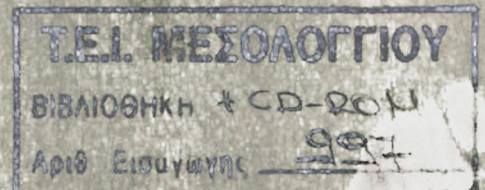


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ (Τ.Ε.Ι.)

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ-ΑΛΙΕΙΑΣ

Διπλωματική εργασία με θέμα :

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΜΜΩΝΙΑΣ ΚΑΙ
ΤΩΝ ΝΙΤΡΩΔΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΟΥ
ΓΟΝΟΥ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ *Dicentrarchus labrax*
(ΛΑΒΡΑΚΙ) ΚΑΙ *Sparus aurata* (ΤΣΙΠΟΥΡΑ)

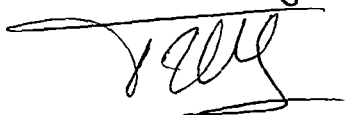


των σπουδαστών :
Βλάμη Αριστεΐδη
Φίλου Βαρβάρα

Εισηγητής :
Δρ. Γεώργιος Χώτος
Καθηγητής

Εγκρίσεων
Μεσογέγγι 11-12-2006

Ο εισηγητής



Dr. F. Xiaros
Καθηγητής

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.

Το θέμα της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι : «**Επίδραση της τοξικότητας της αμμωνίας και των νιτρωδών στην επιβίωση του γόνου των ειδών *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι) και *Sparus aurata* (τσιπούρα)**».

Κατά την πειραματική μελέτη ελέγχθηκαν τα όρια αντοχής των παραπάνω ειδών στην τοξικότητα της αμμωνίας και των νιτρωδών, δια της μεταφοράς τους σε κλιμακούμενες συγκεντρώσεις των μεταβολιτών. Η εύρεση των ορίων αντοχής της τσιπούρας και του λαβρακιού πραγματοποιήθηκε με βάση τα πειράματα LC₅₀ (η ποσότητα της ουσίας που προκαλεί το θάνατο του 50% του πειραματικού πληθυσμού).

Η επιλογή του θέματος της παρούσας διπλωματικής εργασίας, σχετίζεται με την έντονη υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα που υφίστανται το λαβράκι και η τσιπούρα στην Ελλάδα, αλλά και σε άλλες χώρες της Μεσογείου. Είναι γεγονός ωστόσο, ότι η αύξηση των επιπέδων της αμμωνίας και των νιτρωδών στις δεξαμενές εκτροφής και καλλιέργειας ιχθύων, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες αύξησης της θνησιμότητας και μείωσης της παραγωγής των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας. Για τον λόγο αυτό, επιλέχθηκε η ανάλυση και παρουσίαση του συγκεκριμένου θέματος.

Το συγκεκριμένο θέμα προτάθηκε από τους καθηγητές κ. Γ. Χώτο και κ. Ν. Βλάχο, τους οποίους θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά για την πολύτιμη υποστήριξη και καθοδήγηση τους, που συνετέλεσαν στη εκπόνηση της διπλωματικής μας μελέτης. Θα θέλαμε ν` αναφέρουμε ότι από την έναρξη μέχρι και την ολοκλήρωση των πειραματικών διαδικασιών, παρουσιάστηκαν αρκετές φορές δυσκολίες, τόσο σε πρακτικό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο, τις οποίες δεν θα είχαμε ξεπεράσει χωρίς την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη των καθηγητών μας, κ. Γ. Χώτου και κ. Ν. Βλάχου. Επίσης, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τους υπεύθυνους του Ιχθυογεννητικού Σταθμού ΝΗΡΕΑΣ Α.Ε., και ιδιαίτερα τον διευθυντή κύριο Γ. Κυριακίδη, οι οποίοι επίσης συνετέλεσαν στην διεξαγωγή της παρούσας εργασίας, παρέχοντας τον γόνο της τσιπούρας και του λαβρακιού.

Η παρούσα εργασία αποτελείται από τα εξής τέσσερα κεφάλαια :

Κεφάλαιο πρώτο : Εισαγωγή. Αποτελεί μία εισαγωγή στο θέμα της τοξικότητας της αμμωνίας και των νιτρωδών ιόντων, παρέχοντας το απαραίτητο θεωρητικό υπόβαθρο. Επίσης, επιχειρείται μια αναλυτική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με την τοξική δράση της αμμωνίας και των νιτρωδών, ενώ τέλος αναφέρεται ο σκοπός διεξαγωγής της παρούσας εργασίας.

Κεφάλαιο δεύτερο : Υλικά και μέθοδοι έρευνας. Στο κεφάλαιο αυτό αναφέρονται αναλυτικά όλα τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για τον εγκλιματισμό του γόνου, η μεθοδολογία της έρευνας και ο σχεδιασμός της πειραματικής διαδικασίας.

Κεφάλαιο τρίτο : Παρουσίαση αποτελεσμάτων. Παρουσιάζονται η ανάλυση και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της πειραματικής διαδικασίας, τα οποία συνοδεύονται και από τα απαραίτητα διαγράμματα.

Κεφάλαιο τέταρτο : Συμπεράσματα. Στο κεφάλαιο αυτό αναφέρονται τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας και συγκρίνονται με τα αποτελέσματα άλλων

**ΒΛΑΜΗΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ
ΦΙΛΟΥ ΒΑΡΒΑΡΑ**

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ, 2006.

αντίστοιχων μελετών. Επίσης, αναλύονται οι λόγοι για τους οποίους παρατηρούνται οι οποιεσδήποτε διαφοροποιήσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφόρων εργασιών.

**ΒΛΑΜΗΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ
ΦΙΛΟΥ ΒΑΡΒΑΡΑ**

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ, 2006.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.

1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ-ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.

Η αμμωνία αποτελεί το κύριο μεταβολικό προϊόν των τελεόστων ψαριών που προκύπτει από τον καταβολισμό των πρωτεϊνών και αμινοξέων, των πουρινών και πυριμιδινών (Randall and Wright, 1987). Στα εντατικά συστήματα εκτροφής ιχθύων η αμμωνία μπορεί να ανέλθει σε εξαιρετικά επικίνδυνα επίπεδα για την επιβίωση και ανάπτυξη των ψαριών, εξαιτίας των υψηλών ιχθυοφορτίσεων, της αποσύνθεσης των υπολειμμάτων της μη καταναλωθείσας τροφής, της μη επαρκούς ανανέωσης του νερού ή ακόμα και από ύδατα γεωργικών καλλιεργειών, αστικών λυμάτων και βιομηχανικών αποβλήτων. Στο νερό η αμμωνία συνυπάρχει με δυο μορφές, την ιονισμένη και τη μη-ιονισμένη μορφή, οι οποίες βρίσκονται σε μία κατάσταση ισορροπίας. Από τις δύο αυτές μορφές της αμμωνίας τοξική για τους υδρόβιους οργανισμούς είναι η μη-ιονισμένη μορφή. Στη βιβλιογραφία τα τελευταία χρόνια έχει καθιερωθεί ο όρος TAN (Total Ammonium Nitrogen) ο οποίος αντιστοιχεί στο σύνολο και των δύο μορφών.

Τόσο στα φυσικά ύδατα, όσο και στα νερά των δεξαμενών και κλωβών εκτροφής και καλλιέργειας ιχθύων, η αμμωνία οξειδώνεται σε νιτρικά ιόντα (NO_3^-). Τα νιτρώδη ιόντα (NO_2^-) αποτελούν το ενδιάμεσο προϊόν της παραπάνω οξείδωσης. Η οξείδωση των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) σε νιτρώδη πραγματοποιείται με τη δράση των βακτηρίων *Nitrosomonas* και *Nitrobacter*. Οποιοδήποτε παράγοντες επηρεάζουν τη δράση και τον μεταβολισμό των βακτηρίων αυτών μπορεί να οδηγήσουν σε συσσώρευση των νιτρωδών, τα οποία επίσης χαρακτηρίζονται από τοξική δράση (Χώτος και συν, 2001).

Μέχρι σήμερα, έχει πραγματοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός ερευνητικών εργασιών για τη διερεύνηση και την εξακρίβωση των ορίων αντοχής (LC_{50}) διαφόρων ειδών ψαριών στην αμμωνία και στα νιτρώδη.

Οι Lloyd και Herbert το 1960 κατέδειξαν ότι η συγκέντρωση κατώτατων θανατηφόρων ορίων της μη-ιονισμένης αμμωνίας στην επιφάνεια βραγχίων είναι 0,4 mg-N/l, για την πολύχρωμη πέστροφα *Salmo gairdnerii*, ενώ οι Merkens και Downing (1957) διατύπωσαν την άποψη ότι μερικά χονδροειδή είδη ψαριών επιζούν περισσότερο στις υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας από την πέστροφα, και μπορούν να

ταξινομηθούν βάσει της αυξανόμενης ευαισθησίας τους στην ακόλουθη σειρά : γωβιός (*Gobio gobio*), πέρκα (*Fluviatilis perka*), roach (*Rutilus rutilus*), πέστροφα (*Salmo gairdnerii*).

Ο Ball (1957) από την άλλη πλευρά υποστήριξε ότι αν και τα χονδροειδή είδη ψαριών επιζούν περισσότερο στα τοξικά επίπεδα της μη-ιονισμένης αμμωνίας, η τοξική συγκέντρωση κατώτατων ορίων, κάτω από την οποία δεν είναι αντιληπτό κανένα τοξικό αποτέλεσμα, είναι περίπου το ίδιο (0,4 mg-N/L) για την πέστροφα, το roach (*Rutilus rutilus*), το bream (*Abramis brama*) και το rudd (*Erythrophthalmus scardinius*) και ότι η πέρκα είναι μακροπρόθεσμα ελαφρώς πιο ανθεκτική.

Η οξεία τοξικότητα της αμμωνίας στο σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*) μελετήθηκε από τους Herbert and Shurben (1965) καθώς και από τους Alabaster et al. (1979,1983), οι οποίοι οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι το 24h-LC₅₀ για το σολομό του Ατλαντικού ανήκε στο εύρος των 120-210 µg/L NH₃-N.

Ο Κπορη (1992) μελέτησε επίσης την οξεία τοξικότητα της αμμωνίας στο σολομό του Ατλαντικού και βρήκε μία από τις χαμηλότερες τιμές του LC₅₀ που αναφέρονται στην τοξικότητα της μη-ιονισμένης αμμωνίας στα ψάρια. Ωστόσο, είναι πιθανό η χαμηλή αυτή αντοχή να οφείλεται στη χαμηλή θερμοκρασία, pH και σκληρότητα του νερού, παράγοντες που οδηγούν σε υψηλά ποσοστά μη-ιονισμένης αμμωνίας στο νερό. Το 1989 το U.S.EPA πρότεινε μία περιοριστική τιμή της συγκέντρωσης της αμμωνίας των 29 µg/L NH₃-N, η οποία βασιζόταν σε έρευνες για διάφορα θαλάσσια είδη. Δεδομένου όμως τα όρια αντοχής στην αμμωνία διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στα διάφορα είδη και ανάμεσα στις διάφορες αλατότητες, η τιμή αυτή ίσως να μην είναι έγκυρη τόσο για το σολομό, όσο και για διάφορα άλλα είδη.

Η τοξικότητα της αμμωνίας έχει μελετηθεί και σε πολλά ακόμα είδη. Για παράδειγμα το *guppy* (*Poecilia reticulata*) έχει 72h-LC₅₀ ίσο με 1,6mg-N/L (Rubin and Elmaraghy, 1977), το γατόψαρο των καναλιών *Ictalurus punctatus* έχει τοξικό κατώτατο όριο των 0,99 mg-N/L (Colt and Tchobanoglous, 1978), ενώ η *Tilapia aurea* έχει 48h-LC₅₀ ίσο με 2,4 mg-N/L (Redner and Stickney, 1979).

Ο Brownell (1980) διαπίστωσε ότι οι τιμές του 24h-LC₅₀ για τέσσερα είδη *sparid* (*Diplodus sargus*, *Lithognathus mormurus*, *Pachymetopon blochi* και ένα μη αναγνωρισμένο είδος) ποικίλουν από 0,36-0,42 mg/L NH₃-N, ενώ η τιμή του 24h-LC₅₀ για το *Gaidrosparus capensis* είναι 0,46 mg/L.

Αρκετά υψηλότερη τιμή βρήκε ο Sadler (1981) για το δέκα ημερών LC_{50} της τάξης του $1\text{mg/L NH}_3\text{-N}$ στο ευρωπαϊκό χέλι *Anguilla anguilla*. Ο Sadler χρησιμοποίησε στα πειράματα του elvers βάρους $0,2\text{ g}$ και κίτρινο χέλι βάρους $2,8\text{ g}$ και βρήκε ότι καμία θνησιμότητα δεν έλαβε χώρα σε επίπεδα αμμωνίας κάτω από $1\text{ mg/L NH}_3\text{-N}$ για τα elvers, ενώ κάτω από το επίπεδο αυτό η θνησιμότητα των κίτρινων χελιών ήταν 30% ή και λιγότερη. Πάντως και οι δύο ηλικιακές ομάδες είχαν LC_{50} δέκα ημερών περίπου $1\text{ mg/L NH}_3\text{-N}$, αλλά πάνω από τη δόση αυτή τα elvers πέθαιναν γρηγορότερα από τα ενήλικα.

Ο Russo (1985) ασχολήθηκε με την οξεία τοξικότητα της αμμωνίας σε δύο σαλμονοειδή είδη και βρήκε ότι οι τιμές του 96h-LC_{50} για τα είδη αυτά κυμαίνονταν από $0,08\text{-}1,1\text{ mg/L NH}_3\text{-N}$. Έτσι διατύπωσε την άποψη ότι τα σαλμονοειδή είδη είναι πολύ ευαίσθητα στην αμμωνία από τα μη σαλμονοειδή, καθώς οι αντίστοιχες τιμές των 96h-LC_{50} για τα μη σαλμονοειδή κυμαίνονταν από $0,5\text{-}4,6\text{ mg/L NH}_3\text{-N}$.

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) έχουν αποτελέσει πολλές φορές αντικείμενο ερευνητικών εργασιών και πειραμάτων για την εξακρίβωση των ορίων αντοχής τους στην αμμωνία, καθώς είναι είδη που εκτρέφονται και καλλιεργούνται συστηματικά σε πολύ μεγάλο βαθμό. Οι Wajsbrodt, Gasith, Krom και Popper (1991) κατέληξαν ότι η οξεία τοξικότητα της αμμωνίας σε νεαρά άτομα τσιπούρας κυμαίνεται από $13,8\text{-}27,2\text{ mg/L TAN}$ και παρατήρησαν ότι το μέγεθος των ψαριών δεν είχε καμία επίδραση στην ευαισθησία που εμφάνιζαν στην αμμωνία σε όλο το εύρος του βάρους από $0,4\text{-}3,2\text{ g}$, καθώς και ότι η θνησιμότητα των ψαριών συνέβαινε σε ένα περιορισμένο εύρος συγκεντρώσεων μεταξύ $0,79\text{-}1,64\text{ mg/L NH}_3\text{-N}$, καταδεικνύοντας μία απότομη σχέση δόσης-αντίδρασης. Το μέσο 96h-LC_{50} για τον πληθυσμό δοκιμής ήταν 21 mg/L TAN (ή $1,27\text{ mg/L NH}_3\text{-N}$), σε επίπεδα οξυγόνου πάνω από το 80% του κορεσμού, θερμοκρασία $27\text{ }^\circ\text{C}$ και $\text{pH} = 8,1$.

Ο Person – Le Ruyet et al. (1995) χρησιμοποίησε για τα πειράματα του seabass (*Dicentrarchus labrax*), seabream (*Sparus aurata*) και turbot (*Scophthalmus maximus*) τριών διαφορετικών μεγεθών ($6\text{-}163\text{ g}$), διαπιστώνοντας τη μη ύπαρξη διαφορετικής ευαισθησίας ανάλογα με το μέγεθος των ατόμων και στα τρία είδη για βάρους από $6\text{-}150\text{ g}$, παρά το γεγονός ότι οι τιμές του LC_{50} έτειναν να είναι μικρότερες στα μεγαλύτερα ψάρια. Επίσης διαπίστωσε ότι οι τιμές των LC_{50} δεν μεταβάλλονταν σημαντικά μετά τις $24\text{ } \text{ώρες}$.

Έτσι στα turbot και seabream (τσιπούρα) οι μέσες τιμές των 96h-LC₅₀ κυμαίνονταν από 2,5-2,6 mg/L UIA-N (ή 57-59 mg/L TAN). Στο seabass (λαβράκι) παρατηρήθηκε λίγο μεγαλύτερη ευαισθησία για κάθε χρονικό διάστημα έκθεσης (0-96 ώρες), εμφανίζοντας 96h-LC₅₀ 30% μικρότερο από τα άλλα δύο είδη με τιμή ίση με 1,7 mg/L NH₃-N (40mg/L UIA-N).

Ακόμα διαπίστωσε πως οι περισσότερες θνησιμότητες πραγματοποιούνταν σε σχετικά μικρό εύρος συγκεντρώσεων, ενώ σε όλα τα τεστ τα κατώτερα θανατηφόρα όρια κάτω από τα οποία καμία θνησιμότητα δεν πραγματοποιήθηκε ήταν κάτω από 1 mg/L UIN-N στις πιο ευαίσθητες ομάδες του λαβρακιού, σε σχέση με 1,4 mg/L στο turbot. Ωστόσο και στα δύο αυτά είδη, οι τιμές των κατώτερων θανατηφόρων ορίων ήταν 2 φορές υψηλότερες από τις τιμές διαφόρων ανθεκτικών ειδών.

Η έρευνα αυτή των Pearson et al. αποτέλεσε μία συγκριτική μελέτη ανάμεσα στα όρια αντοχής των προαναφερθέντων ειδών, αλλά και άλλων. Έτσι, οι τιμές που προέκυψαν ήταν 2 φορές μεγαλύτερες από τις τιμές που ανέφεραν οι Wajsbrot et al (1991) των 1,27 mg/L UIA-N (23,7 mg/L TAN). Σημαντικές διαφορές υπάρχουν επίσης ανάμεσα στη μελέτη αυτή και εκείνη των Tudor et al (1994) όσο αφορά στην ευαισθησία των ιχθυδίων του λαβρακιού (seabass). Τέλος παρατηρήθηκε ότι το seabass, το seabream και το turbot εμφανίζουν την ίδια περίπου αντοχή στην αμμωνία με το **Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*)** και τα ιχθύδια του *Cyprinus carpio* , όπως προκύπτει από τη μελέτη των Salin και Williot (1991).

Το 1998 ο Pearson et al επανέλαβε τα πειράματα για την αντοχή των τριών ειδών στη αμμωνία και βρήκε υψηλές τιμές του 96h-LC₅₀ που κυμαίνονταν από 1,3-2,6 mg/L NH₃-N. Ειδικότερα η μέση τιμή του 96h-LC₅₀ στο **turbot (*Scophthalmus maximus*)** ήταν 4,9 mmol/L TAN, ενώ στο **seabream (*Sparus aurata*)** ήταν 3,7 mmol/L TAN. Τέλος τη φορά αυτή διαπίστωσε ότι οι τιμές των LC₅₀ δεν μεταβάλλονταν σημαντικά ανάμεσα στις 48 και στις 96 ώρες έκθεσης.

Οι Cardoso, Chiarini-Garcia, Ferreira και Poli (1996) πραγματοποίησαν μία μελέτη με λάρβες και γόνο του είδους *Lophiosilurus alexandri* (ένα νεοτροπικό σιλουροειδές είδος που αναπαράγεται φυσικά σε δεξαμενές και θεωρείται είδος με εξαιρετικές δυνατότητες για καλλιέργεια) και αντιστοίχως βρήκαν ότι οι τιμές του 48h-LC₅₀ ήταν 0,48 mg/L NH₃-N για τις λάρβες και 0,92±0,07 mg/L για τον γόνο. Κατά τη μελέτη τους αυτή οι Cardoso, Garsia, Ferreira και Poli παρατήρησαν ότι οι λάρβες πέθαιναν

κατά την έκθεσή τους σε συγκεντρώσεις πάνω από 0,99 mg/L NH₃-N, ενώ ο γόνος επιβίωνε για περισσότερο από 12 ώρες σε συγκέντρωση 1,5 mg/L.

Είδη που επέδειξαν εξαιρετική αντοχή στην αμμωνία ήταν τα *Opsanus beta*, *Opsanus tau* και *Porichthys notatus* που ανήκουν στην οικογένεια των *Batrachoididae* (Wang-Walsh, 1999). Από τα είδη αυτά το *Opsanus tau* είχε την υψηλότερη τιμή του 96h-LC₅₀ ίση με 19,7 mM TAN εμφανίζοντας και την μεγαλύτερη αντοχή στην αμμωνία, ακολουθούμενο από το *Opsanus beta* με 96h-LC₅₀ ίσο με 9,7 mM TAN, ενώ τέλος το *Porichthys notatus* είχε τη μικρότερη αντοχή και το μικρότερο LC₅₀ ίσο με 6 mM TAN σε σχέση με τα άλλα δύο είδη.

