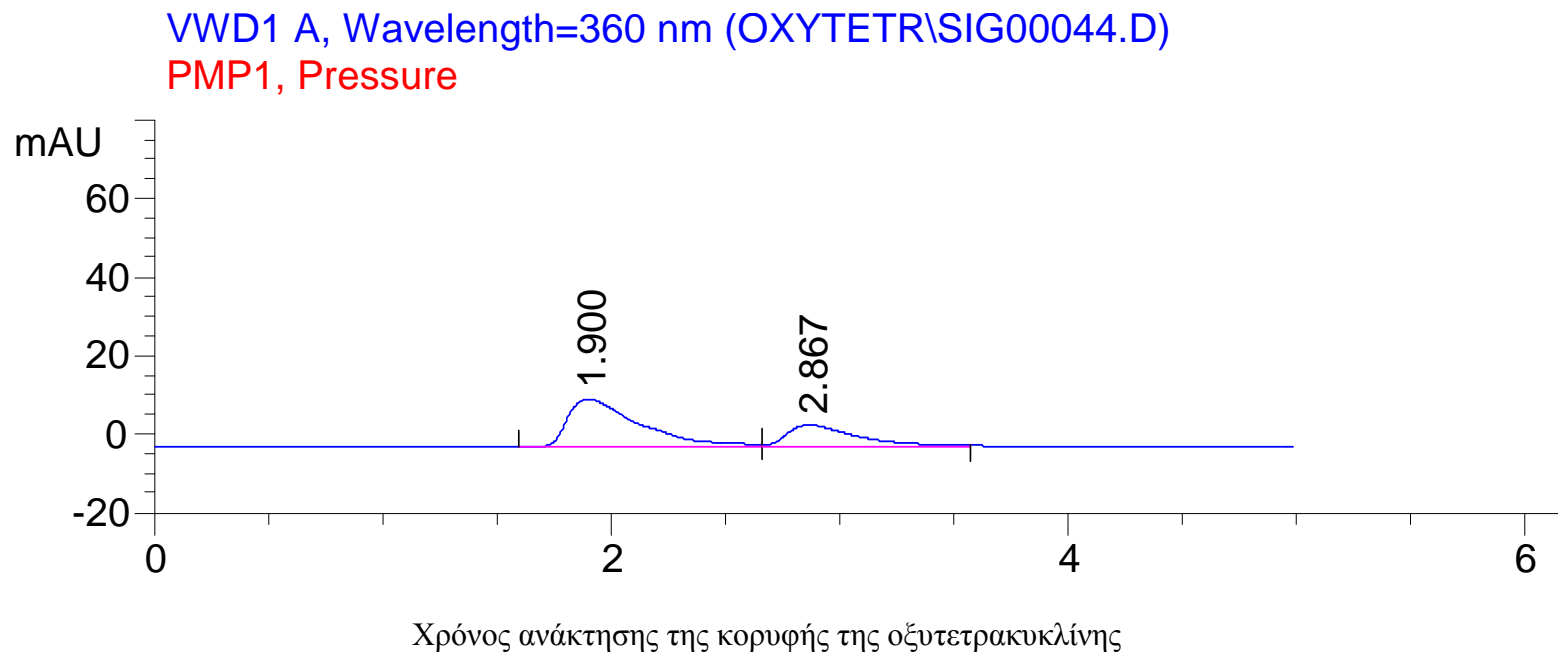
Επίσης μετά την εμβάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής με 2 ml ιχθυέλαιο στο θαλασσινό νερό για χρόνο 1 min, η περιεχόμενη ποσότητα της φαρμακούχου

ουσίας ήταν $1,46 \pm 0,1$ ppm, ενώ μετά την εμβάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής με 4 ml ιχθυέλαιο στο θαλασσινό νερό για χρόνο 1 min, η περιεχόμενη ποσότητα της φαρμακούχου ουσίας ήταν $1,34 \pm 0,2$ ppm. Η διαφορά στις συγκεντρώσεις της οξυτετρακυκλίνης στη φαρμακούχο ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο και στη φαρμακούχο ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο ήταν 0,12 ppm για $p < 0,05$, στατιστικώς μη σημαντική.

Τέλος μετά την εμβάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής με 2 ml ιχθυέλαιο στο θαλασσινό νερό για χρόνο 2 min, η περιεχόμενη ποσότητα της φαρμακούχου ουσίας ήταν $0,88 \pm 0,1$ ppm, ενώ μετά την εμβάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής με 4 ml ιχθυέλαιο στο θαλασσινό νερό για χρόνο 2 min, η περιεχόμενη ποσότητα της φαρμακούχου ουσίας ήταν $0,87 \pm 0,1$ ppm. Μεταξύ της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης στη φαρμακούχο ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο και στη φαρμακούχο ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά και είναι της τάξης των 0,01 ppm για $p < 0,05$.

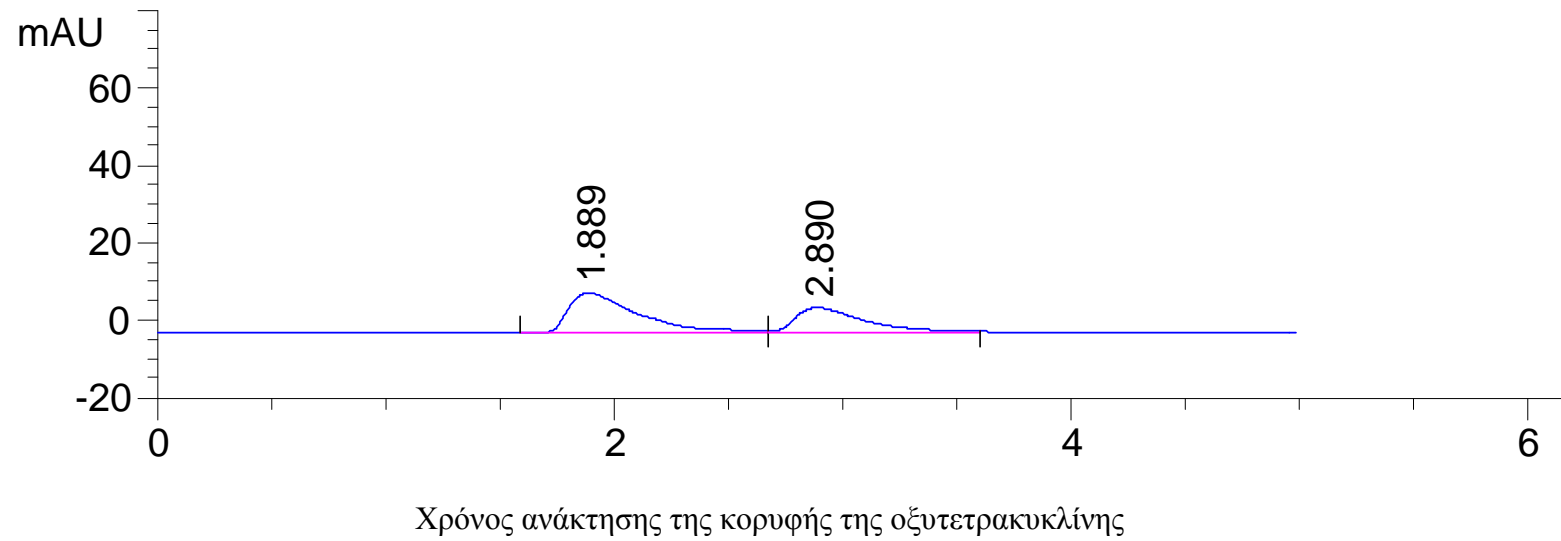
3.2 Κορυφές ανάκτησης οξυτετρακυκλίνης

(Οι κορυφές ανάκτησης της οξυτετρακυκλίνης παρουσιάζονται στα Σχήματα 5 έως 34)



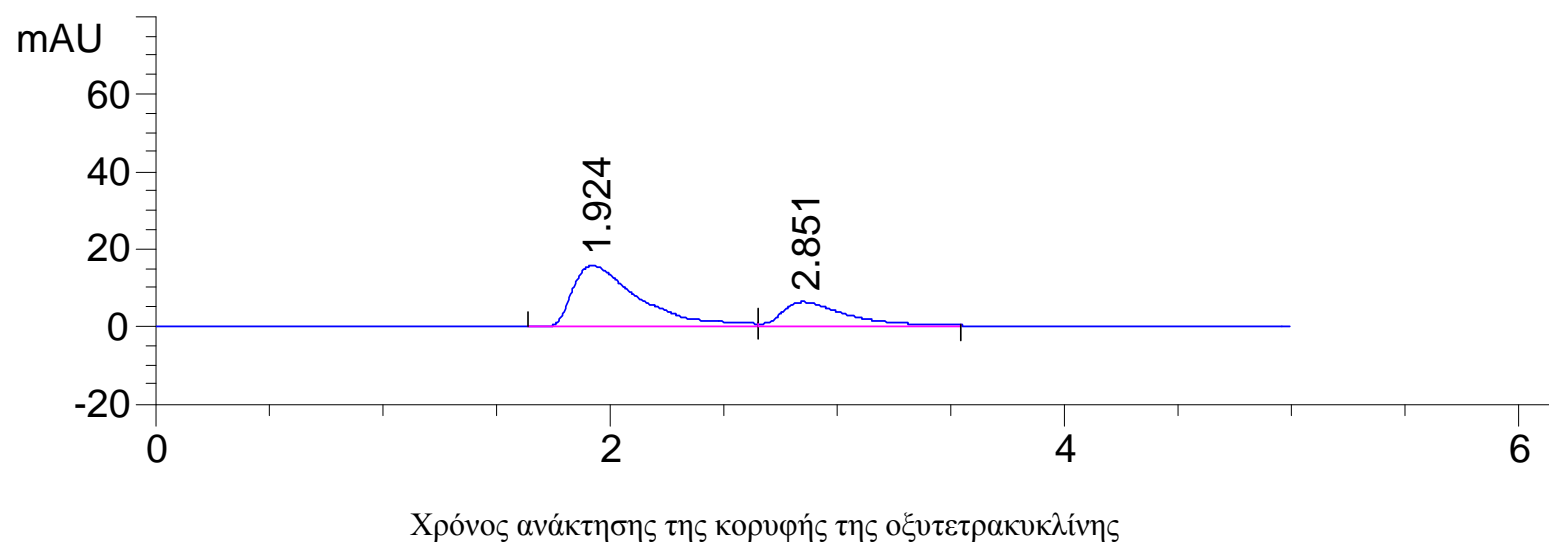
Σχήμα 5: Χρωματογράφημα 1^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής μάρτυρα με 4ml ιχθυέλαιο.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00059.D)
PMP1, Pressure



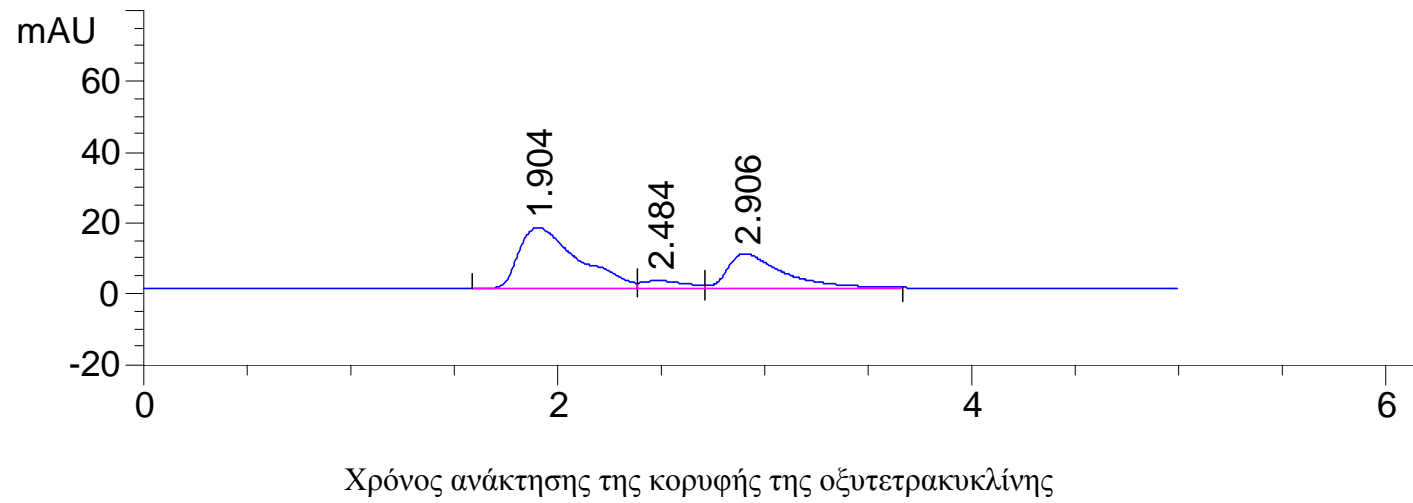
Σχήμα 6: Χρωματογράφημα 2^ο δείγματος ιχθυοτροφής μάρτυρα με 4ml ιχθυέλαιο.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00071.D)
PMP1, Pressure



