

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«Υδατοκαλλιέργειες» -  
«Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδρόβιων Οργανισμών»**

**ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ ΜΕ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ-ΑΛΙΕΙΑΣ ΤΟΥ Τ.Ε.Ι. ΗΠΕΙΡΟΥ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:**

**“ Επίδραση του εντομοκτόνου dimilin (diflubenzuron) στην αύξηση του μικροφύκου *Pavlova lutheri*, στην επιβιωσιμότητα του τροχόζωου *Brachionus plicatilis* καθώς και στην επιβιωσιμότητα των ιχθυδίων τσιπούρας (*Sparus aurata*)**

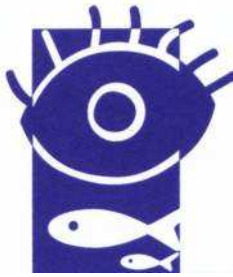
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ**

Ματθαίος Φουρλίγκας

**ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

Ιωάννης Βάτσος

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2010



UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

---

**POSTGRADUATE STUDIES PROGRAM**

***“Aquaculture” – “Aquatic Animal Health”***

***IN COLLABORATION WITH  
THE DEPARTMENT OF AQUACULTURE & FISHERIES, TEI OF EPIRUS***

**Thesis:**

***“Effect of the insecticide dimilin (diflubenzuron) on the growth of microalgae *Pavlova lutheri*, the viability of the rotifer *Brachionus plicatilis* and the viability of the sea bream (*Sparus aurata*) juveniles”***

**POSTGRADUATE STUDENT**

Matthaios Fourligkas

**SUPERVISOR**

Ioannis Vatsos

KARDITSA 2010

***Στην οικογένεια μου***

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χημική ουσία diflubenzuron (εμπορικό όνομα Dimilin) (DFB) αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο εντομοκτόνο που δρα μέσω της αναστολής της σύνθεσης της χιτίνης η οποία στα έντομα συμβάλλει στο σχηματισμό του εξωσκελετού, κατά τη διαδικασία της έκδυσης. Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στην επίδραση της ουσίας αυτής στην αύξηση του μικροφύκους *Pavlova lutheri* καθώς και στην επιβιωσιμότητα του τροχόζωου *Brachionus plicatilis* και των ιχθυδίων *Sparus aurata*. Οι δύο πρώτοι οργανισμοί χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην εντατική θαλάσσια καλλιέργεια όπου αποτελούν τη διατροφή των διαφόρων νυμφικών σταδίων ανάπτυξης των ιχθυδίων. Επιπλέον η τσιπούρα *Sparus aurata* αποτελεί ένα από τα δύο κυριότερα εκτρεφόμενα είδη στις μεσογειακές και ελληνικές θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες. Οι συγκεντρώσεις της ουσίας που εξετάστηκαν ήταν για το μικροφύκος 500, 100, 50 και 25 ppm ενώ για τα τροχόζωα ήταν 100, 50 και 25 ppm. Όσον αφορά τα ιχθύδια τσιπούρας, οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν αναφέρονταν στα 1500, 1000 και 500 ppm. Η έκθεση των οργανισμών αυτών στο DFB διήρκησε 4 ημέρες για το κάθε είδος. Πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση όλων των οργανισμών σε όλες τις συγκεντρώσεις του DFB κατά την περίοδο αυτή. Παράλληλα, στα ιχθύδια έγινε και ιστολογική εξέταση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στη μεγαλύτερη συγκέντρωση DFB αναστέλλεται σημαντικά ( $P \leq 0,05$ ) η ανάπτυξη του μικροφύκους. Για το τροχόζωο *B. plicatilis* παρατηρήθηκε τάση αρνητικής επίδρασης στην επιβίωσή του καθώς η συγκέντρωση του DFB αυξανόταν, ενώ στα ιχθύδια *Sparus aurata* παρατηρήθηκε έντονα αρνητική επίπτωση με αποτέλεσμα και το θάνατο στις υψηλές συγκεντρώσεις της ουσίας και ελάχιστη έως μηδενική στη χαμηλότερη συγκέντρωση του εντομοκτόνου. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις diflubenzuron από αυτές που μπορεί να συναντήσουμε σε κάποιο υδάτινο περιβάλλον αλλά αυτό έγινε για να διερευνηθούν τα όρια αντοχής των οργανισμών που μελετήθηκαν.

## ABSTRACT

Diflubenzuron (commercial name Dimilin) is a widely used insecticide; it inhibits the synthesis of chitin and interferes with the formation of the cuticle (exoskeleton) of the insects, at the time of molting. The present study aimed to investigate the effect of this insecticide on the growth of the microalgae *Pavlova lutheri* as well as the viability of the rotifer *Brachionus plicatilis*, and the sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. The first two organisms are used widely in intensive marine aquaculture to feed several larval stages of marine fishes. Furthermore *Sparus aurata* is one of the two most important cultured fish species in the Mediterranean and especially in Greek marine aquaculture. The concentrations of DFB that were studied for the microalgae, were 500, 100, 50, 25 ppm, and for the rotifers 100, 50 and 25 ppm. As for the sea bream, the concentrations of DFB that were examined were: 1500, 1000 and 500 ppm. The experiment lasted for 4 days for each organism. Each day, enumeration of the microalgal cells as well as the rotifers that were maintained in each concentration took place. Concerning the survival of sea bream, apart from the daily recording of the dead fish, fish were also collected for histological examination in order to investigate the effects of this pesticide on the tissues of the fish. The results showed that in the highest concentration of DFB, the growth of the *P. lutheri* was significantly inhibited ( $P \leq 0,05$ ). Concerning the viability of *B. plicatilis*, the study indicated that the survival of the organisms was affected negatively as the concentration of DFB increased. Furthermore the results for sea bream showed a strong lethal effect at the two highest concentrations of DFB (1500 and 1000 ppm) and negligible effect at 500 ppm. At the present study, the concentrations of DFB that were examined were particularly high, higher than the ones we can find in the aquatic environment but this was done so that we can examine the survival limits of the three studied organisms.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέποντα μου Λέκτορα Ιχθυολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής Α.Π.Θ, κύριο Ιωάννη Βάτσο για την πολύτιμη βοήθεια του στην προετοιμασία και οργάνωση της διπλωματικής μου διατριβής, την συνεχή βοήθεια του κατά τη διάρκεια των πειραματισμών, την κριτική ανάγνωση του κειμένου και τις πολύτιμες συμβουλές του για την τελική μορφή της διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες στον Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιχθυολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής Α.Π.Θ, Αν. Καθηγητή κύριο Παναγιώτη Αγγελίδη, για την παραχώρηση του εργαστηρίου όπου εκπονήθηκε το πειραματικό μέρος της εργασίας αυτής, την πολύτιμη καθοδήγηση του κατά την εκτέλεση του πειράματος και τις χρήσιμες παρατηρήσεις του σε όλη τη διαδικασία πραγματοποίησης της διατριβής αυτής, αποτέλεσμα της πολυετούς εμπειρίας του.

Πολλές ευχαριστίες στην Καθηγήτρια και Πρόεδρο του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κυρία Φωτεινή Αθανασοπούλου και μέλους της συμβουλευτικής επιτροπής για την καθοδήγηση της στην διαδικασία επιλογής του θέματος και την κριτική ανάγνωση του κειμένου.

Επίσης θερμές ευχαριστίες στον συνάδελφο και πολύτιμο συνεργάτη Χρήστο Μαντσούκη, κτηνίατρο, για την άριστη συνεργασία μας στην διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της διπλωματικής διατριβής.

Τέλος ένα ευχαριστώ από καρδιάς στους φίλους Χαληγιάννη Ηλία κτηνίατρο, υποψήφιο διδάκτορα για την κοινή μας διαδρομή και συνεργασία κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού αυτού και Θεόφιλο Παπαδόπουλο κτηνίατρο για τη βοήθεια του σε όλη την περίοδο πραγματοποίησης αυτής της εργασίας.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Αφιερώσεις .....	3
Περίληψη .....	4
Abstract.....	5
Ευχαριστίες.....	6
Περιεχόμενα.....	7

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
1.1 Φυτοφάρμακα και περιβάλλον .....	9
1.2 DIFLUBENZURON .....	11

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ DIFLUBENZURON ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΣ *PAVLOVA LUTHERI*, ΣΤΟ ΤΡΟΧΟΖΩΟ *BRACHIONUS PLICATILIS* ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΤΣΙΠΟΥΡΑ (*SPARUS AURATA*)

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	20
2.1.1 Μικροφύκη - <i>Pavlova lutheri</i> .....	21
2.1.2 Τροχόζωα (Rotifers) - <i>Brachionus plicatilis</i> .....	24
2.1.3 Τσιπούρα - <i>Sparus aurata</i> .....	30
2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	36
2.2.1 Μικροφύκη - <i>Pavlova Lutheri</i> .....	36
2.2.2 Τροχόζωα - <i>Brachionus plicatilis</i> .....	41
2.2.3. Ιχθύδια <i>sparus aurata</i> .....	43

2.3	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....	45
2.4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	47
2.4.1	Μικροφύκη - <i>Pavlova Lutheri</i> .....	47
2.4.2	Τροχόζωα - <i>Brachionus plicatilis</i> .....	49
2.4.3.	Ιχθύδια <i>sparus aurata</i> .....	50

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>.**

ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	60
ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ .....	69



# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Τις τελευταίες δεκαετίες η χρήση των διαφόρων φυτοφαρμάκων και ιδιαίτερος των εντομοκτόνων, είχε ως βασικό στόχο την προστασία της φυτικής παραγωγής. Η σημασία τους υπήρξε μεγάλη ακόμη και για την προστασία της ζωής των ανθρώπων. Ο Dajoz αναφέρει ότι, το χειμώνα του 1944 η χρήση εντομοκτόνων (και πιο συγκεκριμένα του ισχυρότατου DDT) επέτρεψε την αναχαίτιση της επιδημίας τύφου, η οποία οδήγησε στο θάνατο 1.400 άτομα, και απείλησε 2.500.000 στην περιοχή της Νάπολης. Ο έλεγχος της ελονοσίας είναι επίσης αποτέλεσμα εντομοκτόνων. Η σύγχρονη γεωργία παρασύρεται όμως, ολοένα και περισσότερο στην αλόγιστη χρήση χημικών τόσο σε ανόργανη όσο και σε οργανική μορφή. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τα φυτοφάρμακα εξ' αιτίας της μεγάλης τους ποικιλότητας, αλλά και της αυξημένης τοξικότητας, να καταστήσουν τη γεωργία τη μεγαλύτερη πηγή ρύπανσης των υδάτινων οικοσυστημάτων (Vinten et al. 1991). Σε ευρωπαϊκό επίπεδο, υπάρχει μεγάλος αριθμός μελετών για την ρύπανση ποτάμιων οικοσυστημάτων στις βόρειες χώρες.

Τα εντομοκτόνα ακόμη και όταν χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση συγκεκριμένου εχθρού, είναι δυνατόν να επιφέρουν βασικές αλλαγές στο σύνολο του οικοσυστήματος. Η εξαφάνιση ακόμη και ενός μόνο οργανισμού από ένα οικοσύστημα οδηγεί στη αλλοίωση της φυσιογνωμίας του, και στην αποσταθεροποίηση ισορροπιών που στηρίζονται σε μια σειρά βιολογικών ελέγχων, και οι οποίοι αναπτύχθηκαν δια μέσου του χρόνου. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα εντομοκτόνα μπορούν να διασπαρούν πολύ εύκολα και να μεταφερθούν μέχρι τους ποταμούς και τις θάλασσες. Ως ενώσεις χαρακτηρίζονται δύσκολα βιοαποικοδομήσιμες, γεγονός που εξασφαλίζει μακρότατη παραμονή τους στα φυσικά οικοσυστήματα. Επιπλέον, έχουν την ικανότητα βιο-μεγέθυνσης, χάρις στην οποία ανεβαίνοντας στην τροφική αλυσίδα, οι τελικές συγκεντρώσεις φυτοφαρμάκων στο σώμα των πουλιών και των θηλαστικών μπορεί να είναι μερικά εκατομμύρια φορές υψηλότερες από τις αρχικές συγκεντρώσεις στη βάση της (νερό, φυτοπλαγκτόν, φυτά).

Τα εντομοκτόνα μετά την χρήση τους στα φυτά ή στο έδαφος υφίστανται μια σειρά διεργασιών φυσικών, χημικών και βιολογικών (υδρόλυση, οξείδωση, διάσπαση, μεταφορά, εξάτμιση, ριζική πρόσληψη από τα φυτά κ.α.) και ρυπαίνουν το έδαφος, τα νερά και μέσω αυτών, μεταφέρονται στα φυτικούς και ζωικούς ιστούς μέχρι και στον άνθρωπο (McMinn *et al.*, 1983; Erehse, 1974). Υπάρχουν σήμερα αρκετές αποδείξεις ότι τα μόρια πολλών εντομοκτόνων και κυρίως των χλωριωμένων εντομοκτόνων διατηρούνται στο έδαφος και στο νερό για χρόνια ή δεκαετίες και η συγκέντρωσή τους από τρισεκατομμυριοστά στο υδάτινο περιβάλλον, μπορεί να βιο-μεγεθυνθεί 105-107 φορές στους ιστούς των ασπόνδυλων, των ψαριών, των πουλιών, και των θηλαστικών και τελικά η συγκέντρωση να φτάσει σε εκατομμυριοστά (ppm) στα ζώα (Αγγελίδης, 1982).

Η αντοχή και η παραμονή των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων (εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα κλπ.) και η μεταφορά τους από και διαμέσου του εδάφους αποτελεί τον πρώτο παράγοντα της ρύπανσης του περιβάλλοντος. Οι χημικές αντιδράσεις και η φυσική μεταφορά των μορίων των φυτοφαρμάκων καθορίζουν επίσης τον βαθμό της ρύπανσης. Οι ενώσεις μεγάλης διαλυτότητας στο νερό και αντοχής στις διασπάσεις (χημικές, φωτοχημικές και βιολογικές) είναι αυτές που πολύ γρήγορα φτάνουν στα οικοσυστήματα σε μεγάλες ποσότητες. Αν οι παραπάνω ιδιότητες τους συνδυάζονται με την τοξικότητα και πιθανή καρκινογένεση, τότε συνιστούν ένα μεγάλο κίνδυνο για το περιβάλλον.

Η ρύπανση των επιφανειακών νερών μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις σε όλα τα επίπεδα ενός οικοσυστήματος. Μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην υγεία των οργανισμών που βρίσκονται χαμηλά στην τροφική αλυσίδα και, συνεπώς, στη διαθεσιμότητα τροφής στα μεσαία και υψηλότερα στρώματα της τροφικής αλυσίδας. Μπορεί επίσης, να υποβαθμίσει τους υγροτόπους και να περιορίσει τη δυνατότητά τους να υποστηρίξουν τα τοπικά οικοσυστήματα και να ελέγξουν την ποιότητα του νερού της απορροής. Το ρυπασμένο επιφανειακό νερό μπορεί επίσης να έχει επιπτώσεις στην υγεία των ζώων, των ανθρώπων ή των υδρόβιων οργανισμών.

Τα στατιστικά στοιχεία από τις χρήσεις των φυτοφαρμάκων στη Ελλάδα τα τελευταία χρόνια (Δ/νση Φυτοπροστασίας, Υπουργείο Γεωργίας) δείχνουν ότι από τις τρεις βασικές κατηγορίες φυτοφαρμάκων, χρησιμοποιούνται σε καθαρή ουσία περίπου 3.250 τόνοι εντομοκτόνων, 3.440 τόνοι ζιζανιοκτόνων και 2.800 τόνοι οργανικών μυκητοκτόνων. Από το σύνολο των φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται στη χώρα μας αυτά που εφαρμόζονται περισσότερο, έχουν ταχύτερη μεταφορά στο οικοσύστημα και συνδυάζουν σοβαρές επιπτώσεις όπως τοξικότητα, καρκινογένεση κ.ά. (Κουϊμτζής και συν. 1993).