Οι Χώτος και συν. (2001), στα πλαίσια ενός ερευνητικού προγράμματος που χρηματοδοτήθηκε από την επιτροπή ερευνών του Τ.Ε.Ι. Μεσολογγίου, πραγματοποίησαν μια πειραματική μελέτη, χρησιμοποιώντας 4 είδη από διαφορετικές οικογένειες, με σκοπό τον προσδιορισμό των ορίων αντοχής των παραπάνω ειδών στην τοξικότητα της αμμωνίας. Έτσι, τα είδη που μελέτησαν ήταν το χέλι (*Anguilla anguilla*) μέσου βάρους 1,7 g, το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) μέσου βάρους 0,44 g, η τσιπούρα (*Sparus aurata*) μέσου βάρους 0,395 g και ένα κεφαλοειδές, η βελάνισσα (*Chelon labrosus*), μέσου βάρους 0,48 g. Οι τιμές των 24h-LC₅₀ στις οποίες κατέληξαν ήταν 20,69 mg/L TAN για τη βελάνισσα, σε αλατότητα 10 ppt, θερμοκρασία 24.5 °C και pH 7.7 ως 7.9, ενώ για το χέλι ήταν 33.77 mg/L TAN σε αλατότητα 10 ppt, θερμοκρασία 21.5 °C και pH 7.5. Η τιμή του 24h-LC₅₀ για το λαβράκι ήταν 17.36 mg/L TAN σε αλατότητα 10 ppt, θερμοκρασία 24.5 °C και pH 7.5, ενώ τέλος η τσιπούρα είχε 24h-LC₅₀ ίσο με 0.35 mg/L TAN σε αλατότητα 20 ppt, θερμοκρασία 20.6 °C και pH 7.3-7.5

Στον παρακάτω πίνακα εκτίθενται τα LC₅₀ κάποιων επιπλέον ειδών που παρουσιάζουν ενδιαφέρον από την άποψη της υδατοκαλλιέργειας (πηγή :από Χώτος και συν, 2001).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1. Συγκεντρώσεις της μη ιονισμένης αμμωνίας σε mg/L ως LC₅₀ (από Χώτος και συν, 2001).

| ΕΙΔΟΣ | LC ₅₀ |
|---|---|
| Γαρίδα <i>Penaeus monodon</i> | 1,3 |
| Αμερικάνικο γατόψαρο <i>Ictalurus punctatus</i> | 2,4 |
| Αμερικάνικο γατόψαρο | 2,9 |
| Κυπρινοειδές <i>Pimephales promelas</i> | 2,6 |
| Ιριδίζουσα πέστροφα <i>Oncorhynchus mykiss</i> | 0,6 |
| Κινέζικη γαρίδα <i>Penaeus chinensis</i> | 2,5 για νεαρά άτομα, 25 °C, 30ppt |
| Αμερικάνικο λαβράκι <i>Morone chrysops</i> x <i>M. saxatilis</i> | 0,3-0,6 σε 25 °C και 5-80 mg/L ασβέστιο 0,7 σε 25 °C και 1-24 ppt |
| <i>Sciaenops ocellatus</i> | 0,8 σε 20 °C και 4 ppt |
| Γαρίδα γλυκού νερού <i>Macrobrachium rosenbergii</i> | 2,2 για μετανύμφες σε 29 °C και pH = 8,5 2,0 για νεαρά άτομα σε 29 °C και pH=9,0 |
| Γαρίδα <i>Penaeus japonicus</i> | 3,0 για νεαρά άτομα σε 27-28 °C και 34ppt |

Η αμμωνία (κυρίως η μη ιονισμένη της μορφή) μπορεί να αποτελεί τον πιο τοξικό παράγοντα στο νερό εκτροφής και καλλιέργειας ιχθύων, αλλά όχι και τον μόνο. Τα νιτρώδη αποτελούν το ενδιάμεσο προϊόν της διαδικασίας της νιτροποίησης, και μπορεί να ανέλθουν σε υψηλά επίπεδα κατά την εντατική καλλιέργεια ιχθύων. Στις δεξαμενές των ψαριών τα νιτρώδη μπορεί να ανέλθουν σε θανατηφόρα ή υποθανάτια επίπεδα, σαν αποτέλεσμα της διατάραξης της διαδικασίας της νιτροποίησης (Alcaraz and Espina by Collins, Gratzek, Shotts, Dawa, Cambel, 1997). Στις υδατοκαλλιεργητικές δραστηριότητες και ειδικά σε αυτές με ανακυκλούμενα νερά, τα νιτρώδη μπορεί να αυξηθούν σε περιεκτικότητα, αν ο βιολογικός καθαρισμός που εφαρμόζουν δεν έχει ρυθμιστεί κατάλληλα, ή δεν έχει την αναγκαία δυναμικότητα να αντιμετωπίσει την παραγόμενη από τους εκτρεφόμενους οργανισμούς αμμωνία (Χώτος και συν, 2001).

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αναφορές από διάφορους ερευνητές για την τοξικότητα των νιτρωδών στα διάφορα είδη ψαριών. Ο Wallen et al. (1957) βρήκε 96h-LC₅₀ ίσο με 1,5mg/L NO₂⁻-N στο είδος *Gambusia affinis*, ενώ ο Klinger (1957) κατέληξε ότι η τιμή του 96h-LC₅₀ για το είδος *Phoxinus laevis* είναι ίσο με 28 mg/L NO₂⁻-N (Lewis and Morris, 1986, από Χώτος και συν, 2001).

Ο McCoy (1972) μελέτησε τα είδη *Percina caprodes*, *Culaea inconstans*, *Capriodes cyprinus* διεξάγοντας πειράματα 24 ωρών και τα είδη *Ictalurus melas*, *Cyprinus carpio* και *Catostomus commersoni* διεξάγοντας πειράματα 48 ωρών. Οι τιμές του LC₅₀ που βρήκε ήταν < 5 mg/L NO₂⁻-N στα *P. caprodes* και *C. inconstans*, >100 mg/L NO₂⁻-N στα *C. cyprinus* και *C. commersoni*, ενώ ήταν > 40 mg/L στα *I. melas* και *C. carpio* (Lewis and Morris, 1986, από Χώτος και συν, 2001).

Οι Konikoff (1975), Colt and Tchobanoglous (1976) και Palacheck and Tomasso (1984b) μελέτησαν το είδος *Ictalurus punctatus* διεξάγοντας πειράματα 96 ωρών και κατέληξαν σε τιμές 96h-LC₅₀ 7,6 mg/L NO₂⁻-N, 12,8 και 7,1 mg/L αντίστοιχα (Lewis and Morris, 1986, από Χώτος και συν, 2001).

Η τοξικότητα των νιτρωδών και η επίδραση τους στην επιβίωση του ευρωπαϊκού χελιού *Anguilla anguilla* μελετήθηκε από τους Kamstra, Span and van Weerd (1996). Οι προαναφερθέντες ερευνητές, κατέληξαν ότι το 96h-LC₅₀ για χέλια 24 g, ήταν ίσο με 143,7 mg/L NO₂, μία τιμή αρκετά υψηλή σε σχέση με άλλα είδη ψαριών.

Οι Russo and Thurston (1997) βρήκαν 96h-LC₅₀ ίσο με 2,3 mg/L NO₂⁻-N στο είδος *Pimephales promelas*, ενώ οι Palacheck and Tomasso (1984a) βρήκαν 96h-LC₅₀ ίσο με 70 mg/L (Lewis and Morris, 1986 από Χώτος και συν, 2001).

Αν και ο κυπρίνος θεωρείται παραδοσιακά είδος με αντοχές, είναι ωστόσο ευαίσθητος στα νιτρώδη σε χαμηλά επίπεδα χλωρίου. Οι Alcaraz and Espina (1993) κατέληξαν ότι το 96h-LC₅₀ για τον φυτοφάγο κυπρίνο *Ctenopharyngodon idella* είναι ίσο με 10,6 mg/L NO₂⁻-N σε θερμοκρασία 24 °C και 6 mg/L Cl⁻, γεγονός που σύμφωνα με τους Lewis και Morris (1986) τον κατατάσει στα πιο ευαίσθητα είδη.

Η επιβίωση του γόνου της ασημένιας πέρκας *Bidyanus bidyanus* από την επίδραση των νιτρωδών μελετήθηκε από τους Frances, Allan και Nowak (1998), και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η επιβίωση του γόνου της ασημένιας πέρκας δεν επηρεάστηκε από την έκθεση σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 16,2 mg/L NO₂⁻-N.

Οι Parra and Yufera (1999) μελέτησαν τα όρια αντοχής των ειδών *Sparus aurata* και *Solea senegalensis* στα νιτρώδη και βρήκαν ότι η τιμή του 96h-LC₅₀ σε τσιπούρες 12 ημερών ήταν ίση με 1997 p.p.m., ενώ γλώσσες 7 ημερών του είδους *Solea senegalensis* δεν εμφάνισαν καμία θνησιμότητα όταν εκτέθηκαν για 24 ώρες σε συγκεντρώσεις νιτρωδών πάνω από 2000 ppm.

Οι Χώτος και συν (2001) μελέτησαν την επίδραση των νιτρωδών (NO₂⁻) στην επιβίωση του γόνου του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) και της βελάνισσας (*Chelon labrosus*). Οι τιμές των 24h-LC₅₀ στις οποίες κατέληξαν είναι οι εξής : 8,42 mg/L NO₂⁻-N για το λαβράκι σε αλατότητα 10 ppt, θερμοκρασία 24.8 °C και pH 7.5, ενώ η αντίστοιχη τιμή για τη βελάνισσα ήταν 8,74 mg/L NO₂⁻-N σε αλατότητα 10 ppt, θερμοκρασία 24.5°C και pH 7.7 ως 7.9.

Σκοπός της παρούσης εργασίας είναι να καθορίσει την συγκέντρωση της ολικής αμμωνίας (TAN) και των νιτρωδών (NO₂⁻) που προκαλούν το θάνατο του 50% του πληθυσμού δοκιμής (LC₅₀) στο γόνο του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) και της τσιπούρας (*Sparus aurata*) κατά την έκθεσή τους στους μεταβολίτες για χρονική διάρκεια 24 ωρών.

Δηλαδή, η παρούσα ερευνητική εργασία αποσκοπεί στη μελέτη και σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών με εκείνων άλλων εργασιών για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν στα όρια αντοχής του γόνου του λαβρακιού (*D.labrax*) και της τσιπούρας (*S. aurata*) στην αμμωνία και στα νιτρώδη.

1.2. ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΜΜΩΝΙΑΣ (NH₃-N) ΚΑΙ ΤΩΝ ΝΙΤΡΩΔΩΝ ΙΟΝΤΩΝ (NO₂⁻-N).

1.2.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΜΜΩΝΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ.

Η αύξηση των επιπέδων της αμμωνίας στο νερό διαβίωσης των ιχθύων επιδρά στα ψάρια –εκτός των άλλων- και μέσω της **πρόκλησης έντονου stress**. Η παρατεταμένη παραμονή των ιχθύων σε κατάσταση πίεσης (stress) έχει σαν αποτέλεσμα **την αυξημένη έκκριση κορτιζόλης, η οποία δρα ανταγωνιστικά ως προς την αυξητική ορμόνη**. Τα υψηλά επίπεδα κορτιζόλης προκαλούν μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των

ιχθύων και αυτό οφείλεται στις καταβολικές ιδιότητες της, από τις οποίες επιδιώκεται η κάλυψη των αυξημένων ενεργειακών αναγκών των ατόμων εξαιτίας της επίδρασης του stress. Η **αδρεναλίνη, η νοραδρεναλίνη και η δοπαμίνη** είναι ορμόνες που επίσης εκκρίνονται σε καταστάσεις stress για την κάλυψη των αυξημένων ενεργειακών αναγκών, και **επιδρούν αρνητικά στον ρυθμό αύξησης των ιχθύων** λόγω της καταβολικής τους δράσης. **Στην αύξηση των ψαριών επιδρά αρνητικά και η μειωμένη δράση των θυρεοειδικών ορμονών**, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αναβολική δράση (Παπουτσόγλου, 1998).

Τα επίπεδα κατώτατων ορίων της μη ιονισμένης αμμωνίας για τα αποτελέσματα στην αύξηση έχουν αναφερθεί για διάφορα είδη: 0,11 mg/L (Schulze-Wiehenbrauk, 1976) και 0.103 mg-N/L (Foster and Smart, 1979) για την **ιριδίζουσα πέστροφα**, 0,06 mg-N/L (Robinette, 1976) και 0,05 mg-N/L (Colt and Tchobanoglous, 1978) για το **γατόψαρο των καναλιών**, 0,066 mg-N/L για τη **γλώσσα *Solea solea*** και 0,1106 mg-N/L για το ***Scophthalmus maximus*** (Alderson, 1979).

1.2.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΜΜΩΝΙΑΣ.

- Υπερτροφία και υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων των βραγχίων, συμπεριλαμβανομένων των βλεννωδών και των κυττάρων χλωριδίου (Lock, Balm, Bonga).
- Μείωση της δραστηριότητας της ATPάσης ($\text{Na}^+\text{-K}^+$) στα βράγχια (Pearson-Le Ruyet et al, 1998).
- Αύξηση των επιπέδων της ολικής αμμωνίας (TAN) στο πλάσμα και μείωση των επιπέδων της T_3 στο αίμα (Pearson-Le Ruyet et al, 1998).
- Μείωση του pH του αίματος εξαιτίας της συσσώρευσης όξινων προϊόντων που προκύπτουν από την καταστολή του κύκλου του κιτρικού οξέος (Sousa and Meade, 1977, από Χώτος και συν, 2001).
- Ανισορροπία στα ισοζύγια του νερού και των μεταλλικών στοιχείων (Lloyd and Orr, 1969, Tomasso et al, 1980, από Χώτος και συν, 2001).
- Αύξηση της ειδικής δραστηριότητας των τρανσαμινασών και δεαμινασών (GOT, GPT) στο συκώτι (Pearson-Le Ruyet et al, 1998).

- Επίδραση στον καρδιακό ρυθμό στο σαλμονοειδές *Salvelinus fontinalis* (Bubien and Meade, 1986 από Χώτος και συν, 2001) και σε σαλμονοειδή (Smart, 1978, by Knoph and Olsen, 1994)
- Αύξηση της δραστηριότητας της ρενίνης στα σαλμονοειδή (Arillo et al, 1981, by Knoph and Olsen, 1994).
- Επίδραση στη λειτουργία των λυσοσωματίων του ήπατος στην **ιριδίζουσα πέστροφα** και στα επίπεδα του ATP στον **κυπρίνο** (Jeney et al, 1992 από Χώτος και συν. 2001).

Ο Smart (1978) διετύπωσε την άποψη ότι ο μηχανισμός τοξικότητας της αμμωνίας στα ψάρια είναι πιθανό να μοιάζει με την ηπατική εγκεφαλοπάθεια των θηλαστικών, κατάσταση κατά την οποία το ήπαρ δεν έχει την ικανότητα να απομακρύνει την αμμωνία από την κυκλοφορία του αίματος μέσω της σύνθεσης ουρίας (Χώτος, Βλάχος, Αβραμίδου, 2001). Αποτέλεσμα της ασθένειας είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της αμμωνίας σε τέτοιο βαθμό, ώστε το ζώο να πέφτει σε ηπατικό κώμα (Zieve, 1966, από Χώτος και συν, 2001). Η μεταβολική αιτία του ηπατικού κώματος είναι η εξάντληση των μορίων ATP στον εγκέφαλο (μόρια υψηλής ενέργειας). Αυτό συμβαίνει γιατί το ακετογλουταρικό οξύ, που είναι ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου του κιτρικού οξέος, χρησιμοποιείται από τον οργανισμό για την απομάκρυνση της αμμωνίας και όχι για την μετατροπή ενέργειας (Shenker et al, 1967, από Χώτος και συν, 2001).

1.2.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΝΙΤΡΩΔΩΝ.

Τα νιτρώδη είναι τοξικά για τους υδρόβιους οργανισμούς μέσα σε ένα εύρος ppm. Ωστόσο υπάρχουν πολλές ενδοειδικές και διαειδικές διακυμάνσεις στις τιμές των LC₅₀ , οι οποίες οφείλονται κυρίως στις διαφορετικές χημικές συνθήκες του νερού (Alcaraz and Espina, 1997). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα των νιτρωδών και σχετίζονται με τη χημική σύνθεση του νερού διαβίωσης των ιχθύων είναι:

- Η συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου. Σήμερα είναι πλέον αποδεκτό από όλους τους ερευνητές ότι τα **ιόντα χλωρίου αναστέλλουν ως ένα βαθμό την τοξικότητα των νιτρωδών**. Οι Crawford και Allen (1977) διατύπωσαν την άποψη ότι τα νιτρώδη σε θαλασσινό νερό προκαλούν 50-100 φορές μικρότερη θνησιμότητα σε σχέση με τη θνησιμότητα που προκαλούν σε γλυκό νερό (από Χώτος και συν, 2001). Οι Rysso and Thurston (1977) πειραματιζόμενοι στην

ιριδίζουσα πέστροφα χρησιμοποίησαν έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριόντων και κατέληξαν ότι η σχέση μεταξύ του 96h-LC₅₀ των νιτρωδών (mg/L) και της συγκέντρωσης των χλωριόντων (mg/L) ήταν γραμμική, της μορφής Y (νιτρώδη) = 0.53 + 0.29X (χλωριόντα). Οι Schwedler και Tucker (1983) βρήκαν ότι η σχέση που συνδέει το ποσοστό της μεθαιμογλοβίνης και το λόγο της συγκέντρωσης νιτρωδών / χλωριόντων ήταν $Y = 7.33 + 78.17 X$. Γενικά η επίδραση των χλωριόντων φαίνεται να είναι καταλυτική στη μείωση της τοξικότητας των νιτρωδών, καθώς όπως φαίνεται 1 mg/L χλωριόντων εξουδετερώνει την τοξική δράση 2 mg/L νιτρωδών (από Χώτος και συν, 2001). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα χλωριόντα μειώνουν την τοξικότητα των νιτρωδών φαίνεται να είναι ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός των νιτρωδών από την ενεργό μεταφορά τους από τα κύτταρα χλωρίου των μεμβρανών των βραγχίων. Η συγκέντρωση του πλάσματος σε νιτρώδη έχει βρεθεί να είναι πολύ μικρότερη στην ιριδίζουσα πέστροφα (Bath and Eddy, 1980), το αμερικάνικο γατόψαρο (Palachek and Tomasso, 1984), στην τιλάπια (Palachek and Tomasso, 1984) και σε πολλά άλλα είδη όταν εκτέθηκαν ταυτόχρονα σε νιτρώδη και χλωριόντα, συγκριτικά με το πλάσμα των ίδιων ειδών που εκτέθηκαν σε νιτρώδη με μικρή ή καθόλου συγκέντρωση χλωριόντων (Χώτος και συν, 2001). Επίσης έχει βρεθεί από πειράματα που έγιναν στην ιριδίζουσα πέστροφα (Wedemeyer and Yasutake, 1978) και στο αμερικάνικο λαβράκι (Mazik et al, 1991, Weirich et al, 1993), ότι τα χλωριόντα σε μορφή χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂) είναι αποτελεσματικότερα από τη μορφή του χλωριούχου νατρίου (NaCl) στην ανταγωνιστική αποτροπή της πρόσληψης νιτρωδών από τα βράγχια (από Χώτος και συν, 2001). Σήμερα η δράση των χλωριόντων στην προστασία των ιχθύων απέναντι στα νιτρώδη είναι τόσο ξεκάθαρα ταυτοποιημένη, που οι σχετικές εργασίες για να είναι έγκυρες πρέπει οπωσδήποτε να αναφέρουν την αλατότητα (ή τη συγκέντρωση των χλωριόντων) στην οποία εκτελούνται (Χώτος και συν, 2001).

- Το pH του νερού. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές σύμφωνα με τις οποίες το pH του νερού διαβίωσης των ιχθύων επηρεάζει την τοξικότητα των νιτρωδών. Η επίδραση του pH στην τοξικότητα των νιτρωδών οφείλεται στα υψηλά επίπεδα της μη ιονισμένης μορφής των νιτρωδών (HNO₂) σε

χαμηλές τιμές του pH σε σχέση με την συνολική ποσότητα των ολικών νιτρωδών (Χώτος και συν, 2001). Οι Wedemeyer και Yasutake (1978) μελέτησαν την επίδραση του παράγοντα αυτού στην τοξική δράση των νιτρωδών και παρατήρησαν ότι η αύξηση της τιμής του pH από 6 σε 8 είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της τοξικότητας κατά 8 φορές σε ψάρια βάρους 5 g και κατά 3 φορές σε άτομα 10g (Παπουτσόγλου, 1997). Όμως σύμφωνα με τη ανασκόπηση των πειραματικών δεδομένων από τους Lewis και Morris (1986) συμπεραίνεται ότι δεν υπάρχει μία καθαρή άποψη για το αν το χαμηλό pH αυξάνει την τοξικότητα των νιτρωδών.

- Το διαλυμένο οξυγόνο και η θερμοκρασία του νερού. Όπως θα αναφερθεί αναλυτικά παρακάτω, η τοξική δράση των νιτρωδών έγκειται στη μείωση της ικανότητας του αίματος να μεταφέρει οξυγόνο στους ιστούς. Έτσι **μειωμένα επίπεδα οξυγόνου ενισχύουν την τοξικότητα των νιτρωδών**. Οι Browser et al (1983) διαπίστωσαν ότι στο **αμερικάνικο γατόψαρο**, το οποίο κανονικά αντέχει σε συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου μικρότερες των 5 mg/L , κατά την έκθεση του σε νιτρώδη η παραπάνω συγκέντρωση οξυγόνου δεν του ήταν αρκετή (από Χώτος και συν, 2001). Η θερμοκρασία από την άλλη πλευρά, βρίσκεται σε άμεση αλληλεξάρτηση με την ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου, καθώς **αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μείωση της ποσότητας του διαλυμένου οξυγόνου, επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό τις αναπνευστικές ανάγκες των ψαριών**. Επίσης σε νερά με χαμηλή θερμοκρασία παρατηρείται χαμηλότερος μεταβολισμός των ψαριών, γεγονός που καθιστά τα νιτρώδη λιγότερο τοξικά. Οι Huey et al (1984) παρατήρησαν ότι γατόψαρα που παρέμειναν για 24 ώρες σε συγκέντρωση νιτρωδών 0,91 mg/L και θερμοκρασία 30 °C, ανέπτυξαν μεθαιμογλοβίνη σε συγκέντρωση σχεδόν διπλάσια από αυτήν που ανέπτυξαν τα ψάρια που διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 10 °C (από Χώτος και συν, 2001). Ωστόσο θα πρέπει να αναφέρουμε ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες επιδρούν αρνητικά στους φυσιολογικούς μηχανισμούς αποτοξίνωσης των ψαριών (Χώτος και συν, 2001).

Τέλος εκτός από τις παραπάνω παραμέτρους που καθορίζουν την χημική κατάσταση του νερού, στην τοξικότητα των νιτρωδών επιδρά και το μέγεθος

των ψαριών. Οι Russo et al (1974) μελετώντας την τοξική δράση των νιτρωδών σε ψάρια διαφόρων μεγεθών (2-235 g) διαπίστωσαν ότι η ευαισθησία των ψαριών στην τοξική αυτή ουσία αυξάνεται με την αύξηση του βάρους (Παπουτσόγλου, 1997). Η παρατήρηση αυτή των παραπάνω ερευνητών συμφωνεί με την διαπίστωση των Smith και Williams (1974), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι τα μικρότερα άτομα της ιριδιζουσας πέστροφας ήταν λιγότερο ευαίσθητα στην τοξική δράση των νιτρωδών σε σχέση με τα μεγαλύτερα άτομα (από Χώτος και συν, 2001).

Για τα είδη των γλυκών θερμών νερών, η μόνη εργασία είναι εκείνη των Palachek και Tomasso (1984), οι οποίοι βρήκαν ότι τα μικρότερα άτομα του είδους *Pimephales promelas* (0,3-0,8 g) ήταν περισσότερο ανθεκτικά στα νιτρώδη από τα μεγαλύτερα (0,9-3,3 g)(από Χώτος και συν, 2001).

1.2.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΝΙΤΡΩΔΩΝ.