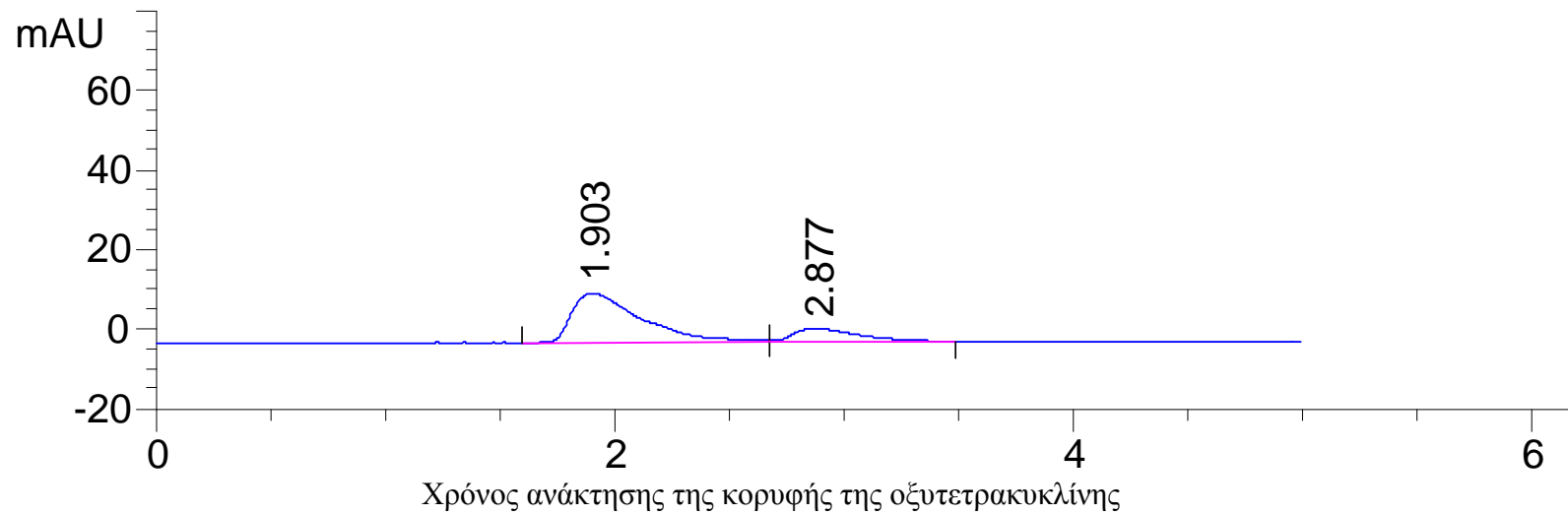
Σχήμα 7: Χρωματογράφημα 3^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής μάρτυρα με 4ml ιχθυέλαιο.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00043.D)
PMP1, Pressure



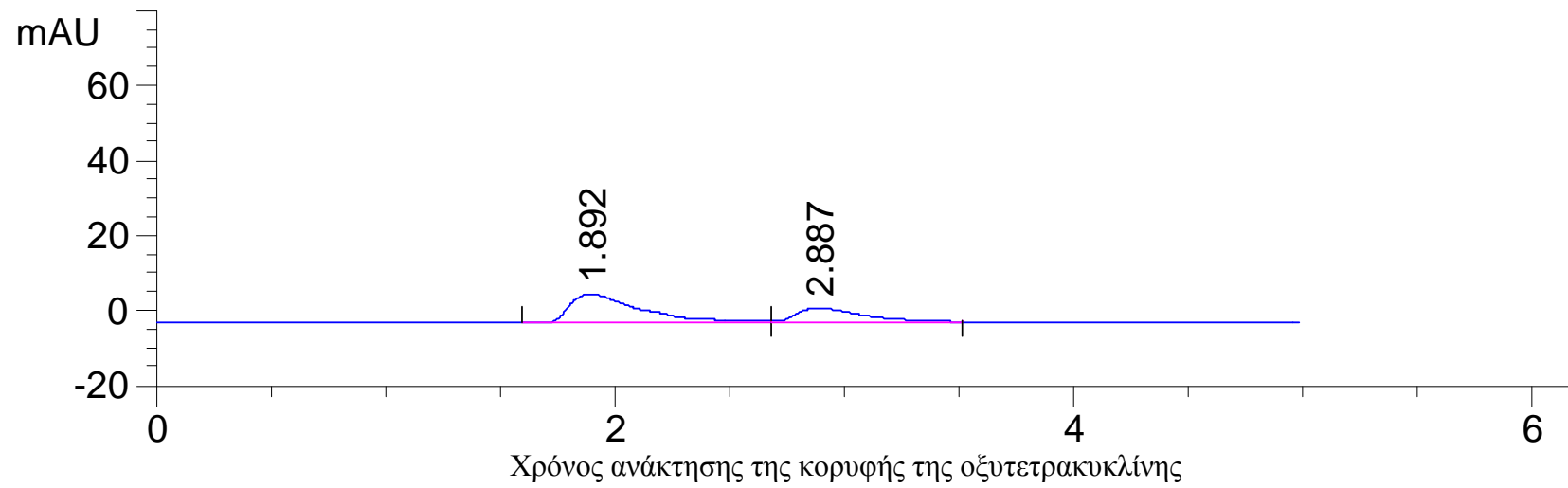
Σχήμα 8: Χρωματογράφημα 1^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 4ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση 1-2sec σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00045.D)
PMP1, Pressure



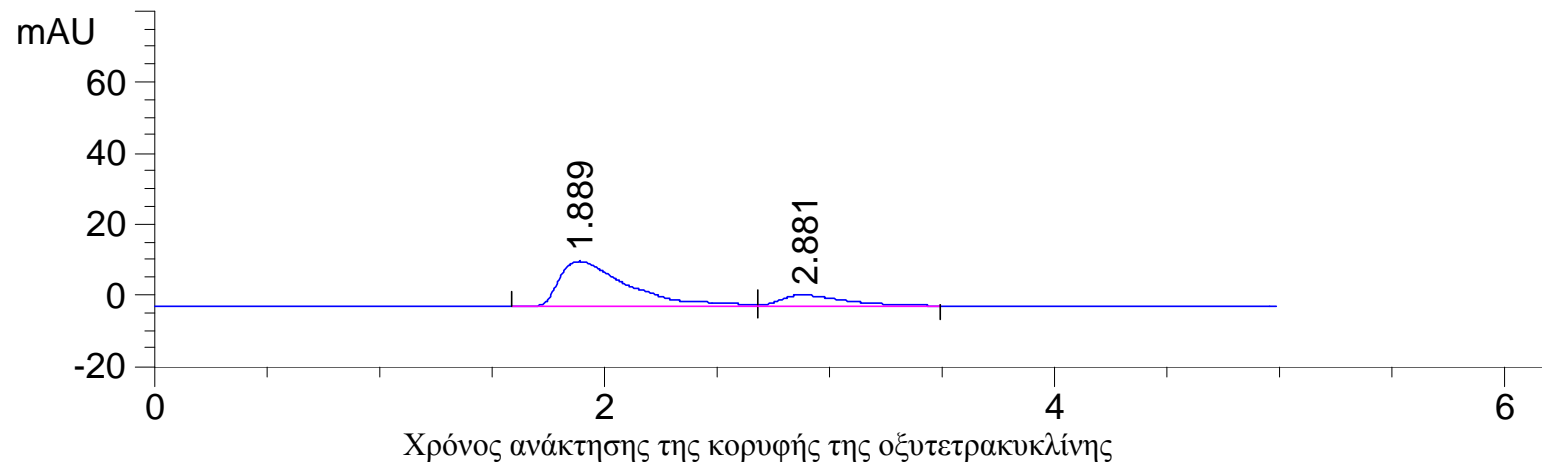
Σχήμα 9: Χρωματογράφημα 2^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 4ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση 1-2 sec σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00061.D)
PMP1, Pressure



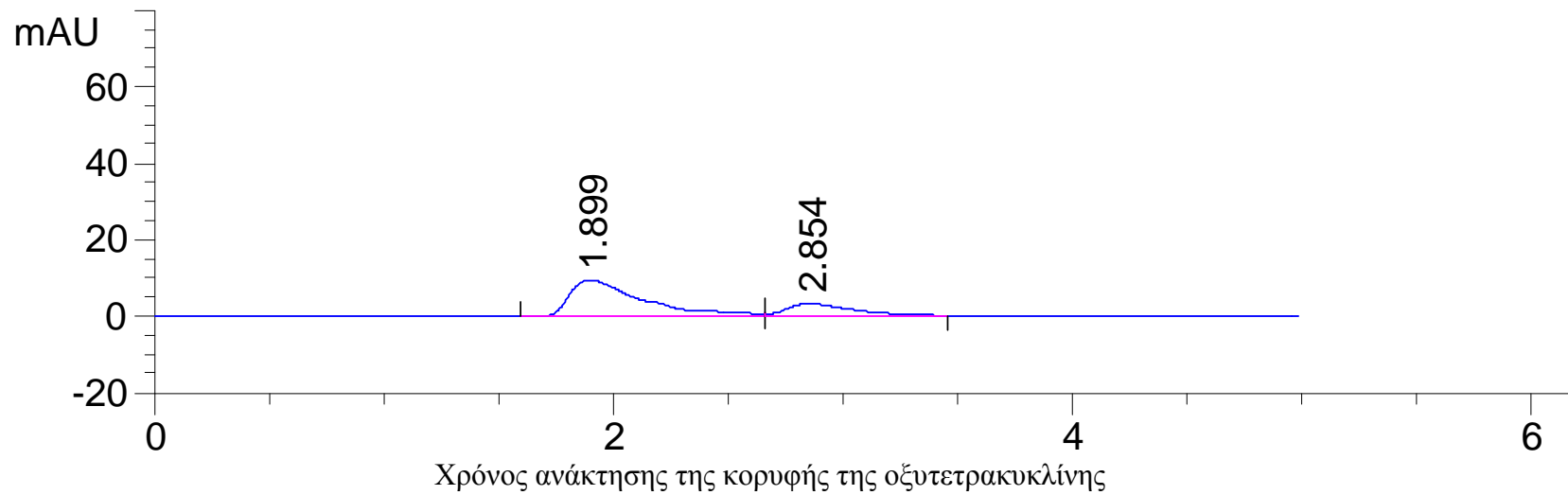
Σχήμα 10: Χρωματογράφημα 3^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 4ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση 1-2 sec σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00048.D)
PMP1, Pressure



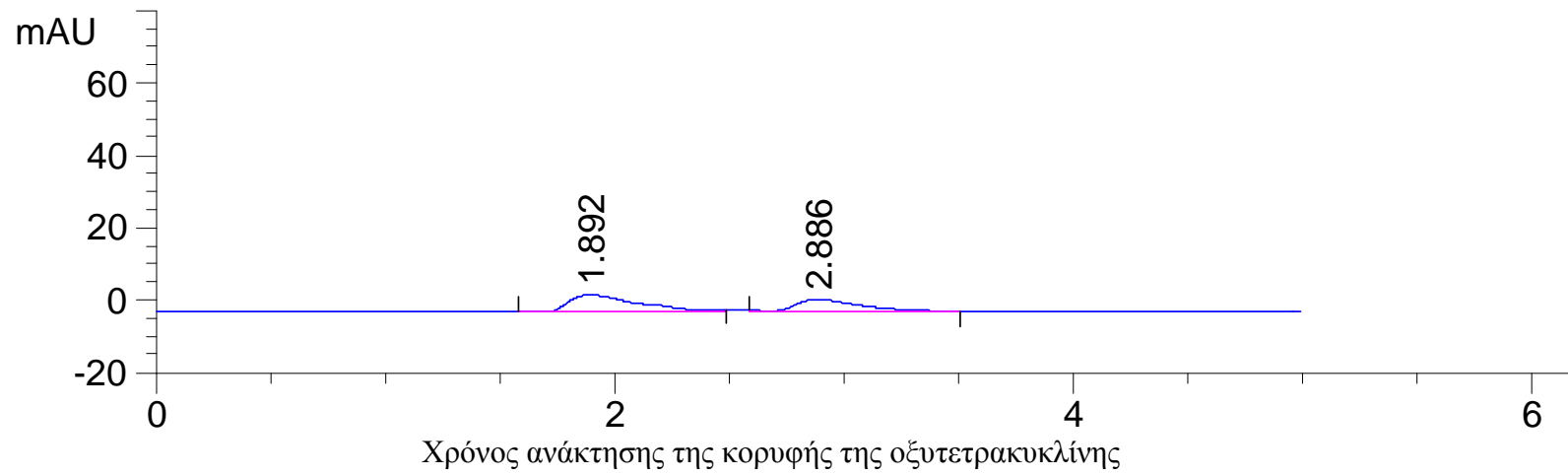
Σχήμα 11: Χρωματογράφημα 1^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 4ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση ½ min σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00070.D)
PMP1, Pressure



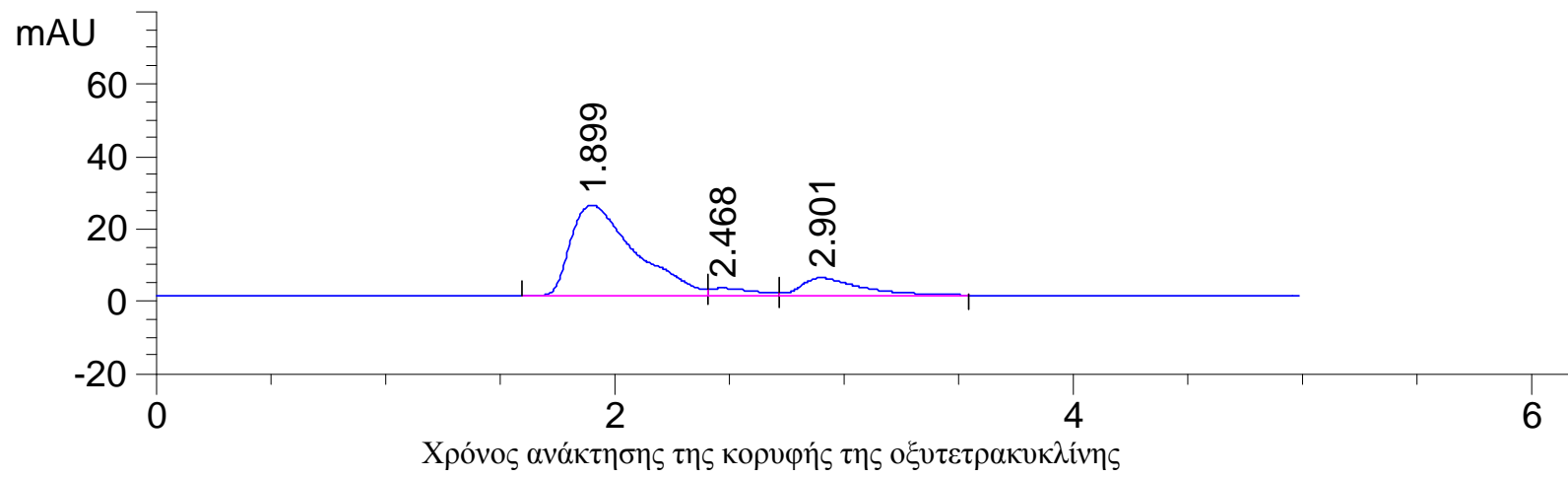
Σχήμα 12: Χρωματογράφημα 2^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 4ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση ½ min σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00069.D)
PMP1, Pressure