## 1.2 DIFLUBENZURON

Μια ομάδα εντομοκτόνων, που δρουν ως ρυθμιστές της ανάπτυξης των εντόμων, έχουν αναγνωρισθεί τα τελευταία χρόνια, ως τα σημαντικότερα εντομοκτόνα νέας γενιάς. Μια από τις πιο γνωστές ουσίες που ανήκουν σε αυτήν την ομάδα είναι το Diflubenzuron (DFB). Το Diflubenzuron [1-χλωροφαινόλη-3-(2,6-διφλουοροβενζόλη ουρία) εμπορική ονομασία Dimilin] είναι ένα εντομοκτόνο τρίτης γενιάς, το οποίο χρησιμοποιείται ευρύτατα και κατά κύριο λόγο στη γεωργία στα περισσότερα είδη καλλιεργειών καθώς και στα δάση. Πρόκειται για την πλέον χρησιμοποιημένη ουσία από την οικογένεια των Βενζοφαινυλ-ουριών. Θεωρείται ως μη διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου με βιολογική δράση καθώς αναστέλλει τη σύνθεση της χιτίνης, και παρεμβαίνει έτσι στο σχηματισμό της επιδερμίδας του εξωσκελετού των εντόμων μέσω της παρεμπόδισης της ενσωμάτωσης της Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης στη χιτίνη (Nakagawa *et al.*, 1993). Δρα κατά το στάδιο της εκκόλαψης των αυγών ή της αποδερμάτωσης των προνυμφών. Δεν παρουσιάζει διασυστηματική δραστηριότητα και δεν διαπερνά τους ιστούς των φυτών. Κατά συνέπεια τα έντομα που τρέφονται απομυζητικά από τα φυτά, γενικά δεν επηρεάζονται από το Diflubenzuron και έτσι παρατηρείται η επιλεκτική δράση του.

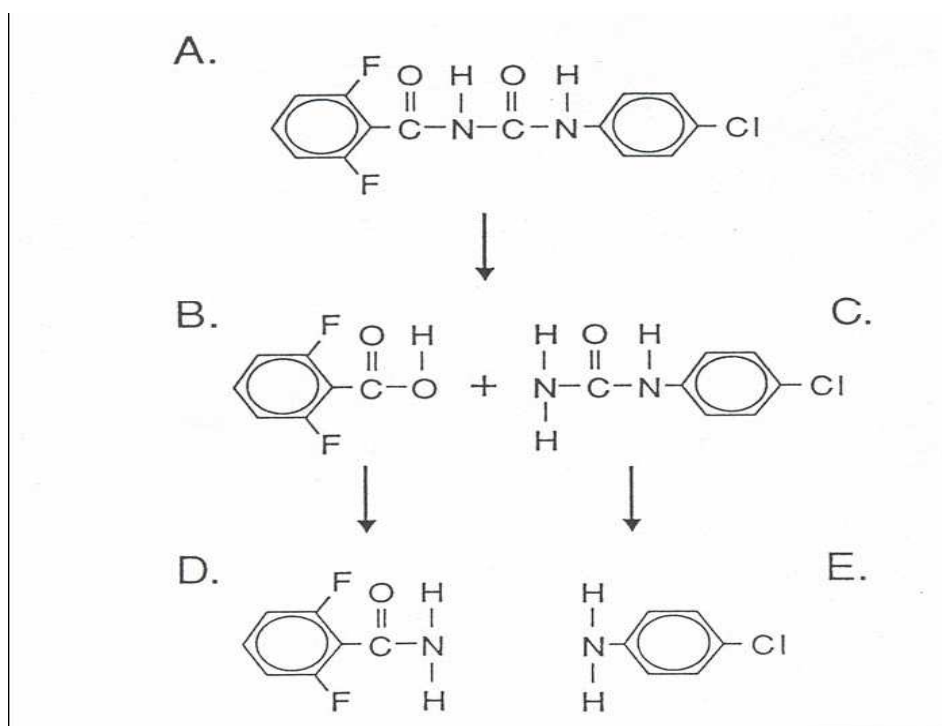
Το Diflubenzuron αναστέλλει πολύ αποτελεσματικά την ανάπτυξη πολλών ειδών εντόμων και παρασίτων, στα προνυμφικά τους κυρίως στάδια, των οικογενειών Λεπιδόπτερα, Κολεόπτερα και Δίπτερα. Στις

Ηνωμένες πολιτείες είχε εγκριθεί για χρήση από την Υπηρεσία Περιβαλλοντικής Προστασίας της Αμερικής (EPA), για την αντιμετώπιση της Λυμάντριας (*Lymantria dispar*) το 1976, του *Anthonomus grandis* το 1979, και φυλλοφάγων εντόμων στους σπόρους σόγιας το 1982. Μέχρι το 1979 χρησιμοποιούταν ήδη για οικιακή χρήση για την αντιμετώπιση των κουνουπιών, των Λεπιδόπτερων του δάσους, των μυγών των μανιταριών, και συγκεκριμένων φυλλοφάγων εντομοπαρασίτων στο κίτρο, σε διάφορα καλλωπιστικά, στα λαχανικά και στα φρούτα (Bull 1980; Nimmo et al. 1980; Gartrell 1981; Cunningham 1986; Muzzarelli 1986; Webb and Wildey 1986; Wilson and Costlow 1987; Martinat et al. 1988; Poplyk 1989).

Στην Ευρώπη και σε άλλες περιοχές το Diflubenzuron έχει χρησιμοποιηθεί και με πολλούς άλλους τρόπους. Για παράδειγμα, τόσο αυτό όσο και άλλες ουσίες της ίδιας κατηγορίας, έχουν χρησιμοποιηθεί ως προσθετικά σε τροφές για κοτόπουλα, βοοειδή και χοίρους ώστε να περιορισθεί ο πολλαπλασιασμός των προνυμφών των μυγών στα κόπρανα τους, καθώς και με τη μορφή spray απ' ευθείας στα κόπρανα πριν την απομάκρυνση τους (Opdycke et al. 1982b; Opdycke and Menzer 1984; Giga 1987). Επίσης έχει χορηγηθεί από το στόμα με τη μορφή βόλου σε κρεοπαραγωγά βοοειδή για τον περιορισμό των μυγών του προσώπου (*Musca autumnalis*) και των κεράτων (*Haematobia irritans*), δύο συχνών εντόμων των βοοειδών της Βόρειας Αμερικής, τα οποία όταν είναι ανώριμα αναπτύσσονται στα φρέσκα κόπρανα σε ανοιχτά λιβάδια. Ένας και μόνο βόλος απελευθερώνει diflubenzuron στα περιττώματα, ικανό να θανατώσει τις προνύμφες των παραπάνω εντόμων για 8 εβδομάδες ενώ παραμένει σχετικά αποτελεσματικό για 16 εβδομάδες (Scott et al. 1986).

Στην Ελλάδα το (DFB) χρησιμοποιείται ευρέως στην καταπολέμηση των κουνουπιών στην πεδιάδα της Θεσσαλονίκης και η εφαρμογή του γίνεται με αεροψεκασμούς των περιαστικών περιοχών και των ορυζώνων κατά τους θερινούς μήνες όπου υπάρχει αφθονία νερών που καταλήγουν στη παρακείμενη θάλασσα. Μερικές φορές χρησιμοποιείται και ως αντιπαρασιτικό φάρμακο για τις παρασιτώσεις των ιχθύων (Selvik et al., 2002).

Το DFB διαλύεται με υδρόλυση, αρχικά σε 2,6 διφλουοροβενζοϊκό οξύ και 4-χλωροφαινυλουρία. Στη συνέχεια με τις διαδικασίες διάσπασης του εδάφους, καθώς και μέσω του μεταβολισμού των φυτών και των ζώων, τα αρχικά αυτά προϊόντα είναι δυνατό να μετατραπούν περαιτέρω σε 2,6 διφλουοροβενζαμίδα και 4-χλωροανιλίνη (**Εικ. 1**). Τα τελικά προϊόντα είτε μετατρέπονται σε υδατοδιαλυτά προϊόντα, είτε υφίστανται βιολογική επεξεργασία και γίνονται αλκύλια και μεθύλια. Ακόμη και σε εξαιρετικά χαμηλές δόσεις, το diflubenzuron είναι δυνατόν να αναστέλλει την ικανότητα ορισμένων αρθρόποδων να συνθέσουν χιτίνη κατά το στάδιο του σχηματισμού του εξωσκελετού, με αποτέλεσμα να επιφέρει το θάνατο του οργανισμού από ρήξη της επιδερμίδας ή από ασιτία. Άλλοι πάλι οργανισμοί που έχουν χιτίνη (όπως μερικά είδη μυκήτων και θαλάσσια διάτομα), ή πολυσακχαρίτες παρόμοιους με την χιτίνη (πουλιά και θηλαστικά), δεν φαίνεται να επηρεάζονται.



**Εικ. 1.** Απλοποιημένη διαδικασία διάσπασης του diflubenzuron. Το diflubenzuron διασπάται σε 2,6 διφλουοροβενζοϊκό οξύ (B) και 4-χλωροφαινυλουρία (C). Το 2,6 διφλουοροβενζοϊκό οξύ διασπάται σε 2,6 διφλουοροβενζαμίδα (D). Η 4-χλωροφαινυλουρία διασπάται σε 4-χλωροανιλίνη. Πηγή : Eisler R. 1992

Η κινητικότητα και η διάσπαση του DFB σε ενώσεις, είναι χαμηλή στο έδαφος ενώ τα κατάλοιπα δεν ανιχνεύονται μετά από 7 ημέρες. Η διάσπαση είναι ταχύτερη με την δράση σχηματισμών μικρών (2-5  $\mu\text{m}$ ) σωματιδίων καθώς και των άφθονων βακτηρίων του εδάφους. Στο νερό συνήθως παραμένει για λίγες ημέρες, ενώ διασπάται γρηγορότερα κάτω από συνθήκες υψηλού οργανικού και ιζηματογόνου φορτίου καθώς και όταν είναι αυξημένο το pH και η θερμοκρασία του νερού.

Καθώς η τοξικότητα του diflubenzuron φαίνεται να είναι παρόμοια στα έντομα και στα καρκινοειδή, θα πρέπει να δοθεί μεγάλη προσοχή όταν χρησιμοποιείται τόσο η ουσία αυτή όσο και άλλοι αναστολείς σύνθεσης της χιτίνης, ως εντομοκτόνα σε περιοχές όπου υπάρχουν υδρόβια καρκινοειδή. Διαφορετικά μπορεί να προκληθεί οικολογική διαταραχή με επιπτώσεις στη διατροφή, το μεταβολισμό, την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και την επιβίωση μεγάλου αριθμού οργανισμών, οι οποίοι δεν αποτελούν τους αρχικούς στόχους αυτών των ουσιών (Christiansen 1986). Ειδικότερα η χρήση του DFB σε ελώδης περιοχές αναπαραγωγής κουνουπιών ή σε καλλιέργειες σε μικρότερη απόσταση από 5 km από τις ακτές, δε συνιστάται εξαιτίας της πιθανότητας της μόλυνσης των γειτονικών εκβολών, τα οποία αποτελούν τα κυρίως εκκολαπτήρια για πολλά οικονομικώς σημαντικά είδη των καρκινοειδών (Costlow 1979; Cunningham 1986; Cunningham and Myers 1986). Επίσης οι συγκεντρώσεις της ουσίας στο θαλασσινό νερό δε θα πρέπει να υπερβαίνουν τα 0.1  $\mu\text{g/L}$ , η οποία είναι η ελάχιστη συγκέντρωση που προκαλεί μετρήσιμες διαταραχές στη συμπεριφορά στις προνύμφες καρκινοειδών (Cunningham and Myers 1986).

Σε περίπτωση που το diflubenzuron, αλλά και άλλα εντομοκτόνα του ίδιου είδους συνεχίσουν να χρησιμοποιούνται κοντά σε παραγωγικά υδρόβια περιβάλλοντα, τότε είναι απαραίτητο να γίνουν μελέτες που θα αφορούν την τροφική αλυσίδα των περιοχών αυτών. Υψηλές συγκεντρώσεις της παραπάνω ουσίας σε υδρόβια φύκη, έως και 4.5  $\text{mg/kg DW}$  σε μερικές περιπτώσεις (Booth and Ferrell 1977), ενοχοποιούν το μηχανισμό της τροφικής αλυσίδας ως μέσο εξάπλωσης της μόλυνσης στα υδρόβια τροφικά δίκτυα των ασπόνδυλων. Για την προστασία συγκεκριμένων ειδών ψαριών, το DFB χρησιμοποιείται για τον περιορισμό των κωπήποδων μεταφορέων

των ανθρώπινων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων υποειδών του είδους *Cyclops*, και κατά συνέπεια δε συνιστάται η εφαρμογή του σε περιοχές όπου τα είδη αυτά των ψαριών αναπαράγονται ή τρέφονται με *Cyclops* (Rao and Paul 1988).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως τα κύρια προϊόντα από τη διάλυση του diflubenzuron στο νερό είναι το 2,6 διφλουοροβενζοϊκό οξύ και η 4-χλωροφαινυλουρία, και τα οποία είναι λιγότερο τοξικά για τους υδρόβιους οργανισμούς από την αρχική ουσία (Julin and Sanders 1978; Schaefer et al. 1979, 1980; Gattavecchia et al. 1981 ). Ένας μικρός μεταβολίτης, η 4-χλωροανιλίνη και η οποία έχει καταχωρηθεί ως ουσία που είναι δυνατό να προκαλέσει μεταλλάξεις (National Cancer Institute and the Cancer Assessment group of the U.S. Environmental Protection Agency (Schaefer et al. 1980)), είναι πολύ πιο τοξική για τα ψάρια από το DFB. Για παράδειγμα οι τιμές της, LC50 (96 h) για την 4-χλωροανιλίνη σε τέσσερα είδη τελεόστεων του γλυκού νερού είναι 16-56 φορές χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές για το diflubenzuron. Αναφορικά ο πιο ευαίσθητος οργανισμός στην 4-χλωροανιλίνη είναι το bluegill (*Lepomis macrochirus*) με τιμή LC50 (96 h) 2.3 mg/L (Julin and Sanders 1978), την οποία τιμή όμως είναι εξαιρετικά απίθανο να συναντήσουμε με τις τωρινές πρακτικές εφαρμογής του diflubenzuron.

Η τοξικότητα και η παραμονή του DFB στο υδρόβιο περιβάλλον εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως τη μορφή του, την συχνότητα της εφαρμογής, την ποσότητα της οργανικής ύλης, το είδος του ιζήματος, το pH και την θερμοκρασία του νερού. Οι βιολογικές παράμετροι είναι πιο σημαντικές από τις φυσικές παραμέτρους στην εκτίμηση της τοξικότητας της παραπάνω ουσίας και ειδικότερα το στάδιο ανάπτυξης των εξεταζόμενων οργανισμών, η συχνότητα και ο συγχρονισμός της εκκόλαψης τους κατά την περίοδο δράσης του εντομοκτόνου (Cunningham 1986). Τα Καρκινοειδή και άλλοι οργανισμοί που πραγματοποιούν έκδυση (διώχνουν το δέρμα και αναπτύσσονται) δεν παρουσιάζουν μια τυπική σχέση δράσης-αντίδρασης με το diflubenzuron επειδή ο θάνατος επέρχεται μόνο όταν το στάδιο της έκδυσης έχει εμποδιστεί (Nebeker et al. 1983; Cunningham 1986; Cunningham and Myers 1987; Wilson and Costlow 1987). Σε γενικές γραμμές

τα πιο ευαίσθητα είδη έχουν συγκριτικά σύντομες προνυμφικές και νυμφικές περιόδους και οι οργανισμοί πραγματοποιούν έκδυση συχνά (Rodrigues and Kaushik 1986). Γενικά τα δεκτικά είδη περιλαμβάνουν τα *Leptophlebia* sp. και *Baetis pygmaeus*, ενώ πιο ανθεκτικά είδη είναι η πετρόμυγα (*Paragnetina media*) και το *Hydropsyche bettani*. Τα αμφίποδα είναι ιδιαίτερος ευαίσθητα στους 25° C, αλλά όχι στους 10°, 15°, or 20° C (Rodrigues and Kaushik 1986). Τέλος το DFB χρησιμοποιείται και ως εξωπαρασιτοκτόνο σε ορισμένες περιπτώσεις στις ιχθυοκαλλιέργειες, όπως για παράδειγμα για την καταπολέμηση των κωπήποδων που μπορεί να αποτελούν ενδιάμεσους ξενιστές νηματωδών σκωλήκων όπως το *Anguillicola Crassus* σε δόσεις μέχρι 0,015mg/L που δεν επηρεάζουν τα βιολογικά φίλτρα (Αθανασοπούλου 2006).