Κατά την έκθεση των ψαριών στα νιτρώδη, αυτά διαχέονται από το πλάσμα του αίματος στα ερυθρά αιμοσφαίρια του αίματος, και οξειδώνουν την αιμογλοβίνη σε μεθαιμογλοβίνη, η οποία δεν είναι ικανή να δεσμεύει και να αποδεσμεύει εύκολα το οξυγόνο που μεταφέρεται στους ιστούς με την κυκλοφορία του αίματος (Bodansky, 1951, από Χώτος και συν, 2001). Τα ψάρια στην κατάσταση αυτή χαρακτηρίζονται από μεθαιμογλοβιναιμία, κατά την οποία τα βράγχια και το αίμα τους έχουν καφέ χρωματισμό.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η μεθαιμογλοβίνη σχηματίζεται και αυθόρμητα, αν και πολύ αργά, ακόμα και απουσία νιτρωδών, καθώς το αίμα των ψαριών περιέχει σε κανονική κατάσταση μία μικρή και μετρήσιμη ποσότητα μεθαιμογλοβίνης. Η ποσότητα αυτή ποικίλλει ανάλογα με το είδος και μπορεί να ξεπεράσει σε ποσοστό το 10% σε φυσιολογική κατάσταση. Αν όμως το ποσοστό της μεθαιμογλοβίνης στο αίμα ξεπεράσει το 70-80% της συνολικής αιμογλοβίνης το ψάρι περιέρχεται σε κατάσταση ατονίας και καθώς το ποσοστό πλησιάζει το 100%, τα ψάρια παρουσιάζουν αποπροσανατολισμό και αδυναμία αντίδρασης.

Η ποσότητα της αιμογλοβίνης που απαιτείται για να σκοτώσει ή για να μειώσει την ανάπτυξη των ψαριών, διαφέρει ανάλογα με το είδος και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Σε γενικές γραμμές πάντως, όταν το ποσοστό της μεθαιμογλοβίνης

ξεπεράσει το 50%, τότε θεωρείται απειλή για τα ψάρια (Bowser et al, 1983, από Χώτος και συν, 2001)

Ωστόσο, η κατάσταση αυτή είναι αντιστρέψιμη, αφού υπάρχει η δυνατότητα επαναφοράς της μεθαινογλοβίνης στην αρχική της μορφή, δηλαδή αυτή της αιμογλοβίνης, μέσω της δράσης της ρεδοουκτάσης (ένζυμο που υπάρχει στα ερυθρά αιμοσφαίρια του αίματος των ψαριών) (Huey και Beitinger, 1982, από Χώτος και συν, 2001). Η μετατροπή αυτή συμβαίνει αυθόρμητα και σε γενικές γραμμές το ποσοστό της αιμογλοβίνης επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα στο αίμα, μέσα σε 24-48 ώρες, αν τα ψάρια μεταφερθούν σε νερά ελεύθερα νιτρωδών (Huey et al, 1980, από Χώτος και συν, 2001).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Ο γόνος και των δυο ειδών ιχθύων που χρησιμοποιήθηκαν (τσιπούρα – *Sparus aurata* και λαβράκι – *Dicentrarchus labrax*) μεταφέρθηκε από τον ιχθυογεννητικό σταθμό ΝΗΡΕΑΣ Α.Ε. που βρίσκεται στη Χιλιαδού Ναυπάκτου στο εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών Ιχθύων Θαλάσσιων, Γλυκών και Υφάλμυρων Υδάτων του Τμήματος Ιχθυοκομίας Αλιείας του Τ.Ε.Ι. Μεσολογγίου. Ο γόνος μεταφέρθηκε μέσα σε πλαστικές φιάλες Nalgin με συνεχόμενη παροχή αέρα από ειδικά μοτέρ που λειτουργούν με μπαταρία (Σχήμα 2.1). Τα λαβράκια είχαν μέσο βάρος 0,25 g και μέσο μήκος 3,3 cm, ενώ οι τσιπούρες είχαν μέσο βάρος 0,09 g και μέσο μήκος 1,92 cm. Τα νεκρά και ετοιμοθάνατα λόγω stress ψάρια απομακρύνθηκαν αμέσως από τις φιάλες, ενώ τα υπόλοιπα τοποθετήθηκαν για εγκλιματισμό.



Σχήμα 2.1. Μεταφορά του γόνου της τσιπούρας και του λαβρακιού από τον ιχθυογεννητικό σταθμό στο εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών Ιχθύων Θαλάσσιων, Γλυκών και Υφάλμυρων Υδάτων.

2.2 ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ

Ο γόνος και των δύο ειδών αμέσως μετά την άφιξή του στο εργαστήριο τοποθετήθηκε σε πλαστικά ενυδρεία χωρητικότητας 20 L (Σχήμα 2.2).



Σχήμα 2.2. Εισαγωγή του γόνου σε πλαστικά ενυδρεία 20 λίτρων με νερό προερχόμενο από τις δεξαμενές του ιχθυογεννητικού σταθμού.

Πρέπει να αναφερθεί ότι το νερό που προστέθηκε στα πλαστικά αυτά ενυδρεία κατά το πρώτο 24ώρο του εγκλιματισμού του γόνου, ήταν το νερό το οποίο περιείχαν οι φιάλες μεταφοράς από τον ιχθυογεννητικό σταθμό. Ο λόγος για τον οποίο προτιμήθηκε τα ψάρια να παραμείνουν στο ίδιο νερό που περιείχαν οι φιάλες μεταφοράς τους για το πρώτο 24ώρο, ήταν η αποφυγή πρόκλησης επιπλέον πίεσης (stress) στα ψάρια, λόγω της μεταβολής των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού, όπως η θερμοκρασία, η αλατότητα και το pH. Στη συνέχεια μέσα στα ενυδρεία προστέθηκε σκόνη οξυτετρακυκλίνης με συγκεκριμένη δοσολογία για την αποφυγή βακτηριακών προσβολών των ιχθύων λόγω stress ιχθυοφόρτισης. Η δοσολογία ήταν 10 g σκόνης οξυτετρακυκλίνης για κάθε 40 λίτρα και υψηλής ιχθυοφόρτισης. Η δοσολογία ήταν 10 g σκόνης οξυτετρακυκλίνης για κάθε 40 λίτρα νερού.



Σχήμα 2.3. Εισαγωγή της σκόνης της οξυτετρακυκλίνης στα πλαστικά ενυδρεία. Διακρίνεται ο κίτρινος χρωματισμός του νερού εξαιτίας του κίτρινου χρώματος της σκόνης.

Στα ενυδρεία ελεγχόταν η παροχή αέρα να παραμένει πάντα πάνω από το 80% του κορεσμού και η θερμοκρασία ακολουθούσε τη θερμοκρασία του δωματίου, ενώ η φωτοπερίοδος ήταν η φυσική. Τα «μπάνια» με οξυτετρακυκλίνη είχαν διάρκεια 24 ωρών και τα αποτελέσματά τους ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητικά αφού σημειώθηκε πολύ μικρό ποσοστό θνησιμότητας εξαιτίας της μεταφοράς.

Μετά τη διέλευση των 24 ωρών, τα ψάρια μεταφέρθηκαν για εγκλιματισμό 15 ημερών. Τα λαβράκια μεταφέρθηκαν σε δυο κυλινδρικές δεξαμενές οι οποίες

αποτελούσαν τμήμα κλειστού κυκλώματος. Η αλατότητα στις δεξαμενές παρέμενε σταθερά στο 19 ‰, το pH παρέμενε 7,4 και η θερμοκρασία ήταν αυτή του περιβάλλοντος. Ο αερισμός των δεξαμενών πραγματοποιούνταν από ένα κεντρικό σύστημα παροχής αέρα μέσω σωλήνων με ρυθμιζόμενη παροχή και παρέμενε πάντα πάνω από το 80% του επιπέδου κορεσμού (Σχήμα 2.4)



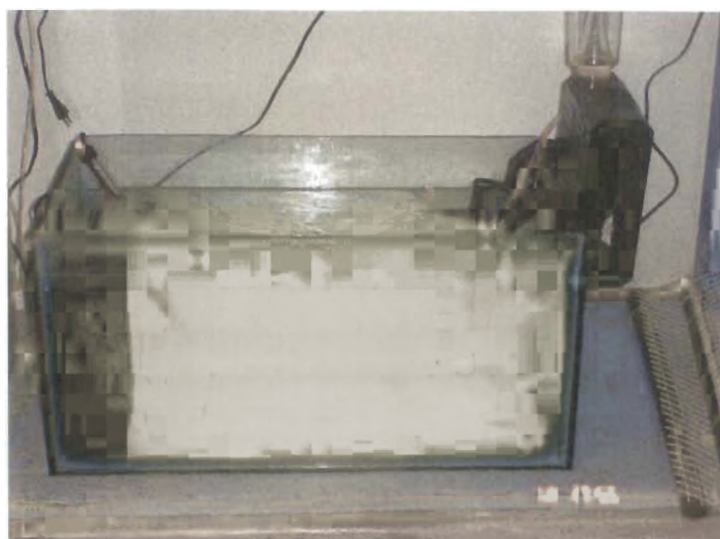
Σχήμα 2.4. Εισαγωγή του γόνου του λαβρακιού σε κυλινδρικές δεξαμενές κλειστού κυκλώματος, για εγκλιματισμό 15 ημερών.

Οι τσιπούρες μεταφέρθηκαν για εγκλιματισμό σε δύο γυάλινα ενυδρεία. Το πρώτο ενυδρείο είχε συνολική χωρητικότητα 320 λίτρα, από τα οποία τα 73 λίτρα χωρίζονταν από το υπόλοιπο ενυδρείο με γυάλινο χώρισμα, έτσι ώστε να τοποθετηθεί εκεί βιολογικό φίλτρο πυθμένα (Σχήμα 2.5). Στα υπόλοιπα 247 λίτρα τοποθετήθηκε γόνος τσιπούρας με πυκνότητα ένα άτομο ανά λίτρο. Στο ενυδρείο τοποθετήθηκε ακόμα κυκλοφορητής νερού, ο οποίος μετέφερε το νερό από το τμήμα του βιολογικού φίλτρου στο υπόλοιπο ενυδρείο, καθώς και ένα εξωτερικό φίλτρο skimmer του οποίου η λειτουργία συνίσταται στη διάσπαση των αιωρούμενων οργανικών σωματιδίων (και άρα στη διατήρηση της αμμωνίας και των νιτρικών ιόντων σε χαμηλά ως μηδενικά επίπεδα) και είναι υποβοηθητική της λειτουργίας του φίλτρου, το οποίο όμως σε καμία περίπτωση δεν αντικαθιστά. Η θερμοκρασία στο ενυδρείο αυτό δεν ρυθμιζόταν με ειδικό θερμοστάτη, αλλά ακολουθούσε τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Το pH ελεγχόταν καθημερινά και κυμαινόταν από 7,3 ως 7,6.



Σχήμα 2.5. Ενυδρείο εγκλιματισμού τσιπούρας, στο οποίο διακρίνεται το βιολογικό φίλτρο πυθμένα, ο κυκλοφορητής νερού και το φίλτρο skimmer.

Το δεύτερο ενυδρείο στο οποίο παρέμειναν οι τσιπούρες για εγκλιματισμό είχε χωρητικότητα 98 λίτρα και ήταν εξοπλισμένο με εσωτερικό βιολογικό φίλτρο προσκολλούμενο στη μία πλευρά του ενυδρείου, με εξωτερικό φίλτρο skimmer τύπου τυμπάνου για την απομάκρυνση των αιωρούμενων σωματιδίων, καθώς και με ειδικό πλαστικό θερμοστάτη, ο οποίος διατηρούσε τη θερμοκρασία του νερού σταθερή στους 20 °C (Σχήμα 2.6) .Το pH του νερού κυμαινόταν από 7,4 ως 7,6. Τα ψάρια παρέμεναν στο ενυδρείο με πυκνότητα 1 άτομο ανά λίτρο.



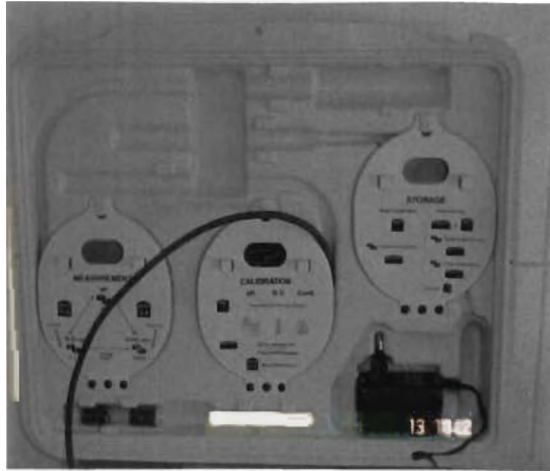
Σχήμα 2.6. Ενυδρείο εγκλιματισμού τσιπούρας, στο οποίο διακρίνονται το εσωτερικό φίλτρο και το εξωτερικό φίλτρο skimmer τύπου τυμπάνου.

Και στα δύο ενυδρεία ο αερισμός πραγματοποιούταν μέσω κεντρικού συστήματος παροχής αέρα και παρέμενε πάντα σε επίπεδα πάνω από το 80% του επιπέδου του κορεσμού. Η αλατότητα των ενυδρείων ήταν 20‰, η οποία επιτυγχανόταν με διάλυση συνθετικού αλατιού σε γλυκό νερό, παρέμενε σε ειδική δεξαμενή 3-4 ημέρες για πλήρη διάλυση, ενώ ταυτόχρονα το νερό αποστειρωνόταν με όζον (1,5 mg/L O₃).

Τόσο στα ενυδρεία εγκλιματισμού των τσιπούρων όσο και στις δεξαμενές εγκλιματισμού των λαβρακιών, γινόταν καθημερινός έλεγχος των επιπέδων της αμμωνίας (TAN) και των νιτρωδών ιόντων (NO₂⁻), ώστε να παραμένουν σε μηδενικά επίπεδα, ενώ ταυτόχρονα ελέγχονταν και τα επίπεδα των νιτρικών ιόντων (NO₃⁻), ώστε να παραμένουν σε σχετικά υψηλά επίπεδα. Για το σκοπό αυτό, ημερησίως πραγματοποιούταν σιφωνισμός των ενυδρείων και των δεξαμενών για την απομάκρυνση των περιττωμάτων και των υπολειμμάτων της τροφής. Επίσης καθημερινά ελέγχονταν τα επίπεδα οξυγόνου, η αλατότητα, η στάθμη και το pH του νερού και όπου χρειαζόταν γίνονταν οι κατάλληλες ρυθμίσεις. Η μέτρηση του pH πραγματοποιούταν με ειδικό μετρητή pH τύπου Multiline P₄ (Σχήμα 2.7), ενώ η μέτρηση του επιπέδου του οξυγόνου πραγματοποιούνταν με το ίδιο όργανο, αλλά με διαφορετικό ηλεκτρόδιο (Σχήμα 2.8). Η αλατότητα μετρούταν με ειδικό θερμοσαλινόμετρο (Σχήμα 2.9), ενώ τα επίπεδα της αμμωνίας, των νιτρωδών και νιτρικών ιόντων μετρούνταν με ειδικά τεστ kit (Σχήμα 2.10).



Σχήμα 2.7. Ειδικό όργανο μέτρησης pH και θερμοκρασίας.



Σχήμα 2.8. Το ίδιο όργανο με αλλαγή ηλεκτροδίου μετρούσε το διαλυμένο οξυγόνο στα ενυδρεία εγκλιματισμού, αλλά και στα πειραματικά ενυδρεία.



Σχήμα 2.9. Ειδικό θερμοσαλινόμετρο για τη μέτρηση της αλατότητας του νερού.



Σχήμα 2.10. Τεστ kit για τη μέτρηση των επιπέδων της αμμωνίας, των νιτρωδών και νιτρικών ιόντων στο νερό των ενυδρείων.

Τα ψάρια μεταφέρονταν στα ενυδρεία με απόχες κατασκευασμένες από μεταξωτό δίχτυ, και όλοι οι χειρισμοί διεξάγονταν με ιδιαίτερη προσοχή, ώστε το προκαλούμενο από τους χειρισμούς stress να είναι όσο το δυνατό μικρότερο και χωρίς μεγάλης έκτασης δυσμενείς συνέπειες. Κατά τις 15 ημέρες του εγκλιματισμού τα ψάρια τρέφονταν 3-5 φορές την ημέρα με πάστα αναμεμιγμένη με οξυτετρακυκλίνη, η οποία διατηρούταν σε ειδική συσκευασία στο ψυγείο στους 4 °C, καθώς και με κατεψυγμένο σκουλήκι (πολύχαιτοι) και *artemia* και παρακολουθούνταν κατά τη διάρκεια των γευμάτων, καθώς η ανορεξία και η μη λήψη τροφής αποτελούσαν ένδειξη μη υγιών ατόμων. Τα υγιή ψάρια εμφάνιζαν έντονο ασημί χρωματισμό και ήταν ιδιαίτερα κινητικά, ενώ τα άρρωστα και ετοιμοθάνατα ψάρια εκτός από την ανορεξία χαρακτηρίζονταν από σκούρο χρωματισμό και σχετική ακινησία. Τα ψάρια αυτά απομακρύνονταν άμεσα από τις δεξαμενές και τα ενυδρεία. Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι στα ενυδρεία εγκλιματισμού των τσιπούρων παρατηρήθηκαν μικρής έκτασης φαινόμενα καννιβαλισμού, τα οποία θεωρούνται αναμενόμενα κατά τα πρώτα στάδια ζωής του είδους *Sparus aurata* (Σχήμα 2.11).



Σχήμα 2.11. Φαινόμενα καννιβαλισμού κατά τη διάρκεια εγκλιματισμού του γόνου της τσιπούρας.

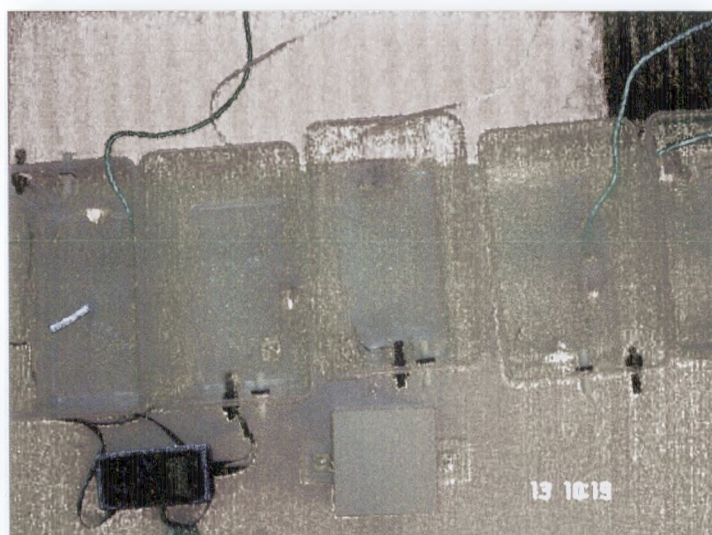
2.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η πειραματική διαδικασία χωρίζεται σε δύο τμήματα: το πρώτο αφορά στην εύρεση των ορίων αντοχής του γόνου της τσιπούρας και του λαβρακιού στην αμμωνία δια της μεταφοράς του γόνου σε κλιμακούμενες συγκεντρώσεις της, και το δεύτερο αφορά στην εύρεση με παρόμοιο τρόπο των ορίων αντοχής του γόνου της τσιπούρας και του λαβρακιού στα νιτρώδη ιόντα , με τελικό σημείο και των δύο πειραμάτων το θάνατο

των ψαριών (LC_{50}). Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζεται η συγκέντρωση της αμμωνίας και των νιτρωδών που επιφέρει το θάνατο στο 50% του πληθυσμού σε διάρκεια 24 ωρών ($24h-LC_{50}$). Και στα δύο πειράματα χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο εργασιών και για κάθε μεταβολίτη χρησιμοποιήθηκαν 4 αντίγραφα.

Τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα προέρχονταν από το προαναφερθέν εγκλιματισμένο στοκ και μεταφέρονταν από τους χώρους εγκλιματισμού σε πλαστικά ενυδρεία των 10 λίτρων τα οποία περιείχαν από την προηγούμενη ημέρα 3 λίτρα νερού αλατότητας 10‰. Το νερό των ενυδρείων του πειράματος είχε ελεγχθεί για την απουσία ανιχνεύσιμης ποσότητας αμμωνίας και νιτρωδών και είχαν εξοπλιστεί με παροχή αέρα από κεντρικό σύστημα σωλήνων παροχής αέρα κατά τέτοιο τρόπο ώστε το οξυγόνο του νερού να είναι πάντα πάνω από το 80% του κορεσμού.

Τα ψάρια μεταφέρονταν στα πειραματικά ενυδρεία με απόχες (κατασκευασμένες από μεταξωτό δίχτυ) και σε κάθε ενυδρείο τοποθετούνταν 10 άτομα για την αποφυγή συνωστισμού. Το pH και η θερμοκρασία του νερού μετρούνταν τόσο κατά την έναρξη όσο και κατά το τέλος των πειραμάτων. Τα ψάρια αμέσως μετά τη μεταφορά τους στα πειραματικά ενυδρεία αφήνονταν να ηρεμήσουν για 1-2 ώρες και κατόπιν στα ενυδρεία προστίθονταν οι μεταβολίτες. Πρέπει να αναφερθεί ότι τα ψάρια που χρησιμοποιούνταν στα πειράματα είχαν νηστέψει για 24 ώρες για την αποφυγή περιττωμάτων τα οποία θα μετέβαλλαν τη συγκέντρωση της αμμωνίας στα ενυδρεία (Σχήμα 2.12).



Σχήμα 2.12. Εισαγωγή των ιχθύων στα πειραματικά ενυδρεία και μέτρηση της τιμής του pH και της θερμοκρασίας του νερού.

Οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών είχαν προετοιμαστεί από την προηγούμενη ημέρα και βρίσκονταν σε μορφή διαλύματος. Για τον σκοπό αυτό πριν την έναρξη των πειραμάτων ζυγιζόταν η εκάστοτε επιθυμητή ποσότητα NH_4Cl ή NaNO_2 (ανάλογα με το πείραμα) σε ζυγό ακριβείας κλειστού τύπου (Σχήμα 2.13) και κατόπιν διαλυόταν σε συγκεκριμένο όγκο απιονισμένου νερού ανάλογα με την ποσότητα και την επιθυμητή συγκέντρωση του χρειαζόμενου διαλύματος. Το διάλυμα που κατασκευαζόταν (συνήθως συγκέντρωσης 10 w/v) αφού παρέμενε σε μαγνητικό αναδευτήρα για 20-30 λεπτά της ώρας για την πλήρη διάλυση της σκόνης, στη συνέχεια στοκαριζόταν και διατηρούταν στο ψυγείο.