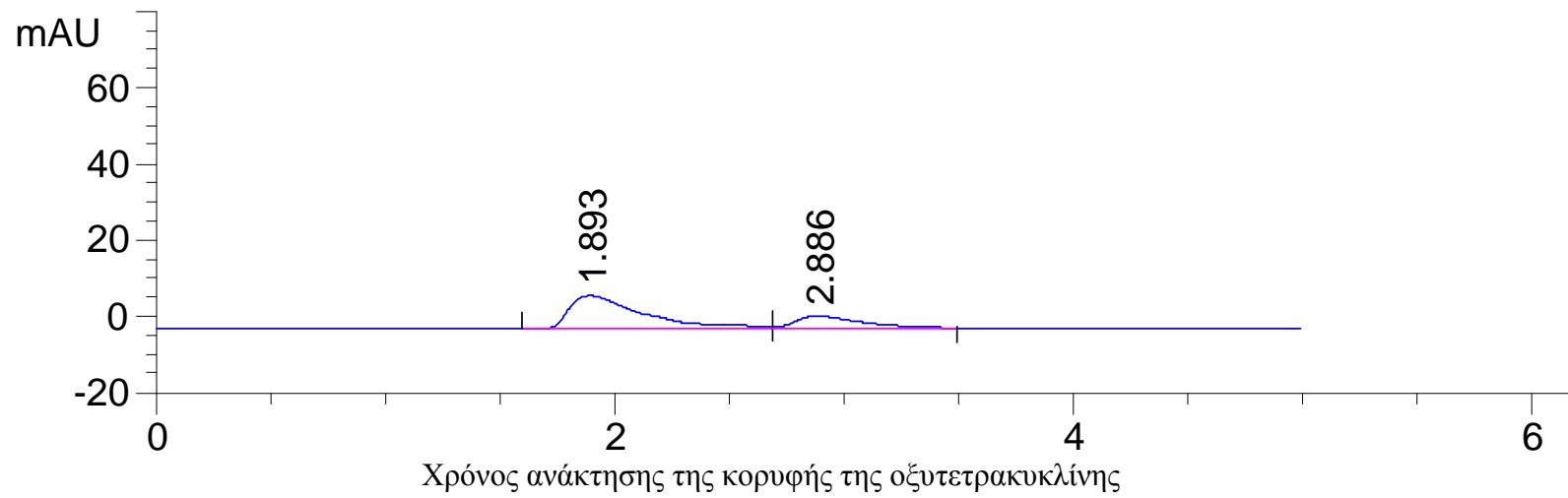
Σχήμα 13: Χρωματογράφημα 3^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 4ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση ½ min σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00041.D)
PMP1, Pressure



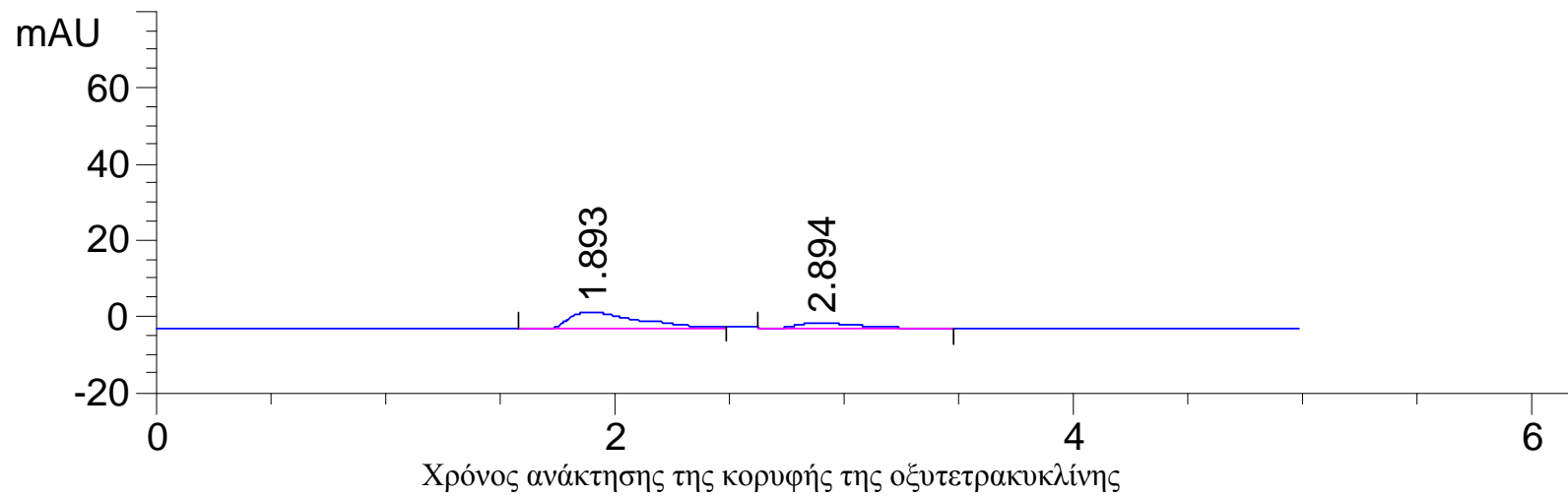
Σχήμα 14: Χρωματογράφημα 1^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 4ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση 1 min σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00051.D)
PMP1, Pressure



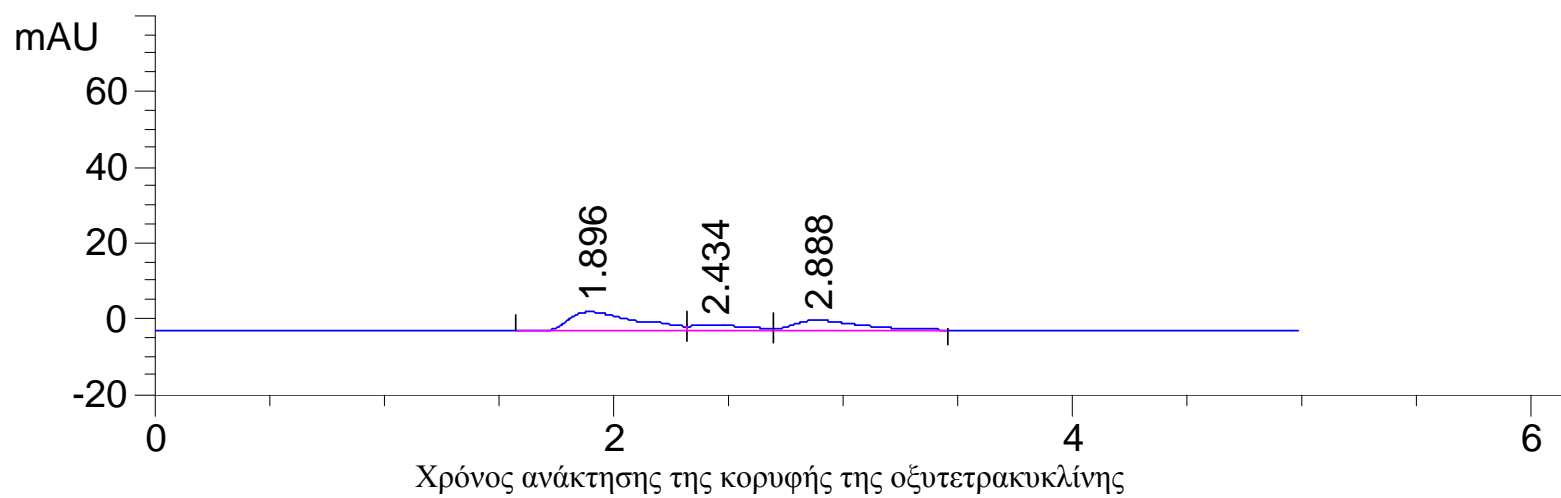
Σχήμα 15: Χρωματογράφημα 2^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 4ml ιχθυέλαιο για εμφάπτιση 1 min σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00064.D)
PMP1, Pressure



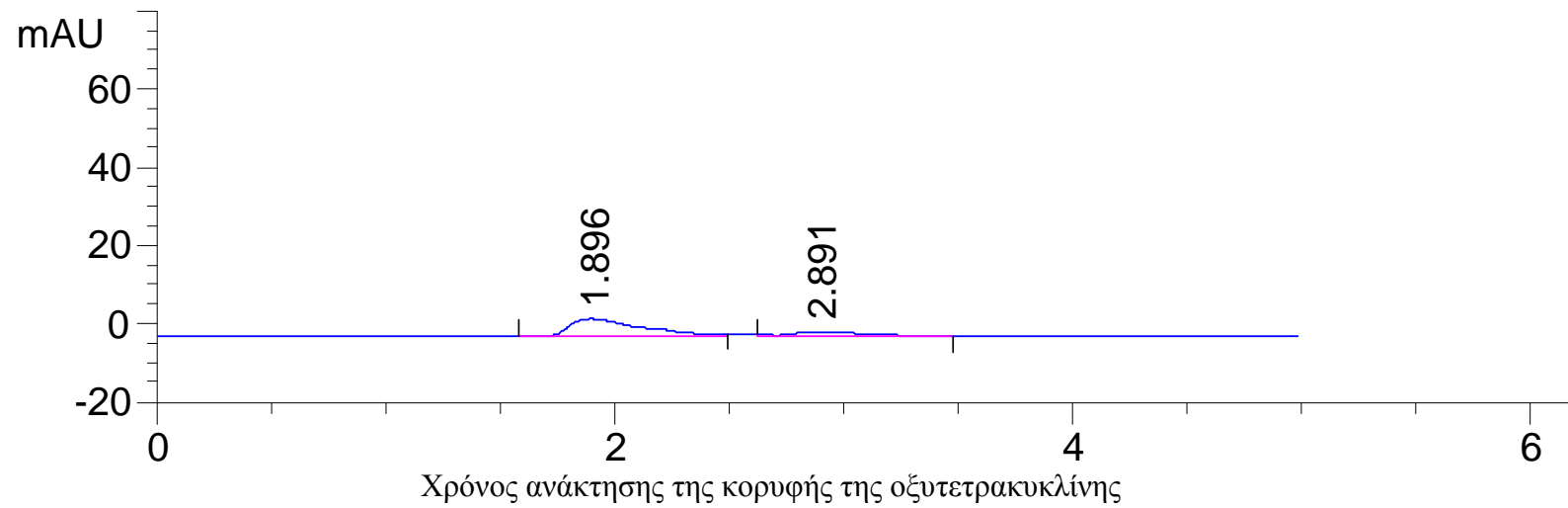
Σχήμα 16: Χρωματογράφημα 3^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 4ml ιχθυέλαιο για εμφάνιση 1 min σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00053.D)
PMP1, Pressure



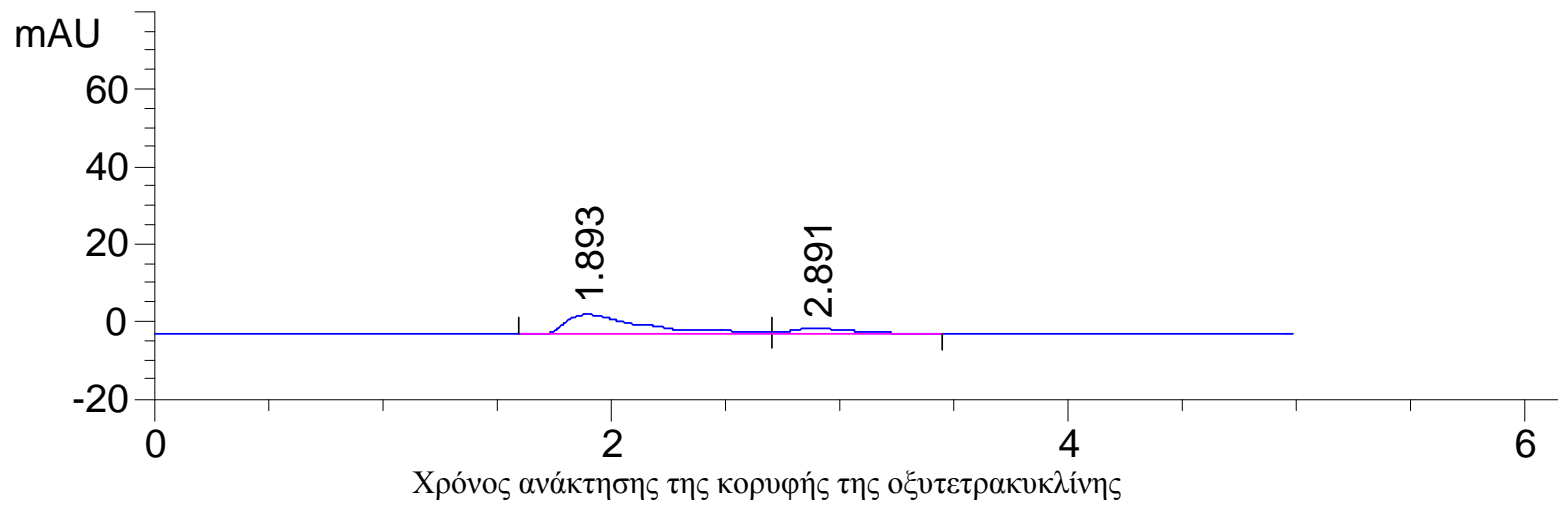
Σχήμα 17: Χρωματογράφημα 1^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 4ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση 2 min σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00054.D)
PMP1, Pressure