Η ύπαρξη καταλοίπων του diflubenzuron σε πολύ μικρές ποσότητες στο θαλάσσιο περιβάλλον, απομακρύνονται εύκολα από το θαλασσινό νερό γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα και την μείωση της θνησιμότητας των προνυμφών των καρκινοειδών. Η παρουσία όμως καταλοίπων που υπερβαίνουν τα 200 g diflubenzuron/kg, τα επίπεδα αυτά τα συναντούμε κατά την εφαρμογή του εντομοκτόνου για την αντιμετώπιση των κουνουπιών στα έλη, μπορεί να είναι καταστροφική για τα νεαρά και ενήλικα καρκινοειδή τα οποία καταναλώνουν υπολείμματα και οργανική ύλη από την επιφάνεια του έλους ή από την περιοχή μεταξύ νερού και ιζήματος (Cunningham and Myers 1986; Cunningham et al. 1987). Παρακάτω στον Πίν. 1 αναφέρονται οι σημαντικότερες χημικές και άλλες ιδιότητες του diflubenzuron.



## Πίν. 1. Χημικές και άλλες ιδιότητες του Diflubenzuron

Μεταβλητές	Στοιχεία
<u>Χημικές ονομασίες</u>	1-(4-χλωροφαινόλη)-3-(2,6- διφλουοροβενζόλη) ουρία). N-[[[(4-χλωροφαινυλ)αμινο]καρβονυλική]-2,6-διφλουοροβενζαμίδη]l-(2,6διφλουοροβενζόλη)-3-(4- χλωροφαινυλ) ουρία
<u>Εναλλακτικές ονομασίες</u>	Deflubenzon, Diflubenuron, Dimilin, DU 112307, Duphar BV, ENT-29054, Largon, Micromite, OMS 1804, PDD 6040-I, PH 60-40, TH 6040
<u>Δράση</u>	Εντομοκτόνο, προνυμφοκτόνο, νυμφοκτόνο. Ρυθμιστής της ανάπτυξης των εντόμων μέσω της παρεμπόδισης της εναπόθεσης χιτίνης στα έντομα.
<u>Αριθμός CAS</u>	35367-38-5
<u>Εμπειρικός τύπος</u>	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> ClF <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<u>Μοριακό Βάρος</u>	310.68
<u>Μορφή</u>	Κοκκώδης, λιποδιαλυτό συμπυκνωμένο διάλυμα; υγρή σκόνη
<u>Βιομηχανική επεξεργασία /κατάλοιπα</u>	Παράγεται με αντίδραση του 2,6 διφλουορο-Βενζαμίδη με 4-χλωροφαινύλ-ισοκυανάτη. Το τεχνικό προϊόν είναι 95% καθαρό. Τα τελικά κατάλοιπα είναι χαμηλού τοξικολογικού ενδιαφέροντος.
<u>Σταθερότητα</u>	Σταθερή στο ηλιακό φως και σε ουδέτερα ή ελαφρώς όξινα διαλύματα. Ασταθής σε ισχυρά βασικά διαλύματα.
<u>Φυσική μορφή</u>	Λευκή κρυσταλλική στερεά
<u>Σημείο τήξης</u>	210–230 °C (technical); 230-232 °C (pure)
<u>Διαλυτότητα</u>	
Νερό	0.1-0.2 mg/L at 20 °C; 1.0 mg/L at 25 °C
Polar organic solvents	Μέτριο έως καλό
Οκτάνιο/νερό	3,500

Πηγές: Metcalf et al. 1975; Farlow 1976; Johnson and Finley 1980; Gartrell 1981; Hudson et al. 1984; Mayer 1987; Poplyk 1989.

Τέλος, εργαστηριακές μελέτες που έχουν γίνει σε σχέση με την επίδραση του diflubenzuron πάνω σε διάφορους αντιπροσωπευτικούς

υδρόβιους οργανισμούς, κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (Πίν. 2), καταδεικνύουν συγκεκριμένες δράσεις όπως :

1. Τα καρκινοειδή είναι η πιο ευαίσθητη ομάδα οργανισμών ενώ δυσμενείς επιδράσεις παρατηρούνται και στην ανάπτυξη, την αναπαραγωγή, και την συμπεριφορά των κωπήποδων, της αρτέμιας, της δάφνιας, των αμφίποδων και των καβουριών σε συγκεντρώσεις DFB μεταξύ 0.062 και 2.0 μg/L. Παράλληλα τα μεγαλύτερη ευαισθησία παρατηρείται γενικότερα στα νεαρά στάδια ανάπτυξης.

2. Οι αμέσως επόμενοι οργανισμοί, όσον αφορά την ευαισθησία, είναι τα υδρόβια έντομα όπως mayflies, chironomids, caddisflies, και σκνίπες ,τα οποία σε επίπεδα DFB 0.1 έως 1.9 μg/L παρουσιάζουν χαμηλή επιβιωσιμότητα.

3. Άλλες ομάδες που έχουν εξεταστεί, είναι συγκριτικά πιο ανθεκτικές αφού οι δυσμενείς επιδράσεις παρατηρούνται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 45 μg/L. Στα ψάρια λοιπόν ο θάνατος επέρχεται σε επίπεδα DFB >33,000 μg/L.

4. Αυξημένη συσσώρευση του diflubenzuron παρατηρείται και σε υδρόβια φυτά κατά την έκθεση τους σε συγκεντρώσεις 100 μg/L, ενώ στα ψάρια σε συγκεντρώσεις μεταξύ 1 και 13 μg/L. Παρόλα αυτά, όλα τα παραπάνω είδη δεν φαίνεται να επηρεάζονται σημαντικά από τη αυξημένη σωματική τους επιβάρυνση, όπως αυτή εμφανίζεται σε σχέση με τη φυσιολογική ανάπτυξη και το μεταβολισμό τους.

**Πίν. 2.** Επιδράσεις του Diflubenzuron σε υδρόβιους οργανισμούς.

Ταξινόμηση-οργανισμός και Μέση Συγκέντρωση DFB σε µg/L (ppb).	Επίδραση	Πηγή
<b>Άλγη και μακρόφυτα</b>		
Διάτομα <i>Cyclotella cryptica</i> 5.000	Καμία επίδραση στη φωτοσύνθεση σε περίοδο 2 εβδομάδων	1
<b>Υδρόβια έντομα</b>		
Κουνούπια <i>Aedes aegypti</i> , 4 σταδίου προνύμφη 20 (ίση με 0,056 kg/ha)	Θανατηφόρο στο 100% μέσα σε 24h, περίπου 50% μετά 4 ημ., και <20% μετά 8 ημ.	2
Caddisfly, <i>Clistoronia magnifica</i> 0,1	Αναστολή της ανάπτυξης του ενηλικού κατά την 4 εβδομ. έκθεση στο DFB	4
Σκνίπα, <i>Cricotopus</i> spp. 1,6 4,9	Αναστολή της ανάπτυξης του ενηλικού μετά 96-ωρη έκθεση	4
<b>Μαλάκια</b>		
Οστρακοειδή, <i>Anodonta cygnea</i> 200.000	Έπειτα από 3μηνη έκθεση, όλα επιβίωσαν και εμφανίζονταν φυσιολογικά. Αλλά η φυσιολογική διαδικασία της ασβεστοποίησης διακόπηκε, με αποτέλεσμα εύθρυπτο κέλυφος.	6
<b>Καρκίνοειδή</b>		
<i>Artemia salina</i> 1, 2 ή 5 ή 10	Κατά τη διάρκεια έκθεσης για 90 ημ. σημαντική μείωση της αναπαραγωγής στα 2,5 και 10 µg/L.	7
Nauplii 1 ή 10 ή 100	Όλα νεκρά μέσα σε 30 ημ. στα 100 µg/L, η επιβιωσιμότητα ίδια με τα controls στα 1 και 10 µg/L	7
<b>Ψάρια</b>		
Πέστροφα, <i>Oncorhynchus mykiss</i> 29-300	Καμία δυσμενή επίδραση στα αυγά (με μάτια) και στα ιχθύδια σε 30ημ. έκθεση	3
Σολωμός Ατλαντικού <i>Salmo salar</i> LC50 (96 h) >50.000	Αποφυγή της έκθεσης σε επιλογής, δυνατότητα μετά από 10-λεπτη δοκιμή	8 5

**Πηγές:** 1, Antia et al. 1985; 2, Madder and Lockhart 1980; 3, Johnson and Finley 1980; 4, Nebeker et al. 1983; 5, Mayer and Ellersieck 1986; 6, Machado et al. 1990; 7, Cunningham 1976; 8, Granett et al. 1978;

## 2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ DIFLUBENZURON ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΣ *ΡΑΥΛΟΝΑ ΛΥΤΗΡΗ*, ΣΤΟ ΤΡΟΧΟΖΩΟ *ΒΡΑΧΙΟΝΟΥΣ ΠΛΙΚΑΤΙΛΙΣ* ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΤΣΙΠΟΥΡΑ (*SPARUS AURATA*)

### 2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι οργανισμοί οι οποίοι επιλέχθηκαν να μελετηθούν στην παρούσα εργασία, αποτελούν σημαντικούς αντιπροσώπους 3 ομάδων οργανισμών του υδρόβιου περιβάλλοντος και συγκεκριμένα των μικροφυκών, των τροχόζων και των ιχθύων.

Το φυτοπλαγκτόν (μικροφύκη) αποτελεί τη βάση της τροφικής αλυσίδας στο θαλάσσιο περιβάλλον. Για το λόγο αυτό τα μικροφύκη είναι αναντικατάστατα, για διάφορα θαλάσσια είδη, ως πηγή τροφής για όλα τα στάδια ανάπτυξης των δίθυρων μαλακίων, για τα προνυμφικά είδη ορισμένων ειδών καρκινοειδών και για κάποια πρώιμα στάδια ανάπτυξης συγκεκριμένων ειδών ψαριών. Ένα από τα βασικότερα είδη μικροφυκών αποτελεί και το *Pavlova lutheri*, το οποίο συνήθως καλλιεργείται και σαν καθαρό στέλεχος (μονοκαλλιέργεια) σε εντατικά συστήματα. Το *P. lutheri* και γενικότερα τα μικροφύκη τρέφουν επίσης σημαντικές ποσότητες από ζωοπλαγκτόν (rotifers, κωπήποδα, αρτέμια), το οποίο με τη σειρά του χρησιμεύει ως τροφή για προνύμφες και νεαρά στάδια καρκινοειδών και ιχθύων. Εκτός από τα παραπάνω, σύμφωνα με την «τεχνική πράσινου νερού», τα φύκη χρησιμοποιούνται απ' ευθείας στις δεξαμενές με τις προνύμφες όπου πιστεύεται ότι συμμετέχουν στην σταθεροποίηση της ποιότητας του νερού, στην διατροφή των προνυμφών και στον μικροβιακό έλεγχο (Coutteau 1992).

Τα τροχόζωα, με τη σειρά τους, αποτελούν ένα πολύ σημαντικό κρίκο στη υδρόβια τροφική αλυσίδα καθώς χρησιμοποιούνται ως πρώτη ζωντανή τροφή (θήραμα), κατά την εξέλιξη του διατροφολόγιου των νυμφών πολλών ειδών θαλασσινών ψαριών. Αν και το 90% των τροχόζων απαντώνται αποκλειστικά σε γλυκά νερά, το *Brachionus plicatilis* αποτελεί τον πλέον

γνωστό αντιπρόσωπο των αλμυρών και υφάλμυρων υδάτων. Η σπουδαιότητα των τροχόζων, ως θηραμάτων στις νυμφικές καλλιέργειες, έγκειται και στο γεγονός ότι τα πεπτικά τους ένζυμα παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της πέψης των νεαρών νυμφών, οι οποίες τα χρησιμοποιούν εξαιτίας της έλλειψης των δικών τους πεπτικών ενζύμων που δεν έχουν ακόμη αναπτυχθεί. Το μεγαλύτερο όμως πλεονέκτημα των καλλιεργειών των τροχόζων είναι η ικανότητα τους να φτάνουν σε πολύ μεγάλες πυκνότητες, έως και 2000 ατόμων/ml (Hirata 1979). Ακόμα όμως και σε υψηλές συγκεντρώσεις, αναπαράγονται γρήγορα δίνοντας μεγάλες ποσότητες ζωντανής τροφής σε μικρό χρονικό διάστημα.

Η τσιπούρα *Sparus aurata* είναι ένα από τα δυο κύρια θαλάσσια είδη ψαριών που εκτρέφονται στην Ελλάδα αλλά και γενικότερα στη Μεσόγειο, ενώ θεωρείται και ένα από τα απαραίτητα συστατικά της θρεπτικής και υγιεινής μεσογειακής διατροφής. Η συνολική ετήσια παραγωγή τσιπούρας στην ΕΕ ανέρχεται στους 55.000 τόνους και οι κύριες χώρες παραγωγής είναι η Ελλάδα, η Ισπανία, η Ιταλία και η Γαλλία. Η Ελλάδα συγκεκριμένα είναι ο κύριος παραγωγός στην Ευρωπαϊκή Ένωση, με ποσοστό 63% επί της συνολικής ευρωπαϊκής παραγωγής τσιπούρας (ακολουθεί η Ιταλία με 18%) ([www.fishportal.com](http://www.fishportal.com)).

Παρακάτω θα περιγραφούν αναλυτικότερα τα 3 αυτά είδη καθώς θα παρουσιαστούν οι επιδράσεις του εντομοκτόνου Diflubenzuron, σε κάθε ένα από αυτά, και θα αφορούν τόσο στην αύξηση τους όσο και στην επιβίωση τους.

### 2.1.1. *Pavlova lutheri*

Σήμερα περισσότερα από 40 διαφορετικά είδη μικροφυκών έχουν απομονωθεί σε διάφορα μέρη του κόσμου και καλλιεργούνται σαν καθαρά στελέχη (μονοκαλλιέργειες) σε εντατικά συστήματα. Η τεχνική καλλιέργειας φυτοπλαγκτού είναι μια διαδικασία επιστημονικά τεκμηριωμένη και υπόθεση ρουτίνας σε εκκολαπτήρια ιχθύων, οστρακοειδών και καρκινοειδών. Από μια μεγάλη ποικιλία στελεχών φυτοπλαγκτού (De Pauw et al. 1988) το 90% του όγκου που παράγεται στις μονάδες και στα

ερευνητικά κέντρα βασίζεται στην καλλιέργεια 8 μόνο ειδών (Coutteau 1992). Αυτά τα είδη επιλέχθηκαν με κριτήρια τη διατροφική τους αξία και το βαθμό δυσκολίας στην καλλιέργεια τους. Η θρεπτική αξία κάθε είδους από τα μικροφύκη για κάθε οργανισμό-καταναλωτή εξαρτάται από το μέγεθος του κυττάρου, την ικανότητα πέψης του από τον καταναλωτή, την παραγωγή τοξικών ουσιών και τη βιοχημική του σύσταση. Ένα από τα 8 αυτά βασικά είδη μικροφυκών είναι και το *Pavlova lutheri*.