Η χρήση διαλύματος αντί σκόνης των μεταβολιτών προτιμήθηκε για δύο λόγους: α) για την αποφυγή τυχαίων σφαλμάτων κατά τη ζύγιση. Ο ανθρώπινος παράγοντας πάντα έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία σφαλμάτων σε μία πειραματική διαδικασία, αλλά με τον τρόπο αυτό το σφάλμα μετετρέπη από τυχαίο σε συστηματικό και β) γιατί το διάλυμα διαλύεται περισσότερο εύκολα από τη σκόνη σε όλο τον όγκο του ενυδρείου, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση των μεταβολιτών να είναι ο ίδιος σε όλο τον όγκο του νερού, κάτι το οποίο δεν μπορούσε να εξασφαλιστεί 100% με τη σκόνη αφού η ανάδευση του νερού για την διάλυση και μεταφορά της σκόνης θα αποτελούσε παράγοντα stress για τα ψάρια που βρίσκονταν ήδη μέσα στα ενυδρεία. Οι εκάστοτε συγκεντρώσεις του διαλύματος λαμβάνονταν από το στοκ είτε με σύριγγες του 1 ή 0,5 ml (στη περίπτωση πολύ μικρών συγκεντρώσεων), είτε με ογκομετρικό κύλινδρο των 10 ml (στην περίπτωση των μεγαλύτερων συγκεντρώσεων).



Σχήμα 2.13. Ζυγός ακριβείας για την μέτρηση της απαιτούμενης ποσότητας αλάτων.

Μετά την εισαγωγή των μεταβολιτών στα πειραματικά ενυδρεία η φυσιολογική κατάσταση και η συμπεριφορά των ψαριών παρακολουθούνταν συνεχώς. Τα ενοχλημένα ψάρια παρουσίαζαν σκούρο χρωματισμό και ακινησία ενώ λίγο πριν το θάνατο εμφάνιζαν σπασμούς και κατατονία. Οι πρώτοι θάνατοι παρατηρούνταν συνήθως μετά τη διέλευση 4-6 ωρών και τα νεκρά ή ετοιμοθάνατα ψάρια απομακρύνονταν άμεσα από τα ενυδρεία με τη χρήση μακριάς πλαστικής λαβίδας και έτσι δεν συνιστούσαν παράγοντα ρύπανσης του νερού.

Κατά το τέλος του 24ωρου πειράματος ελέγχονταν ξανά το pH και η θερμοκρασία του νερού. Τα ζωντανά ψάρια μεταφέρονταν πολύ προσεκτικά σε ενυδρεία ή δεξαμενές ανάρρωσης όπου τους παρείχετο πολύ οξυγόνο και τροφή, ενώ τα ψάρια αυτά δεν ξαναχρησιμοποιούνταν σε άλλα πειράματα.

Οι συνθήκες των πειραμάτων παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1. Βασικά στοιχεία της πειραματικής διαδικασίας.

| ΕΙΔΟΣ | ΜΕΣΟ ΒΑΡΟΣ (g) | ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ /ΔΟΧΕΙΟ | ΟΓΚΟΣ ΝΕΡΟΥ (L/ΕΝΥΔΡΕΙΟ) | pH | T (°C) | S (ppt) |
|-----------------------------|----------------------|------------------------------|--------------------------------|-----|-----------|------------|
| NH₄Cl | | | | | | |
| <i>Dicentrarchus labrax</i> | 0,25 | 10 | 3 | 8.3 | 24 | 10 |
| <i>Sparus aurata</i> | 0,09 | 10 | 3 | 8.3 | 25 | 10 |
| NaNO₂ | | | | | | |
| <i>Dicentrarchus labrax</i> | 0,24 | 10 | 3 | 8.2 | 11 | 10 |
| <i>Sparus aurata</i> | 0,09 | 10 | 3 | 8.4 | 24.5 | 10 |

2.4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

Οι τιμές των LC₅₀ καθώς και το τυπικό τους σφάλμα υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των probit (Wardlaw, 1989). Η τιμή του LC₅₀

υπολογίστηκε με αντικατάσταση της τιμής 5 για τα probit της θνησιμότητας στις εξισώσεις παλινδρόμησης probit της θνησιμότητας – μεταβολίτη, οι οποίες αναγράφονται ενσωματωμένες στις αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις των σχημάτων 3.1.1, 3.1.2, 3.2.1, 3.2.2.

Στη συνέχεια υπολογίστηκαν τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης των LC_{50} , χρησιμοποιώντας τον τύπο :

$$LC_{50} (95\% C.L.) = LC_{50} \pm 1.96 [SE(LC_{50})].$$

Τα τυπικά σφάλματα (SE) των LC_{50} υπολογίστηκαν με χρήση του τύπου :

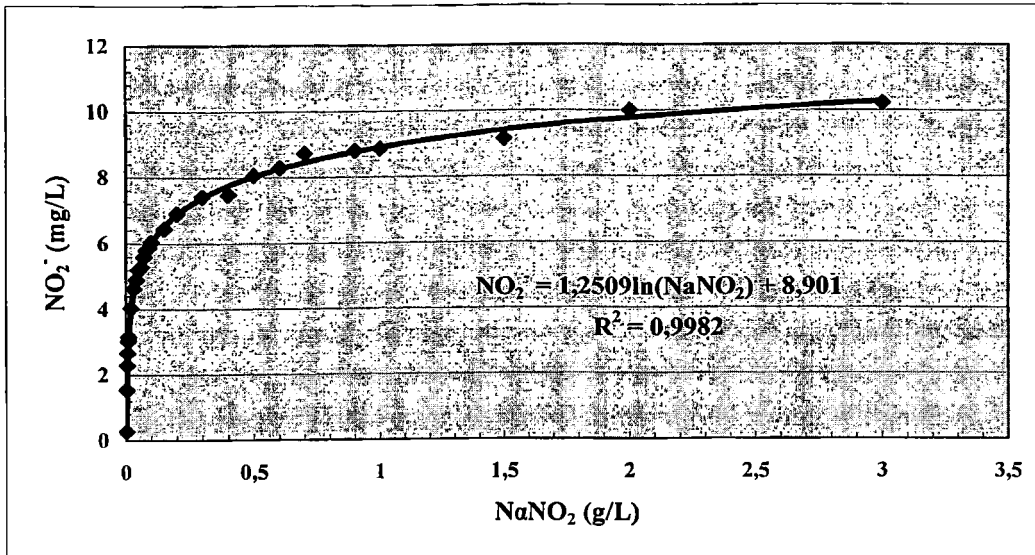
$$SE (LC_{50}) = \frac{1}{b\sqrt{pn\bar{w}}} \quad \text{όπου :}$$

- b είναι η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης probit θνησιμότητας – μεταβολίτη.
- p είναι ο αριθμός των συγκεντρώσεων του κάθε μεταβολίτη που χρησιμοποιήθηκαν (συμπεριλαμβανομένων και των συγκεντρώσεων που δεν χρησιμοποιήθηκαν στα διαγράμματα probit θνησιμότητας – μεταβολίτη). Έτσι, ο αριθμός των συγκεντρώσεων αυτών είναι 12 για το λαβράκι (*D. labrax*) και την τσιπούρα (*S. aurata*) όσο αφορά στα νιτρώδη (NO_2^-) και 13 για το λαβράκι (*D. labrax*) και 10 για την τσιπούρα (*S. aurata*) όσο αφορά στην αμμωνία (NH_3).
- n είναι ο αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε μεταβολίτη και είναι ίσος με 10 άτομα και για τα δύο είδη, όσο αφορά και στους δύο μεταβολίτες.
- \bar{w} είναι η μέση τιμή των συντελεστών βαρύτητας. Οι συντελεστές βαρύτητας προκύπτουν από τους πίνακες του παραρτήματος και η μέση τιμή τους αναγράφεται στους πίνακες ανάλυσης των probit.

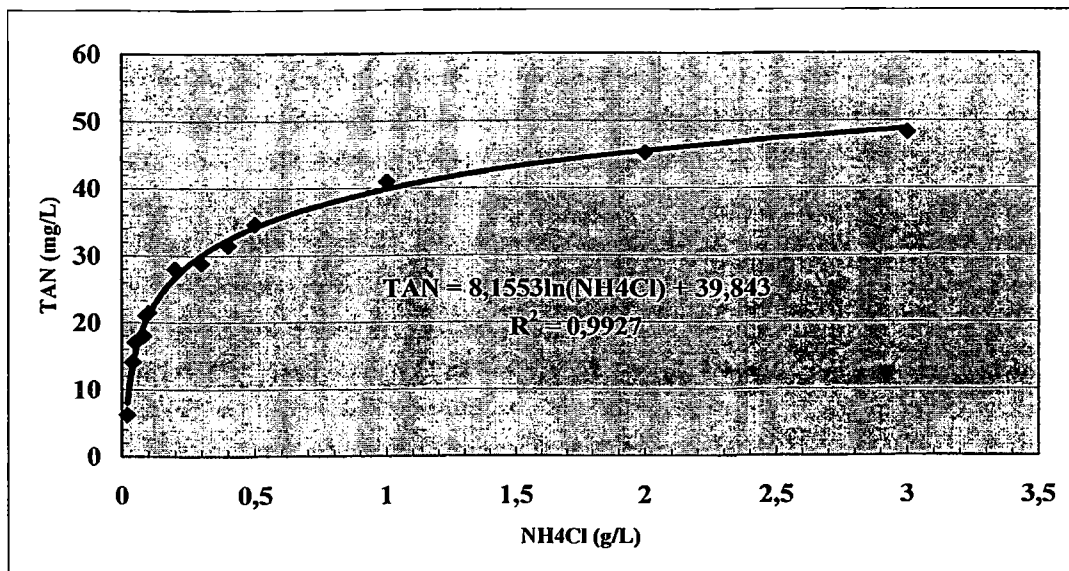
2.5. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ.

Η εκάστοτε επιθυμητή συγκέντρωση ολικής αμμωνίας (TAN) ή νιτρωδών (NO_2^-) δεν μπορούσε εξαρχής να επιτευχθεί επακριβώς, παρά μόνο μέσω της διάλυσης των χημικά καθαρών αλάτων χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl) και νιτρώδους νατρίου ($NaNO_2$) αντίστοιχα. Ανάλογα με τη διαλυόμενη ποσότητα τους στο νερό προέκυπτε και μια ορισμένη μετρήσιμη ποσότητα αμμωνίας ή νιτρωδών. Από τα πρώτα προκαταρκτικά πειράματα καθορίστηκαν οι εξισώσεις που συνδέουν την ποσότητα των διαλυμένων αλάτων και της αμμωνίας ή των νιτρωδών που προκύπτουν (Σχήματα 2.5.1 και 2.5.2)

Κατόπιν αυτού, μπορούσε να σχεδιαστεί η κλιμάκωση των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων στα πειράματα δια της ζύγισης της απαιτούμενης ποσότητας των αλάτων.



Σχήμα 2.5.1 . Καμπύλη και εξίσωση της σχέσης του διαλυμένου NaNO₂ και της προκύπτουσας συγκέντρωσης NO₂⁻.



Σχήμα 2.5.2 .Καμπύλη και εξίσωση της σχέσης του διαλυμένου NH₄Cl και της προκύπτουσας συγκέντρωσης ολικής αμμωνίας (TAN).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.

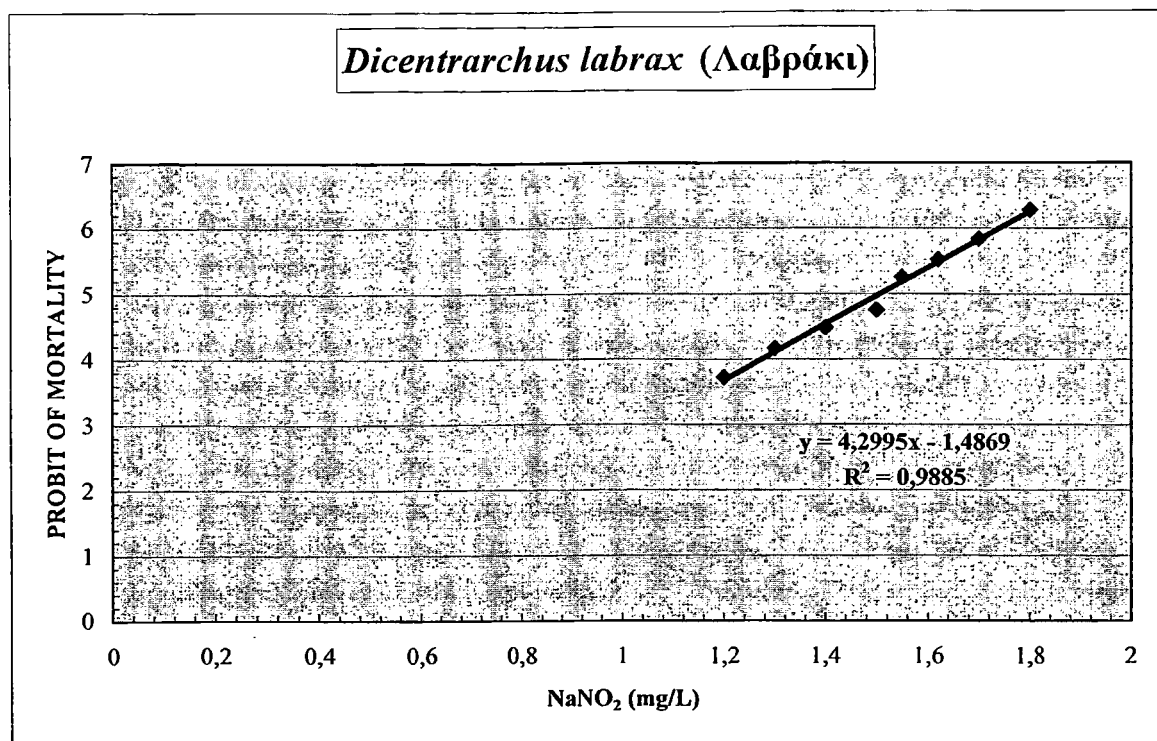
3.1. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ *DICENTRARCHUS LABRAX* (ΛΑΒΡΑΚΙ) ΓΙΑ ΤΑ ΝΙΤΡΩΔΗ.

Η διεξαγωγή, η παρουσίαση και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων, όπως έχει ήδη αναφερθεί, βασίστηκαν στη μέθοδο των probit (Wardlaw, 1989).

Από την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων και την ανάλυση τους με τη μέθοδο των probit , προέκυψε ο πίνακας 3.1 , στον οποίο παρουσιάζονται αναλυτικά οι διάφορες συγκεντρώσεις άλατος NaNO_2 που χρησιμοποιήθηκαν, οι αναλογίες και τα ποσοστά επί τοις εκατό της θνησιμότητας που επέφεραν οι συγκεντρώσεις αυτές, τα probit της παρατηρούμενης θνησιμότητας, καθώς και τα αναμενόμενα probit, και τέλος οι συντελεστές βαρύτητας w καθώς και το σύνολό τους Σw και η μέση τιμή τους \bar{w} .

Πίνακας 3.1. Ανάλυση probit για τη θνησιμότητα στις διάφορες συγκεντρώσεις του NaNO_2 στο γόνιο *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι).

| ΑΝΑΛΥΣΗ PROBIT ΓΙΑ ΤΟ ΛΑΒΡΑΚΙ (NaNO_2) | | | | | |
|---|--------------------------------------|---------------|--|-----------------------|------------------|
| ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ NaNO_2 (g/L) | % ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ | PROBIT ΠΑΡΑΤΗΡΟΥΜΕΝΗΣ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ | ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟ PROBIT | w |
| 0/10 | 1,0 | 0 | | 2,81 | 0,09 |
| 0/10 | 1,1 | 0 | | 3,24 | 0,19 |
| 1/10 | 1,2 | 10 | 3,72 | 3,67 | 0,32 |
| 2/10 | 1,3 | 20 | 4,16 | 4,10 | 0,47 |
| 3/10 | 1,4 | 30 | 4,48 | 4,53 | 0,59 |
| 4/10 | 1,5 | 40 | 4,75 | 4,96 | 0,64 |
| 6/10 | 1,55 | 60 | 5,25 | 5,18 | 0,63 |
| 7/10 | 1,62 | 70 | 5,52 | 5,48 | 0,59 |
| 8/10 | 1,7 | 80 | 5,84 | 5,82 | 0,49 |
| 9/10 | 1,8 | 90 | 6,28 | 6,25 | 0,35 |
| 10/10 | 1,9 | 100 | | 6,68 | 0,22 |
| 10/10 | 2,0 | 100 | | 7,11 | 0,11 |
| | | | | $\Sigma w = 4,69$ | $\bar{w} = 0,39$ |



Σχήμα 3.1. Ευθεία και εξίσωση probit για τη θνησιμότητα στις διάφορες συγκεντρώσεις του NaNO₂ στο γόνο του *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι) με βάση τις τιμές του πίνακα 3.1 .

Τα probit της παρατηρούμενης θνησιμότητας υπολογίζονται από τον πίνακα 3.5 (παράρτημα), ενώ τα αναμενόμενα probit υπολογίζονται από την ευθεία παλινδρόμησης probit της θνησιμότητας-συγκέντρωση NaNO₂ , η οποία αναγράφεται ενσωματωμένη στο σχήμα 3.1 ($y = 4,2995x - 1,4869$), με αντικατάσταση στη θέση του αγνώστου x την καθεμία από τις συγκεντρώσεις του NaNO₂ που αναγράφονται στον πίνακα 3.1. Με βάση τα προηγούμενα προκύπτουν οι παρακάτω τιμές των αναμενόμενων probit :

1. $y = 4,2995 * 1,2 - 1,4869 \rightarrow y = 3,67$
2. $y = 4,2995 * 1,3 - 1,4869 \rightarrow y = 4,10$
3. $y = 4,2995 * 1,4 - 1,4869 \rightarrow y = 4,53$
4. $y = 4,2995 * 1,5 - 1,4869 \rightarrow y = 4,96$
5. $y = 4,2995 * 1,55 - 1,4869 \rightarrow y = 5,18$
6. $y = 4,2995 * 1,62 - 1,4869 \rightarrow y = 5,48$
7. $y = 4,2995 * 1,7 - 1,4869 \rightarrow y = 5,82$

$$8. y = 4,2995 * 1,8 - 1,4869 \rightarrow y = 6,25$$

$$9. y = 4,2995 * 1,9 - 1,4869 \rightarrow y = 6,68$$

$$10. y = 4,2995 * 2,0 - 1,4869 \rightarrow y = 7,11$$

Η εύρεση των συντελεστών βαρύτητας w πραγματοποιείται από τον πίνακα 3.6 του παραρτήματος, με βάση τις προκύπτουσες τιμές των αναμενόμενων probit.

Κατόπιν, για να υπολογίσουμε το 24h-LC₅₀ (δηλαδή τη συγκέντρωση του NaNO₂ που θανατώνει το 50% του πληθυσμού σε διάρκεια 24 ωρών), αντικαθιστούμε την τιμή 5 στο y της ευθείας παλινδρόμησης. Έτσι προκύπτει:

$$y = 4,2995x - 1,4869$$

$$5 = 4,2995x - 1,4869$$

$$4,2995x = 6,4869$$

$$x = 6,4869 / 4,2995$$

$$x = 1,509$$

Άρα, 24h-LC₅₀ NaNO₂ = 2,21 g/L

Για να βρούμε το 24h-LC₅₀ των νιτρωδών που προκύπτουν από τη διάλυση στο νερό του NaNO₂ χρησιμοποιούμε την εξίσωση που αναγράφεται ενσωματωμένη στο σχήμα 2.5.1 : NO₂⁻ (mg/L) = 1,2509 [ln (g/L NaNO₂)] + 8,901. Έτσι έχουμε :

$$24\text{h-LC}_{50} \text{ NO}_2^- \text{ (mg/L)} = 1.2509 \ln 2.21 + 8.901 = 9.89$$

Άρα προκύπτει ότι **24h-LC₅₀ NO₂⁻ = 9,89 mg/L**

Εν συνεχεία υπολογίστηκαν τα 95% όρια εμπιστοσύνης ($\pm 95\%$ C.L.) του 24h-LC₅₀

με χρήση του τύπου $SE (LC_{50}) = \frac{1}{b\sqrt{pnw}}$ όπου :

- b είναι η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης του σχήματος 3.1, με τιμή 4,2995
- p είναι ο αριθμός των συγκεντρώσεων του NaNO₂ που χρησιμοποιήθηκαν (12)
- n είναι ο αριθμός των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε συγκέντρωση (10)

- και \bar{w} είναι η μέση τιμή των συντελεστών βαρύτητας (=0,39 όπως προκύπτει και φαίνεται στον πίνακα 3.1).

Με αντικατάσταση των τιμών αυτών στον παραπάνω τύπο προκύπτει ότι $SE(LC_{50}) = 0,034$. Πολλαπλασιάζοντας το αποτέλεσμα αυτό με 1,96 προκύπτει ότι

$$\boxed{24h-LC_{50} (\pm 95\% C.L.) = 2,21 \pm 0,067 \text{ (g/L NaNO}_2\text{)}}$$

3.2. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ *DICENTRARCHUS LABRAX* (ΛΑΒΡΑΚΙ) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΜΜΩΝΙΑ.