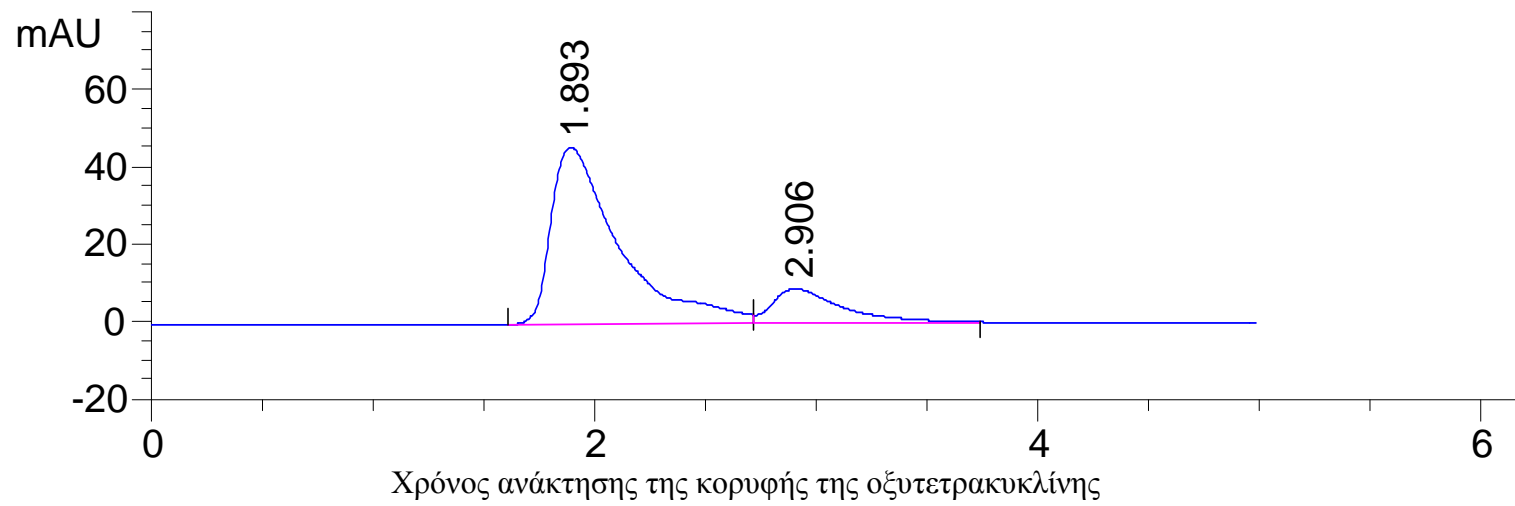
Σχήμα 18: Χρωματογράφημα 2^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 4ml ιχθυέλαιο για εμφύσηση 2 min σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00066.D)
PMP1, Pressure



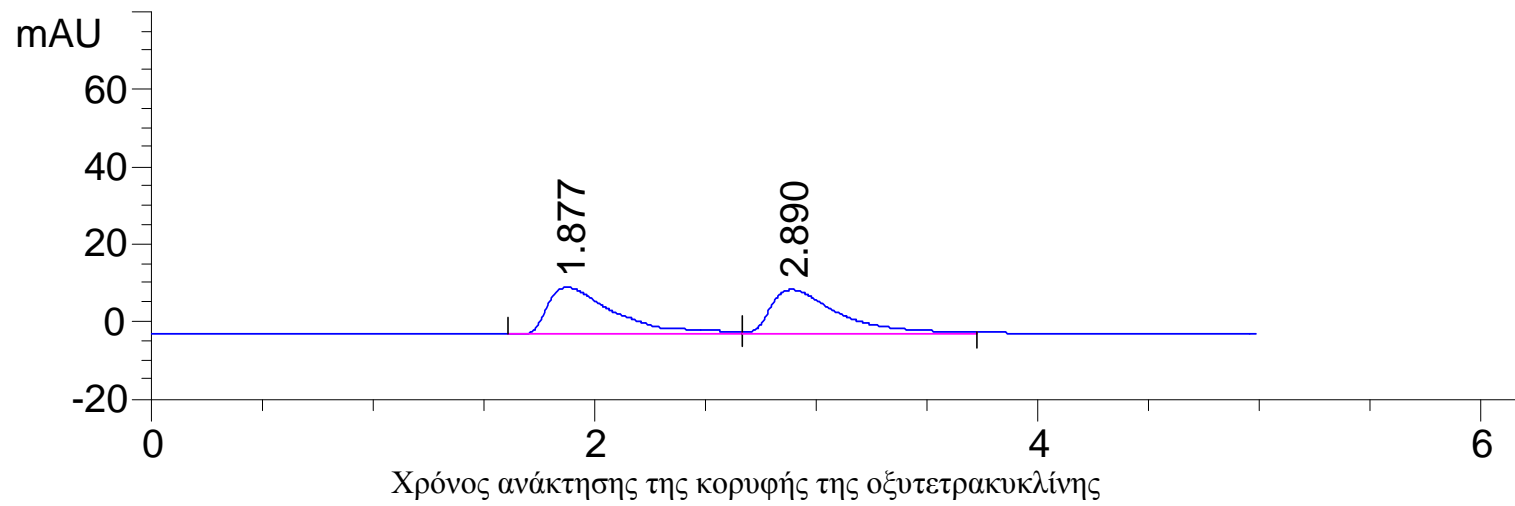
Σχήμα 19: Χρωματογράφημα 3^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 4ml ιχθυέλαιο για εμφύσηση 2 min σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00029.D)
PMP1, Pressure



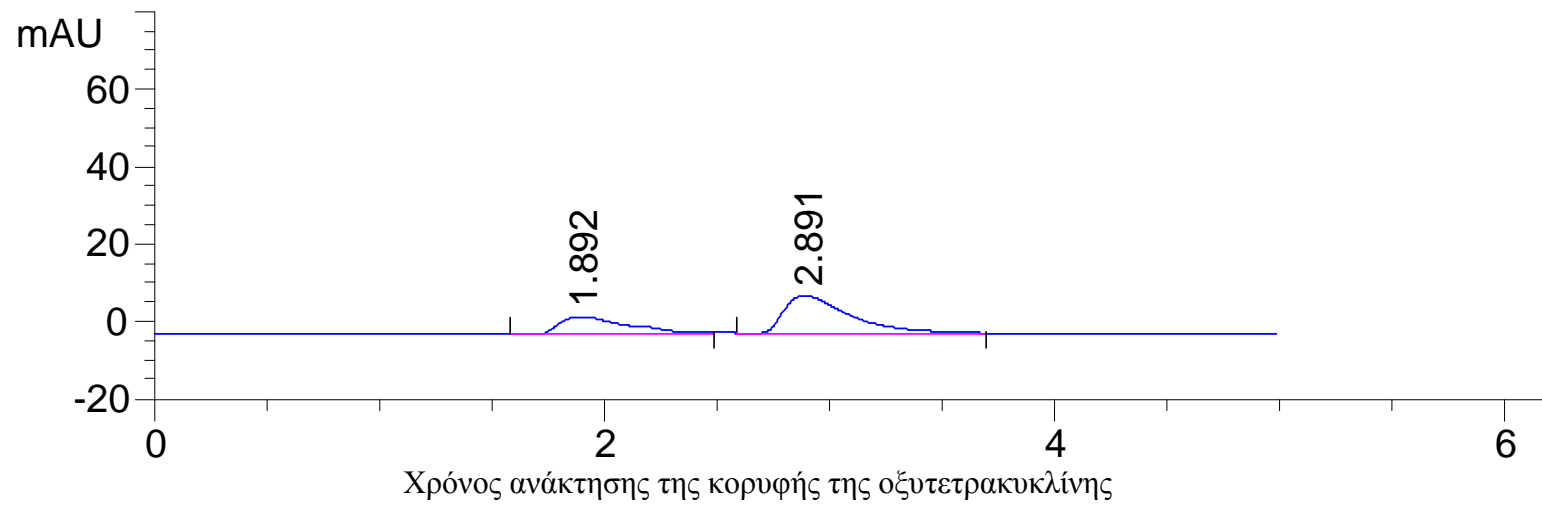
Σχήμα 20: Χρωματογράφημα 1^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής μάρτυρα με 2ml ιχθυέλαιο.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00060.D)
PMP1, Pressure



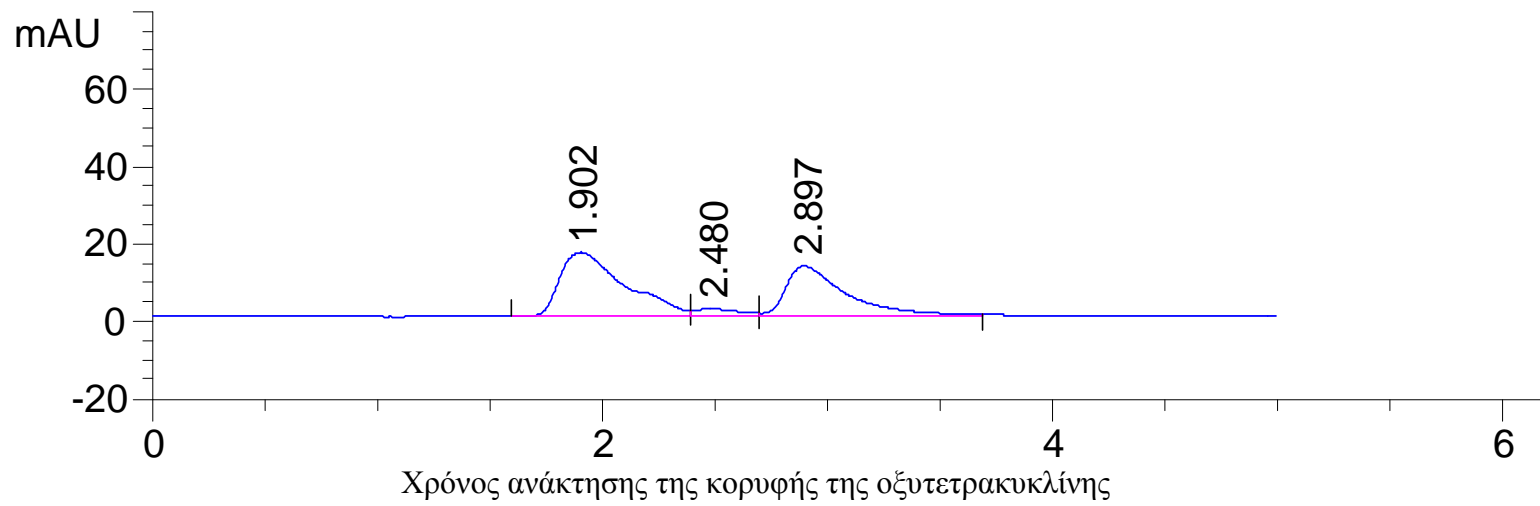
Σχήμα 21: Χρωματογράφημα 2^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής μάρτυρα με 2ml ιχθυέλαιο.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00068.D)
PMP1, Pressure



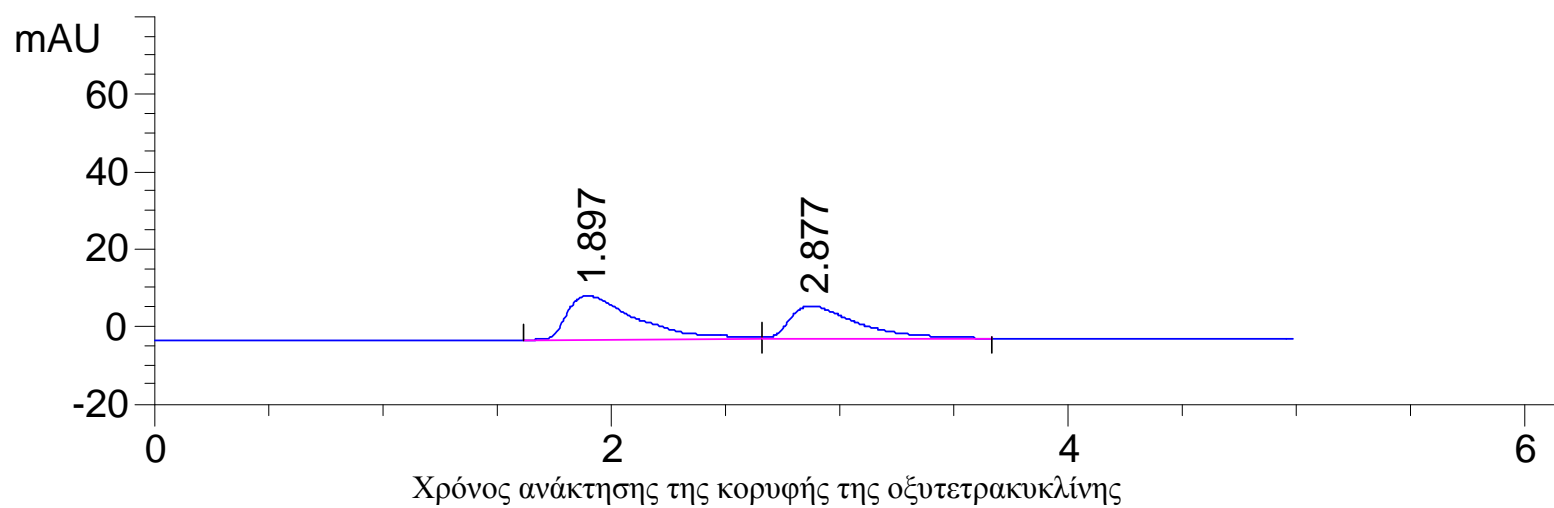
Σχήμα 22: Χρωματογράφημα 3^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής μάρτυρα με 2ml ιχθυέλαιο.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00042.D)
PMP1, Pressure