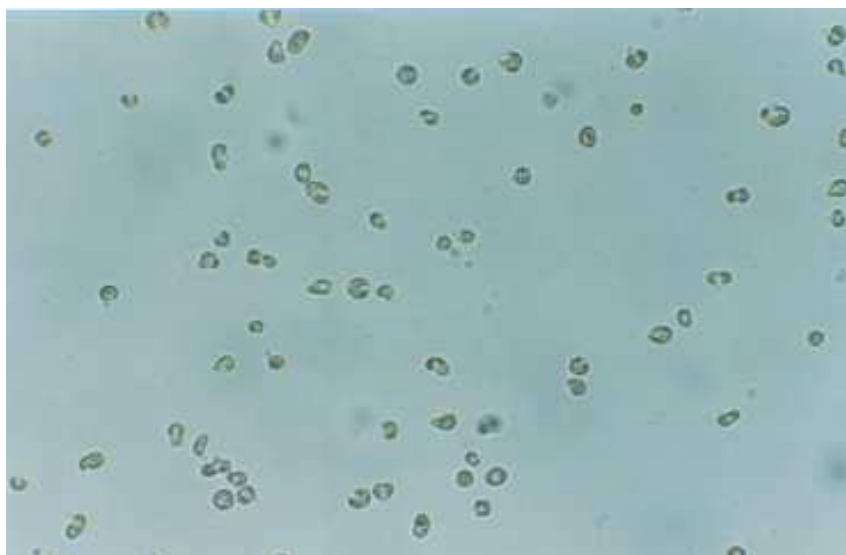
Η Συστηματική κατάταξη του μικροφύκου αυτού έχει ως εξής :

Βασίλειο	Chromista
Υπερσυνομοταξία	Chromobiota
Συνομοταξία	Haptophyta
Κλάση	Pavlovophyceae
Υποκλάση	Pavlovophycidae
Σειρά	Pavloales
Οικογένεια	Pavlovaceae
Γένος	<i>Pavlova</i>

Το haptophyte *Pavlova lutheri* (Εικ.2 και 3) χρησιμοποιείται ευρύτατα στις ιχθυοκαλλιέργειες ως ζωντανή τροφή για διάφορα θαλάσσια ασπόνδυλα (μαλάκια, καρκινοειδή, ζωοπλαγκτόν) και συγκεκριμένα για τα Δίθυρα (προνύμφες, ανήλικα, νεογέννητα) (Webb and Chu, 1983; Borowitzka 1997; Wickfors and Onho, 2001; Brown, 2002; Rico-Villa et al., 2006). Αυτό το είδος μικροφύκου χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα, κυρίως εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) και δοκοσαεξανικό οξύ (DHA) (Volkman et al., 1989), που είναι απαραίτητα για τα θαλάσσια είδη (Kanazawa et al., 1979). Πειράματα που έχουν διεξαχθεί στα είδη *Saccostrea glomerata* και *Pecten fumatus*, έχουν αναδείξει την καλή ποιότητα στις συγκεντρώσεις του μικροφύκου, ιδιαίτερα σε χαμηλές θερμοκρασίες, με ορισμένα αποτελέσματα να είναι ανώτερα ακόμα και από τα φρέσκα φύκη (Nell and O'Connor, 1991; Heasman et al., 2000).



Εικ.2 Μικροφύκος *Pavlova lutheri*. Πηγή : ([eol.org/pages/3391](http://eol.org/pages/3391))



Εικ.3 Πληθυσμός από μικροφύκη *Pavlova lutheri*. Πηγή : ([knusun.kangnung.ac.kr/~livefood/ph-speci.htm](http://knusun.kangnung.ac.kr/~livefood/ph-speci.htm))

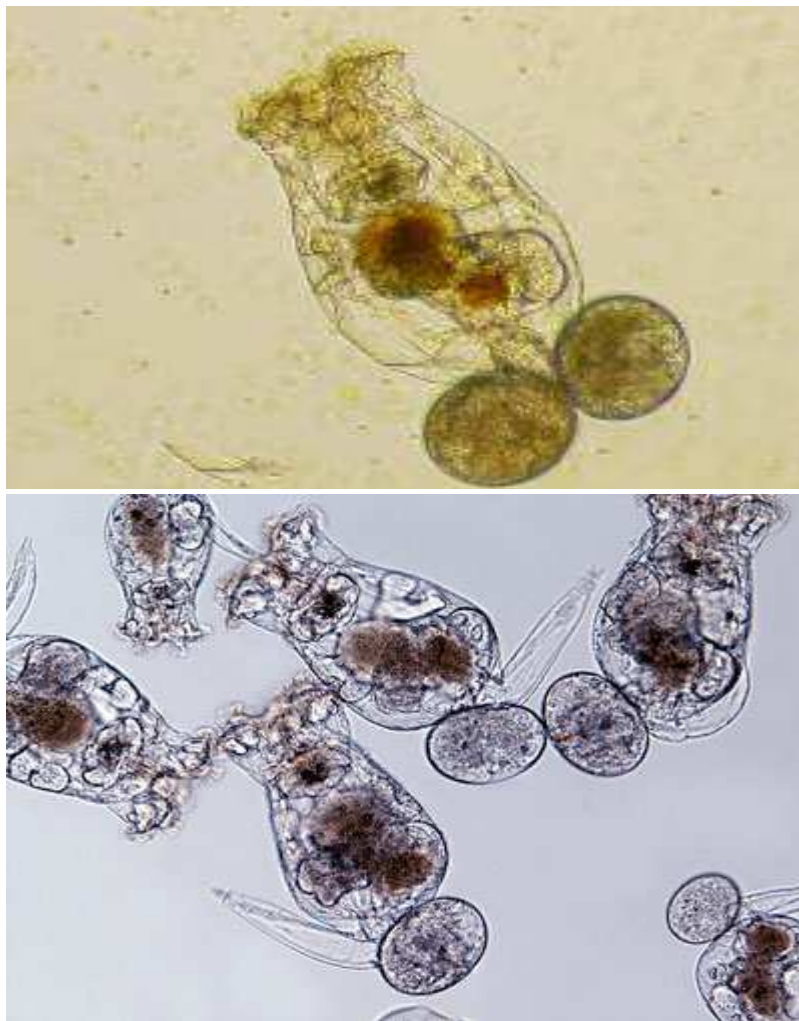
Η βιοχημική σύσταση του μικροφύκου *Pavlova lutheri* εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες καλλιέργειας και κατά συνέπεια από τη συγκέντρωση θρεπτικών και τη σύνθεση τους, τη θερμοκρασία του νερού, την ένταση του φωτός και το μήκος κύματος, τη φωτοπερίοδο και το στάδιο ανάπτυξης της καλλιέργειας κατά τη συγκομιδή. Το παραπάνω είδος φύκους καθώς και τα υπόλοιπα είδη με τη μεγαλύτερη θρεπτική αξία (π.χ *Chaetoceros*, *Isochrysis*, *Skeletonema*, *Thalassiosira*) χρειάζονται φως για να αναπτυχθούν (Gladue 1991). Η τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη αυτών των μικροφυκών, απαιτεί ειδικό και ακριβό εξοπλισμό (κεμοστάτες) και προσωπικό με ανώτερο επίπεδο εκπαίδευσης.

Στην πράξη έχει παρατηρηθεί ότι η ανάπτυξη και απόδοση των εκτρεφόμενων οργανισμών είναι συχνά καλύτερη όταν τους δοθεί μίγμα διαφορετικών ειδών μικροφυκών. Αυτό οφείλεται στο ότι οι ελλείψεις ή τα χαμηλά επίπεδα κάποιου θρεπτικού στοιχείου σε ένα είδος μπορούν να αναπληρωθούν ή να συμπληρωθούν από τα θρεπτικά στοιχεία άλλου είδους.

### 2.1.2. *Brachionus plicatilis*

Τα τροχόζωα είναι μικροί πλαγκτονικοί οργανισμοί που ανήκουν στο φύλο *Rotifera*, ενώ συγκαταλέγονται μεταξύ των μικρότερων μεταζώων (πολυκυτταρικοί οργανισμοί) με μεγέθη συνήθως μεταξύ 100 και 500 μm. Τα είδη που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες ανήκουν στο γένος *Brachionus*. Το 90% των τροχόζωων απαντώνται αποκλειστικά σε γλυκά νερά, ενώ στις καλλιέργειες που γίνονται σε θαλασσινό νερό χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο το είδος *B. plicatilis* εξαιτίας της αντοχής του στο θαλασσινό περιβάλλον (Εικ. 4 και 5).





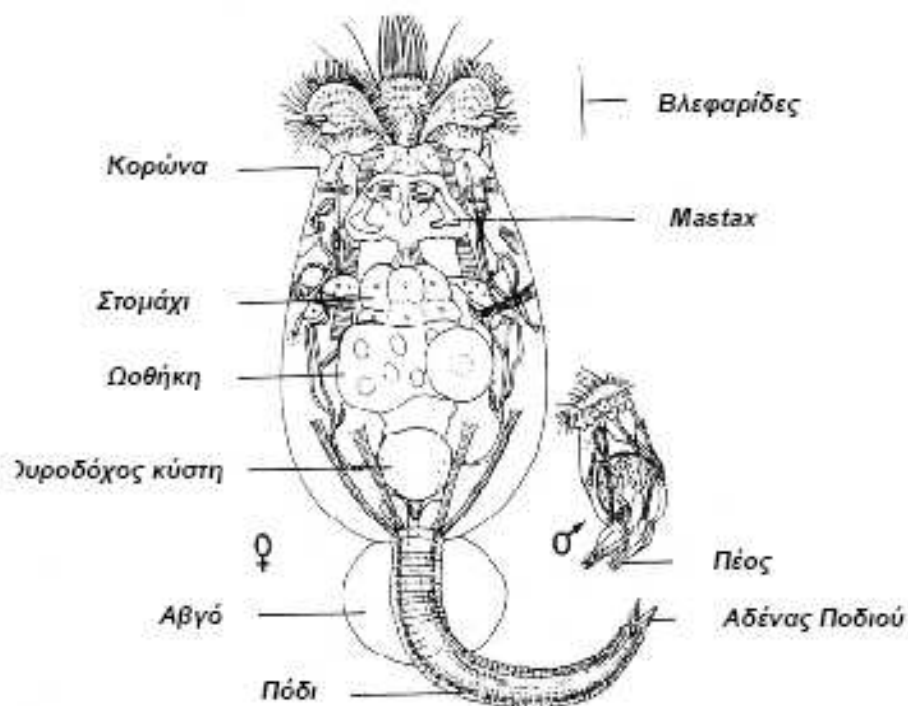
Εικ. 4 και 5 Τροχόζωα (Rotifers) *Brachionus plicatilis*. (Πηγή: J.B. Leonardsen)

Οι οργανισμοί αυτοί χαρακτηρίζονται από μεγάλη ικανότητα πληθυσμιακής αύξησης, όταν βρεθούν σε κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες, κάτι που συμβαίνει την άνοιξη και το φθινόπωρο. Τις περιόδους αυτές συνιστούν, το κύριο μέρος της βιομάζας των ελών (*Brachionus calcyflorus*) και των υφάλμυρων λεκανών (*Brachionus plicatilis*). Τα τροχόζωα χρησιμοποιούνται ως πρώτη ζωντανή τροφή (θήραμα), κατά την εξέλιξη του διατροφολόγιου των νυμφών πολλών ειδών θαλασσινών ψαριών, καθώς ικανοποιούν τα εξής βασικά κριτήρια :

- οι τεχνικές καλλιέργειάς τους είναι πλήρως ελεγχόμενες και η μαζική παραγωγή τους δεν παρουσιάζει δυσκολίες ,
- έχουν διαστάσεις τέτοιες ώστε να αντιστοιχούν στο άνοιγμα του στόματος των νυμφών στο τέλος του προνυμφικού τους σταδίου,

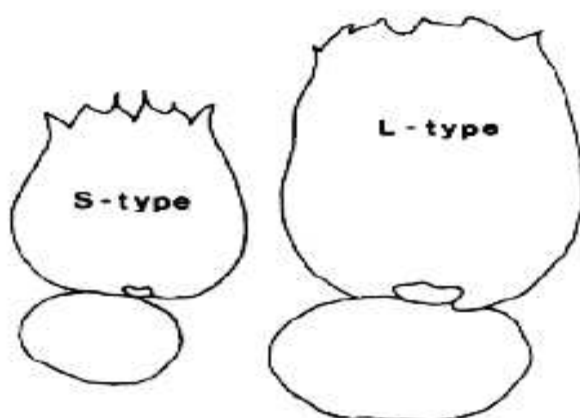
- εξαιτίας της αδιάκοπης κίνησής τους γίνονται εύκολα αντιληπτά από τις μικρής ηλικίας προνύμφες, οι οποίες δε διαθέτουν πλήρη αντίληψη του χώρου,
- η μετατόπιση τους κατά τη κίνησή είναι περιορισμένη, γεγονός το οποίο εξυπηρετεί τις προνύμφες που, σε αυτές τις ηλικίες, έχουν περιορισμένη κολυμβητική ικανότητα,
- είναι πιο εύπεπτα από τα νεαρά νυμφικά στάδια των ψαριών, συγκρινόμενα με άλλα θηράματα, όπως τα μικρά καρκινοειδή,
- μπορούν εύκολα να εμπλουτιστούν με απαραίτητα για τις νύμφες θρεπτικά συστατικά, κυρίως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ανοσοενισχυτικά και βιταμίνες (Κλαδάς Ι. 2006).

Τα τροχόζωα μέσα σε κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες και με διαθέσιμη κατάλληλη τροφή αναπαράγονται παρθενογεννητικά με αποτέλεσμα ο πληθυσμός τους να αποτελείται μόνο από θηλυκά άτομα που φέρουν αυγά. Σε περίπτωση που διαταραχθούν οι συνθήκες αυτές: α) η γονιμότητα του πληθυσμού ελαττώνεται και β) εμφανίζονται στον πληθυσμό αρσενικά άτομα, τα οποία είναι μικρά σε μέγεθος (Εικ. 6), κινούνται γρήγορα και ακατάπαυστα, χαρακτηρίζονται από την έλλειψη πεπτικού συστήματος και άρα δεν τρέφονται ενώ έχουν ως μοναδικό σκοπό την φυλετική αναπαραγωγή, η οποία οδηγεί στην παραγωγή αυγών (εγγενής αναπαραγωγή) (Κλαδάς Ι. 2006). Τα αυγά αυτά ονομάζονται κύστεις, είναι μεγάλα (μέχρι και 60% του μεγέθους του θηλυκού) και έχουν χοντρό κυτταρικό τοίχωμα που τα κάνει ανθεκτικά σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτού του είδους οι καλλιέργειες, με εγγενή αναπαραγωγή, είναι αργές όσον αφορά τον ρυθμό αύξησης τους, ενώ τα αρσενικά που παράγονται είναι μικρής θρεπτικής αξίας καθώς είναι μικρά, περιέχουν λίγα θρεπτικά στοιχεία και αποτελούν ένδειξη ότι κάτι δεν πάει καλά με τις φυσικοχημικές παραμέτρους στο σύστημα. Παρόλα αυτά, η περιστασιακή παραγωγή κύστεων και η διατήρησή τους αποτελεί ασφαλιστική δικλείδα για τον καλλιεργητή και την μονάδα του (Συμεωνίδης Χ. 2003).