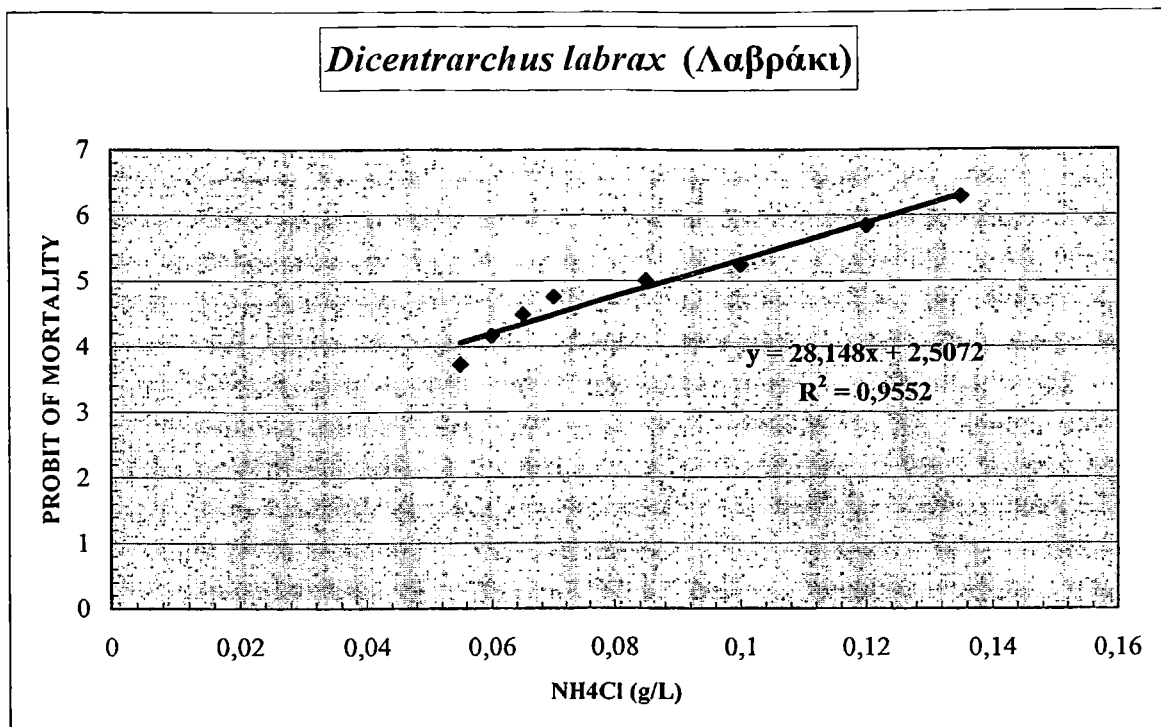
Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση των νιτρωδών, τα πειραματικά δεδομένα επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν με τη μέθοδο των probit. Έτσι προέκυψε ο πίνακας 3.2, στον οποίο και πάλι παρουσιάζονται αναλυτικά οι διάφορες συγκεντρώσεις άλατος που χρησιμοποιήθηκαν, οι αναλογίες και τα ποσοστά επί τοις εκατό της θνησιμότητας που επέφεραν οι συγκεντρώσεις αυτές, τα παρατηρούμενα και τα αναμενόμενα probit και τέλος οι συντελεστές βαρύτητας w , καθώς και το σύνολο τους Σw και η μέση τιμή τους \bar{w} .

Τα probit της παρατηρούμενης θνησιμότητας, τα αναμενόμενα probit, οι συντελεστές βαρύτητας, καθώς και η μέση τιμή τους και το σύνολο τους υπολογίζονται με τον ίδιο τρόπο που υπολογίστηκαν και στην προηγούμενη περίπτωση.

Για τον υπολογισμό των αναμενόμενων probit χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης του αναγράφεται ενσωματωμένη στο σχήμα 3.2. και προέκυψαν οι τιμές που αναγράφονται στον πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2. Ανάλυση probit για την θνησιμότητα στις διάφορες συγκεντρώσεις του NH_4Cl στο γόνο του *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι).

| ΑΝΑΛΥΣΗ PROBIT ΓΙΑ ΤΟ ΛΑΒΡΑΚΙ (NH_4Cl). | | | | | |
|---|---|---------------|--|-----------------------|------|
| ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ NH_4Cl (g/L) | % ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ | PROBIT ΠΑΡΑΤΗΡΟΥΜΕΝΗΣ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ | ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟ PROBIT | W |
| 0/10 | 0,045 | 0 | | 3,77 | 0,35 |
| 0/10 | 0,050 | 0 | | 3,91 | 0,40 |
| 1/10 | 0,055 | 10 | 3,72 | 4,05 | 0,45 |
| 2/10 | 0,060 | 20 | 4,16 | 4,20 | 0,50 |
| 3/10 | 0,065 | 30 | 4,48 | 4,34 | 0,54 |
| 4/10 | 0,070 | 40 | 4,75 | 4,48 | 0,57 |
| 5/10 | 0,085 | 50 | 5,0 | 4,90 | 0,63 |
| 6/10 | 0,100 | 60 | 5,25 | 5,32 | 0,61 |
| 8/10 | 0,120 | 80 | 5,84 | 5,88 | 0,49 |
| 9/10 | 0,135 | 90 | 6,28 | 6,31 | 0,34 |
| 10/10 | 0,150 | 100 | | 6,73 | 0,19 |
| 10/10 | 0,155 | 100 | | 6,87 | 0,17 |
| 10/10 | 0,160 | 100 | | 7,01 | 0,13 |
| | | | | $\Sigma w = 5,36$ | |
| | | | | $\bar{w} = 0,41$ | |



Σχήμα 3.2. Ευθεία και εξίσωση probit για τη θνησιμότητα στις διάφορες συγκεντρώσεις NH₄Cl στο γόνο του *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι), με βάση τις τιμές του πίνακα 3.2.

Για τον υπολογισμό της τιμής του 24h- LC₅₀, δηλαδή της συγκέντρωσης του NH₄Cl που θανατώνει το 50% του πληθυσμού σε διάρκεια 24 ωρών αντικαθιστούμε τον παράγοντα y με την τιμή 5 στην εξίσωση παλινδρόμησης του σχήματος 3.2.

Οπότε προκύπτει :

$$y = 28,148x + 2,5072$$

$$5 = 28,148x + 2,5072$$

$$28,148x = 5 - 2,5072$$

$$28,148x = 2,4928$$

$$x = 2,4928 / 28,148$$

$$x = 0,0089$$

Επομένως το $24\text{h-LC}_{50} \text{ NH}_4\text{Cl} = 0,0089 \text{ g/L}$

Από την παραπάνω εξίσωση και με χρήση της εξίσωσης που αναγράφεται ενσωματωμένη στο σχήμα 2.5.2 [$\text{TAN (mg/L)} = 8,1553 \ln \text{NH}_4\text{Cl (g/L)} + 39,843$] μπορούμε να υπολογίσουμε το 24h-LC_{50} της ολικής αμμωνίας.

Έτσι προκύπτει : $24\text{h-LC}_{50} \text{ TAN (mg/L)} = 8,1553 \ln 0,0089 \text{ (g/L)} + 39,843$

$$24\text{h-LC}_{50} \text{ TAN (mg/L)} = 1,34$$

Εν συνεχεία, υπολογίστηκαν τα 95% όρια εμπιστοσύνης με χρήση, όπως και προηγουμένως, του τύπου $SE (\text{LC}_{50}) = \frac{1}{b\sqrt{pn\bar{w}}}$, όπου

- b είναι η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης του σχήματος 3.2 (= 28,148)
- p είναι ο αριθμός των συγκεντρώσεων του NH_4Cl που χρησιμοποιήθηκαν (13)
- n είναι ο αριθμός των ατόμων κάθε πειραματικού ενυδρείου (10)
- \bar{w} είναι ο μέσος συντελεστής βαρύτητας από τον πίνακα 3.2 (0,41)

Με αντικατάσταση των τιμών αυτών στον παραπάνω τύπο έχουμε :

$$SE (\text{LC}_{50}) = \frac{1}{28.148\sqrt{10*13*0.41}} = \frac{1}{205.5} = 0.0049$$

Πολλαπλασιάζοντας το παραπάνω αποτέλεσμα με 1,96 έχουμε :

$$24\text{h-LC}_{50} (\pm 95\% \text{ C.L.}) = 0,0089 \pm 0,0096 \text{ g/L NH}_4\text{Cl}$$

3.3. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ *SPARUS AURATA* (ΤΣΙΠΟΥΡΑ) ΓΙΑ ΤΑ ΝΙΤΡΩΔΗ.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και αναλυθεί στις παραγράφους 3.1 και 3.2 για το λαβράκι (*D. labrax*), έτσι και για την τσιπούρα (*S. aurata*), η διεξαγωγή, η ερμηνεία και η παρουσίαση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των probit , όπως αυτή έχει παρουσιαστεί και αναλυθεί στις παραγράφους 3.1 και 3.2.

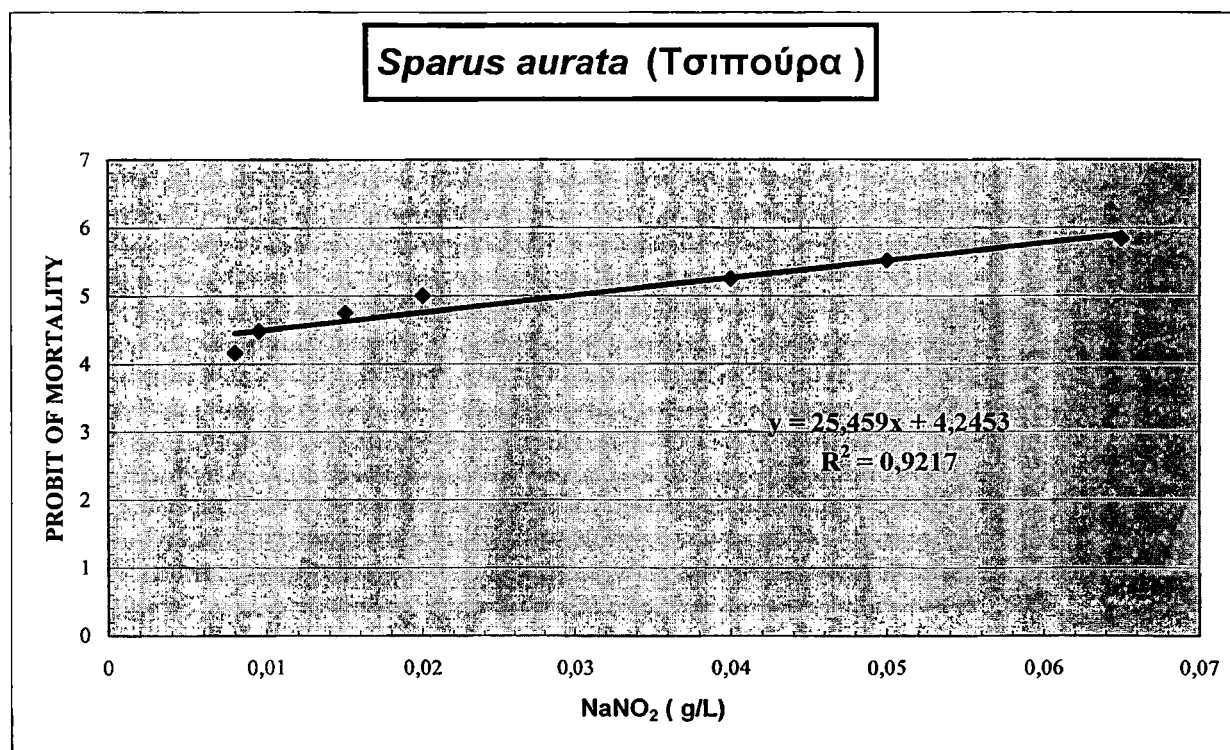
Ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο εργασιών στην τσιπούρα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα που αφορούσαν στα όρια αντοχής του γόνου της τσιπούρας στα νιτρώδη, κατά τη μεταφορά των ψαριών σε κλιμακούμενες συγκεντρώσεις τους. Η ανάλυση και η επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων με τη μέθοδο των probit οδήγησε στα παρακάτω αποτελέσματα :

Πίνακας 3.3. Ανάλυση probit για τη θνησιμότητα στις διάφορες συγκεντρώσεις του NaNO_2 στο γόνο του *Sparus aurata* (τσιπούρα).

| ΑΝΑΛΥΣΗ PROBIT ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΣΙΠΟΥΡΑ (NaNO_2) | | | | | |
|---|-----------------------------------|---------------|------------------------------------|--------------------|------|
| ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ NaNO_2 (g/L) | % ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ | PROBIT ΠΑΡΑΤΗΡΟΥΜΕΝΗΣ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ | ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟ PROBIT | W |
| 0/10 | 0,0065 | 0 | | 4,41 | 0,57 |
| 0/10 | 0,0075 | 0 | | 4,44 | 0,57 |
| 2/10 | 0,0085 | 2 | 4,16 | 4,46 | 0,57 |
| 3/10 | 0,0095 | 3 | 4,48 | 4,49 | 0,58 |
| 4/10 | 0,015 | 4 | 4,75 | 4,63 | 0,61 |
| 5/10 | 0,02 | 5 | 5,0 | 4,75 | 0,62 |
| 6/10 | 0,04 | 6 | 5,25 | 5,26 | 0,62 |
| 7/10 | 0,05 | 7 | 5,52 | 5,52 | 0,57 |
| 8/10 | 0,065 | 8 | 5,84 | 5,90 | 0,47 |
| 9/10 | 0,075 | 9 | 6,28 | 6,15 | 0,39 |
| 10/10 | 0,085 | 10 | | 6,41 | 0,30 |
| 10/10 | 0,095 | 10 | | 6,66 | 0,22 |
| $\Sigma w = 6,09 \quad \bar{w} = 0,51$ | | | | | |

Τα μεγέθη που παρουσιάζονται στον πίνακα 3.3 προέκυψαν από τα πειραματικά δεδομένα και από τους πίνακες του παραρτήματος. Τα αναμενόμενα probit

υπολογίστηκαν από την εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης probit θνησιμότητας-συγκέντρωση NaNO_2 της γραφικής παράστασης 3.3, με αντικατάσταση του αγνώστου x από την εκάστοτε συγκέντρωση του NaNO_2 , οι οποίες αναγράφονται στον πίνακα 3.3. Έτσι, με βάση τα δεδομένα του πίνακα 3.3 προκύπτει η παρακάτω γραφική παράσταση.



Σχήμα 3.3. Ευθεία και εξίσωση probit για τη θνησιμότητα στις διάφορες τιμές NaNO_2 του γόνου του *Sparus aurata* (τσιπούρα) με βάση τις τιμές του πίνακα 3.3.

Ο υπολογισμός του 24h-LC₅₀ του NaNO_2 πραγματοποιήθηκε με αντικατάσταση του παράγοντα y με την τιμή 5 στην εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης του σχήματος 3.3. Έτσι έχουμε :

$$y = 25,459x + 4,2453$$

$$5 = 25,459x + 4,2453$$

$$25,459x = 0,7547$$

$$x = 0,7547 / 25,459$$

$$x = 0,03.$$

$$\boxed{24\text{h-LC}_{50} \text{ NaNO}_2 \text{ (g/L)} = 0,03}$$

Για τον υπολογισμό του 24h-LC₅₀ των νιτρωδών που προκύπτουν από τη διάλυση του NaNO₂ στο νερό, χρησιμοποιούμε την εξίσωση που αναγράφεται ενσωματωμένη στο σχήμα 2.5.1: NO₂⁻ (mg/L) = 1.2509 ln NaNO₂ (g/L) + 8.901. Έτσι έχουμε :

$$24\text{h-LC}_{50} \text{ NO}_2^- \text{ (mg/L)} = 1.2509 \ln 0.03 + 8.901 = 4.51.$$

Άρα προκύπτει ότι $\boxed{24\text{h-LC}_{50} \text{ NO}_2^- \text{ (mg/L)} = 4,51}$

Στη συνέχεια υπολογίζονται τα 95% όρια εμπιστοσύνης (± 95% C.L.) , με χρήση του τύπου $\boxed{SE (LC_{50}) = \frac{1}{b\sqrt{pn\bar{w}}}}$, όπου

- b είναι η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης του σχήματος 3.3 (= 25,459)
- p είναι ο αριθμός των συγκεντρώσεων του NaNO₂ που χρησιμοποιήθηκαν (12)
- n είναι ο αριθμός των ατόμων κάθε πειραματικού ενυδρείου (10)
- \bar{w} είναι ο μέσος συντελεστής βαρύτητας από τον πίνακα 3.3 (0,51)

Με αντικατάσταση των τιμών αυτών στον παραπάνω τύπο, προκύπτει ότι

$$SE (LC_{50}) = \frac{1}{25.459\sqrt{12*10*0.51}} = 0.05$$

$$SE(LC_{50}) = 0,005$$

Πολλαπλασιάζοντας το αποτέλεσμα αυτό με 1,96 έχουμε :

$$\boxed{24\text{h-LC}_{50} (\pm 95\% \text{ C.L.}) = 0,03 \pm 0,0098 \text{ (g/L NaNO}_2 \text{)}}$$

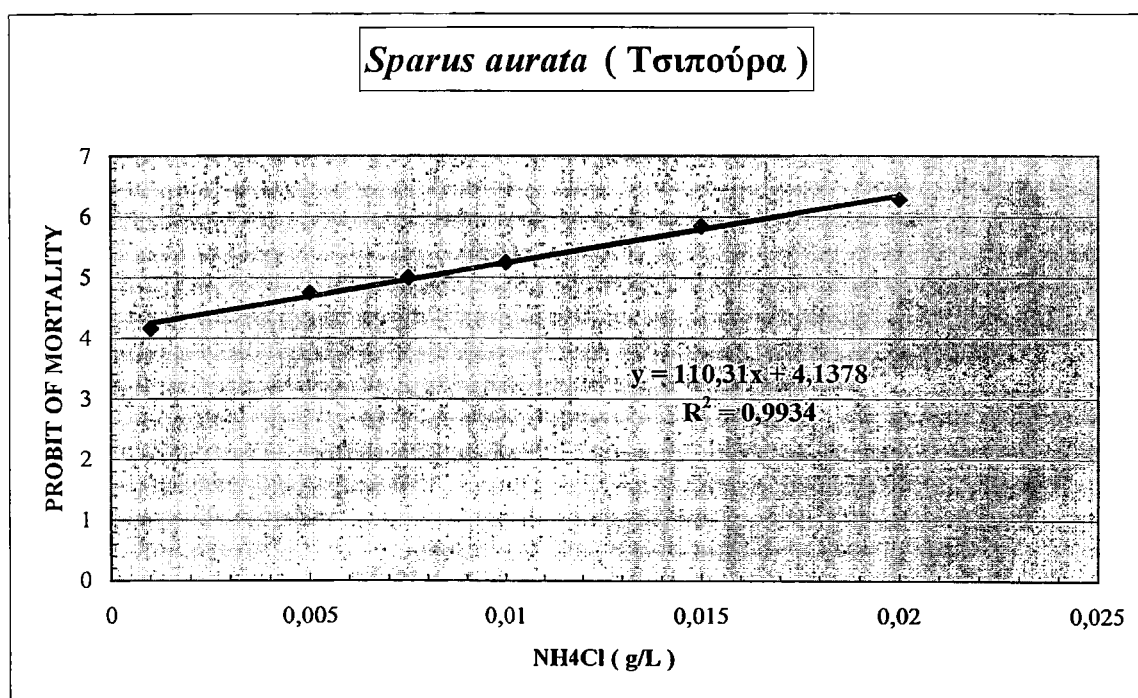
3.4. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ *SPARUS AURATA* (ΤΣΙΠΟΥΡΑ) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΜΜΩΝΙΑ.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και αναλυθεί στις παραγράφους 3.1, 3.2 και 3.3, η διεξαγωγή, η ερμηνεία και η παρουσίαση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των probit. Ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο εργασιών για την αμμωνία, στον γόνο της τσιπούρας πραγματοποιήθηκαν πειράματα που αφορούσαν στα όρια αντοχής του στην αμμωνία, κατά τη μεταφορά των ψαριών σε κλιμακούμενες συγκεντρώσεις της. Η ανάλυση και η επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων με τη μέθοδο των probit οδήγησε στα παρακάτω αποτελέσματα :

Πίνακας 3.4. Ανάλυση probit για τη θνησιμότητα σε διάφορες συγκεντρώσεις NH_4Cl του γόνου του *Sparus aurata* (τσιπούρα).

| ΑΝΑΛΥΣΗ PROBIT ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΣΙΠΟΥΡΑ (NH_4Cl) | | | | | |
|--|---|------------------|--|-----------------------|------|
| ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ | ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ NH_4Cl (g/L) | % ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ | PROBIT ΠΑΡΑΤΗΡΟΥΜΕΝΗΣ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ | ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟ PROBIT | W |
| 0/10 | 0,0008 | 0 | | 4,23 | 0,52 |
| 0/10 | 0,0009 | 0 | | 4,24 | 0,52 |
| 2/10 | 0,001 | 20 | 4,16 | 4,25 | 0,52 |
| 4/10 | 0,005 | 40 | 4,75 | 4,69 | 0,61 |
| 5/10 | 0,0075 | 50 | 5,0 | 4,97 | 0,64 |
| 6/10 | 0,01 | 60 | 5,25 | 5,24 | 0,62 |
| 8/10 | 0,015 | 80 | 5,84 | 5,79 | 0,50 |
| 9/10 | 0,02 | 90 | 6,28 | 6,34 | 0,32 |
| 10/10 | 0,025 | 100 | | 6,90 | 0,15 |
| 10/10 | 0,03 | 100 | | 7,45 | 0,06 |
| $\Sigma w = 4,46 \quad \bar{w} = 0,44$ | | | | | |

Τα μεγέθη που παρουσιάζονται στον πίνακα 3.4 προέκυψαν από τα πειραματικά δεδομένα και από τους πίνακες του παραρτήματος. Τα αναμενόμενα probit υπολογίστηκαν από την εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης probit θνησιμότητας-συγκέντρωση NH₄Cl της γραφικής παράστασης 3.4, με αντικατάσταση του αγνώστου x από την εκάστοτε συγκέντρωση του NH₄Cl, οι οποίες αναγράφονται στον πίνακα 3.4. Έτσι, με βάση τα δεδομένα του πίνακα 3.4 προκύπτει η παρακάτω γραφική παράσταση.



Σχήμα 3.4. Ευθεία και εξίσωση probit για τη θνησιμότητα στις διάφορες συγκεντρώσεις NH₄Cl του γόνου του *Sparus aurata* (τσιπούρα).

Για τον υπολογισμό της τιμής του 24h- LC₅₀, δηλαδή της συγκέντρωσης του NH₄Cl που θανατώνει το 50% του πληθυσμού σε διάρκεια 24 ωρών αντικαθιστούμε τον παράγοντα y με την τιμή 5 στην εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης του σχήματος 3.4. Έτσι προκύπτει :

$$y = 110,31x + 4,1378$$

$$5 = 110,31x + 4,1378$$

$$110,31x = 5 - 4,1378$$

$$110,31x = 0,8622$$

$$x = 0,8622 / 110,31$$

$$x = 0,008$$

$$\text{Άρα } \boxed{24\text{h-LC}_{50} \text{ NH}_4\text{Cl (g/L) = 0,008}}$$

Για τον υπολογισμό του 24h-LC₅₀ της ολικής αμμωνίας (TAN) που προκύπτει από τη διάλυση του χλωριούχου αμμωνίου (NH₄Cl) στο νερό, αντικαθιστούμε στην εξίσωση που αναγράφεται ενσωματωμένη στο σχήμα 2.5.2 [TAN (mg/L) = 8.1553 ln NH₄Cl (g/L) + 39.843] την τιμή του 24h-LC₅₀ που βρήκαμε για το NH₄Cl. Έτσι προκύπτει :

$$24\text{h-LC}_{50} \text{ TAN (mg/L) } = 8,1553 \ln 0,008 + 39,843$$

$$\boxed{24\text{h-LC}_{50} \text{ TAN (mg/L) = 0,47}}$$

Στη συνέχεια υπολογίζονται τα 95% όρια εμπιστοσύνης (± 95% C.L.) , με χρήση

του τύπου
$$\boxed{\text{SE (LC}_{50}) = \frac{1}{b\sqrt{pn\bar{w}}}}$$
, όπου

- b είναι η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης του σχήματος 3.4 (= 110,31)
- p είναι ο αριθμός των συγκεντρώσεων του NaNO₂ που χρησιμοποιήθηκαν (10)
- n είναι ο αριθμός των ατόμων κάθε πειραματικού ενυδρείου (10)
- \bar{w} είναι ο μέσος συντελεστής βαρύτητας από τον πίνακα 3.4 (0,44)

Με αντικατάσταση των τιμών αυτών στον παραπάνω τύπο, προκύπτει ότι

$$\text{SE (LC}_{50}) = \frac{1}{110.31\sqrt{10*10*0.44}} = \frac{1}{731.714} = 0.0014. \text{ Οπότε προκύπτει ότι}$$

$$\text{SE (LC}_{50}) = 0,0014.$$

Πολλαπλασιάζοντας το αποτέλεσμα αυτό με 1,96 προκύπτει 0,0027. Οπότε

$$\boxed{24\text{h-LC}_{50} \text{ NH}_4\text{Cl (}\pm 95\% \text{ C.L.) = 0,008 } \pm 0,0027 \text{ g/L}}$$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

4.1. ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΙΧΘΥΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΕΝΥΔΡΕΙΑ.