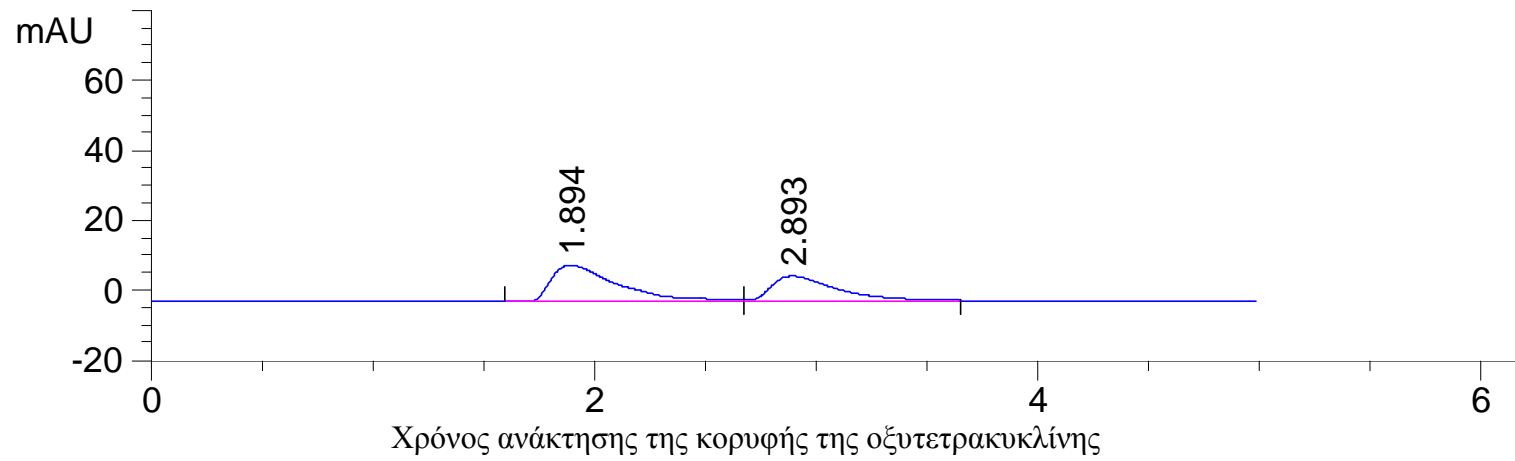
Σχήμα 23: Χρωματογράφημα 1^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 2ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση 1-2sec σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00046.D)
PMP1, Pressure



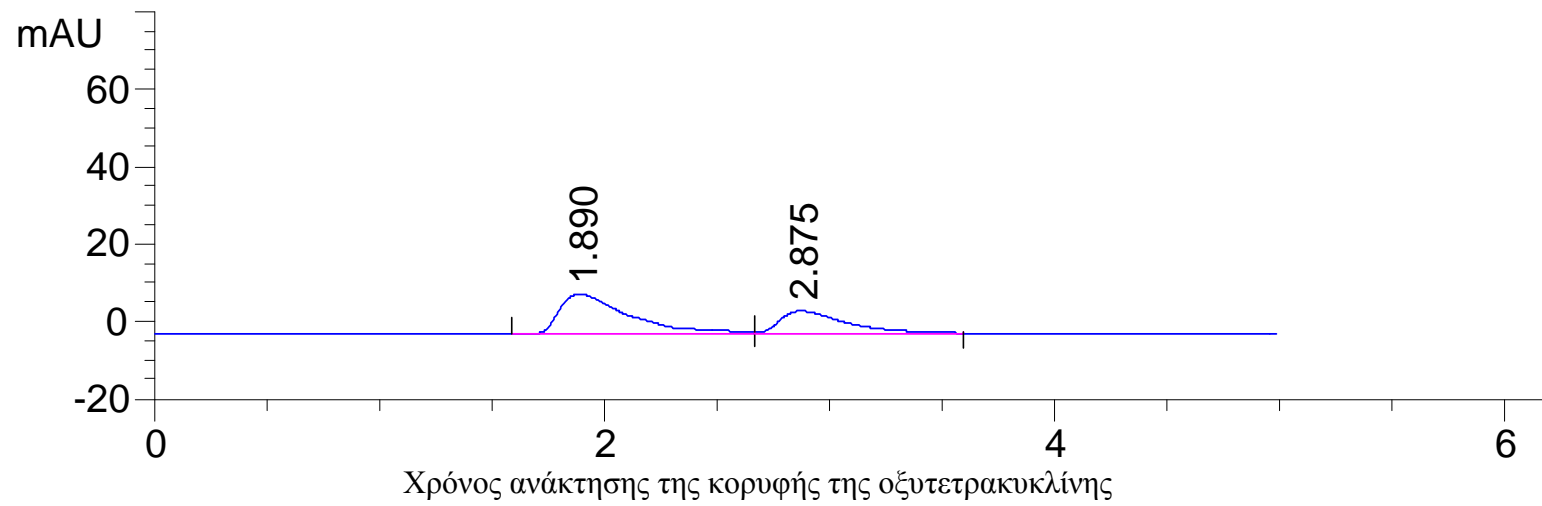
Σχήμα 24: Χρωματογράφημα 2^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 2ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση 1-2sec σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00062.D)
PMP1, Pressure



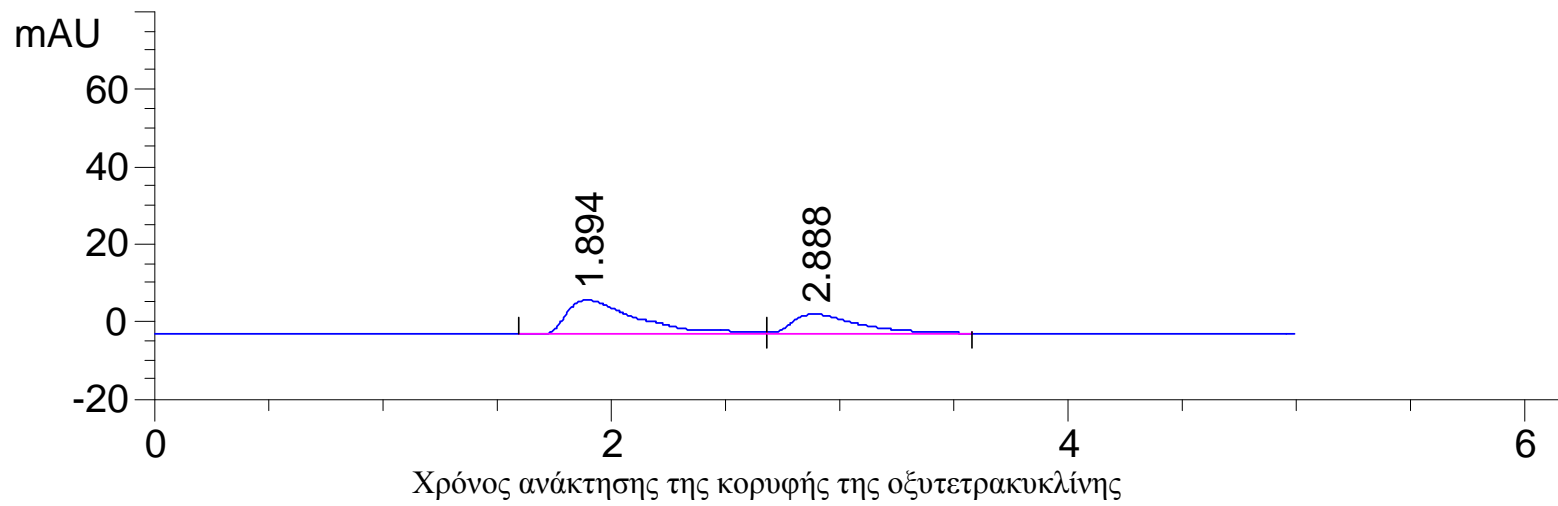
Σχήμα 25: Χρωματογράφημα 3^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 2ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση 1-2sec σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00049.D)
PMP1, Pressure



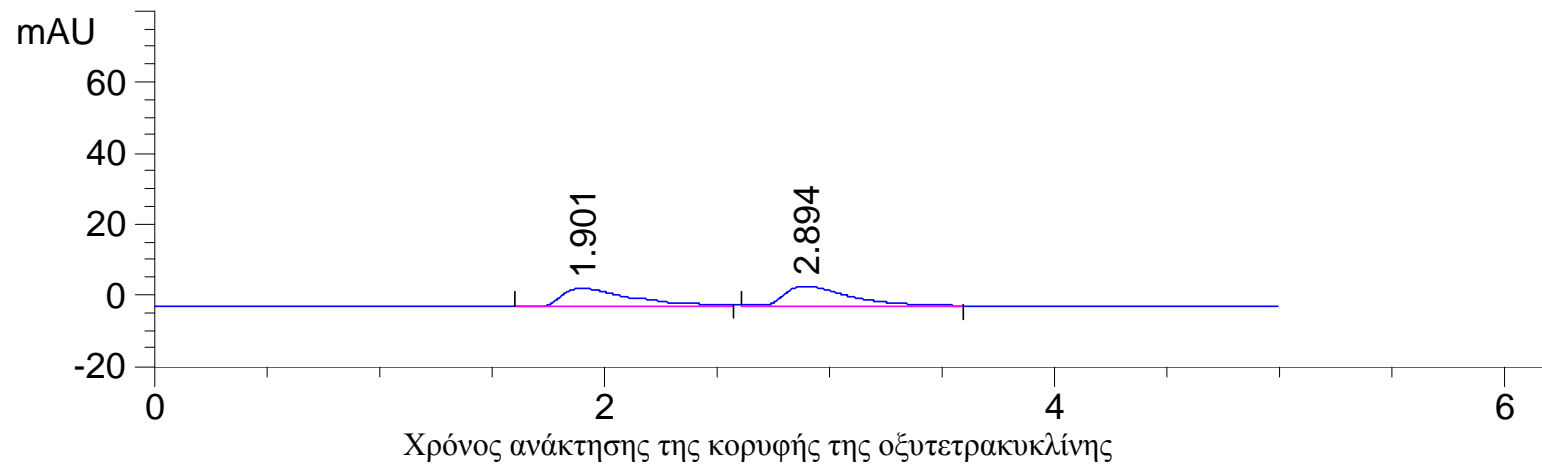
Σχήμα 26: Χρωματογράφημα 1^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 2ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση 1/2min σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00050.D)
PMP1, Pressure



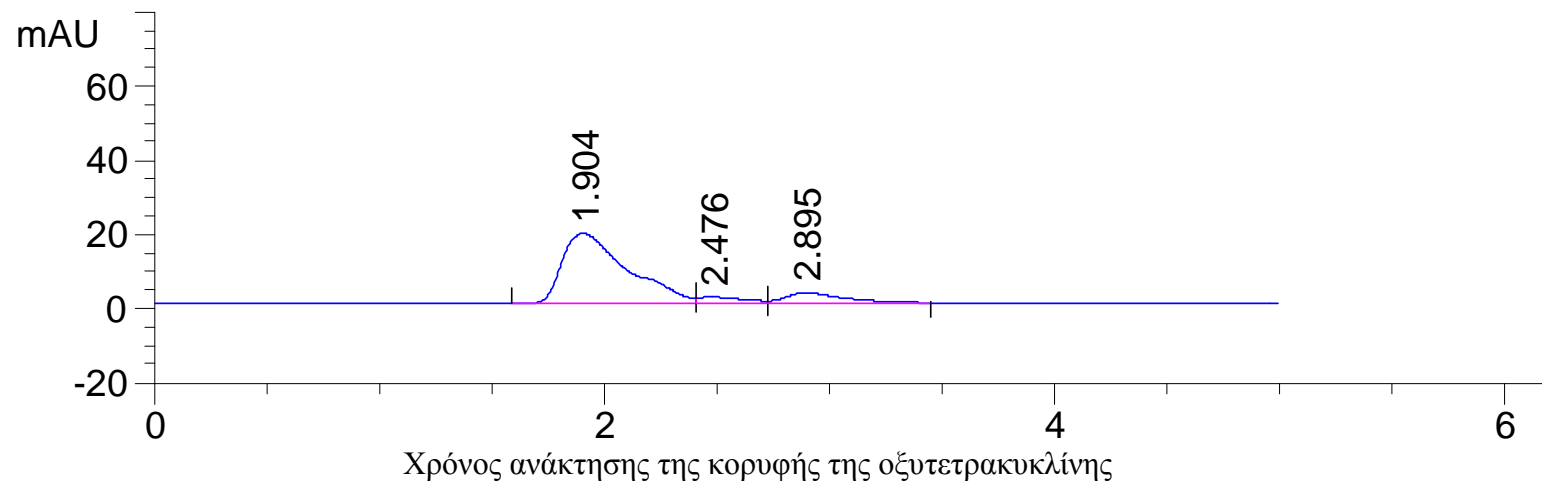
Σχήμα 27: Χρωματογράφημα 2^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 2ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση 1/2min σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00063.D)
PMP1, Pressure



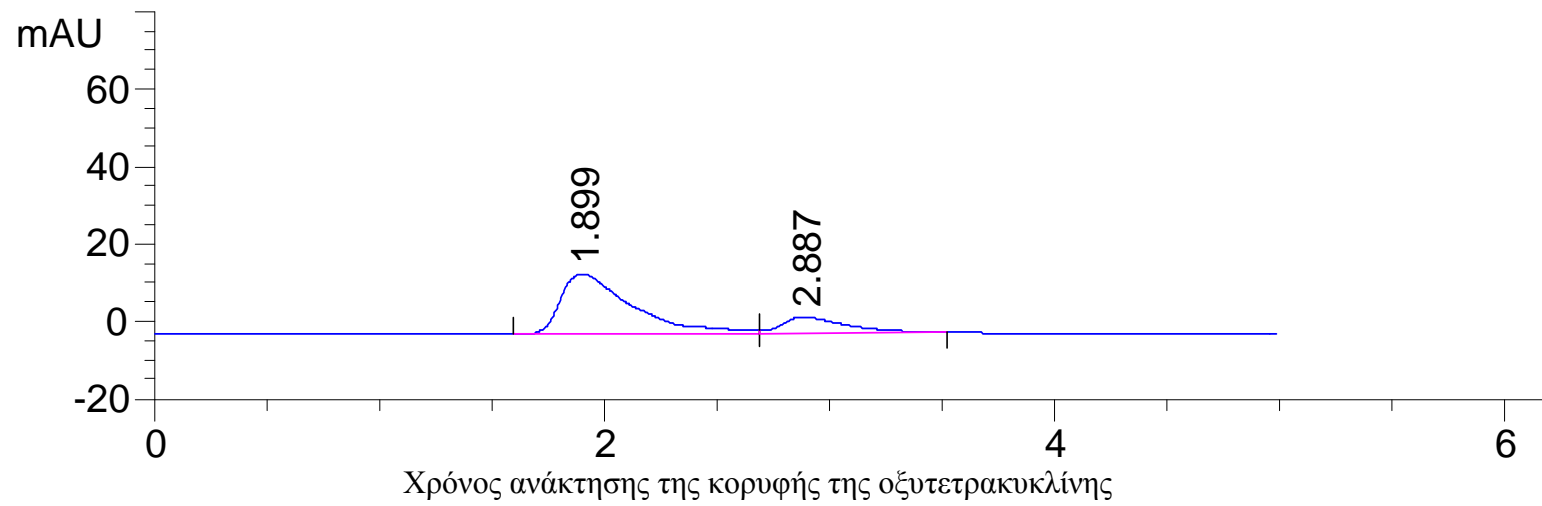
Σχήμα 28: Χρωματογράφημα 3^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 2ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση 1/2min σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00040.D)
PMP1, Pressure