Εικ. 6. Μορφολογία θηλυκού και αρσενικού rotifer. Πηγή: (Koste 1980)

Υπάρχουν 2 ποικιλίες («στελέχη») τροχοζώων, τα μεγαλόσωμα L-type (*B. plicatilis typicus*) και των μικρόσωμα S-type (*B. plicatilis rotundiformis*) (Εικ. 7).



Εικ. 7. Μορφολογικές διαφορές των δύο τύπων τροχοζώων. Αριστερά L-type rotifers, δεξιά S-type. Διακρίνεται η θέση και το σχετικό μέγεθος του αυγού. Πηγή: (Κλαδάς Ι.)

Η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ των δυο αυτών ποικιλιών τροχοζώνων είναι η μορφή του άνω μέρους του κελύφους τους (lorica), η οποία αναδεικνύεται σε πρόσφατα θανατωμένα άτομα (π.χ. με αραιό διάλυμα φορμόλης). Στα μικρόσωμα τροχοζώα (S-type), το πάνω μέρος του lorica χαρακτηρίζεται από κανονικά διατεταγμένες οξείες άκανθες, ενώ στα L-type οι άκανθες είναι ακανόνιστου σχήματος και με μεγαλύτερες γωνίες. Τα L-τύπου τροχοζώα έχουν περίπου τριπλάσιο βάρος από τα S-τύπου, ενώ το μήκος τους κυμαίνεται από 130 - 340μm έναντι 100-210μm των μικρόσωμων. Η γονιμότητα που χαρακτηρίζει τους πληθυσμούς των τροχοζώνων τύπου S είναι πολύ μεγαλύτερη εκείνης του τύπου L. Η μέγιστη ημερήσια αύξηση των πληθυσμών των δυο τύπων (στις αντίστοιχα βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας: 34oC έναντι 25oC) ανέρχεται στα 250% και 170% αντίστοιχα. Η μεγάλη γονιμότητα των S-τύπου τροχοζώνων σε συνδυασμό με το μικρότερο μέγεθός τους τα καθιστά ελκυστικά για χρησιμοποίηση στις νυμφικές καλλιέργειες. Αυτό όμως σημαίνει ότι, δεδομένου του πολύ μικρότερου βάρους τους, οι ποσότητες (αριθμό ατόμων) που πρόκειται να χορηγηθούν για τη διατροφή των νυμφών θα πρέπει να είναι πολύ μεγαλύτερες.

Τα τροχοζώα τρέφονται με:

- πλαγκτονικά μικροφύκη, ζωντανά, λυοφιλισμένα ή κατεψυγμένα. Τα κύρια είδη που χρησιμοποιούνται είναι το *Nannochloropsis* sp., το *Tetraselmis (Platymonas) suecica* και το *T. tetrahele*.
- ζύμη (μαγιά, *Saccharomyces cerevisiae*). Έχει αποδειχθεί ότι, σε συνθήκες μαζικής καλλιέργειας η μικτή διατροφή με μαγιά και φυτοπλαγκτόν ευνοεί την καλύτερη ανάπτυξη των πληθυσμών συγκρινόμενη από την διατροφή των τροχοζώνων μόνον με μικροφύκη, ενώ για την ομαλή αύξηση των πληθυσμών, είναι απαραίτητη η προσθήκη της βιταμίνης B12 .
- Βακτήρια,
- εμπλουτισμένες μαγιές,
- ή με οποιοδήποτε συνδυασμό των ανωτέρω.

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την καλλιέργεια των παραπάνω τροχόζων είναι :

1. **Η θερμοκρασία.** Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των δυο τύπων των τροχοζών διαφέρουν. Τα τύπου- S τροχόζωα είναι θερμοφιλα και μπορούν να ανεχθούν αλλαγές θερμοκρασιών 15-35°C, με βέλτιστες θερμοκρασίες για την ανάπτυξη τους 30-35°C, ενώ τα τύπου-L μπορούν να ανεχθούν θερμοκρασίες από 5-25°C και αναπτύσσονται καλύτερα στους 25°C (Πίν. 3).
2. **Αλατότητα .** Αν και το *Brachionus plicatilis* είναι ανθεκτικό σε ένα μεγάλο εύρος αλατότητας από 1 έως και 97 ppt (Walker 1981), η ιδανική αναπαραγωγή επιτυγχάνεται σε επίπεδα κάτω από 35 ppt (Lubzens 1987).
3. **Διαλυμένο οξυγόνο .** Τα επίπεδα του δ/νου οξυγόνου στο νερό εξαρτώνται από τη θερμοκρασία του νερού, την πυκνότητα του πληθυσμού και την τροφή. Τα τροχόζωα επιβιώνουν σε επίπεδα έως και 2 ppm δ/νου οξυγόνου στο νερό.
4. **pH .** Το εύρος επιβίωσης των τροχοζών είναι σε τιμές pH 5 ως 9. Η βέλτιστη περιοχή του pH, αναφορικά με την πληθυσμιακή τους αύξηση, είναι από 6 έως 8.
5. **Αμμωνία .** Η τοξικότητα της αμμωνίας εξαρτάται από την αλατότητα, τη θερμοκρασία και το pH. Η θανατηφόρα δόση LC50 του N.NH<sub>3</sub>,4 στους 23°C έχει εκτιμηθεί ότι είναι 17mg/l .
6. **Βακτήρια .** Τα βακτήρια *Pseudomonas* και *Acinetobacter* μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή συμπληρωματικής τροφής για τα τροχόζωα. Για παράδειγμα κάποια είδη *Pseudomonas* συνθέτουν βιταμίνη B12 η οποία μπορεί σε συνθήκες έλλειψης της να αποτελέσει περιοριστικό παράγοντα στην απόδοση μιας καλλιέργειας (Yu *et al.*, 1988).

**Πίν. 3.** Επίδραση της θερμοκρασίας στην αναπαραγωγική δραστηριότητα του *Brachionus plicatilis*.

Θερμοκρασία (°C).	15 °C	20 °C	25 °C
Χρόνος για εμβρυϊκή ανάπτυξη (ημέρες).	1.3	1.0	0.6
Χρόνος για τα νεαρά θηλυκά να ωριμάσουν και να παράγουν αυγά (ημέρες) .	3.0	1.9	1.3
Διάστημα ανάμεσα σε δύο γέννες (ώρες).	7.0	5.3	4.0
Διάρκεια ζωής (ημέρες).	15	10	7
Αριθμός αυγών κατά τη διάρκεια ζωής του θηλυκού.	23	23	20

(Πηγή: Ruttner-Kolisko, 1972)

### 2.1.3. Τσιπούρα (*Sparus aurata*)

#### ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ

Φύλο:	Χορδωτά
Υπόφυλο:	Σπονδυλόζωα
Ομοταξία:	Οστειχθύες
Υφομοταξία:	Ακτινοπτερύγιοι
Υπερτάξη:	Τελεόστεοι
Τάξη:	Περκόμορφοι
Υπόταξη:	Περκοειδείς
Οικογένεια:	Sparidae
Γένος:	Sparus
Είδος:	S.aurata ( Linnaeus 1758)

«Τσιπούρα» είναι η κοινή ονομασία του *Sparus aurata* που χρησιμοποιείται στην Ελλάδα, ενώ στις Αγγλόφωνες χώρες είναι γνωστό ως

"Gilthead seabream". Άλλοι γνωστοί αντιπρόσωποι της οικογένειας Sparidae είναι ο σπάρος και η συναγρίδα.

#### ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΑ - ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η τσιπούρα είναι ένα ψάρι με ένα χαρακτηριστικό ασημογάλαζο χρώμα στην κορυφή της ράχης της, και ασημί, γαλάζιες γκρι αποχρώσεις στα πλευρά (Εικ. 8). Το σώμα του έχει ωοειδές σχήμα και έχει μία μαύρη κηλίδα στο κάλυμμα των βραγχίων, στην αρχή της πλευρικής γραμμής. Επίσης, εμφανίζει έναν χρυσοκίτρινο χρωματισμό ανάμεσα στους οφθαλμούς ενώ εμφανίζει και μαύρες ζωνώσεις στην άκρη της ουράς. Όσον αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του *Sparus aurata*, παρατηρούμε ότι το μέγεθός του είναι συνήθως 30-40 cm στα ενήλικα άτομα και το μέγιστο αναφερόμενο στην βιβλιογραφία είναι 70cm. Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί άτομο με μήκος 76cm (Γαλλία 2000, Florn Estuary, Brest). Αν και το μέγιστο βάρος ψαριού που έχει δημοσιευτεί για το είδος αγγίζει τα 17,2kg , συνήθως το βάρος του κυμαίνεται γύρω στα 400 με 600 g (κατηγορία G).



Εικ.8 Τσιπούρα *Sparus aurata* (Πηγή: [www.fishportal.com](http://www.fishportal.com))

Το σώμα του είναι στενόμακρο, παχύ και συμπιεσμένο πλευρικά. Διαθέτει ομόκερκο ουραίο πτερύγιο καθώς και ένα ενιαίο ραχιαίο και ένα εδρικό πτερύγιο. Το κεφάλι του είναι μεγάλο με απότομο, κοντό ρύγχος που εκτείνεται ως το ύψος του μέσου των οφθαλμών. Στόμα μικρό με 6

κυνόδοντες και την κάτω γνάθο του να διαθέτει πολλά μικρά στρογγυλεμένα δόντια σε 5-6 σειρές τα οποία χρησιμεύουν για να συνθλίβει την τροφή του (οστρακόδερμα).

#### ΦΥΣΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ - ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ

Το *Sparus aurata* ζει σε υποτροπικά κλίματα ( $60^{\circ}\text{N}$  -  $14^{\circ}\text{N}$ ,  $26^{\circ}\text{W}$  -  $36^{\circ}\text{E}$ ). Λόγω των ευρύαλων και ευρύθερμων συνηθειών του το είδος βρίσκεται τόσο στο θαλάσσιο χώρο αλλά και σε υφάλμυρες παράκτιες λιμνοθάλασσες και σε εκβολές ποταμών. Λόγω των παραπάνω, το *Sparus aurata* είναι κοινό στη Μεσόγειο, είναι παρόν κατά μήκος των ανατολικών ατλαντικών ακτών από τη Μεγάλη Βρετανία στη Σενεγάλη, και είναι σπάνιο στη Μαύρη Θάλασσα. Αντιπρόσωποι του είδους βρίσκονται και γύρω από τα Κανάρια Νησιά. Η τσιπούρα βρίσκεται συνήθως σε βραχώδη βυθό με φύκη αλλά μπορεί να την συναντήσουμε και σε αμμώδη μέρη. Τα νέα ψάρια παραμένουν στο χαμηλό βάθος (μέχρι 30 μ), ενώ οι ενήλικοι μπορούν να φθάσουν στα πιο μεγάλα θαλάσσια βάθη (μέγιστο βάθος 150 μ).

#### ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ

Η τσιπούρα είναι στατικό ψάρι και ζει είτε απομονωμένο είτε σε μικρές συναθροίσεις στο φυσικό περιβάλλον. Πρόκειται για κυρίως σαρκοφάγο ψάρι, το οποίο μεταναστεύει χαρακτηριστικά την άνοιξη προς τις υφάλμυρες παράκτιες λιμνοθάλασσες στην αναζήτηση άφθονης τροφής και των ηπιότερων θερμοκρασιών (τροφική μετανάστευση). Πολύ ευαίσθητα στις χαμηλές θερμοκρασίες (το χαμηλότερο θανατηφόρο όριο είναι  $4^{\circ}\text{C}$ ), στα τέλη του φθινοπώρου επιστρέφουν στην ανοικτή θάλασσα, όπου τα ενήλικα ψάρια αναπαράγουν. Η μέση ηλικία στη οποία βρίσκονται τα ψάρια στο φυσικό τους περιβάλλον είναι μεταξύ 1,4 και 4,4 χρόνων. Παρόλα αυτά σε συνθήκες αιχμαλωσίας μπορούν να διπλασιάσουν αυτό το χρόνο καθώς ξεπερνούν τα 10 χρόνια με μέγιστη δημοσιευμένη ηλικία τα 11 χρόνια.



## ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, η τσιπούρα είναι σαρκοφάγο ψάρι και περιστασιακά (σπάνια) φυτοφάγο. Στο φυσικό περιβάλλον τρέφεται κυρίως με οστρακόδερμα (μύδια, στρείδια) τα οποία συνθλίβει με τα δυνατά της δόντια.

Τα ψάρια της υδατοκαλλιέργειας ταιίζονται κυρίως με ζωντανή τροφή. Συγκεκριμένα όταν περάσει το προνυμφικό στάδιο, και οι γόννοι σταματήσουν να τρέφονται από τον λεκιθικό τους σάκο, την 5<sup>η</sup> ημέρα ταιίζονται με τροχόζωα (*Branchionus plicatilis*). Στην συνέχεια την 6<sup>η</sup> έως 10<sup>η</sup> ημέρα τρέφονται με τροχόζωα και *Artemia*. Από την 11<sup>η</sup> έως την 20<sup>η</sup> ημέρα με ναύπλιους και μεταναύπλιους και συνεχίζουν έως την 30<sup>η</sup> ημέρα με μεταναύπλιους. Τα τροχόζωα που χρησιμοποιούνται για την διατροφή των ψαριών καλλιεργούνται στην μονάδα και είναι εμπλουτισμένα με γαλακτώματα (λίπη, πρωτείνες, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, βιταμίνες, αντιοξειδωτικά).

Εκτός από ζωντανή τροφή στα ψάρια δίδεται και σύνθετη τροφή - αδρανής βιομηχανοποιημένη (ιχθυοτροφή) η οποία συνίσταται από θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για το ψάρι(πρωτείνες, αμινοξέα, λιπαρά, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία). Η σύνθετη τροφή δίδεται υπό την μορφή συμπήκτων τα οποία προέρχονται από ανάμειξη ιχθυάλευρου, ιχθυελαίου, σόγιας, αλευριού και ανόργανων συστατικών. Έτσι επιτυγχάνεται η δημιουργία εύγεστης τροφής η οποία έχει πλούσια θρεπτική αξία.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια να αντικατασταθεί η ζωντανή τροφή από την σύνθετη (ιχθυοτροφή) καθώς η δεύτερη είναι λιγότερο δαπανηρή και πιο πλούσια σε θρεπτική και ενεργειακή αξία. Επιπρόσθετα, τα τροχόζωα λόγω της ικανότητας τους να διηθούν το νερό υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να γίνουν φορείς παθογόνων μικροοργανισμών και να μεταδώσουν ασθένειες στα ψάρια.

## ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Στο τμήμα γεννητόρων κάτω από απόλυτα ελεγχόμενες συνθήκες τα ψάρια γεννούν τα αβγά (γεννήτορες ή μάνες) μέσα σε ειδικές δεξαμενές, που είναι κυλινδρικές, χοντρές, όγκου 30 m<sup>3</sup>, από πάνω είναι σκεπασμένες με δίκτυα για προστασία από θηρευτές και για να μην πηδήξουν έξω τα ψάρια. Οι γεννήτορες προέρχονται από ελεύθερη αλιεία με αγκίστρι και τράτα. Μετά την επιλογή των πιο εύρωστων και ικανών για αναπαραγωγή γίνεται προληπτικό μπάνιο με φορμόλη. Κατά καιρούς γίνεται εμπλουτισμός με νέους γεννήτορες. Η αναλογία θηλυκών-αρσενικών στις δεξαμενές ωοτοκίας ισούται με 2/3. Τα ζώα ωριμάζουν αναπαραγωγικά μετά από το πρώτο έτος ζωής τους, όταν είναι μεγαλύτερα από 25 εκατ. Και αφού ορισμένα αλλάξουν φύλο από αρσενικό σε θηλυκό (πρωτανδρικός ερμαφροδιτισμός) Αν όμως κάποια δεξαμενή έχει έλλειψη σε αρσενικά, βγάζουμε όλα τα αρσενικά από τη δεξαμενή και τότε γίνεται η αντίστροφη μετατροπή.