4.1.1. ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ *D. LABRAX* ΚΑΙ *S. AURATA* ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΑΜΜΩΝΙΑΣ (NH_3) ΣΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΕΝΥΔΡΕΙΑ.

Αμέσως μετά την εισαγωγή της αμμωνίας στα ενυδρεία του πειράματος, τόσο η τσιπούρα (*Sparus aurata*), όσο και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), παρέμεναν ακίνητα στον πάτο, ενώ κατά τη διάρκεια του 24ώρου ο χρωματισμός τους γινόταν **σκουρότερος σταδιακά**, με αποτέλεσμα μετά το πέρας του 24ώρου τα ψάρια που επιζούσαν της τοξικότητας να είναι τελείως μαύρα. Μετά τη διέλευση των πρώτων 5-6 ωρών, την αρχική ακινησία διαδέχονταν οι έντονα **σπασμωδικές κινήσεις**. Όσο περνούσε η ώρα η συμπεριφορά των ψαριών γινόταν όλο και περισσότερο άστατη και ανομοιόμορφη. Άλλα ψάρια **κολυμπούσαν στην επιφάνεια σε κατακόρυφη θέση με το στόμα να ακουμπάει την επιφάνεια του νερού, άλλα διέγραφαν ελικοειδείς τροχιές σε όλο τον όγκο του νερού**, ενώ άλλα παρέμεναν ακίνητα και ξαφνικά παρουσίαζαν πολύ έντονη κινητικότητα. Πάντως, όλα τα ψάρια εμφάνιζαν σημάδια αποπροσανατολισμού και ανοξίας. Λίγο πριν το τελικό σημείο, **τα ετοιμοθάνατα ψάρια παρέμεναν στην επιφάνεια, χωρίς να εμφανίζουν την παραμικρή ικανότητα κολύμβησης**. Αυτό που πρέπει να αναφερθεί είναι ότι η όψη σχεδόν όλων των ψαριών μετά το θάνατό τους υπονοούσε ότι η αιτία του θανάτου ήταν η ανοξία, καθώς όλα είχαν εντελώς ανοιχτό στόμα και διεσταλμένο βραγχιακό επικάλυμμα το οποίο αποκάλυπτε τα βράγχια.

Εντελώς διαφορετική ήταν η συμπεριφορά μέσα στα πειραματικά ενυδρεία των ατόμων που τελικά επιζούσαν των 24ώρων τεστ. Τόσο οι τσιπούρες όσο και τα λαβράκια, καθόλη τη διάρκεια του πειραματικού 24ώρου **παρέμεναν ακίνητα, εκτελώντας ελάχιστες μετακινήσεις (εμφανίζοντας μια πιθανώς προσαρμοστική συμπεριφορά με σκοπό την ελαχιστοποίηση της κατανάλωσης ενέργειας και οξυγόνου, καθώς και των δυσμενών συνεπειών της αμμωνίας)**, ενώ όπως προαναφέρθηκε το χρώμα του δέρματός τους ήταν πολύ σκούρο.

Μετά την απομάκρυνση των ζωντανών ατόμων από τα πειραματικά ενυδρεία, η κατάσταση ήταν διαφορετική ανάμεσα στην τσιπούρα και στο λαβράκι. **Οι τσιπούρες που μεταφέρονταν για ανάρρωση πολύ σπάνια ανακτούσαν τις δυνάμεις τους και τη φυσιολογική τους κατάσταση**, με αποτέλεσμα ακόμα και τα άτομα που επέζησαν της τοξικότητας της αμμωνίας να πεθαίνουν μέσα σε λίγες ώρες κατά τη μεταφορά τους σε νερό ελεύθερο αμμωνίας. Το γεγονός αυτό μπορεί να μαρτυρά μια αδυναμία του οργανισμού της τσιπούρας να αποτοξινωθεί και να εξαρτάται από το μέγεθος των ατόμων. Επιπλέον είναι πιθανό η θνησιμότητα των επιζώντων ατόμων να οφείλεται στην επιπλέον πρόκληση έντονου stress κατά τη μεταφορά, υπόθεση που είναι αρκετά πιθανή, αν σκεφτεί κανείς ότι τα άτομα αυτά υπέστησαν έντονη κατάσταση stress εξαιτίας της παρουσίας του τοξικού παράγοντα. Το πολύ μικρό μέγεθος των ατόμων (0,09 g) ενισχύει την άποψη αυτή, αφού είναι πιθανό ψάρια μεγαλύτερου μεγέθους να ήταν ικανότερα να αντεπεξέλθουν στο προκαλούμενο stress από την τοξική αμμωνία και την μεταφορά.

Η κατάσταση για το λαβράκι ήταν πολύ καλύτερη, εμφανίζοντας σαν είδος πολύ μεγαλύτερες αντοχές. **Κατά την μεταφορά τους σε νερό ελεύθερο αμμωνίας, σχεδόν όλα τα άτομα ανακτούσαν το φυσιολογικό χρωματισμό τους και σε διάρκεια μικρότερη ενός 24ώρου η φυσιολογική τους κατάσταση παρουσίαζε έντονη βελτίωση: εμφάνιζαν φυσιολογική κινητική κατάσταση (έντονη για το λαβράκι), τρέφονταν φυσιολογικά και μάλιστα πολλές φορές εμφάνιζαν έντονη επιθυμία για τη λήψη τροφής.** Πρέπει ωστόσο να αναφερθεί ότι τα άτομα που επιζούσαν των τεστ, εμφάνιζαν αιμορραγικές περιοχές στην τραχηλική περιοχή, στα βράγχια και πιο σπάνια στην κοιλιά, κοντά στην περιοχή της έδρας, οι οποίες ακόμα και μετά την διέλευση πολλών ημερών δεν εξαλείφονταν σε όλα τα άτομα. Τα άτομα στα οποία παρέμεναν οι αιμορραγίες, εμφάνιζονταν περισσότερο νωχελικά από τα υπόλοιπα και παρουσίαζαν μικρότερη επιθυμία λήψης τροφής, γεγονός που επηρέαζε το ρυθμό αύξησής τους και όχι την επιβίωσή τους.

4.1.2. ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ *D. LABRAX* ΚΑΙ *S. AYRATA* ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΝΙΤΡΩΔΩΝ (NO_2^-) ΣΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΕΝΥΔΡΕΙΑ.

Κατά την εισαγωγή των νιτρωδών στα πειραματικά ενυδρεία η συμπεριφορά των ψαριών ήταν παρόμοια με την συμπεριφορά τους στην αμμωνία, αν και δεν έδειχναν τόσο ενοχλημένα. Κατά τις πρώτες ώρες ήταν σχετικά κινητικά και ο σκουρότερος χρωματισμός του δέρματός τους πραγματοποιούνταν αρκετές ώρες μετά την εισαγωγή του τοξικού παράγοντα στα ενυδρεία. Και στην περίπτωση αυτή, ωστόσο, **οι τσιπούρες (*Sparus aurata*) φαίνονταν να είναι πολύ περισσότερο ευαίσθητες στην τοξικότητα σε σχέση με τα λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*)**, καθώς οι θνησιμότητες στις τσιπούρες άρχιζαν να πραγματοποιούνται πολύ νωρίτερα κατά τη διάρκεια του 24ώρου.

Και τα δύο είδη λίγο πριν το τελικό σημείο (θάνατο) **παρέμεναν στην επιφάνεια εμφανίζοντας σημάδια ανοξίας**, χωρίς να εκδηλώνουν **καμία κολυμβητική ικανότητα**. Πρέπει να αναφερθεί ότι οι ετοιμοθάνατες ή πεθαμένες τσιπούρες που απομακρύνονταν από τα ενυδρεία **χαρακτηρίζονταν όλες από καταστροφή ενός μικρού ή μεγάλου τμήματος του βραγχιακού επικαλύμματος, κατά τέτοιο τρόπο ώστε τα βράγχια έμεναν ακάλυπτα και φαίνονταν εξωτερικά.**

Σε αντίθεση όμως με την έκθεση στην αμμωνία, οι τσιπούρες που επιβίωναν από τα 24ωρα τεστ και μεταφέρονταν για ανάρρωση σε νερό ελεύθερο νιτρωδών και με πολύ μεγάλη παροχή αέρα, **κατάφερναν τελικά να ανακτήσουν την ομοιοστασία τους και να επιβιώσουν**. Μέσα σε λίγες ώρες ανάρρωσης οι τσιπούρες αποκτούσαν και πάλι τον φυσιολογικό ασημί χρωματισμό τους, εμφάνιζαν φυσιολογική κινητικότητα και επιθυμία για τη λήψη τροφής.

Η ίδια κατάσταση με τη έκθεση σε αμμωνία επικρατούσε και σε αυτή την περίπτωση για τα λαβράκια, χωρίς όμως να εμφανίζουν αιμορραγικές περιοχές κατά το τέλος των τεστ. Τα λαβράκια που επιζούσαν κατά τη διάρκεια του 24ώρου παρέμεναν ακίνητα στον πάτο των πειραματικών ενυδρείων και χαρακτηρίζονταν από μαύρο χρωματισμό του δέρματός τους, αλλά εγκλιματίζονταν σχεδόν αμέσως στις συνθήκες των δεξαμενών ανάρρωσης.

4.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΜΜΩΝΙΑΣ (NH₃) ΣΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΟΥ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ *DICENTRARCHUS LABRAX* ΚΑΙ *SPARUS AURATA*.

Κατά την έκθεση του γόνου της τσιπούρας (*Sparus aurata*) και του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) στην αμμωνία, οι τιμές των LC₅₀ που προέκυψαν από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι οι εξής:

Για τη τσιπούρα (*Sparus aurata*) το 24h-LC₅₀ βρέθηκε ίσο με **0.027 mg/L NH₃-N** ή **0.47 mg/L TAN** σε συνθήκες θερμοκρασίας T 25 °C, pH= 8.3, αλατότητας 10‰ και οξυγόνου πάνω από το 80% του επιπέδου κορεσμού, ενώ

Για το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) το 24h-LC₅₀ βρέθηκε ίσο με 0.08 mg/L NH₃-N ή 1,34 mg/L TAN σε συνθήκες θερμοκρασίας T 24 °C, pH=8.3, αλατότητας 10‰ και οξυγόνου πάνω από το 80% του επιπέδου κορεσμού.

Συνεπώς, παρατηρείται ότι το λαβράκι (*D.labrax*) εμφανίζεται σαν είδος να είναι περισσότερο ανθεκτικό από την τσιπούρα (*S.aurata*). Επίσης κατά την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, διαπιστώθηκε ότι οι παραπάνω τιμές είναι πολύ μικρές συγκριτικά με εκείνες άλλων ερευνητών, τόσο για το λαβράκι και την τσιπούρα, όσο και για άλλα είδη γλυκών και αλμυρών νερών. Ένα παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των Wajsbrodt, Gasith, Krom και Popper (1990), οι οποίοι βρήκαν τιμή του 96h-LC₅₀ ίση με 1,27 mg/L NH₃-N σε νεαρά άτομα τσιπούρας βάρους 0,4-3,2 g.

Κατά πολύ μεγαλύτερες ήταν οι τιμές των 24h-LC₅₀ στις οποίες κατέληξαν οι Person-Le Ruyet, Chartois και Quemener (1995) για τη τσιπούρα, το λαβράκι και ένα ακόμα είδος, το *Scophthalmus maximus*. Οι παραπάνω ερευνητές μελετώντας άτομα των τριών αυτών ειδών βάρους 6-163 g, σε θερμοκρασία 17-18 °C , pH=8.15, αλατότητα 34‰ και οξυγόνο πάνω από 75% του επιπέδου κορεσμού, κατέληξαν ότι οι μέσες τιμές των 24h-LC₅₀ για τα seabass (*D. labrax*), seabream (*S. aurata*) και turbot (*S. maximus*) ήταν 2,035, 3,03 και 2,84 mg/L NH₃-N αντίστοιχα και διαπίστωσαν από τις τιμές αυτές ότι το λαβράκι είναι το πιο ευαίσθητο από τα τρία είδη. Είναι εμφανές λοιπόν ότι τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας εμφανίζουν πολύ μεγάλη απόκλιση από τις τιμές των παραπάνω και άλλων ερευνητών.

Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες. Ένας από αυτούς είναι το μέγεθος των υπό μελέτη ατόμων. Έτσι, στην παρούσα μελέτη είναι πολύ πιθανό οι

εξαιρετικά μικρές τιμές των LC₅₀ να οφείλονται στο πολύ μικρό μέγεθος των ιχθύων (0,09g για την τσιπούρα και 0,25 g για το λαβράκι), αν και οι Person-Le Ruyet, Chartois και Quemener (1995) υποστήριξαν ότι και για τα τρία είδη που μελέτησαν (seabass, seabream, turbot) και για εύρος βάρους από 6-150 g οι τιμές των LC₅₀ ήταν ανεξάρτητες από το βάρος.

Από την άλλη πλευρά οι Daniels et al. (1987) αναφέρουν ότι οι τιμές των 96h-LC₅₀ της αμμωνίας στην πέστροφα *Cynoscion nebulosus* αυξάνουν σημαντικά με την ηλικία: 0,98 mg/L NH₃-N στα ιχθύδια ενός μήνα, ως 1,72 mg/L στα ιχθύδια τεσσάρων μηνών. Επίσης στην ιριδιζούσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) οι Thurston και Russo (1983) παρατήρησαν ότι οι τιμές των LC₅₀ αυξάνουν καθώς τα ψάρια περνούν από το στάδιο της λάρβας στο στάδιο των ιχθυδίων και αργότερα στα ενήλικα άτομα, όπου αυξάνουν περισσότερο οι τιμές, ενώ στη συνέχεια από το βάρος των 3 κιλών παρατηρείται μείωση των LC₅₀. Σύμφωνα με τα ευρήματα των παραπάνω μελετών, είναι πιθανό να δικαιολογούνται οι εξαιρετικά μικρές τιμές των LC₅₀ της παρούσας εργασίας.

Επίσης είναι βέβαιο ότι οι διαφορετικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε πειραματική διαδικασία, επηρεάζουν λίγο ή περισσότερο την τοξικότητα της αμμωνίας, και κατά συνέπεια την ευαισθησία των εκάστοτε ειδών και τις τιμές των LC₅₀. Για παράδειγμα, η μελέτη των Person-Le Ruyet, Chartois και Quemener πραγματοποιήθηκε σε pH=8.15 και οι τιμές των LC₅₀ που βρήκαν αναφέρονται στο συγκεκριμένο pH. Στην παρούσα εργασία όμως το pH στο οποίο αναφέρονται οι θνησιμότητες ήταν 8,3, γεγονός που εν μέρει δικαιολογεί την μεγάλη ευαισθησία των ψαριών και τις μικρές τιμές των LC₅₀. Αυτό συμβαίνει γιατί το pH επηρεάζει με δραματικό τρόπο την ισορροπία μεταξύ της ιονισμένης (NH₄⁺) και μη ιονισμένης (NH₃) μορφής της αμμωνίας στο νερό. Η αύξηση του pH έστω και κατά λίγο έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής της μη ιονισμένης αμμωνίας (NH₃) κατά πολύ (Χώτος, Βλάχος, Αβραμίδου, 2001), η οποία είναι η πιο τοξική μορφή της αμμωνίας. Αυτό έχει αποδοθεί στο γεγονός ότι η μη ιονισμένη αμμωνία είναι εύκολα διαλυτή στο λιπίδιο των μεμβρανών των κυττάρων και λαμβάνεται πολύ εύκολα από τα βράγχια των ψαριών, ενώ η ιονισμένη μορφή δεν μπορεί εύκολα να διαπεράσει τις μεμβράνες των κυττάρων (Hamprson, 1976). Χαρακτηριστικό παράδειγμα στο οποίο η τοξικότητα της αμμωνίας επηρεάζεται από το pH είναι εκείνο για τα νεαρά άτομα του αμερικάνικου

γατόψαρου (*Ictalurus punctatus*) όπου η τιμή για το 24h-LC₅₀ σε pH=9 ήταν 4.5 mg/L TAN , ενώ στις ίδιες συνθήκες αλλά σε pH=7 η τιμή του LC₅₀ ήταν 264mg/L TAN. Συμπερασματικά λοιπόν, η παραμικρή αύξηση του pH έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού της μη ιονισμένης αμμωνίας, η οποία είναι ισχυρή νευροτοξίνη, και επιδρά καταλυτικά στην αντοχή των ψαριών.

Επίσης, οι υψηλές θερμοκρασίες της παρούσας εργασίας (24-25 °C) σε σχέση με τις αρκετά χαμηλότερες των προηγούμενων μελετών (17-18 °C) επηρεάζουν την αύξηση του ποσοστού της μη ιονισμένης αμμωνίας, επιδρώντας κατά αυτόν τον τρόπο στην ευαισθησία των ψαριών. **Αν και η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μικρή αύξηση της μη ιονισμένης αμμωνίας σε σχέση με το pH, προκαλεί ωστόσο μείωση των ορίων αντοχής των διαφόρων ειδών και των τιμών των LC₅₀.** Επίσης, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η αύξηση της θερμοκρασίας επιδρά και στην **διαλυτότητα του παρεχόμενου οξυγόνου**, αποτελώντας έναν επιπλέον παράγοντα που ενισχύει την ευαισθησία των ψαριών.

Αν και με τα μέχρι τώρα στοιχεία οι χαμηλές τιμές των LC₅₀ (0,027mg/L για την τσιπούρα και 0.08mg/L για το λαβράκι) για την αμμωνία που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη δικαιολογούνται, ωστόσο έρχονται ακόμα σε αντίθεση με τα ευρήματα των Wajsbrot, Gasith, Krom και Popper (1991) που αφορούν στην τοξικότητα της αμμωνίας σε νεαρές τσιπούρες (96h-LC₅₀ = 1.27 mg/L NH₃-N), καθώς η θερμοκρασία της συγκεκριμένης μελέτης ήταν 27 °C και το pH ίσο με 8,1, δηλαδή πολύ κοντά στις τιμές της παρούσας εργασίας. Στην περίπτωση αυτή, οι αποκλίσεις μπορούν να ερμηνευτούν αν λάβουμε υπόψη μας τα πολύ μεγαλύτερα μεγέθη ψαριών (0,4-3,2 g) που χρησιμοποίησαν οι προαναφερθέντες ερευνητές (αναλύθηκε παραπάνω η επίδραση του μεγέθους στην τοξικότητα της αμμωνίας), καθώς και την πολύ μεγαλύτερη αλατότητα στην οποία αναφέρονται τα αποτελέσματά τους (40,5 ppt). Έχει βρεθεί ότι **η αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμένων ιόντων , μέσω των αλάτων χλωριούχου νατρίου και ασβεστίου, μειώνει την τοξικότητα της αμμωνίας** (Tomasso et al, 1980, Russo et al, 1988, από Χώτος, 2001), **το ίδιο και η αύξηση της αλατότητας** (Alabaster et al, 1979, από Χώτος, 2001). Άρα είναι λογικό ότι αλατότητα ίση με 10‰ που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία να προκαλεί αύξηση της τοξικότητας της αμμωνίας, γεγονός που δικαιολογεί τις χαμηλές τιμές των LC₅₀.

Για τους ίδιους λόγους, παρατηρούνται αποκλίσεις ανάμεσα στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και εκείνης των Χώτου, Αβραμίδου και Βλάχου (2001). Οι Χώτος και συν (2001) μελέτησαν την τοξικότητα της αμμωνίας σε νεαρά άτομα τσιπούρας και λαβρακιού. Η τιμή του 24h-LC₅₀ στην οποία κατέληξαν ήταν 0,35 mg/L TAN για τσιπούρες μέσου βάρους 0,4 g, σε συνθήκες αλατότητας 20 ppt, θερμοκρασίας 20,6 °C και pH από 7,3 ως 7,5, ενώ για το λαβράκι μέσου βάρους 0,4g, η τιμή του 24h-LC₅₀ ήταν 17,36 mg/L TAN σε συνθήκες αλατότητας 10 ppt, θερμοκρασίας 24.8 °C και pH ίσο με 7,5. Κατά τη σύγκριση των τιμών αυτών με τις τιμές της παρούσας εργασίας, μόνο το μεγαλύτερο μέγεθος ιχθύων που χρησιμοποιήσαν οι Χώτος και συν (και το μικρότερο pH για την περίπτωση του λαβρακιού) μπορεί να δικαιολογήσει τις αποκλίσεις μεταξύ των 24h-LC₅₀.