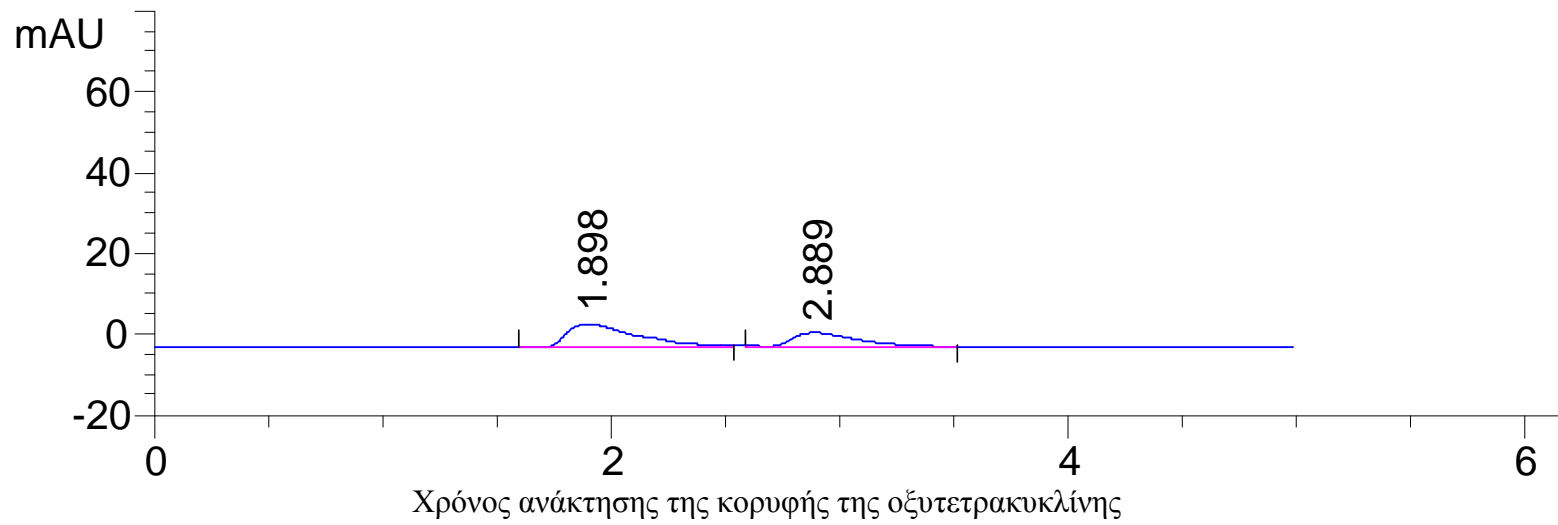
Σχήμα 29: Χρωματογράφημα 1^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 2ml ιχθυέλαιο για εμφύσηση 1min σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00052.D)
PMP1, Pressure



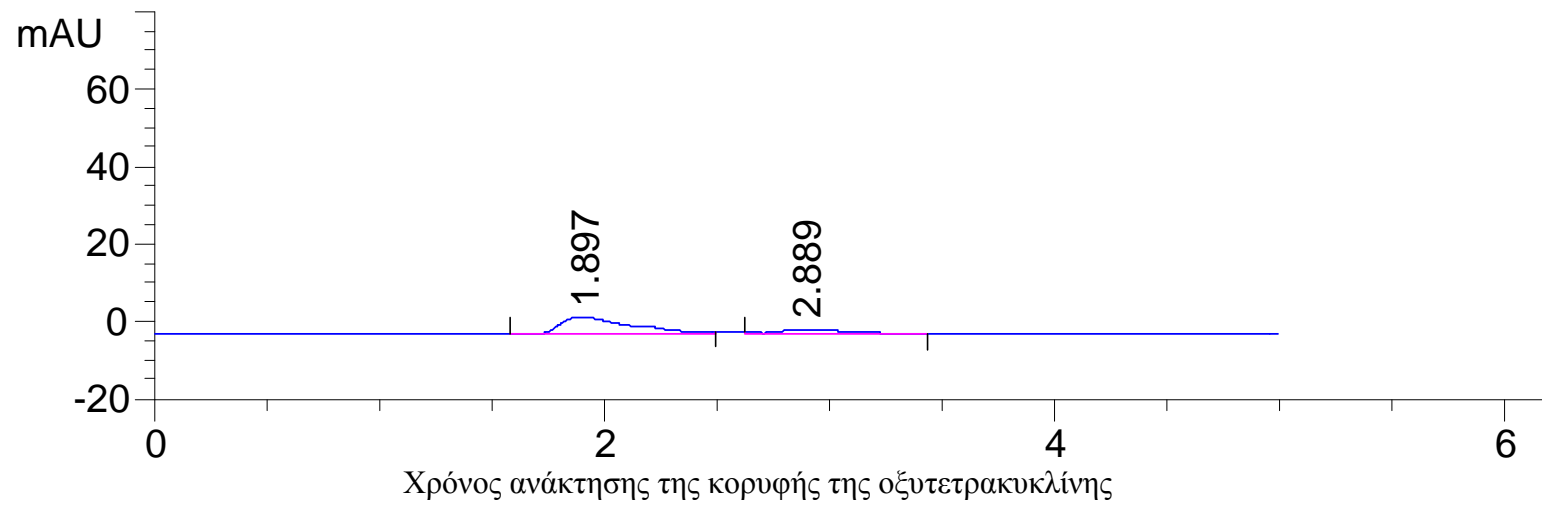
Σχήμα 30: Χρωματογράφημα 2^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 2ml ιχθυέλαιο για εμφύσηση 1min σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00065.D)
PMP1, Pressure



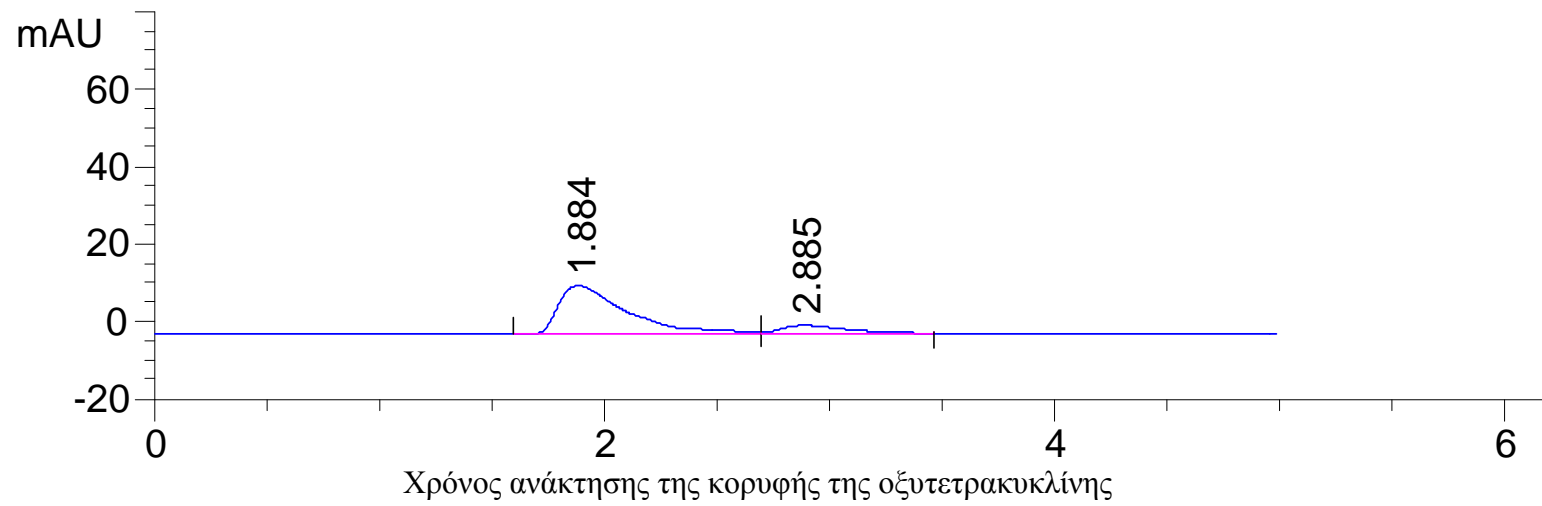
Σχήμα 31: Χρωματογράφημα 3^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 2ml ιχθυέλαιο για εμφάνιση 1min σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00055.D)
PMP1, Pressure



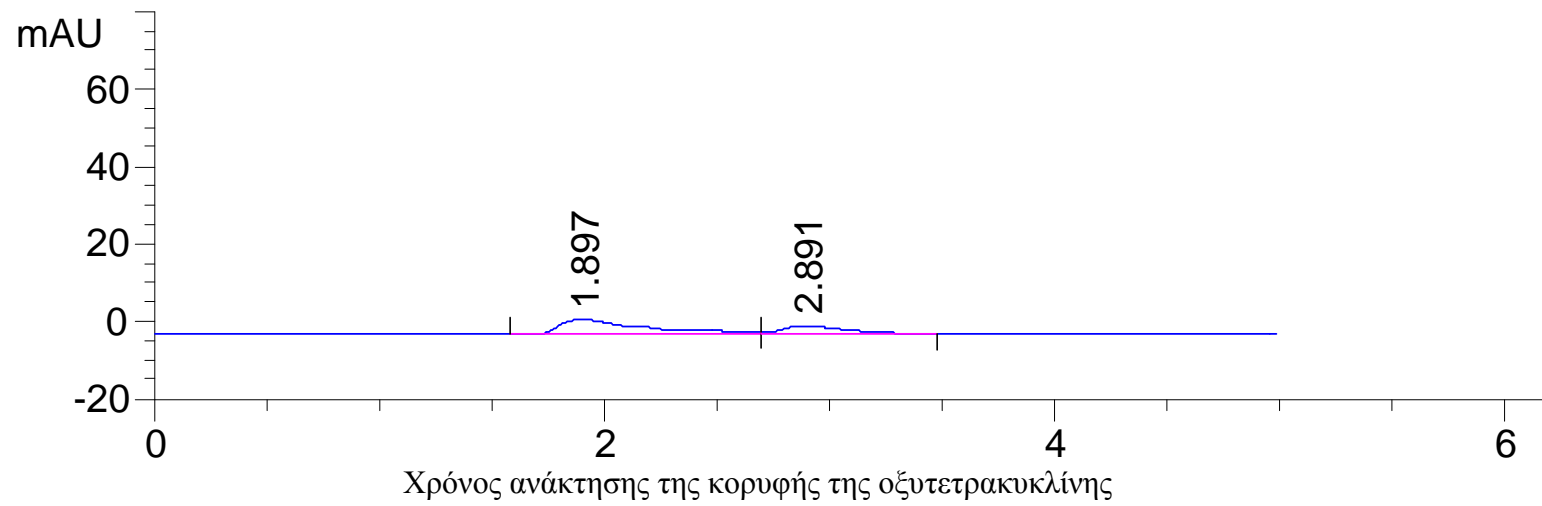
Σχήμα 32: Χρωματογράφημα 1^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 2ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση 2min σε θαλασσινό νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00056.D)
PMP1, Pressure



Σχήμα 33: Χρωματογράφημα 2^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 2ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση 2min σε θαλασσίνο νερό.

VWD1 A, Wavelength=360 nm (OXYTETR\SIG00067.D)
PMP1, Pressure



Σχήμα 34: Χρωματογράφημα 3^{ου} δείγματος ιχθυοτροφής με 2ml ιχθυέλαιο για εμβάπτιση 2min σε θαλασσινό νερό.

4. Συζήτηση

Ο έλεγχος των νόσων στην υδατοκαλλιέργεια θα πρέπει να αποσκοπεί κατά κύριο λόγο στην πρόληψη (ορθές πρακτικές διαχείρισης, εμβόλια, κλπ.) παρά στη θεραπεία. Η χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων είναι αναγκαία σε ορισμένες περιπτώσεις. Τα κτηνιατρικά φάρμακα τα οποία είναι εγκεκριμένα στην Ελλάδα για χρήση κατά των νοσημάτων των ψαριών, είναι η υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη, ο συνδυασμός σουλφαδιαζίνης με τριμεθοπρίμη και δύο κινολόνες (το οξολινικό οξύ και η φλουμεκίνη) (ΕΟΦ, 2001). Σύμφωνα με τους Xu & Rogers (1994), η ενδεδειγμένη μέθοδος χορήγησης της θεραπείας μέσω της τροφής είναι η ενσωμάτωση του φαρμάκου σ' αυτή από τις εταιρείες παραγωγής ιχθυοτροφών, αν και σε πολλές περιπτώσεις η διαθεσιμότητα φαρμακούχων ιχθυοτροφών δεν είναι ούτε πρακτική, ούτε οικονομική.