Στις άγριες περιοχές οι τσιπούρες ωοτοκούν το χειμώνα, αλλά στις υδατοκαλλιέργειες ρυθμίζονται και αναπαράγονται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους κάτω από ελεγχόμενες μεθόδους (αλλαγές στη συγκεκριμένη πυκνότητα του ύδατος, της θερμοκρασίας και της περιόδου φωτός). Η ωοτοκία διαρκεί 72 ώρες σε θερμοκρασία 14°C. Ο έλεγχος του βαθμού ωρίμανσης των γονάδων γίνεται πιέζοντας πλευρικά τα τοιχώματα της κοιλιάς. Με ενέσιμη ανθρώπινη χορειακή γοναδοτροπίνη γίνεται συγχρονισμός της αναπαραγωγής, που είναι απαραίτητος για τη σωστή και εύκολη ανάπτυξη των αβγών. Η γονιμοποίηση των αβγών γίνεται με επίβρεξη από τα αρσενικά μετά την ωοτοκία των θηλυκών τσιπούρων. Η ποσότητα αβγών καθορίζεται κυρίως από το βάρος του θηλυκού γεννήτορα και υπολογίζεται σε 180.000 αβγά / κιλό. Τα αβγά επιπλέουν στην επιφάνεια των δεξαμενών ωοτοκίας και συλλέγονται βάσει αυτής της ιδιότητας. Συλλέγονται από τον ωοσυλλέκτη, επιλέγονται τα καλύτερα σε ποιότητα, καταμετράται ο αριθμός και το βάρος τους και μεταφέρονται στη μονάδα επώασης.

Η μονάδα επώασης αποτελείται από μια γούρνα που τροφοδοτείται με νερό. Η οξυγόνωση (>80%) του ύδατος επιτυγχάνεται με αυτόματο μηχανισμό ανάδευσής του. Ολόκληρο το σύστημα συνδέεται με μια δεξαμενή 35L που παρέχει φιλτραρισμένο φρέσκο θαλασσινό νερό. Οι συνθήκες επώασης πρέπει να διατηρούνται σταθερές. Συγκεκριμένα, οξυγόνωση 8 mg/L, θερμοκρασία 16,3-16,7°C, αλατότητα 35 psu, φυσική φωτοπερίοδος, διαυγές νερό, PH 7-8. Η άριστη πυκνότητα είναι  $10^3$ - $10^4$  αβγά/L και η συνήθης θνησιμότητα 16.2-25%. Όταν η πυκνότητα ανέβει από 20.000 στις 30.000 αβγά/L, η θνησιμότητα αυξάνεται σημαντικά.

Την επώαση ακολουθεί μεταφορά των προνυμφών σε δεξαμενή. Εκεί διεξάγονται καθημερινοί έλεγχοι μέχρι την εμφάνιση του στόματος που σηματοδοτεί την έναρξη παροχής ζωντανής τροφής. Τότε ξεκινά το νυμφικό στάδιο. Οι νύμφες κατανέμονται σε δεξαμενές ανάλογα με την ηλικία και τον αριθμό τους. Το νυμφικό στάδιο τελειώνει και η τροφή των ιχθυδίων γίνεται αδρανής βιομηχανοποιημένη. Η επιβίωση των προνυμφών στις καλλιέργειες φτάνει στο 80%, ενώ στο φυσικό περιβάλλον δεν ξεπερνά το 5%. Το λαρβικό στάδιο διαρκεί περίπου 50 ημέρες στη θερμοκρασία 17 με 18° C.

## 2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.2.1 Μικροφύκη - *Pavlova Lutheri*

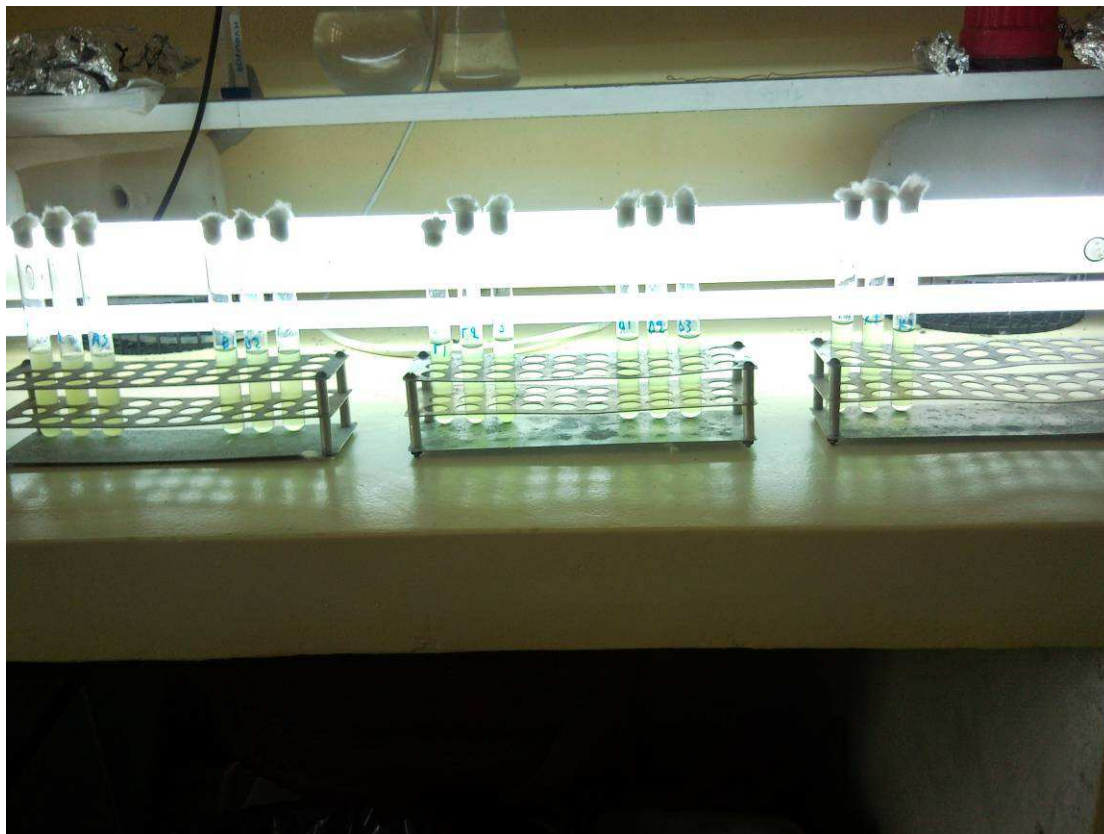
Αρχικά, δημιουργήθηκε μια καθαρή καλλιέργεια από το μικροφύκος *P. lutheri* σε θρεπτικό υλικό Wallne (1970) (Πίν. 4), όπου παρέμεινε για επώαση για τρεις ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου, υπό το φως 2 λαμπτήρων, 36 W έκαστος. Μετά από επώαση τριών ημερών και αφού η ανάπτυξη του πληθυσμού του φύκους ήταν σε εκθετική φάση, εκτιμήθηκε η συγκέντρωση του στην καλλιέργεια αυτή σύμφωνα με τον εξής τρόπο : 4 δείγματα όγκου 100 μl έκαστο από την καλλιέργεια, τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς περιέκτες τύπου erendorf και στη συνέχεια προστέθηκαν αντίστοιχα 5 μl εξουδετερωμένης φορμόλης σε κάθε περιέκτη με στόχο την ακινητοποίησή των κυττάρων του μικροφύκους. Έπειτα μικροποσότητα από κάθε περιέκτη τοποθετήθηκε σε αιμοκυττόμετρο (Neubauer plate) και πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο. Από τον μέσο όρο των τεσσάρων μετρήσεων υπολογίστηκε η συγκέντρωση του μικροφύκους στην καλλιέργεια και ισοδυναμούσε με  $15 \times 10^6$  κύτταρα /ml .

Στη συνέχεια ελήφθησαν 150 ml από την καλλιέργεια και μοιράστηκαν σε 15 γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Σε αυτούς προστέθηκε θρεπτικό υλικό, ώστε η τελική συγκέντρωση του μικροφύκους μέσα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα ήταν  $7.5 \times 10^5$  κύτταρα/ml.

Στους 12 από αυτούς τους σωλήνες προστέθηκε ουσία Diflubenzuron (DFB) έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι :

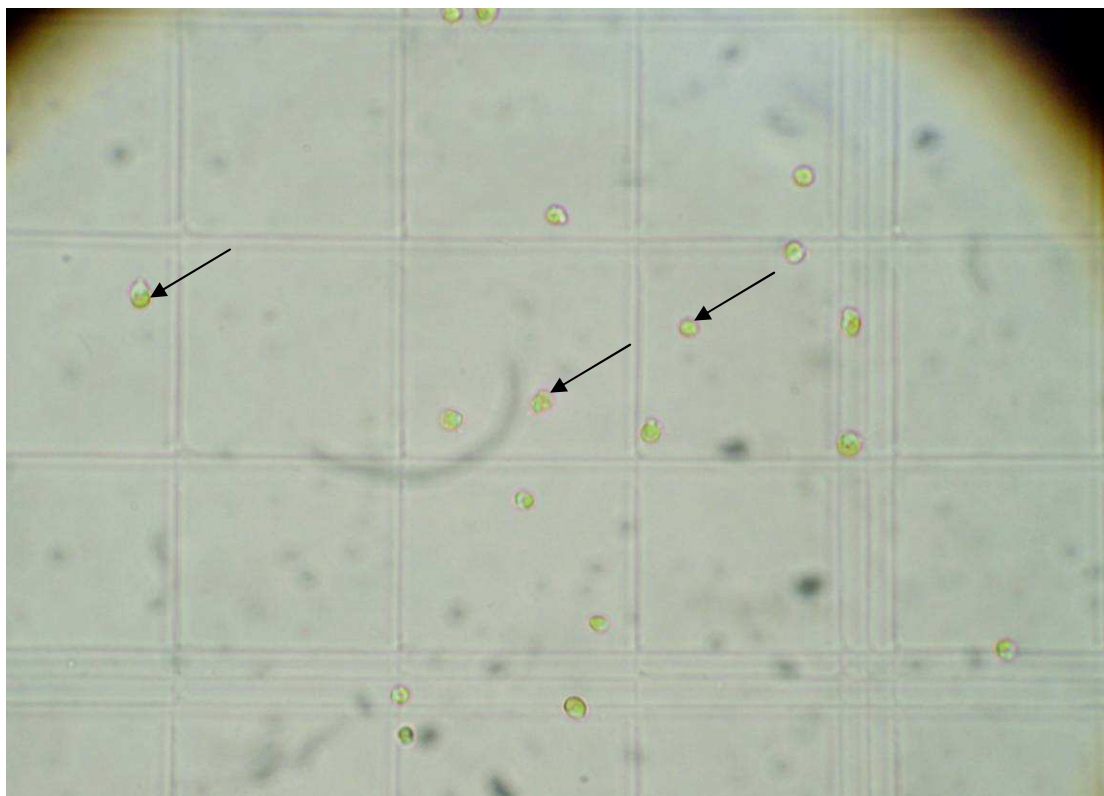
- 1) στους πρώτους 3 σωλήνες (ομάδα Α): τελική συγκέντρωση 500 ppm
- 2) στους επόμενους τρεις (ομάδα Β): τελική συγκέντρωση 100 ppm
- 3) στους επόμενους τρεις (ομάδα Γ): τελική συγκέντρωση 50 ppm
- 4) και στους τελευταίους τρεις (ομάδα Δ): τελική συγκέντρωση 25 ppm.
- 5) Στους τελευταίους 3 δοκιμαστικούς σωλήνες δεν προστέθηκε DFB και χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες.

Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες διατηρήθηκαν επί 4 ημέρες σε θερμοκρασία  $23\pm 0,5$  °C και υπό συνεχή φωτισμό δύο λαμπτήρων 36 W, που βρίσκονται σε απόσταση 20 cm από τους σωλήνες (Εικ. 9).



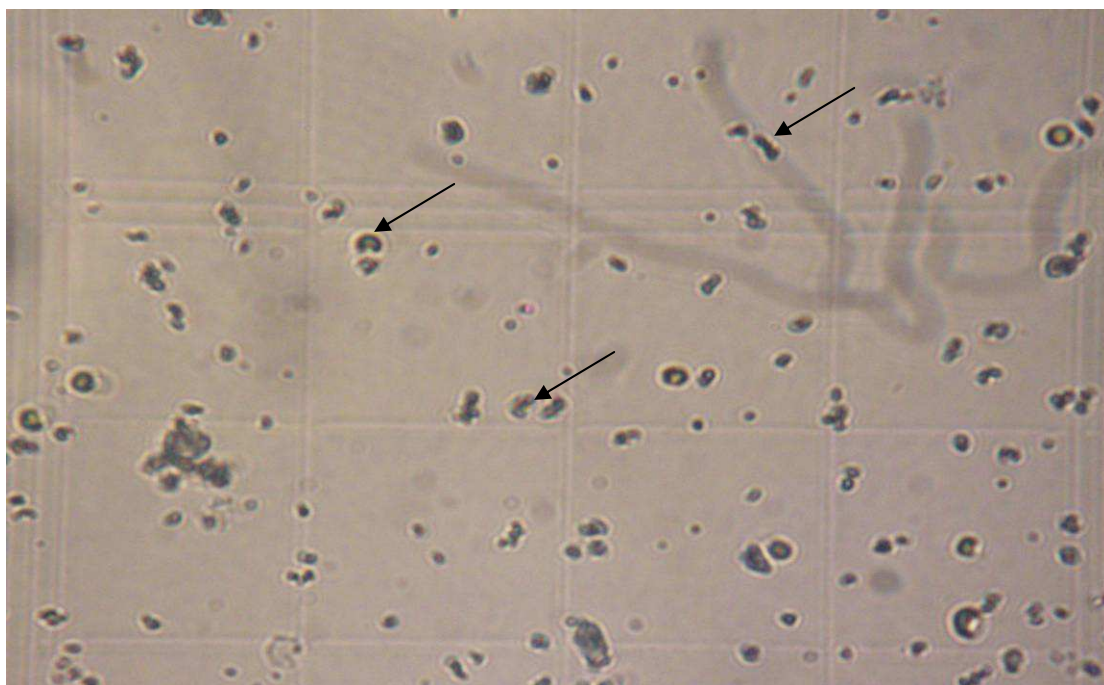
**Εικ 9.** Οι τριάδες των δοκιμαστικών σωλήνων που περιέχουν τα μικροφύκη *Pavlova lutheri* με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις DFB , στο εργαστήριο  
(Φωτογραφία Φουρλίγκας Ματθαίος)

Κατά το χρονικό αυτό διάστημα από κάθε σωλήνα λαμβάνονταν καθημερινά, με τη βοήθεια ενός σιφωνίου και μετά από έντονη ανάμειξη του περιεχομένου, 4 δείγματα των 100 μl και αφού προσθέτονταν μικροποσότητα εξουδετερωμένης φορμόλης με στόχο την ακινητοποίησή τους, γινόταν καταμέτρηση των κυττάρων (Εικ.10 και 11) στο μικροσκόπιο σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο.