Εκτός από τα παραπάνω χαρακτηριστικά του νερού, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν σε μικρότερο ποσοστό την ευαισθησία των ειδών και τις τιμές των LC₅₀ σε πειραματικό επίπεδο. Αυτοί είναι 1) Ο τρόπος διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας, αν δηλαδή **τα τεστ είναι στατικά ή αν είναι τεστ συνεχόμενης ροής** (Pearson-Le Ruyet et al, 1995) 2) **η προγενέστερη έκθεση των ψαριών σε αμμωνία**. Αν τα ψάρια έχουν εγκλιματιστεί πριν την μελέτη σε πολύ μικρές ή υποθανάτιες συγκεντρώσεις αμμωνίας, τότε παρουσιάζονται πιο ανθεκτικά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (Χώτος, Βλάχος, Αβραμίδου, 2001). Οι Redner and Stickney επίσης κατέδειξαν ότι η έκθεση του *Tilapia aurea* σε sublethal συγκεντρώσεις της αμμωνίας(0,43-0,53 mg/L NH₃) αύξησε την αντοχή του, έτσι ώστε μετά από 35 μέρες εγκλιματισμού δεν παρουσίαζε καμία θνησιμότητα μέσα σε 48 ώρες, και τέλος 3) **από τη φυσιολογία και την ικανότητα προσαρμογής κάθε είδους**. Για παράδειγμα τρία είδη της οικογένειας των *Batrachoididae*, τα *Opsanus beta*, *Opsanus tau* και *Porichthys notatus* (Wang-Walsh,1999), η τιλάπια της λίμνης Magadi (Walsh et al,1993) και το mudskipper (Peng et al,1998) εμφανίζουν πολύ μεγάλα όρια αντοχής στην αμμωνία. Το κοινό όλων αυτών των ειδών είναι η ικανότητά τους να μετατρέπονται από αμμωνιοτελικά σε ουριοτελικά όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος τους δεν είναι ευνοϊκές. Αυτά τα ουριογεννητικά ψάρια σε γενικές γραμμές εμφανίζουν πολύ υψηλότερες αντοχές στην αμμωνία και οι τιμές των LC₅₀ ανήκουν στο εύρος των 400-700 μmol/L NH₃ (6.8-9.8 mg/L). Είναι πιθανό αυτή η αυξημένη αντοχή στην αμμωνία να οφείλεται στην ικανότητα των ειδών αυτών να μετατρέπουν την τοξική

αμμωνία στην λιγότερο τοξική ουρία ή γλουταμίνη (Halperin et al, 1985, Cooper and Plum, 1987, Mommsen and Walsh, 1991, Walsh, 1998, Wright and Land, 1998).

Συμπερασματικά, η αμμωνία ασκεί πολύ ισχυρή τοξική δράση στους ιχθύς, σε ένα μεγάλο εύρος τιμών. Η άμεση σύγκριση ωστόσο, των επιδράσεων της στα διάφορα είδη ιχθύων, μέσω της σύγκρισης των τιμών των LC₅₀ που προκύπτουν από τις διάφορες μελέτες, είναι ουσιαστικά αδύνατη, αφού οι διαφορετικές φυσικές και χημικές συνθήκες του νερού στις οποίες αναφέρονται οι εκάστοτε μελέτες και τα διαφορετικά στοιχεία της φυσιολογίας του κάθε είδους, επιδρούν στην τοξικότητα της αμμωνίας. Συγκεκριμένα, αύξηση του pH και της θερμοκρασίας του νερού προκαλούν αύξηση της τοξικότητας της αμμωνίας, μέσω της επίδρασης τους στην ισορροπία της ιονισμένης και μη ιονισμένης της μορφής. Αντίθετα, η αύξηση της ποσότητας των διαλυμένων ιόντων, μέσω των αλάτων χλωριούχου νατρίου και ασβεστίου, και η αύξηση της αλατότητας προκαλούν μείωση της τοξικότητας της αμμωνίας.

4.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΝΙΤΡΩΔΩΝ (NO₂⁻) ΣΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΓΟΝΟΥ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ *DICENTRARCHUS LABRAX* ΚΑΙ *SPARUS AURATA*.

Κατά την έκθεση του γόνου της τσιπούρας (*Sparus aurata*) και του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) στα νιτρώδη ιόντα, οι τιμές των LC₅₀ που προέκυψαν από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, είναι οι εξής :

Για την τσιπούρα (*Sparus aurata*) το 24h-LC₅₀ βρέθηκε ίσο με 4,51mg/L NO₂⁻ σε συνθήκες θερμοκρασίας 24.5 °C, αλατότητας 10‰, pH ίσο με 8.4 και οξυγόνου πάνω από το 80% του επιπέδου κορεσμού.

Για το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) το 24h-LC₅₀ βρέθηκε ίσο με 9.89 mg/L NO₂⁻ σε συνθήκες θερμοκρασίας 11 °C, αλατότητας 10‰, pH ίσο με 8.2 και οξυγόνου πάνω από το 80% του επιπέδου κορεσμού.

Συνεπώς παρατηρείται ότι το λαβράκι εμφανίζεται σαν είδος να είναι περισσότερο ανθεκτικό από την τσιπούρα και στα νιτρώδη. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή, κατά την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας υπάρχουν πολλές αναφορές από διάφορους ερευνητές σε σχέση με τη θνησιμότητα που προκαλεί η τοξικότητα των

νιτρωδών. Οι αποκλίσεις και διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στις διάφορες μελέτες όσο αφορά στις θανατηφόρες συγκεντρώσεις των νιτρωδών και στις τιμές των LC₅₀, οφείλονται σε διάφορους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα των νιτρωδών.

Οι Χώτος και συν. (2001) μελέτησαν την επίδραση της τοξικότητας των νιτρωδών (NO₂⁻) σε λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) μέσου βάρους 0,46g και σε ένα κεφαλοειδές, τη βελάνισσα (*Chelon labrosus*) μέσου βάρους 0,45g. Οι τιμές των 24h-LC₅₀ στις οποίες κατέληξαν ήταν 8.42 mg/L NO₂⁻ για το λαβράκι, σε συνθήκες pH ίσο με 7, θερμοκρασία 19.9 °C και αλατότητα 10 ppt, ενώ το 24h-LC₅₀ για τη βελάνισσα ήταν 8.74 mg/L NO₂⁻ σε συνθήκες pH ίσο με 7.4, θερμοκρασία 20.9 °C και αλατότητα 10ppt. Από τη σύγκριση της μελέτης των Χώτου, Αβραμίδου, Βλάχος (2001) και της παρούσας εργασίας, προκύπτει μια μικρή διαφοροποίηση των τιμών του LC₅₀ για το λαβράκι. Η μεγαλύτερη τιμή του 24h-LC₅₀ για το λαβράκι της παρούσας εργασίας, σε σχέση με την τιμή που βρήκαν οι Χώτος και συν (2001), μπορεί να δικαιολογηθεί εξαιτίας της χαμηλότερης θερμοκρασίας και του υψηλότερου pH της παρούσας εργασίας, συνθήκες που αμβλύνουν την τοξικότητα των νιτρωδών. Επίσης, και το μεγαλύτερο μέγεθος ψαριών που χρησιμοποίησαν οι Χώτος και συν (2001) συνετέλεσε στην μικρότερη τιμή του LC₅₀, αφού όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, τα μικρού μεγέθους άτομα επιδεικνύουν μεγαλύτερη αντοχή στα νιτρώδη.

Αν και στην παρούσα εργασία δεν μελετήθηκε η επίδραση των νιτρωδών στην ανάπτυξη των ψαριών, ωστόσο στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικά με το θέμα αυτό. Στην ιριδιζούσα πέστροφα *Salmo gairdnerii* δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της αύξησης της για περίοδο έκθεσης 6 μηνών σε συγκέντρωση νιτρωδών ίση με 10% του 96h-LC₅₀ (Wedemeyer and Yasutake, 1978 από Χώτος και συν, 2001). Από την άλλη πλευρά οι Alcaraz και Espina (1997) παρατήρησαν μείωση της ανάπτυξης των ιχθυδίων του κυπρίνου *Ctenopharyngodon idella* κατά 54, 14 και 69% όταν εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις νιτρωδών 1,0, 1,6 και 2,5 mg/L αντίστοιχα. Μείωση επίσης παρατήρησαν και στον συντελεστή αφομοίωσης της τροφής, ενώ διατύπωσαν την άποψη ότι το μεγαλύτερο μέρος της αφομοιώσιμης ενέργειας χρησιμοποιείται στο μεταβολισμό της αναπνοής και όχι για την ανάπτυξη των ατόμων. Κατέληξαν λοιπόν στο συμπέρασμα ότι η μεταβολική αντίδραση που παρατήρησαν και που είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση της ανάπτυξης του κυπρίνου

Ctenopharyngodon idella, μπορεί να αποτελεί μια προσαρμοστική στρατηγική που τον καθιστά ικανό να αντιμετωπίσει την τοξικότητα των νιτρωδών.

Συμπερασματικά λοιπόν, τα νιτρώδη είναι ιδιαίτερα τοξικά για τους υδρόβιους οργανισμούς, αν και η άμεση σύγκριση της τοξικότητας τους όπως αυτή προκύπτει από τις διάφορες μελέτες, δεν είναι εφικτή, εξαιτίας της πολύπλοκης δράσης που ασκούν οι διάφοροι περιβαλλοντικοί και βιολογικοί παράγοντες στην τοξικότητα των νιτρωδών.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- 1.. Alcaraz, G. and. Espina, S., 1997. Scope for Growth of Juvenile Grass Carp *Ctenopharyngodon idella* Exposed to Nitrite. *Comp. Biochem. Physiol.* 116, 85-88.
2. Cardoso, E.L., Chiarini-Garsia, H., Ferreira, R.M.A. and Poli, C.R., 1996. Morfological changes in the gills of *Lophiosilurus alexandri* exposed to un-ionized ammonia. *Journal of Fish Biology* 49, 778-787.
3. Frances, J., Nowak, B.F. and Allan, G.L., 1998. The effects of nitrite on the short-term growth of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture* 163, 63-72.
4. Frances, J., Nowak, B.F. and Allan, G.L., 2000. Effects of ammonia on juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture* 183, 95-103.
5. Kamstra, A., Span, J.A., van Weerd, J.H., 1996. The acute toxicity and sublethal effects of nitrite on growth and feed utilization of European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *Aquaculture research* 27, 903-911.
6. Knoph, M.B. and Olsen, Y.A., 1994. Subacute toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater: effects on water and salt balance, plasma cortisol and plasma ammonia levels. *Aquatic Toxicology* 30, 295-310.
7. Παπουτσόγλου, Σ., 1997. Εισαγωγή στις υδατοκαλλιέργειες. Εκδόσεις Σταμούλης, 100-120.
8. Παπουτσόγλου, Σ., 1998. Ενδοκρινολογία ιχθύων. Εκδόσεις Σταμούλης, 524-528.
9. Parra, G. and Yufera, M., 1999. Tolerance response to ammonia and nitrite exposure in larvae of two marina fishes species (gilthead seabream *Sparus aurata* L. and *Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture research* 30, 857-863.
10. Person-Le Ruyet, J., Chartois, H. and Quemener, L., 1995. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. *Aquaculture* 136, 181-194.
11. Person-Le Ruyet, J., Galland, R., Le Roux, A. and Chartois, H., 1997. Chronic ammonia toxicity in juveniles turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 154, 155-171.

12. Person-Le Ruyet, J., Boeuf, G., Infante, J.Z., Helgason, S. and Le Roux, A., 1998. Short- Term Physiological Changes in Turbot and Seabream Juveniles Exposed to Exogenous Ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, 511-518.
13. Sadler, K., 1981. Η τοξικότητα της αμμωνίας στο ευρωπαϊκό χέλι (*Anguilla anguilla*). *Υδατοκαλλιέργεια* 26, 173-180.
14. Wajsborn, N., Gasith, A., Krom, M.D. and Popper, D.M., 1991. Acute toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* under reduced oxygen levels. *Aquaculture* 92, 277-288.
15. Wang, Y. and Walsh, P.J., 2000. High ammonia tolerance in fishes of family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). *Aquatic Toxicology* 50, 205-219.
16. Χ.ώτος, Γ., Βλάχος, Ν. και Αβραμίδου, Δ., 2001. Μελέτη του μεταβολισμού και καθορισμός ασφαλών ορίων των κυριότερων από τα εκτρεφόμενα είδη ψαριών στην Ελλάδα. *Μεσολόγγι, 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιχθυολόγων*, σ.σ. 50-73.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3.5 Probit που αντιστοιχεί στα δεκαδικά ποσοστά.

| Μονάδες ποσοστού | Probit που αντιστοιχεί στα δεκαδικά ποσοστά. | | | | | | | | | |
|------------------|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 0.0 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 |
| 0 | | 1.9098 | 2.1218 | 2.2522 | 2.3479 | 2.4242 | 2.4879 | 2.5427 | 2.5911 | 2.6344 |
| 1 | 2.6737 | 2.7096 | 2.7429 | 2.7738 | 2.8027 | 2.8299 | 2.8556 | 2.8799 | 2.9031 | 2.9251 |
| 2 | 2.9463 | 2.9665 | 2.9859 | 3.0046 | 3.0226 | 3.0400 | 3.0569 | 3.0732 | 3.0890 | 3.1043 |
| 3 | 3.1192 | 3.1337 | 3.1478 | 3.1616 | 3.1750 | 3.1881 | 3.2009 | 3.2134 | 3.2256 | 3.2376 |
| 4 | 3.2493 | 3.2608 | 3.2721 | 3.2831 | 3.2940 | 3.3046 | 3.3151 | 3.3253 | 3.3354 | 3.3454 |
| 5 | 3.3551 | 3.3648 | 3.3742 | 3.3836 | 3.3928 | 3.4018 | 3.4107 | 3.4195 | 3.4282 | 3.4368 |
| 6 | 3.4452 | 3.4536 | 3.4618 | 3.4699 | 3.4780 | 3.4859 | 3.4937 | 3.5015 | 3.5091 | 3.5167 |
| 7 | 3.5242 | 3.5316 | 3.5389 | 3.5462 | 3.5534 | 3.5605 | 3.5675 | 3.5742 | 3.5813 | 3.5882 |
| 8 | 3.5949 | 3.6016 | 3.6083 | 3.6148 | 3.6213 | 3.6278 | 3.6342 | 3.6405 | 3.6468 | 3.6531 |
| 9 | 3.6592 | 3.6654 | 3.6715 | 3.6775 | 3.6835 | 3.6894 | 3.6953 | 3.7012 | 3.7070 | 3.7127 |
| 10 | 3.7184 | 3.7241 | 3.7298 | 3.7354 | 3.7409 | 3.7464 | 3.7519 | 3.7574 | 3.7628 | 3.7681 |
| 11 | 3.7735 | 3.7788 | 3.7840 | 3.7893 | 3.7945 | 3.7996 | 3.8048 | 3.8099 | 3.8150 | 3.8200 |
| 12 | 3.8250 | 3.8300 | 3.8350 | 3.8399 | 3.8448 | 3.8497 | 3.8545 | 3.8593 | 3.8641 | 3.8689 |
| 13 | 3.8736 | 3.8783 | 3.8830 | 3.8877 | 3.8923 | 3.8969 | 3.9015 | 3.9061 | 3.9107 | 3.9152 |
| 14 | 3.9197 | 3.9242 | 3.9286 | 3.9331 | 3.9375 | 3.9419 | 3.9463 | 3.9506 | 3.9550 | 3.9593 |
| 15 | 3.9636 | 3.9678 | 3.9721 | 3.9763 | 3.9806 | 3.9848 | 3.9890 | 3.9931 | 3.9973 | 4.0014 |
| 16 | 4.0055 | 4.0096 | 4.0137 | 4.0178 | 4.0218 | 4.0259 | 4.0299 | 4.0339 | 4.0379 | 4.0419 |
| 17 | 4.0458 | 4.0498 | 4.0537 | 4.0576 | 4.0615 | 4.0654 | 4.0693 | 4.0731 | 4.0770 | 4.0808 |
| 18 | 4.0846 | 4.0884 | 4.0922 | 4.0960 | 4.0998 | 4.1035 | 4.1073 | 4.1110 | 4.1347 | 4.1184 |
| 19 | 4.1221 | 4.1258 | 4.1295 | 4.1331 | 4.1367 | 4.1404 | 4.1440 | 3.3476 | 4.1512 | 4.1548 |
| 20 | 4.1584 | 4.1619 | 4.1655 | 4.1690 | 4.1726 | 4.1761 | 4.1796 | 4.1831 | 4.1866 | 4.1901 |
| 21 | 4.1936 | 4.1970 | 4.2005 | 4.2039 | 4.2074 | 4.2108 | 4.2042 | 4.2176 | 4.2210 | 4.2244 |
| 22 | 4.2278 | 4.2312 | 4.2345 | 4.2379 | 4.2412 | 4.2446 | 4.2479 | 4.2512 | 4.2546 | 4.2579 |
| 23 | 4.2612 | 4.2644 | 4.2677 | 4.2710 | 4.2743 | 4.2775 | 4.2808 | 4.2840 | 4.2872 | 4.2905 |
| 24 | 4.2937 | 4.2969 | 4.3001 | 4.3033 | 4.3065 | 4.3097 | 4.3129 | 4.3160 | 4.3192 | 4.3324 |
| 25 | 4.3255 | 4.3287 | 4.3318 | 4.3349 | 4.3380 | 4.3412 | 4.3443 | 4.3474 | 4.3505 | 4.3536 |
| 26 | 4.3567 | 4.3597 | 4.3628 | 4.3659 | 4.3689 | 4.3720 | 4.3750 | 4.3781 | 4.3811 | 4.3842 |
| 27 | 4.3872 | 4.3902 | 4.3932 | 4.3962 | 4.3992 | 4.4052 | 4.4052 | 4.4082 | 4.4112 | 4.4142 |
| 28 | 4.4172 | 4.4201 | 4.4231 | 4.4260 | 4.4290 | 4.4349 | 4.4349 | 4.4378 | 4.4408 | 4.4437 |
| 29 | 4.4466 | 4.4495 | 4.4524 | 4.4554 | 4.4583 | 4.4641 | 4.4641 | 4.4670 | 4.4698 | 4.4727 |
| 30 | 4.4756 | 4.4785 | 4.4813 | 4.4842 | 4.4871 | 4.4928 | 4.4928 | 4.4956 | 4.4985 | 4.5013 |
| 31 | 4.5041 | 4.5070 | 4.5098 | 4.5126 | 4.5155 | 4.5211 | 4.5211 | 4.5239 | 4.5267 | 4.5295 |
| 32 | 4.5323 | 4.5351 | 4.5379 | 4.5407 | 4.5435 | 4.5490 | 4.5490 | 4.5518 | 4.5546 | 4.5573 |
| 33 | 4.5601 | 4.5628 | 4.5656 | 4.5684 | 4.5711 | 4.5766 | 4.5766 | 4.5793 | 4.5821 | 4.5848 |
| 34 | 4.5875 | 4.5903 | 4.5930 | 4.5957 | 4.5984 | 4.6039 | 4.6039 | 4.6066 | 4.6093 | 4.6120 |
| 35 | 4.6147 | 4.6174 | 4.6201 | 4.6228 | 4.6255 | 4.6308 | 4.6308 | 4.6335 | 4.6362 | 4.6389 |
| 36 | 4.6415 | 4.6442 | 4.6469 | 4.6495 | 4.6522 | 4.6575 | 4.6575 | 4.6602 | 4.6628 | 4.6695 |
| 37 | 4.6681 | 4.6708 | 4.6734 | 4.6761 | 4.6787 | 4.6840 | 4.6840 | 4.6866 | 4.6893 | 4.6919 |
| 38 | 4.6945 | 4.6971 | 4.6998 | 4.7024 | 4.7050 | 4.7102 | 4.7102 | 4.7129 | 4.7155 | 4.7181 |
| 39 | 4.7207 | 4.7233 | 4.7259 | 4.7285 | 4.7311 | 4.7337 | 4.7363 | 4.7389 | 4.7415 | 7.7441 |
| 40 | 4.7467 | 4.7492 | 4.7518 | 4.7544 | 4.7570 | 4.7596 | 4.7622 | 4.7647 | 4.7673 | 4.7699 |
| 41 | 4.7725 | 4.7750 | 4.7776 | 4.7802 | 4.7828 | 4.7853 | 4.7879 | 4.7904 | 4.7930 | 4.7955 |
| 42 | 4.7981 | 4.8007 | 4.8032 | 4.8058 | 4.8083 | 4.8109 | 4.8134 | 4.8160 | 4.8185 | 4.8211 |
| 43 | 4.8236 | 4.8262 | 4.8287 | 4.8313 | 4.8338 | 4.8363 | 4.8389 | 4.8414 | 4.8440 | 4.8465 |
| 44 | 4.8490 | 4.8516 | 4.8541 | 4.8566 | 4.8592 | 4.8617 | 4.8642 | 4.8668 | 4.8693 | 4.8718 |