Στο συγκεκριμένο πείραμα έγινε ο υπολογισμός της πραγματικής ποσότητας του αντιβιοτικού οξυτετρακυκλίνη που προσλαμβάνεται από τα ψάρια, μέσω της τροφής, ανάλογα με τη χρονική στιγμή πρόσληψης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής, μέσα στην υδάτινη στήλη. Οι χρόνοι που μελετήθηκαν ήταν 1-2 sec, ½ min, 1 min, 2 min, εμβάπτισης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής σε θαλασσινό νερό και έγινε σύγκριση με την αρχική συγκέντρωση πριν την εμβάπτιση (μάρτυρας). Για την παρασκευή της φαρμακούχου ιχθυοτροφής χρησιμοποιήθηκαν δύο ποσότητες ιχθυελαίου, 2 ml και 4 ml, σαν συνδετικό μέσο της οξυτετρακυκλίνης στην ιχθυοτροφή. Έτσι μελετήθηκε η συμπεριφορά της φαρμακούχου ιχθυοτροφής, με 2 ml και με 4 ml ιχθυέλαιο στο θαλασσινό νερό.

Σύμφωνα με την παρούσα έρευνα, από τη σύγκριση των μαρτύρων προέκυψε ότι υπήρχαν μεγαλύτερες απώλειες της φαρμακούχου ουσίας κατά τη διαδικασία παρασκευής της φαρμακούχου ιχθυοτροφής με 4 ml ιχθυέλαιο σε σχέση με την

φαρμακούχο ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο. Η διαφορά αυτή πιθανώς να οφείλεται σε απώλειες του φαρμάκου κατά τη διαδικασία παρασκευής της φαρμακούχου ιχθυοτροφής στην περίπτωση που προστίθεται μεγαλύτερη ποσότητα ιχθυελαίου.

Επιπλέον και κατά την εμβάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής στο θαλασσινό νερό για 1-2 sec παρατηρήθηκε ότι οι απώλειες της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης ήταν μικρές τόσο στη φαρμακούχο ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο όσο και στη φαρμακούχο ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο. Επομένως στο διάστημα αυτό των 1-2 sec, που συμπίπτει με τη στιγμή πρόσληψης του μεγαλύτερου μέρους της τροφής από τα ψάρια, δεν είχαμε ουσιαστικές απώλειες της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης και στις δύο φαρμακούχες ιχθυοτροφές.

Στο διάστημα εμβάπτισης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής στο θαλασσινό νερό για 1min παρατηρήθηκαν οι σημαντικότερες απώλειες στη συγκέντρωση της οξυτετρακυκλίνης. Ο ρυθμός απώλειας ήταν μεγαλύτερος στην περίπτωση της ιχθυοτροφής με 2 ml ιχθυέλαιο σε σχέση με τη φαρμακούχο ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο. Το αποτέλεσμα αυτό επαληθεύτηκε σε όλη τη διάρκεια του πειράματος οπότε και προκύπτει ότι η μεγαλύτερη ποσότητα του ιχθυελαίου πιθανόν να συγκρατεί καλύτερα τη φαρμακούχο ουσία μέσα στο θαλασσινό νερό, εξισσοροπώντας, όπως τελικά προέκυψε, τις απώλειες κατά την παρασκευή της φαρμακούχου ιχθυοτροφής με τη μεγαλύτερη ποσότητα ιχθυελαίου. Ωστόσο σε κάθε περίπτωση η συγκέντρωση της οξυτετρακυκλίνης στην ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο ήταν μεγαλύτερη ή ίση με αυτή της φαρμακούχου ιχθυοτροφής με 4 ml ιχθυέλαιο, λόγω της αρχικά μεγαλύτερης συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης. Επομένως θα μπορούσαμε να συστήσουμε την ποσότητα των 2 ml ιχθυελαίου αφού στο 1 min και στα 2 min οι συγκεντρώσεις της οξυτετρακυκλίνης δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους και στις δύο μεταχειρίσεις της φαρμακούχου ιχθυοτροφής

(ιχθυοτροφή με 2 ml και ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο). Εδώ βέβαια εισέρχεται ο προβληματισμός της χρονικής στιγμής πρόσληψης της τροφής από τα ψάρια. Επιπλέον ένα ποσοστό της ιχθυοτροφής δεν θα καταναλωθεί από τα ψάρια επειδή κατά τη διάρκεια της θεραπευτικής αγωγής η όρεξη των ασθενών ψαριών είναι μειωμένη.

Έρευνες έχουν δείξει ότι το ιχθυέλαιο αλλοιώνει τη γευστικότητα της ιχθυοτροφής. Ωστόσο, στις περιπτώσεις όπου η επικάλυψη της φαρμακούχου ιχθυοτροφής με ιχθυέλαιο αποτελεί αναγκαστικά την τελευταία λύση για τη θεραπεία, θα πρέπει η γεύση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής να γίνει πιο ελκυστική χρησιμοποιώντας κάποιο άλλο υλικό (π.χ. πρώτη ύλη από καλαμάρι) που να βελτιώνει τη διάθεση πρόσληψής της από τα ψάρια (Toften *et al.*, 1995). Επίσης η μειωμένη πρόσληψη τροφής που περιέχει οξυτετρακυκλίνη ενσωματωμένη με ιχθυέλαιο φαίνεται να περιορίζεται με τη ανάμιξη άλλων φαρμάκων, αν και ο Hustvedt *et al.*, (1991b) απέδειξε ότι η προσθήκη μιας μικρότερης δόσης φαρμάκου με την τροφή οδήγησε σε μικρή βελτίωση της κατανάλωσης της τροφής. από την πέστροφα *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Αυτό πιθανώς αποτελεί ένδειξη ότι η γευστικότητα του φαρμάκου ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων ειδών ψαριών.

Επίσης οι Xu & Rogers (1994) αναφέρουν μειωμένη απώλεια της οξυτετρακυκλίνης που ενσωματώθηκε με την ιχθυοτροφή σε σχέση με την απώλεια της οξυτετρακυκλίνης που έγινε με επίπαση στην τροφή. Οι εν λόγω ερευνητές οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι η ανάμιξη του φαρμάκου με την ιχθυοτροφή πρέπει να είναι η συνιστώμενη μέθοδος προετοιμασίας των θεραπευτικών σιτηρέσιων των ψαριών. Υπάρχει όμως σημαντικό πρόβλημα με τις εταιρείες παραγωγής ιχθυοτροφών οι οποίες δεν μπορούν να ανταποκριθούν άμεσα σε μια περιστασιακή απαίτηση από τους ιχθυοκαλλιεργητές, δεδομένου ότι η συνεχής διαθεσιμότητα των

θεραπευτικών σιτηρέσιων με διαφορετικής προέλευσης φαρμάκα δεν είναι ούτε πρακτική ούτε οικονομικά αποδοτική.

Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις της οξυτετρακυκλίνης για το χρονικό διάστημα εμφάνισης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής στο θαλασσινό νερό από 1 min έως και 2 min προκύπτει ότι οι απώλειες στη συγκέντρωση της οξυτετρακυκλίνης ήταν επίσης σημαντικές και στα ίδια επίπεδα τόσο στη φαρμακούχο ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο όσο και στη φαρμακούχο ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο.

Το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί με την εργασία του Fribourgh *et al.*, (1969), ο οποίος αναφέρει μια σχετικά μεγαλύτερη απώλεια οξυτετρακυκλίνης από τις φαρμακούχες ιχθυοτροφές κατά τη διάρκεια των πρώτων 3 λεπτών της εμφάνισης στο θαλασσινό νερό.

Από τους Duis *et al.*, (1995) αναφέρεται επίσης μια μειωμένη απώλεια στην έκπλυση της οξυτετρακυκλίνης όταν το φάρμακο ήταν επικαλυμμένο με άλας αλγινικού οξέος στα σύμπηκτα. Όμως, η προσθήκη του άλατος πιθανόν να επηρεάσει τη γευστικότητα των θεραπευτικών σιτηρέσιων.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, κατά τη διάρκεια χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής η ποσότητα που απομακρύνεται από αυτή διαχέεται στο υδάτινο περιβάλλον.

Οι Lunestad and Goksoyr (1990) αναφέρουν ότι το ασβέστιο και το μαγνήσιο μειώνουν τη συγκέντρωση της ελεύθερης οξυτετρακυκλίνης στο θαλασσινό νερό κατά 95%. Αυτό σημαίνει ότι παρατηρείται μια σημαντική μείωση της αντιβακτηριακής ικανότητας της οξυτετρακυκλίνης παρουσία των κατιόντων Ca^{2+} και Mg^{2+} που οφείλεται στους χηλικούς δεσμούς που δημιουργούνται. Καθίσταται σαφές ότι η ευαισθησία των μικροοργανισμών στην οξυτετρακυκλίνη στο θαλασσινό νερό θα πρέπει να καθορίζεται σε υπόστρωμα που περιέχει κατιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} , για να

υπάρχει μια σαφής εκτίμηση της ευαισθησίας τους στην οξυτετρακυκλίνη. Επομένως, σύμφωνα με τους παραπάνω ερευνητές, ενδεχομένως να απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα οξετετρακυκλίνης από τη συνιστώμενη συνυπολογίζοντας και την απώλεια της αντιβακτηριακής ικανότητας της οξυτετρακυκλίνης παρουσία των κατιόντων Ca^{2+} και Mg^{2+} , δεδομένου ότι αυτά εμπεριέχονται υποχρεωτικά στο θαλασσινό νερό.

Οι Samuelsen *et al.* (1992a), βρήκαν ότι κατά τις πρώτες ημέρες της θεραπευτικής αγωγής παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης στο ίζημα. Ωστόσο ένα ποσοστό της τάξης του 10% της αρχικής συγκέντρωσης παρέμεινε για χρονικό διάστημα 225 ημερών. Σύμφωνα με αυτούς τους ερευνητές, ενδεχομένως η απώλεια της οξυτετρακυκλίνης δεν οφείλεται στην αποικοδόμηση αλλά στην έκπλυση από το ίζημα. Επίσης ένα μέρος της φαρμακούχου ουσίας που φθάνει στον πυθμένα αποικοδομείται από τους μικροοργανισμούς ή διαχέεται στον περιβάλλοντα χώρο, όπου ενδέχεται να αδρανοποιηθεί με χημικές ή φωτοχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο θαλασσινό νερό.

Οι Poulíquien *et al.*, (2007) και Choo (1994), μελέτησαν την αποικοδόμηση της οξυτετρακυκλίνης μέσω του φαινομένου της υδρόλυσης. Οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι το φαινόμενο της υδρόλυσης είναι η κύρια αιτία αποικοδόμησης της οξυτετρακυκλίνης, ενώ το ποσοστό της αυξάνεται με την αύξηση του pH του νερού από 7.0 σε 7.9 ή 8.4.

Γενικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι σε υδατικά διαλύματα οι όξινες συνθήκες ευνοούν στη σταθερότητα της οξυτετρακυκλίνης, ενώ οι αλκαλικές συνθήκες αυξάνουν το ποσοστό αποικοδόμησης της οξυτετρακυκλίνης. Η αποικοδόμηση της οξυτετρακυκλίνης ήταν πιο αργή στο θαλασσινό νερό σε σχέση με το γλυκό νερό (Choo, 1994).

Ένας άλλος παράγοντας αποικοδόμησης της οξυτετρακυκλίνης είναι και η φωτόλυση, η οποία επηρεάζεται από το pH του νερού και αυξάνεται όταν αυξάνεται το pH του νερού σύμφωνα με τους Doi και Stoskopf, (2000). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται από τους Lunestad και Goksoyr (1990), οι οποίοι διαπίστωσαν μεγαλύτερη φωτόλυση της οξυτετρακυκλίνης σε θαλασσινό νερό από ότι στο γλυκό νερό.

Επίσης έχει αναφερθεί ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής της οξυτετρακυκλίνης είναι μεγαλύτερος στις χαμηλές θερμοκρασίες. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της οξυτετρακυκλίνης στο θαλασσινό νερό (μέσο pH 7,9, μέση θερμοκρασία 27° C, με φυσικό φωτισμό) ήταν 298 ώρες. Ο Samuelsen (1989) αναφέρει πως η διάρκεια ημιζωής της οξυτετρακυκλίνης στους 15° C με φωτισμό με έναν σωλήνα φθορισμού 40-W για 24 ώρες ήταν 128 ώρες και 168 ώρες στους 4° C. Στο απόλυτο σκοτάδι, η διάρκεια ημιζωής στους 4° C ήταν 390 ώρες και στους 15° C ήταν 234 ώρες. Τα αποτελέσματα του Samuelsen έδειξαν ότι η αποικοδόμηση της οξυτετρακυκλίνης ήταν πιο αργή στο θαλασσινό νερό στους 4° C σε σύγκριση με τους 15° C όταν φωτίζεται καθώς επίσης και στο απόλυτο σκοτάδι. Όμως οι αυξημένες θερμοκρασίες των νερών της ελληνικής επικράτειας μειώνουν το χρόνο ημίσειας ζωής της οξυτετρακυκλίνης και ευνοούν τη γρήγορη αποβολή της από τα ψάρια.

Άλλος παράγοντας που μελετήθηκε για την αποικοδόμηση της οξυτετρακυκλίνης ήταν και η οξειδωση, η οποία φάνηκε να μην επηρεάζει την αποικοδόμηση της σε απιονισμένο νερό, ενώ φάνηκε να την επηρεάζει σε ιονισμένο νερό και σε διάλυμα Ringer (Kuehn, 2000).

Θα λέγαμε ότι ο ορθότερος τρόπος ενσωμάτωσης της φαρμακούχου ουσίας στην ιχθυοτροφή θα μπορούσε να γίνει από τις βιομηχανίες παρασκευής ιχθυοτροφών. Αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη από τα υπό θεραπεία ψάρια της

σωστής θεραπευτικής δόσης, είτε αυτά προορίζονται για καλλιέργεια, είτε αποτελούν μέρος πειραμάτων για ερευνητικούς λόγους.