**Εικ. 10.** Κύτταρα *Pseudomonas lutheri* (βέλη) σε συγκέντρωση DFB 25 ppm, κατά την καταμέτρηση τους σε αιμοκυττόμετρο Neubauer plate, με οπτικό μικροσκόπιο (25x)

(Φωτογραφία Φουρλίγκας Ματθαίος)



**Εικ. 11.** Κατεστραμμένα κύτταρα *Pseudomonas lutheri* και κυτταρικά ράκη (βέλη) σε συγκέντρωση DFB 500 ppm, κατά την καταμέτρηση τους σε αιμοκυττόμετρο Neubauer plate

(Φωτογραφία Φουρλίγκας Ματθαίος)

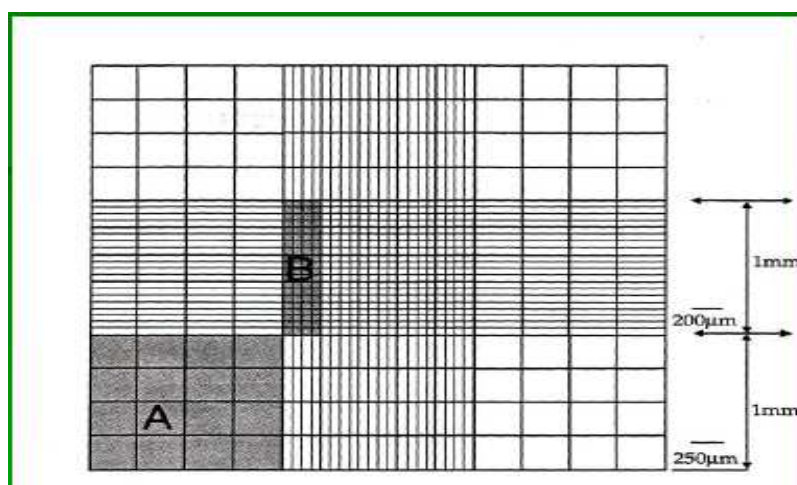
Κατά τη μέθοδο καταμέτρησης σε αιμοκυττόμετρο Neubauer (Εικ. 12), γίνεται μέτρηση των κυττάρων σε 5 τουλάχιστον από τα 25 τετραγωνάκια και αφού βγει η μέση τιμή, εκτιμάται ο μέσος αριθμός κυττάρων για ολόκληρο το μεγάλο πλαίσιο του αιμοκυττόμετρου, σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$A \times 9/0.0025 = \text{αριθμός κυττάρων}$$

όπου A είναι ο αριθμός των κυττάρων που βρέθηκε καταμετρώντας τα κύτταρα στα ελάχιστα τετραγωνάκια των  $0.0025 \text{ mm}^2$  και το κλάσμα  $9/0.0025$  είναι ο συντελεστής ή καλύτερα ο αριθμός των ελάχιστων τετραγωνιδίων των  $0.0025 \text{ mm}^2$  που αντιστοιχούν στην επιφάνεια του μεγάλου πλαισίου εμβαδού  $9 \text{ mm}^2$ . Στη συνέχεια αφού πολλαπλασιάσουμε τον αριθμό των κυττάρων, που υπολογίσαμε προηγουμένως, με το 1ml και διαιρέσουμε με το 0.0009 ml που αντιπροσωπεύει τον όγκο δείγματος επάνω στο πλαίσιο, ο αριθμός κυττάρων / ml δείγματος είναι :

$$\text{αριθμός κυττάρων} \times 1 / 0.0009 = \text{αριθμός κυττάρων / ml δείγματος}$$

Η διαδικασία επαναλαμβάνονταν άλλη μία φορά. Έτσι προέκυπταν 4 τιμές από τις οποίες υπολογιζόταν η μέση τιμή. Αφού ολοκληρωνόταν η διαδικασία σε όλα τα δείγματα γινόταν με κατάλληλες αναγωγές ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των κυττάρων σε κάθε σωλήνα.



Εικ. 12 Αιμοκυττόμετρο Neubauer.

**Πίν. 4.** Θρεπτικό Υλικό κατά Wallne**Διάλυμα Wallne**

Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για όλα τα καλλιεργούμενα είδη μικροφυκών

<b>Διάλυμα No 1</b>		<b>Διάλυμα No 2 (ιχνοστοιχεία)</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA	45.00 g	ZnCl <sub>2</sub>	2.1 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33.00 g	CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	2.0 g
NaNO <sub>3</sub> (KNO <sub>3</sub> )	100.00 g (116g)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0.9 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	20.00 g	CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	2.0 g
MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	0.36 g	Στα παραπάνω συμπληρώνεται	
FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O	1.30 g	απεσταγμένο νερό και HCl για	
Διάλυμα No 2	1.00 g	καλύτερη διάλυση, μέχρι ο όγκος	
		γίνει 1 λίτρο.	

Στα παραπάνω συμπληρώνεται απεσταγμένο νερό μέχρι ο όγκος γίνει 1 λίτρο.

<b>Διάλυμα No 3 (Βιταμίνες)</b>	Thiamin chlorhydrate	200 mg
	Cyanocobalamin	10 mg

Στα παραπάνω συμπληρώνεται απεσταγμένο νερό μέχρι ο όγκος γίνει 100ml.

**Διάλυμα για καλλιέργειες διατόμων**

<b>Διάλυμα No 4:</b> Sodium metasilicate	20 g	<b>Διάλυμα No 5:</b> KNO <sub>3</sub>	100 g
--	------	---------------------------------------	-------

Και στα δύο διαλύματα (4 και 5) συμπληρώνεται απεσταγμένο νερό μέχρι ο όγκος για το καθένα ξεχωριστά γίνει 1 λίτρο.

**Εκτός από το διάλυμα No3 (Βιταμίνες), όλα τα υπόλοιπα διαλύματα τοποθετούνται σε αυτόκαυστο για 30 λεπτά στους 125 °C.**

**Δοσολογία :** Για τα διαλύματα 1, 4, και 5 1ml/λίτρο. Για το διάλυμα 3 0.1ml/ λίτρο

(Πηγή: Aquasop 1983, σελ. 6-7., Συμμεωνίδης Χ. 2003 σελ. 30)



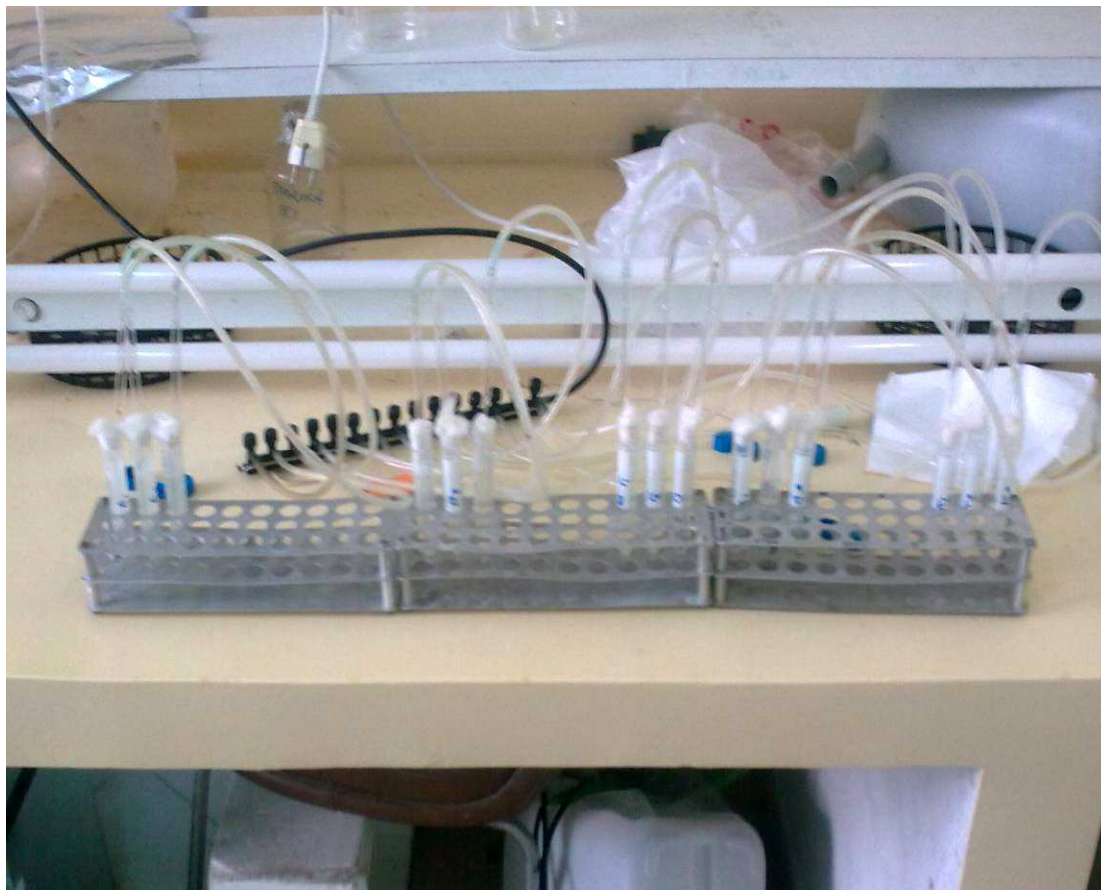
### 2.2.2 Τροχόζωα - *Brachionus plicatilis*

Τα τροχόζωα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από μονάδα εντατικής εκτροφής ιχθυδίων τσιπούρας και λαβρακιού. Πριν τη συλλογή τους, τα τροχόζωα ταϊστήκαν στη μονάδα με μικροφύκη του είδους *Tetraselmis suecica*. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν μέσα σε έναν πλαστικό σάκο που περιείχε θαλασσινό νερό και μεταφέρθηκαν εντός μιας ώρας στο εργαστήριο ιχθυολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. Αρχικά εκτιμήθηκε ο αριθμός των τροχοζώων μέσα στο σάκο σύμφωνα με την εξής μέθοδο: 4 δείγματα όγκου 5 μl τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες και σε κάθε ένα από αυτά καταμετρήθηκε ο συνολικός αριθμός των ζωντανών τροχοζώων, με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου (x10 μεγέθυνση) (Εικ. 14). Από τον μέσο όρο των τεσσάρων μετρήσεων υπολογίστηκε η συγκέντρωση των τροχοζώων. Στη συνέχεια, ελήφθησαν 120 ml θαλασσινού νερού που περιείχαν τροχόζωα και μοιράστηκαν σε 12 γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Σε αυτούς προστέθηκε αποστειρωμένο και φιλτραρισμένο (0,45 μm) θαλασσινό νερό ώστε η τελική συγκέντρωση των τροχοζώων μέσα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα ήταν  $1.2 \times 10^3$  τροχοζώα/ml. Στους 9 από αυτούς τους σωλήνες προστέθηκε ουσία Diflubenzuron (DFB) έτσι ώστε:

- 1) στους πρώτους 3 σωλήνες (ομάδα Α) η τελική συγκέντρωση να είναι **100 ppm**
- 2) στους επόμενους τρεις (ομάδα Β) η τελική συγκέντρωση να είναι **50 ppm**
- 3) και στους τελευταίους τρεις (ομάδα Δ) η τελική συγκέντρωση να είναι **25 ppm**
- 4) Στους τελευταίους 3 δοκιμαστικούς σωλήνες δεν προστέθηκε DFB και χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες.

Οι δοκιμαστικοί αυτοί σωλήνες διατηρήθηκαν επί 4 ημέρες σε θερμοκρασία  $23 \pm 0,5^\circ \text{C}$  και υπό συνεχή φωτισμό δύο λαμπτήρων φθορισμού 36 W που βρισκόταν σε απόσταση 20 cm από τους σωλήνες. Επιπροσθέτως,

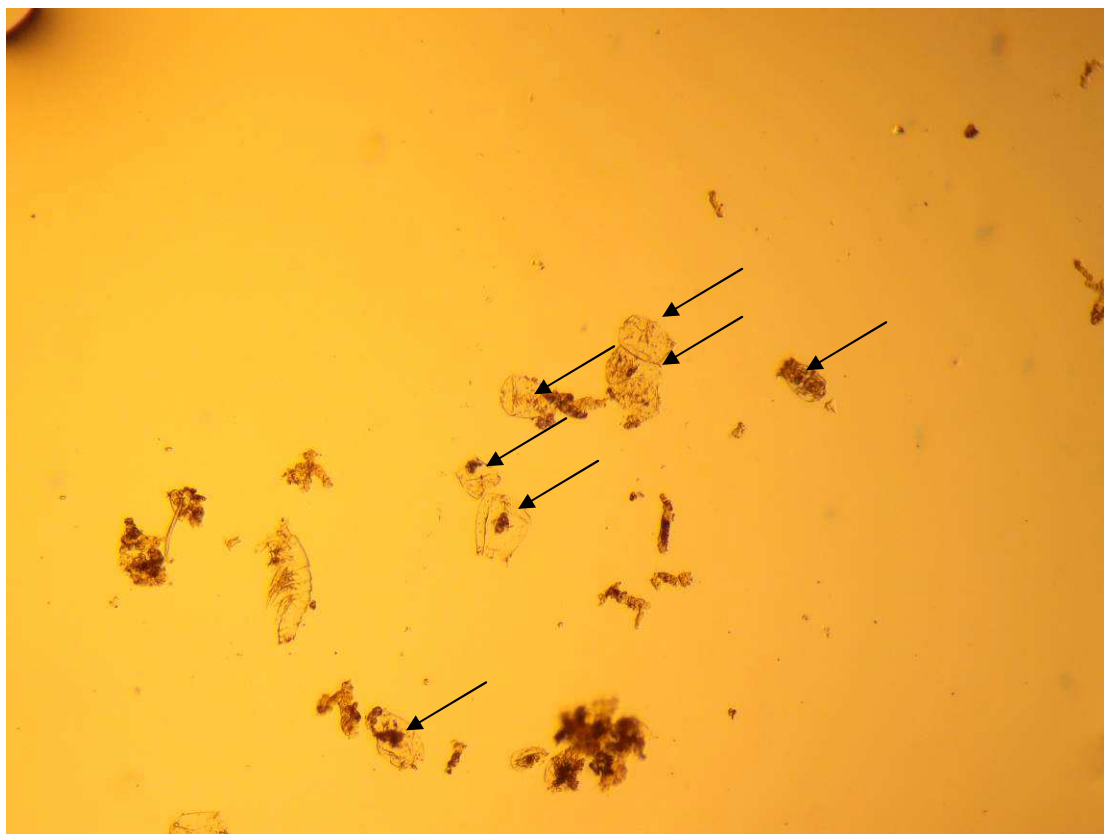
το νερό σε κάθε σωλήνα αεριζόταν με την βοήθεια μιας γυάλινης μικροπιπέτας που εισήγαγε αέρα υπό μορφή μικρών φυσαλίδων (Εικ. 13).



**Εικ 13.** Οι τριάδες των δοκιμαστικών σωλήνων που περιέχουν τα τροχόζωα με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις DFB, ο φωτισμός και η παροχή οξυγόνου.

(Φωτογραφία Φουρλίγκας Ματθαίος)

Κατά το χρονικό αυτό διάστημα από κάθε σωλήνα λαμβάνονταν καθημερινά, με τη βοήθεια ενός σιφωνίου και μετά από έντονη ανάμειξη του περιεχομένου, 4 δείγματα των 5 μl και σε αυτά καταμετρούνταν τα τροχόζωα σύμφωνα με τη παραπάνω μέθοδο.



Εικ 14. Εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο (10x) στο οποίο παρατηρούμε ζωντανά τροχόζωα *B. plicatilis* (βέλη), σε συγκέντρωση 25 ppm DFB.