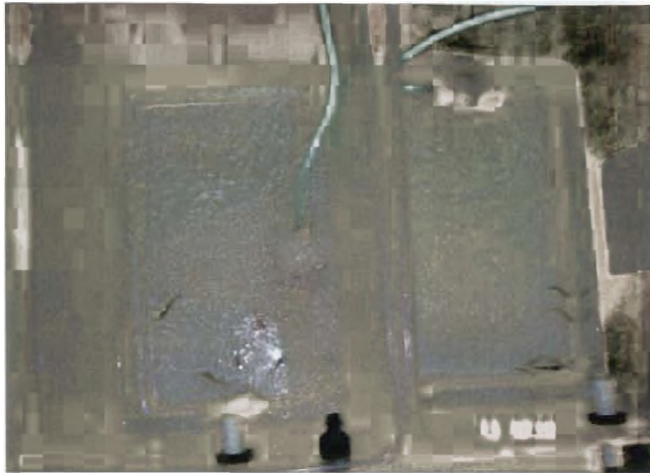
| | | | | | | | | | | |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 45 | 4.8743 | 4.8769 | 4.8794 | 4.8819 | 4.8844 | 4.8870 | 4.8895 | 4.8920 | 4.8945 | 4.8970 |
| 46 | 4.8696 | 4.9021 | 4.9046 | 4.9071 | 4.9096 | 4.9122 | 4.9147 | 4.9172 | 4.9197 | 4.9222 |
| 47 | 4.9247 | 4.9272 | 4.9298 | 4.9323 | 4.9348 | 4.9373 | 4.9398 | 4.9423 | 4.9448 | 4.9473 |
| 48 | 4.9498 | 4.9524 | 4.9549 | 4.9574 | 5.9599 | 4.9624 | 4.9649 | 4.9674 | 4.9699 | 4.9724 |
| 49 | 4.9747 | 4.9774 | 4.9799 | 4.9825 | 4.9850 | 4.9875 | 4.9900 | 4.9925 | 4.9950 | 4.9975 |
| 50 | 5.0000 | 5.0025 | 5.0050 | 5.0075 | 5.0100 | 5.0125 | 5.0150 | 5.0175 | 5.0201 | 5.0226 |
| 51 | 5.0251 | 5.0276 | 5.0301 | 5.0326 | 5.0351 | 5.0376 | 5.0401 | 5.0426 | 5.0451 | 5.0476 |
| 52 | 5.0502 | 5.0527 | 5.0552 | 5.0577 | 5.0602 | 5.0627 | 5.0652 | 5.0677 | 5.0702 | 5.0728 |
| 53 | 5.0753 | 5.0778 | 5.0803 | 5.0828 | 5.0853 | 5.0878 | 5.0409 | 5.0929 | 5.0954 | 5.0979 |
| 54 | 5.1004 | 5.1030 | 5.1055 | 5.1080 | 5.1105 | 5.1130 | 5.1156 | 5.1181 | 5.1206 | 5.1231 |
| 55 | 5.1257 | 5.1282 | 5.1307 | 5.1332 | 5.1358 | 5.1383 | 5.1408 | 5.1434 | 5.1459 | 5.1484 |
| 56 | 5.1510 | 5.1535 | 5.1560 | 5.1586 | 5.1611 | 5.1637 | 5.1662 | 5.1687 | 5.1713 | 5.1738 |
| 57 | 5.1764 | 5.1789 | 5.1815 | 5.1840 | 5.1866 | 5.1891 | 5.1917 | 5.1942 | 5.1968 | 5.1993 |
| 58 | 5.2019 | 5.2045 | 5.2070 | 5.2096 | 5.2121 | 5.2147 | 5.2173 | 5.2198 | 5.2224 | 5.2250 |
| 59 | 5.2275 | 5.2301 | 5.2327 | 5.2353 | 5.2378 | 5.2404 | 5.2430 | 5.2456 | 5.2482 | 5.2508 |
| 60 | 5.2533 | 5.2559 | 5.2585 | 5.2611 | 5.2637 | 5.2663 | 5.2689 | 5.2715 | 5.2741 | 5.2767 |
| 61 | 5.2793 | 5.2819 | 5.2845 | 5.2871 | 5.2898 | 5.2924 | 5.2950 | 5.2976 | 5.3002 | 5.3029 |
| 62 | 5.3055 | 5.3081 | 5.3107 | 5.3134 | 5.3160 | 5.3186 | 5.3213 | 5.3239 | 5.3266 | 5.3292 |
| 63 | 5.3319 | 5.3345 | 5.3372 | 5.3398 | 5.3425 | 5.3451 | 5.3475 | 5.3505 | 5.3531 | 5.3558 |
| 64 | 5.3585 | 5.3614 | 5.3638 | 5.3665 | 5.3692 | 5.3719 | 5.3745 | 5.3772 | 5.3799 | 5.3826 |
| 65 | 5.3853 | 5.3880 | 5.3907 | 5.3004 | 5.3961 | 5.3989 | 5.4016 | 5.4043 | 5.4070 | 5.4097 |
| 66 | 5.4125 | 5.4112 | 5.4179 | 5.4207 | 5.4234 | 5.4261 | 5.4289 | 5.4316 | 5.4344 | 5.4372 |
| 67 | 5.4399 | 5.4427 | 5.4454 | 5.4482 | 5.4510 | 5.4538 | 5.4566 | 5.4593 | 5.4621 | 5.4649 |
| 68 | 5.4677 | 4.4705 | 5.4733 | 5.4761 | 5.4789 | 5.4817 | 5.4845 | 5.4874 | 5.4902 | 5.4930 |
| 69 | 5.4959 | 5.4987 | 5.5015 | 5.5044 | 5.5072 | 5.5101 | 5.5129 | 5.5158 | 5.5187 | 5.5215 |
| 70 | 5.5244 | 5.5273 | 5.5302 | 5.5330 | 5.5359 | 5.5388 | 5.5417 | 5.5446 | 5.5486 | 5.5505 |
| 71 | 5.5534 | 5.5563 | 5.5592 | 5.5622 | 5.5651 | 5.5681 | 5.5710 | 5.5740 | 5.5769 | 5.5799 |
| 72 | 5.5828 | 5.5858 | 5.5888 | 5.5918 | 5.5948 | 5.5978 | 5.6008 | 5.6038 | 5.6068 | 5.6098 |
| 73 | 5.6128 | 5.6158 | 5.6189 | 5.6219 | 5.6250 | 5.6280 | 5.6311 | 5.6341 | 5.6372 | 5.6403 |
| 74 | 5.6433 | 5.6464 | 5.6495 | 5.6526 | 5.6557 | 5.6588 | 5.6620 | 5.6651 | 5.6682 | 5.6713 |
| 75 | 5.6745 | 5.6776 | 5.6808 | 5.6840 | 5.6871 | 5.6903 | 5.6935 | 5.6967 | 5.6999 | 5.7031 |
| 76 | 5.7063 | 5.7095 | 5.7128 | 5.7160 | 5.7192 | 5.7225 | 5.7257 | 5.7290 | 5.7323 | 5.7356 |
| 77 | 5.7388 | 5.7421 | 5.7454 | 5.7488 | 5.7521 | 5.7554 | 5.7588 | 5.7621 | 5.7655 | 5.7688 |
| 78 | 5.7722 | 5.7756 | 5.7790 | 5.7824 | 5.7858 | 5.7892 | 5.7926 | 5.7961 | 5.7995 | 5.8030 |
| 79 | 5.8064 | 5.8099 | 5.8134 | 5.8169 | 5.8204 | 5.8239 | 5.8274 | 5.8310 | 5.8345 | 5.8381 |
| 80 | 5.8416 | 5.8542 | 5.8488 | 5.8524 | 5.8560 | 5.8596 | 5.8633 | 5.8669 | 5.8705 | 5.8742 |
| 81 | 5.8779 | 5.8816 | 5.8853 | 5.8890 | 5.8927 | 5.8965 | 5.9002 | 5.9040 | 5.9078 | 5.9116 |
| 82 | 5.9154 | 5.9192 | 5.9230 | 5.9269 | 5.9307 | 5.9346 | 5.9385 | 5.9424 | 5.9463 | 5.9502 |
| 83 | 5.9542 | 5.9581 | 5.9621 | 5.9661 | 5.9701 | 5.9741 | 5.9782 | 5.9822 | 5.9863 | 5.9904 |
| 84 | 5.9945 | 5.9986 | 6.0027 | 6.0069 | 6.0110 | 6.0151 | 6.0194 | 6.0237 | 6.0279 | 6.0322 |
| 85 | 6.0364 | 6.0407 | 6.0450 | 6.0494 | 6.0537 | 6.0581 | 6.0625 | 6.0669 | 6.0714 | 6.0758 |
| 86 | 6.0803 | 6.0848 | 6.0993 | 6.0939 | 6.0985 | 6.1031 | 6.1077 | 6.1123 | 6.1170 | 6.1217 |
| 87 | 6.1264 | 6.1311 | 6.1359 | 6.1407 | 6.1455 | 6.1503 | 6.1552 | 6.1601 | 6.1650 | 6.1700 |
| 88 | 6.1750 | 6.1800 | 6.1850 | 6.1901 | 6.1952 | 6.2004 | 6.2055 | 6.2107 | 6.2160 | 6.2212 |
| 89 | 6.2265 | 6.2319 | 6.2372 | 6.2426 | 6.2481 | 6.2536 | 6.2591 | 6.2646 | 6.2702 | 6.2759 |
| 90 | 6.2816 | 6.2873 | 6.2930 | 6.2988 | 6.3047 | 6.3106 | 6.3165 | 6.3225 | 6.3285 | 6.3346 |
| 91 | 6.3408 | 6.3469 | 6.3532 | 6.3595 | 6.3658 | 6.3722 | 6.3787 | 6.3852 | 6.3917 | 6.3984 |
| 92 | 6.4051 | 6.4118 | 6.4187 | 6.4255 | 6.4325 | 6.4395 | 6.4466 | 6.4538 | 6.4611 | 6.4684 |
| 93 | 6.4758 | 6.4833 | 6.4909 | 6.4985 | 6.5063 | 6.5141 | 6.5220 | 6.5301 | 6.5382 | 6.5464 |
| 94 | 6.5548 | 6.5632 | 6.5718 | 6.5805 | 6.5893 | 6.5892 | 6.6072 | 6.6164 | 6.6258 | 6.6352 |
| 95 | 6.6449 | 6.6546 | 6.6646 | 6.6747 | 6.6849 | 6.6954 | 6.7060 | 6.7169 | 6.7279 | 6.7392 |
| 96 | 6.7507 | 6.7624 | 6.7744 | 6.7866 | 6.7991 | 6.8119 | 6.8250 | 6.8384 | 6.8522 | 6.8663 |
| 97 | 6.8808 | 6.8975 | 6.9110 | 6.9268 | 6.9431 | 6.9600 | 6.9774 | 6.9954 | 7.0141 | 7.0335 |
| 98.0 | 7.0537 | 7.0558 | 7.0579 | 7.0600 | 7.0621 | 7.0642 | 7.0663 | 7.0684 | 7.0706 | 7.0727 |
| 98.1 | 7.0749 | 7.0770 | 7.0792 | 7.0814 | 7.0836 | 7.0858 | 7.0880 | 7.0902 | 7.0924 | 7.0947 |
| 98.2 | 7.0969 | 7.0992 | 7.1015 | 7.1038 | 7.1061 | 7.1084 | 7.1107 | 7.1130 | 7.1154 | 7.1177 |
| 98.3 | 7.1201 | 7.1224 | 7.1248 | 7.1272 | 7.1297 | 7.1321 | 7.1345 | 7.1370 | 7.1394 | 7.1419 |
| 98.4 | 7.1444 | 7.1469 | 7.1494 | 7.1520 | 7.1545 | 7.1571 | 7.1596 | 7.1622 | 7.1648 | 7.1675 |

| | | | | | | | | | | |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 98.5 | 7.1701 | 7.1727 | 7.1754 | 7.1781 | 7.1808 | 7.1835 | 7.1862 | 7.1890 | 7.1917 | 7.1945 |
| 98.6 | 7.1973 | 7.2001 | 7.2029 | 7.2058 | 7.2086 | 7.2115 | 7.2144 | 7.2173 | 7.2203 | 7.2232 |
| 98.7 | 7.2262 | 7.2292 | 7.2322 | 7.2353 | 7.2383 | 7.2414 | 7.2445 | 7.2476 | 7.2508 | 7.2539 |
| 98.8 | 7.2571 | 7.2603 | 7.2636 | 7.2668 | 7.2701 | 7.2734 | 7.2768 | 7.2801 | 7.2835 | 7.2869 |
| 98.9 | 7.2904 | 7.2938 | 7.2973 | 7.3009 | 7.3044 | 7.3080 | 7.3116 | 7.3152 | 7.3189 | 7.3226 |
| 99.0 | 7.3263 | 7.3301 | 7.3339 | 7.3378 | 7.3416 | 7.3455 | 7.3495 | 7.3535 | 7.3585 | 7.3615 |
| 99.1 | 7.3656 | 7.3698 | 7.3739 | 7.3181 | 7.3824 | 7.3867 | 7.3911 | 7.3954 | 7.3999 | 7.4044 |
| 99.2 | 7.4089 | 7.4135 | 7.4181 | 7.4228 | 7.4276 | 7.4324 | 7.4372 | 7.4422 | 7.4471 | 7.4522 |
| 99.3 | 7.4573 | 7.4624 | 7.4677 | 7.4730 | 7.4783 | 7.4838 | 7.4893 | 7.4949 | 7.5006 | 7.5063 |
| 99.4 | 7.5121 | 7.5181 | 7.5241 | 7.5302 | 7.5364 | 7.3427 | 7.9451 | 7.5556 | 7.5622 | 7.5690 |
| 99.5 | 7.5758 | 7.5828 | 7.5899 | 7.5972 | 7.6045 | 7.6121 | 7.6197 | 7.6276 | 7.6356 | 7.6437 |
| 99.6 | 7.6521 | 7.6606 | 7.6693 | 7.6783 | 7.6874 | 7.6968 | 7.7065 | 7.7164 | 7.7266 | 7.7370 |
| 99.7 | 7.7478 | 7.7589 | 7.7703 | 7.7822 | 7.7944 | 7.8070 | 7.8202 | 7.8338 | 7.8480 | 7.8627 |
| 99.8 | 7.8782 | 7.8943 | 7.9112 | 7.9290 | 7.9478 | 7.9677 | 7.9889 | 8.0115 | 8.0357 | 8.0618 |
| 99.9 | 8.0902 | 8.1214 | 8.1559 | 8.1947 | 8.2398 | 8.2905 | 8.3528 | 8.4316 | 8.5401 | 8.7190 |

Πίνακας 3.6 Συντελεστές βαρύτητας για το αναμενόμενο probit.

| ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟ PROBIT | ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΒΑΡΥΤΗΤΑΣ |
|---------------------------|------------------------------|
| 2.0 ή 8.0 | 0.015 |
| 2.1 7.9 | 0.019 |
| 2.2 7.8 | 0.025 |
| 2.3 7.7 | 0.031 |
| 2.4 7.6 | 0.040 |
| 2.5 ή 7.5 | 0.050 |
| 2.6 7.4 | 0.062 |
| 2.7 7.3 | 0.076 |
| 2.8 7.2 | 0.092 |
| 2.9 7.1 | 0.110 |
| 3.0 ή 7.0 | 0.131 |
| 3.1 6.9 | 0.154 |
| 3.2 6.8 | 0.180 |
| 3.3 6.7 | 0.208 |
| 3.4 6.6 | 0.237 |
| 3.5 ή 6.5 | 0.269 |
| 3.6 6.4 | 0.302 |
| 3.7 6.3 | 0.336 |
| 3.8 6.2 | 0.370 |
| 3.9 6.1 | 0.405 |
| 4.0 ή 6.0 | 0.439 |
| 4.1 5.9 | 0.471 |
| 4.2 5.8 | 0.503 |
| 4.3 5.7 | 0.532 |
| 4.4 5.6 | 0.558 |
| 4.5 ή 5.5 | 0.581 |
| 4.6 5.4 | 0.601 |
| 4.7 5.3 | 0.616 |
| 4.8 5.2 | 0.627 |
| 4.9 5.1 | 0.634 |
| 5.0 | 0.637 |

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ



Σχήμα 1. Γόνος λαβρακιού μετά την είσοδο της αμμωνίας στα ενυδρεία. Διακρίνεται ο σκούρος χρωματισμός του δέρματος.



Σχήμα 2. Γόνος λαβρακιού που επιβίωσε της τοξικότητας της αμμωνίας. Διακρίνονται οι αιμορραγικές περιοχές στο βραγχιακό επικάλυμμα



Σχήμα 3. Γόνος τσιπούρας αμέσως μετά την εισαγωγή των νιτρικών.



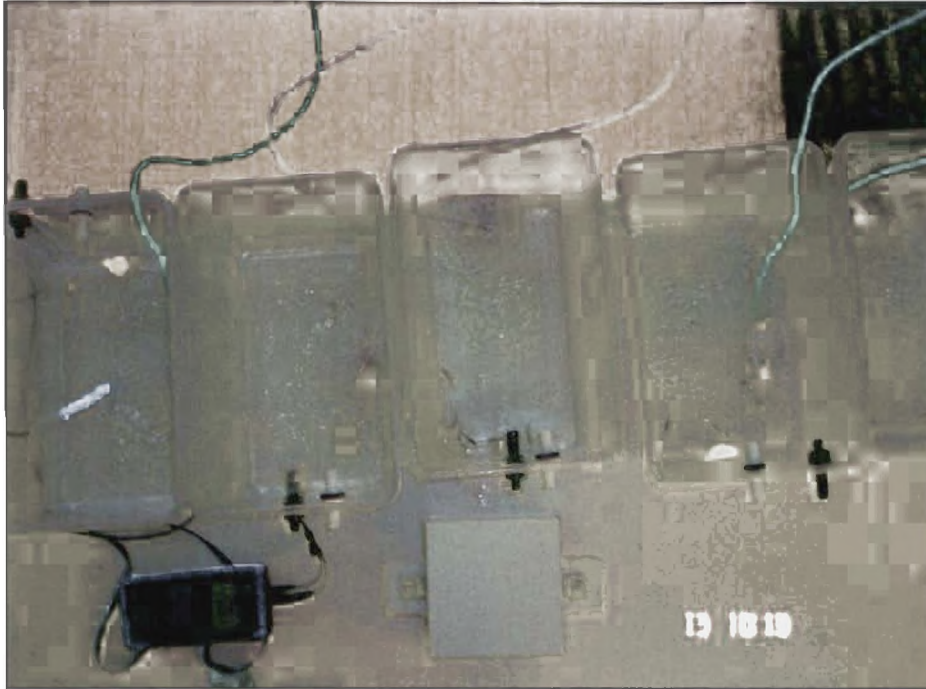
Σχήμα 4. Γόνος τσιπούρας αρκετές ώρες μετά την εισαγωγή των νιτρικών στα ενυδρεία. Ο χρωματισμός των ατόμων έχει αρχίσει να σκουραίνει.



Σχήμα 5. Άτομο στο οποίο διακρίνεται καθαρά η καταστροφή του βραγχιακού επικαλύμματος, μετά την έξοδο του από το πειραματικό ενυδρείο.



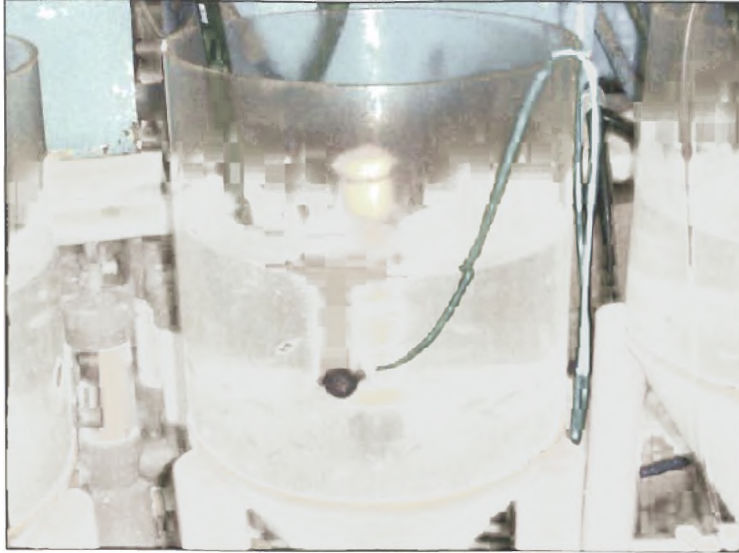
Σχήμα 6. Τα νεκρά ψάρια απομακρύνονταν από τα πειραματικά ενυδρεία και καταγράφονταν το μήκος και το βάρος τους.



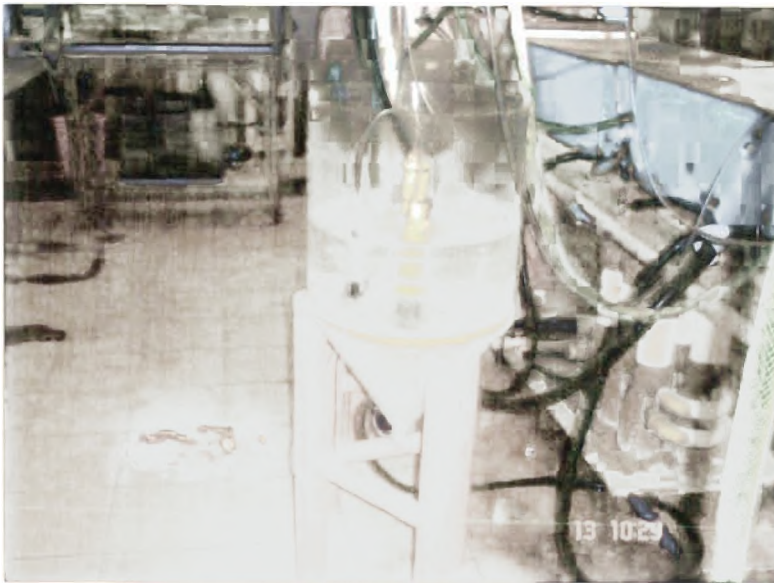
Σχήμα 7. Τα πειραματικά ενυδρεία.



Σχήμα 8. Μία από τις κυλινδροκωνικές δεξαμενές, οι οποίες αποτελούν τμήμα κλειστού κυκλώματος εκτροφής. Από τη συγκεκριμένη δεξαμενή λαμβάνονταν τα λαβράκια που αποτελούσαν τον πειραματικό πληθυσμό.



Σχήμα 9. Μία άλλη δεξαμενή, από την οποία λαμβάνονταν οι τσιπούρες που προορίζονταν να αποτελέσουν τον πειραματικό πληθυσμό.



Σχήμα 10. Δεξαμενή στην οποία τοποθετούνταν τα λαβράκια προς ανάρρωση, μετά το πέρας του πειραματικού 24ώρου.



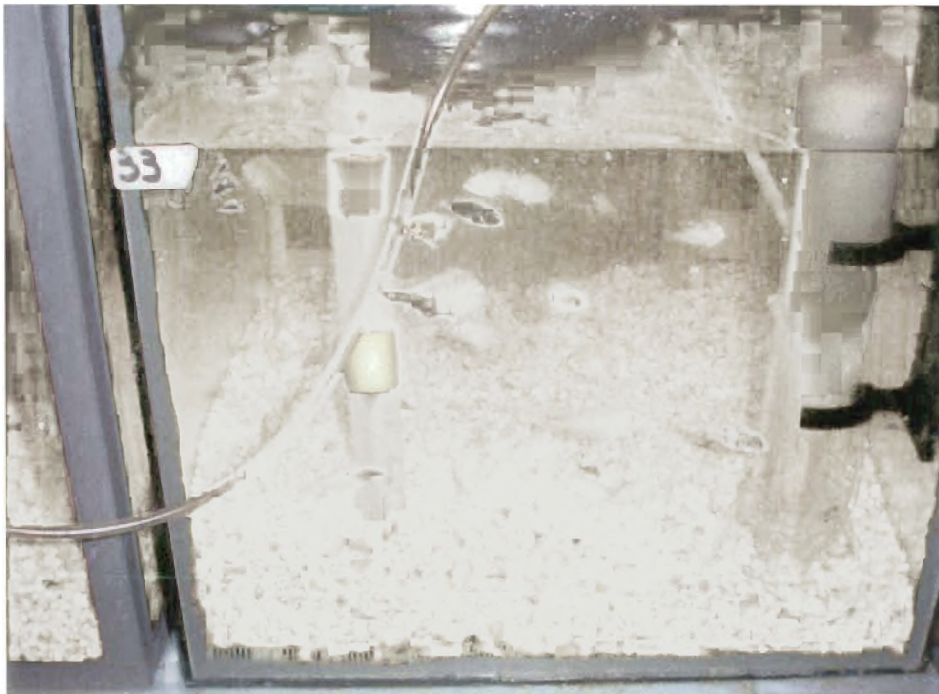
Σχήμα 11. Τα ενυδρεία στα οποία τοποθετήθηκαν για εγκλιματισμό οι τσιπούρες μετά τον ερχομό τους από τον ιχθυογεννητικό σταθμό.



Σχήμα 12. Ενυδρείο στο οποίο τοποθετήθηκαν λαβράκια που επιβίωσαν των πειραμάτων, αρκετούς μήνες μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας.



Σχήμα 13. Μία όψη των κυλινδροκωνικών δεξαμενών.



Σχήμα 14. Τσιπούρες ου δεν χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, σε ενυδρείο με βιολογικό φίλτρο βυθού και φίλτρο skimmer.