Στο πείραμά μας εφαρμόζοντας την επίταση ως τρόπο ενσωμάτωσης της φαρμακούχου ουσίας στην ιχθυοτροφή και το ιχθυέλαιο ως συνδετικό μέσο, διαπιστώθηκε ότι η μεγαλύτερη ποσότητα ιχθυελαίου συγκράτησε ισχυρότερα την οξυτετρακυκλίνη μετά την εμβάπτιση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής στο νερό με αποτέλεσμα να έχουμε μικρότερες απώλειες και ενδεχομένως καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Ωστόσο παραμένει το βασικό μειονέκτημα της μεγαλύτερης απώλειας της οξυτετρακυκλίνης κατά τη διάρκεια παρασκευής της φαρμακούχου ιχθυοτροφής.

Επειδή κατά τη διάρκεια μιας θεραπευτικής αγωγής η όρεξη των ασθενών ψαριών είναι συνήθως μειωμένη, είναι φυσικό η φαρμακούχος ιχθυοτροφή να μην καταναλώνεται πλήρως. Οι ποσότητες αυτές ποικίλλουν από εκτροφή σε εκτροφή ανάλογα με τη μέθοδο διατροφής, την τεχνική της παρασκευής της και τη θεραπευτική αγωγή. Για τον περιορισμό των απωλειών αυτών εφαρμόζονται πολλές μέθοδοι όπως είναι, η διατροφή των ασθενών ψαριών με το χέρι αντί με αυτοματισμούς, η χρησιμοποίηση συστημάτων βίντεο κάτω από το νερό για τον έλεγχο της κατανάλωσης, η χρησιμοποίηση μηχανικών μέσων συλλογής και απομάκρυνσης της τροφής, που χάνεται στο περιβάλλον και η ρύθμιση της συχνότητας χορήγησης (Stephen and Iwama, 1998).

Συνοψίζοντας θα μπορούσαμε να πούμε ότι ο βαθμός επιβάρυνσης του υδάτινου περιβάλλοντος από την εφαρμογή της οξυτετρακυκλίνης είναι αμελητέος δεδομένων:

► των απωλειών της οξυτετρακυκλίνης στο θαλάσσιο περιβάλλον που σημειώνονται το πολύ στα δύο πρώτα λεπτά εμβάπτισης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής, οπότε και έχει προσληφθεί κατά το μεγαλύτερο ποσοστό της από τα ψάρια,

- ▶ της σύντομης διάρκειας ημιζωής της οξυτετρακυκλίνης στο νερό,
- ▶ της αποικοδόμησής της στο υδρόβιο περιβάλλον λόγω των φαινομένων της υδρόλυσης και φωτόλυσης (Peterson *et al.*, 1993),
- ▶ των αυξημένων θερμοκρασιών των νερών της Ελληνικής Επικράτειας και των μεγάλων περιόδων ηλιοφάνειας που συμπίπτουν με την έναρξη των παθολογικών προβλημάτων και την περίοδο χορήγησης της θεραπείας και
- ▶ της απώλειας της αντιβακτηριακής δραστηριότητάς της στο θαλασσινό νερό λόγω της δημιουργίας συμπλόκων με τα κατιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} .

5. Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

1. **Anonymous (2001)**. Establishment of maximum residue limits (MRIs/ for residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Volume 8. Notice to Applicants and note for Guidance. EUROPEAN COMMISSION Enterprise Directorate-General. F2/AW D (2001)-Final.
2. **CAMAG (1995)**. HPLC Analysis of Quinolonic Antibiotics in Fish and Fish Feed. CAMAG Technical Document, Switzerland.
3. **Choo P.S. (1994)**. Degradation of Oxytetracycline Hydrochloride in Fresh and Seawater. Asian Fisheries Science, 7: 195-200.
4. **Doi, A.M., Stoskopf, M.K., 2000**. The kinetics of oxytetracycline degradation in deionized water under varying temperature, pH, light, substrate and organic matter. J. Aquat. Anim. Health 12, 246–253.
5. **Duis K., Inglis V., Beveridge M. & Hammer (1995)**. Leaching of four antibacterials from oil and alginated coated fish-feed pellets. Aquaculture Research, 26: 549-556.
6. **EMEA (1999)**. Antibiotic Resistance in the European Union Associated with Therapeutic Use of Veterinary Medicines. Report and Qualitative Risk Assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit. EMEA/CVMP/342/99-corr-Final.
7. **FAO (2005)**. Aquaculture production, 2003. Year book of Fishery Statistics, Vol.96/2. Food and Agriculture organization of the United Nations. Rome, Italy.

8. **Fribourgh J.H., Meyer F.R. & Robinson J.A. (1969).** Oxytetracycline leaching from medicated fish feeds. Technical Papers of the Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, 40:1-7.
9. **Gingerich W.H, Stehly G.R., Clark K.J. & Hayton W.L. (1998).** Crop grouping: a proposal for public aquaculture. Veterinary and Human Toxicology, 40 (2): 24-31.
10. **Halling-Sorensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.R., Ingerslev F., Holten-Luthoft E.C. & Jorgensen S.E. (1998).** Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. A review. Chemosphere, 36 (2): 357-393.
11. **Holford N.H.G. & Benet L.Z. (1995).** Pharmacokinetics & Pharmacodynamics: Rational Dose Selection & the Time Course of Drug Action. In: Katzung BG, Basic and Clinical Pharmacology. Prentice-Hall International; Inc., USA, 1995: 33-47.
12. **Hustvedt S.O., Storebakken T. & Salte R. (1991b).** Does oral administration of oxolinic acid and oxytetracycline affect feed intake of rainbow trout? Aquaculture, 92:109-113.
13. **Ingebrigtsen K. (1991).** Factors affecting drug disposition in fish. In: Christian F., Gyrd-Hansen N., Nielsen P., Rasmussen F. Proceedings of the 5th Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. ACTA Veterinaria Scandinavica. Copenhagen, Denmark.
14. **Kuehn, M. (2000).** Stability of tetracycline in water and liquid manure. J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med., 47: 379–384.
15. **Levy S.B. (1997).** The Challenge of Antibiotic Resistance. Scientific American, March 1997.

16. **Lunestad B.T. & Goksoyr J. (1990).** Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. *Diseases of Aquatic Organisms*, 9: 67-79.
17. **Peterson S. M., Batley G. E., & Scammell M. S. (1993).** Tetracycline in antifouling paints. *Marine Pollution Bulletin*, 26 (2): 96-100.
18. **Pouliquen H., Delepee R., Larhantec-Verdier M., Morvan M. L., & Le Bris H. (2007).** Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline, oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water, freshwater and seawater under abiotic conditions. *Aquaculture*, 262: 23-28.
19. **Reilly A. & Kaferstein F. (1997).** Food safety hazards and the application of the principles of the hazard analysis and critical control point (HACCP) system for their control in aquaculture production. *Aquaculture Research*, 28: 735-752.
20. **Rigos G., Alexis M. & Negas I. (1999).** Leaching, palatability and digestibility of oxytetracycline and oxolinic acid included in diets fed to seabass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture Research*, 30: 841-847.
21. **Ruiter A., Scherpenisse P. & Hajee C.A.J. (1996).** Analysis of Drug Residues in Fish. In: Haagsma N., Ruiter A., Czedik-Eysenberg P.B. *Proceedings of the EuroResidue III Conference*, Veldhoven, The Netherlands: 87-98.
22. **Samuelsen O.B. (1989).** Degradation of oxytetracycline in sea water at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm *Aquaculture*, 83: 7-16.
23. **Samuelsen O.B., Torsvik V. & Ervik A. (1992a).** Long range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance towards oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *Science Total Environment*, 114: 25-36.

24. **Schneider J. (1994).** Problems related to the usage of veterinary drugs in aquaculture-a review. *Quimica Analytica, Suppl*, 1: 34-42.
25. **Schwedler T.E. & Johnson S.K. (1997).** Animal Welfare Issues: Responsible care and health maintenance of fish in commercial aquaculture. In: Reynnells R.D., & Eastwood B.R. *Animal Welfare Issues Compendium. A Collection of 14 Discussion Papers.* Cooperative State Research, US Department of Agriculture, 1997.
26. **Smith P., Hiney M. & Samuelsen O.B. (1994).** Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annual review of fish diseases*, 4: 273-313.
27. **Stamm J. (1992).** In vitro activity and resistance development for sarafloxacin (A-56620): an aquacultural antibacterial. In: Michel C, and Alderman D.J. *Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality.* Paris, Office International de Epizooties: 333-339.
28. **Stephen C. & Iwama G. (1998).** Salmon Aquaculture Review. Fish Health Discussion Paper. Part C. Environmental Assessment Office (EAO), University of British Columbia, Canada.
29. **Toften H., Jorgensen E.H. & Jobiing M. (1995).** The study of feeding preferences using radiography: oxytetracycline as a feeding deterrent and squid extract as a stimulant in diets for Atlantic salmon. *Aquaculture Nutrition* ,1: 145-149.
30. **Volmer D.A., Mansoori B. & Locke, S.J. (1997).** Study of 4-Quinolone Antibiotics in Biological Samples by Short-Column Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 69: 4143-4155.

31. **Xu D. & Rogers W.A. (1994).** Leaching loss from oxytetracycline medicated feeds *Journal of Applied Aquaculture*, 4: 29-38.

Ελληνική βιβλιογραφία

1. **Γαλανοπούλου-Κούβαρη, Λιάπη Χ. (2000).** Φαρμακολογία. Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης. Αθήνα. Σελ.436.
2. **Κανονισμός (ΕΟΚ) 2377/90** του Συμβουλίου της 26ης Ιουνίου 1990 για τη θέσπιση κοινοτικής διαδικασίας για τον καθορισμό ανώτατων ορίων καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L 224: 1-8.
3. **ΕΟΦ (2001).** Φάρμακα νοσημάτων των ιχθύων. Κεφάλαιο 14. Κτηνιατρικό Συνταγολόγιο. Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων Pharmaceutica Prinsnop. Σελ.: 281-282.
4. **Πνευματικάτος Γ. (1996).** Ιχθυοτροφία και Ιχθυοπαθολογία. Εκδόσεις «Αδελφών Κυριακίδη», Θεσσαλονίκη.
5. **Φώτης Γ. (1999).** Υδάτινο περιβάλλον. Στοιχεία ιχθυολογίας. Ιχθυοτροφία και Ιχθυολογία. Τόμος Α' Εκτροφή και Παθολογία Ιχθύων. Εκδόσεις «Σύγχρονη Παιδεία», Θεσσαλονίκη.

Abstract

Increased production of farmed fish in sea cages in Greece is a common practice. High fish stocking density as a necessary presupposition of intensive farming, results the spreading of infectious diseases. Disease control in mariculture must focus aim mainly at prevention (proper management practices, vaccination, etc) rather than remedy. Nevertheless, use of antibiotics is often necessary under certain circumstances.

Antibiotics are drugs produced either from natural or from synthetic substances and have the ability to destroy or prevent the development of microorganisms.

The aim of this project is the evaluation of the actual substance of the antibiotic oxytetracycline consumed by fish through feeding procedure with time.

The experimental protocol included two types of medicated fish food, one with 2 ml of fish oil and one with 4 ml of fish oil, four treatments (1-2 sec, ½ min, 1 min, 2 min submergence, in sea water) and the control. The control was also medicated fish feed, which has not been submerged in sea water, with fish oil (2ml and 4 ml respectively). Each treatment involved three replicates.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) HP-1100 was used in order to determine the oxytetracycline concentration.

This research led to the conclusion that the oxytetracycline concentration in the medicated fish feed is related to its preparation process. Specifically, it was shown that the preparation of 50g of medicated fish food using 2 ml of fish oil results in almost double concentration of oxytetracycline compared to using 4 ml of fish oil.

However, there was evidence that the fish feed with 4ml of fish oil responded better in the water compared to that with 2ml of fish oil, thus reducing the drug's loss rate in it.

Finally, evidence is provided that the greater loss of oxytetracycline in sea water occurs during the first minute, time long enough to ensure the reception of the largest amount of feed by the fish, even in cases of reduced appetite due to disease.

This fact, combined with the half life of oxytetracycline in the Greek warm waters, its decomposition rate in the aquatic environment due to hydrolysis, photolysis the loss of its antibacterial activity in sea water due to interaction with Ca^{2+} and Mg^{2+} , leads to the conclusion that the environment impact is insignificant.

Key words: antibiotics, aquaculture, oxytetracycline, High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Παράρτημα

Αναλυτικά παρουσιάζεται η ανάλυση παραλλακτικότητας με βάση το στατιστικό πακέτο SPSS 12

Σύγκριση της μεταβολής της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης στην ιχθυοτροφή για τις δύο ποσότητες ιχθυελαίου

Oneway

ANOVA

Check

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,375	1	3,375	7,792	,049
Within Groups	1,733	4	,433		
Total	5,108	5			

Oneway

ANOVA

DIP1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,241	1	3,241	4,015	,116
Within Groups	3,229	4	,807		
Total	6,470	5			

Oneway

ANOVA

MIN12

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,050	1	1,050	39,010	,003
Within Groups	,108	4	,027		
Total	1,158	5			

Oneway**ANOVA**

MIN1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,054	1	,054	,250	,643
Within Groups	,866	4	,216		
Total	,920	5			

Oneway**ANOVA**

MIN2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,000	1	,000	,009	,930
Within Groups	,192	4	,048		
Total	,193	5			

Μεταβολή της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης στην ιχθυοτροφή με 2 ml ιχθυέλαιο

Oneway

ANOVA

oil2ml

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22,166	4	5,542	18,724	,000
Within Groups	2,960	10	,296		
Total	25,126	14			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

oil2ml

Duncan^a

time	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
5,00	3	,8867		
4,00	3	1,4600	1,4600	
3,00	3		2,3867	
2,00	3			3,7133
1,00	3			3,9900
Sig.		,226	,064	,547

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Μεταβολή της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης στην ιχθυοτροφή με 4 ml ιχθυέλαιο

Oneway

ANOVA

oil4ml

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5,443	4	1,361	4,296	,028
Within Groups	3,168	10	,317		
Total	8,611	14			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

oil4ml

Duncan^a

time	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
5,00	3	,8700		
4,00	3	1,2700	1,2700	
3,00	3	1,5500	1,5500	1,5500
2,00	3		2,2433	2,2433
1,00	3			2,4900
Sig.		,188	,070	,079

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.