(Φωτογραφία Φουρλίγκας Ματθαίος)

### 2.2.3. Ιχθύδια *Sparus aurata*

Τα ιχθύδια που χρησιμοποιήθηκαν για μελέτη ήταν γόνος και ήταν εβδομήντα ημερών και μέσου βάρους 0,25 gr. Τα ιχθύδια προήλθαν από τον ιχθυογεννητικό σταθμό Τρίτωννα στη Σαγιάδα Θεσπρωτίας και δεν έλαβαν τροφή την ημέρα της μεταφοράς στο εργαστήριο ιχθυολογίας της κτηνιατρικής του Α.Π.Θ. Η μεταφορά τους έγινε μέσα σε μεγάλες πλαστικές σακούλες στις οποίες έγινε προσθήκη υπεροξυγονομένου νερού από την μονάδα προέλευσης των ιχθύων. Στη συνέχεια μέσα σε 12 πλαστικούς περιέκτες του 1,5 λίτρου προστέθηκε από 1 λίτρο θαλασσινού νερού προερχόμενο από τον ιχθυογεννητικό σταθμό που ελήφθησαν τα ψάρια. Σε

κάθε περιέκτη τοποθετήθηκαν ομάδες των 10 ατόμων ενώ όλοι οι περιέκτες βρισκόταν κάτω από χαμηλό φωτισμό, υπό συνεχή αερισμό και σε σταθερή θερμοκρασία  $23\pm 0,5$  °C, η οποία ήταν και η θερμοκρασία του νερού στις σακούλες μεταφοράς.

Έπειτα με τη βοήθεια δοσομετρητή προστέθηκε στους 12 από αυτούς τους περιέκτες ουσία Diflubenzuron ως εξής :

- 1) στους πρώτους 3 περιέκτες (ομάδα Α): 3 ml (τελική συγκέντρωση **1500 ppm**)
- 2) στους επόμενους τρεις (ομάδα Β): 2 ml (τελική συγκέντρωση **1000 ppm**)
- 3) και στους τελευταίους τρεις (ομάδα Γ): 1 ml (τελική συγκέντρωση **500 ppm**).
- 4) Στους τελευταίους τρεις περιέκτες δεν τοποθετήθηκε Diflubenzuron, και χρησιμοποιήθηκαν σαν **μάρτυρες** του πειράματος.

Το πείραμα διήρκησε 4 ημέρες και κάθε ημέρα γινόταν καταμέτρηση των ζωντανών ιχθύων ενώ ταυτόχρονα γινόταν λήψη δειγμάτων για ιστολογική εξέταση. Αναλυτικότερα έγιναν δύο δειγματοληψίες για ιστολογική εξέταση, μια φορά στις 24 ώρες: ένα ιχθύδιο ανά περιέκτη (3 ανά ομάδα), και μια στις 96 ώρες, όπου είχαν παραμείνει μόνο ζωντανά στα 500 ppm και στους μάρτυρες. Ελήφθησαν δύο ιχθύδια από τους εναπομείναντες περιέκτες (6 ανά ομάδα). Στις 24 πρώτες ώρες έγινε λήψη μόνο νεκρών ψαριών στα 1500 ppm, καθώς είχαν πεθάνει όλα, ενώ στα 1000ppm έγινε λήψη 2 νεκρών και ενός ζωντανού. Τα δείγματα αυτά των ιχθύων τοποθετήθηκαν σε διάλυμα εξουδετερωμένης φορμόλης 10% .

Μετά την λήξη του πειράματος τα δείγματα που βρισκόταν στη φορμόλη, τοποθετήθηκαν σε ιστοκινέτα για τον εγκλεισμό τους σε παραφίνη. Κατόπιν με την βοήθεια μικροτόμου έγιναν ιστολογικές τομές οι οποίες αφού μονιμοποιήθηκαν βάφθηκαν με χρώση ηωσίνη-αιματοξυλίνη σύμφωνα με τον Πίν. 5 και στη συνέχεια έγινε ιστοπαθολογική παρατήρησή τους με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου.

Πίν. 5. Πρωτόκολλο χρώσης ηωσίνης - αιματοξυλίνης

ΒΗΜΑ	ΔΙΑΛΥΜΑ	ΧΡΟΝΟΣ
1	Υποκατάστατο Ξυλόλης Shandon ή Ξυλόλη	.3-4 λεπτά
2	Υποκατάστατο Ξυλόλης Shandon ή Ξυλόλη	.3-4 λεπτά
3	Υποκατάστατο Ξυλόλης Shandon ή Ξυλόλη	.3-4 λεπτά
4	Αλκοόλη 100%	.1 λεπτό
5	Αλκοόλη 95%	.1 λεπτό
6	Αλκοόλη (προαιρετικά)	.1 λεπτό
7	Διάλυμα Πλύσης Αποσταγμένου Νερού	.1-2 λεπτά
8	Αιματοξυλίνη Harris (διήθηση πριν από τη χρήση)	.4-8 λεπτά
	Η Αιματοξυλίνη Gill (αναλόγως για σκεύασμα 2 ή 3)	.2-5 λεπτά
9	Διάλυμα Πλύσης Αποσταγμένου Νερού	.1-2 λεπτά
10	Nu-Clear I	.10 δευτερόλεπτα
	Η Nu-Clear 11	.20 δευτερόλεπτα
11	Διάλυμα Πλύσης Αποσταγμένου Νερού	.1 λεπτό
12	Αντιδραστήριο Κυάνωσης	.1 λεπτό
13	Διάλυμα Πλύσης Αποσταγμένου Νερού	.1-2 λεπτά
14	Αλκοόλη (70%-95% προαιρετικά)	.1 λεπτό
15	Ηωσίνη Υ, αλκοολική	.10 δευτερόλεπτα ως 1 λεπτό
	Η Ηωσίνη, υδατική	.2-4 λεπτά
16	Αλκοόλη 95%	.20 -30 δευτερόλεπτα
17	Απόλυτη Αλκοόλη	.1-2 λεπτά
18	Απόλυτη Αλκοόλη	.1-2 λεπτά
19	Απόλυτη Αλκοόλη	.1-2 λεπτά
20	Υποκατάστατο Ξυλόλης Shandon ή Ξυλόλη	.1-2 λεπτά
21	Υποκατάστατο Ξυλόλης Shandon ή Ξυλόλη	.1-2 λεπτά
22	Υποκατάστατο Ξυλόλης Shandon ή Ξυλόλη	.1-2 λεπτά
23	Στερέωση με Histo-Mount ή Shandon-Mount	

#### 2.2.4. Στατιστική ανάλυση

Η σύγκριση των μέσων όρων των συγκεντρώσεων των κυττάρων του μικροφύκους και των τροχοζώων ελέχθησαν με ανάλυση διακύμανσης ενός δρόμου (one way ANOVA), χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα STATGRAPHICS PLUS 3. Η μέθοδος Tukey χρησιμοποιήθηκε για να εντοπιστούν οι στατιστικές διαφορές όταν  $P \leq 0,05$ .

Η σύγκριση της επιβιωσιμότητας των ιχθυδίων τσιπούρας έγινε με τη μέθοδο Kaplan - Meier και χρησιμοποιήθηκε τοτέστ Breslow, και οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές όταν  $P \leq 0,05$ .

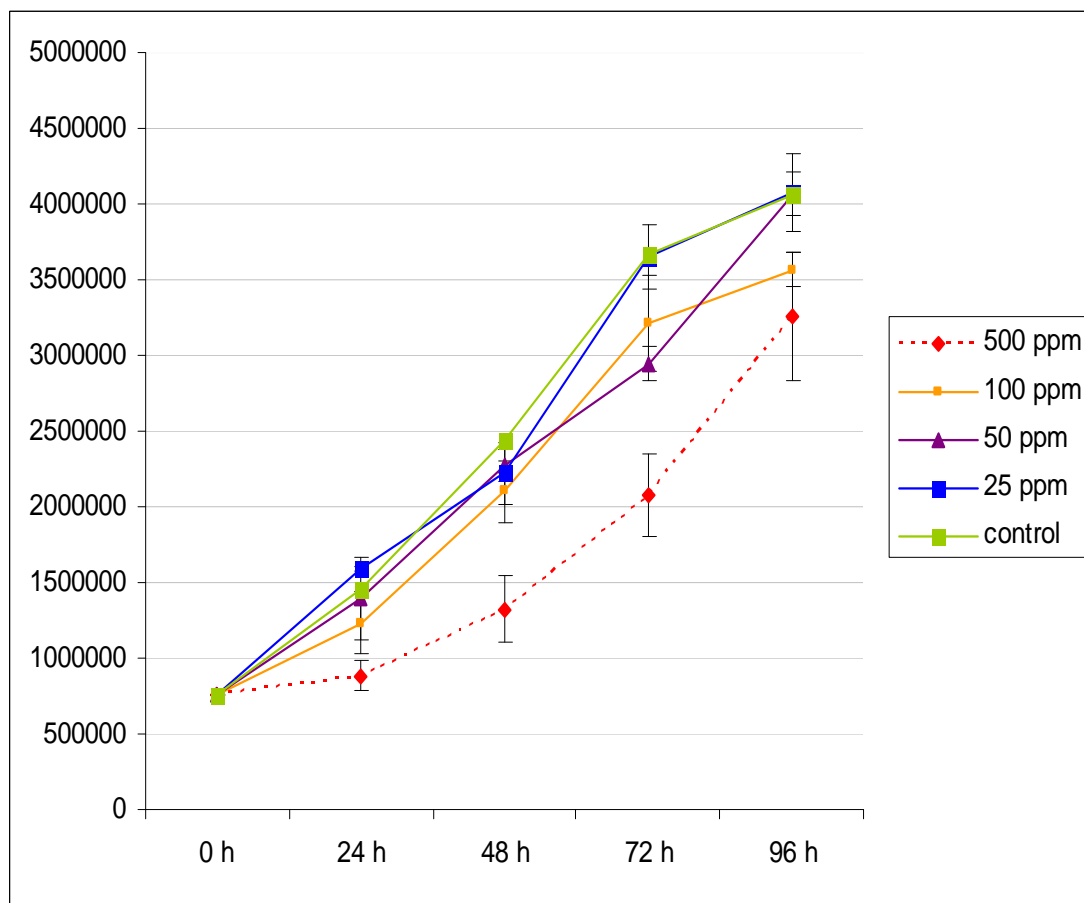
## 2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 2.3.1 *Pavlova Lutheri*

Στο είδος *P. Lutheri* στις τέσσερις μετρήσεις που έγιναν σε 24, 48, 72 και 96h η μικρότερη ( $P \leq 0,005$ ) αύξηση παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση DFB (500ppm) (Εικ. 15). Αναλυτικότερα τα αποτελέσματα των μετρήσεων των μικροφυκών, για όλες τις συγκεντρώσεις του DFB και για όλες τις ημέρες, παραθέτονται στον παρακάτω Πίν. 6.

Πίν. 6. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων DFB στην αύξηση του μικροφύκου *P. lutheri*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές  $\pm$  SD από τις 3 επαναλήψεις ανά ομάδα και ανά ημέρα, ενώ διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σε μια χρονική στιγμή ( $P \leq 0,05$ ). Οι παρακάτω τιμές είναι  $\cdot 10^6$  κύτταρα / ml .

	500 ppm	100 ppm	50 ppm	25 ppm	μάρτυρες
24h	0,88 $\pm$ 0,1 <sup>α</sup>	1,23 $\pm$ 0,2 <sup>αβ</sup>	1,39 $\pm$ 0,3 <sup>β</sup>	1,59 $\pm$ 0,08 <sup>β</sup>	1,44 $\pm$ 0,04 <sup>β</sup>
48h	1,32 $\pm$ 0,2 <sup>α</sup>	2,10 $\pm$ 0,2 <sup>β</sup>	2,27 $\pm$ 0,1 <sup>β</sup>	2,22 $\pm$ 0,2 <sup>β</sup>	2,43 $\pm$ 0,1 <sup>β</sup>
72h	2,07 $\pm$ 0,3 <sup>α</sup>	3,21 $\pm$ 0,3 <sup>β</sup>	2,94 $\pm$ 0,1 <sup>β</sup>	3,64 $\pm$ 0,2 <sup>β</sup>	3,66 $\pm$ 0,7 <sup>β</sup>
96h	3,26 $\pm$ 0,4 <sup>α</sup>	3,56 $\pm$ 0,1 <sup>αβ</sup>	4,06 $\pm$ 0,1 <sup>β</sup>	4,08 $\pm$ 0,2 <sup>β</sup>	4,06 $\pm$ 0,3 <sup>β</sup>



Εικ. 15. Επίδραση του DFB στην αύξηση (κύτταρα/ml) του *Pavlova lutheri*. Οι τιμές αντίπροσωπεύουν τις μέσες τιμές από 4 μετρήσεις ανά σωλήνα  $\pm$  SD.

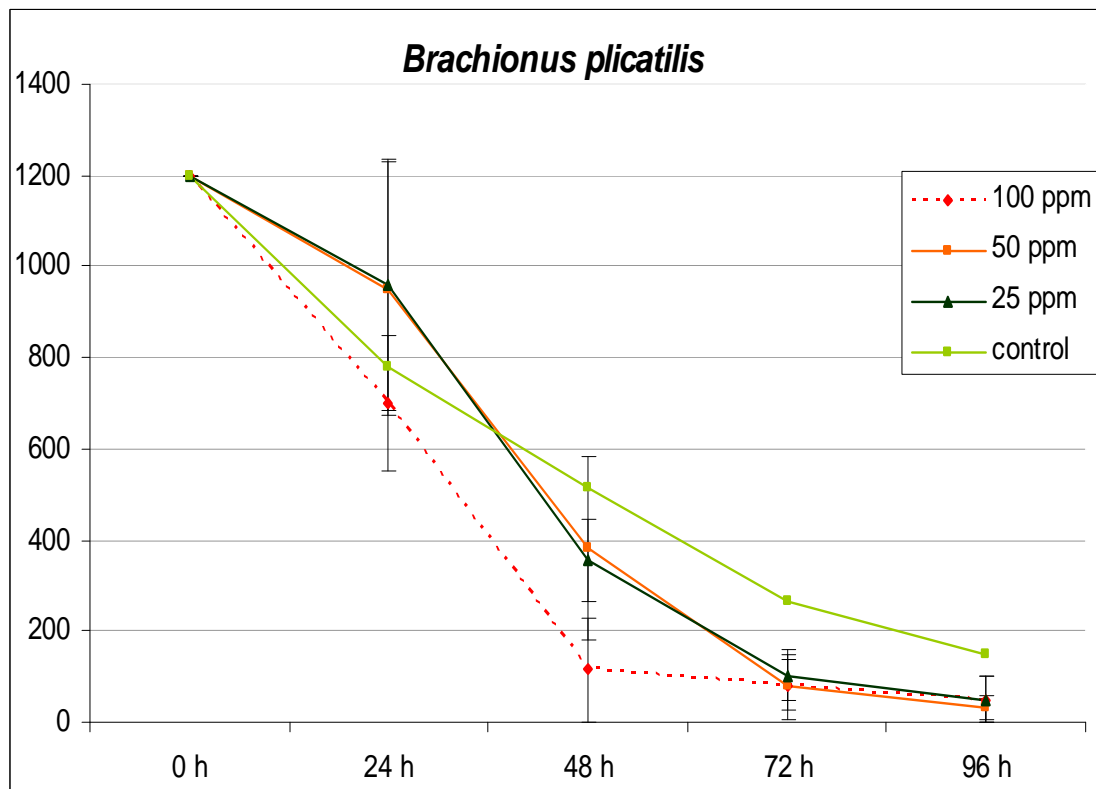


### 2.3.2 *Brachionus plicatilis*

Τάση ( $P > 0,05$ ) γρηγορότερης μείωσης του αριθμού των τροχοζών παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς που καλλιεργήθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση DFB στα 100 ppm (Εικ. 16). Αναλυτικότερα τα αποτελέσματα των μετρήσεων των ζωντανών τροχοζών, για όλες τις συγκεντρώσεις του DFB και για όλες τις ημέρες, παραθέτονται στον παρακάτω Πίν. 7.

Πίν. 7. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων DFB στην επιβιωσιμότητα του τροχοζώου *B. plicatilis*. Οι τιμές αναφέρονται σε  $10^3$  τροχοζώα /ml και αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές από τις 3 επαναλήψεις ανά ομάδα  $\pm$  SD.

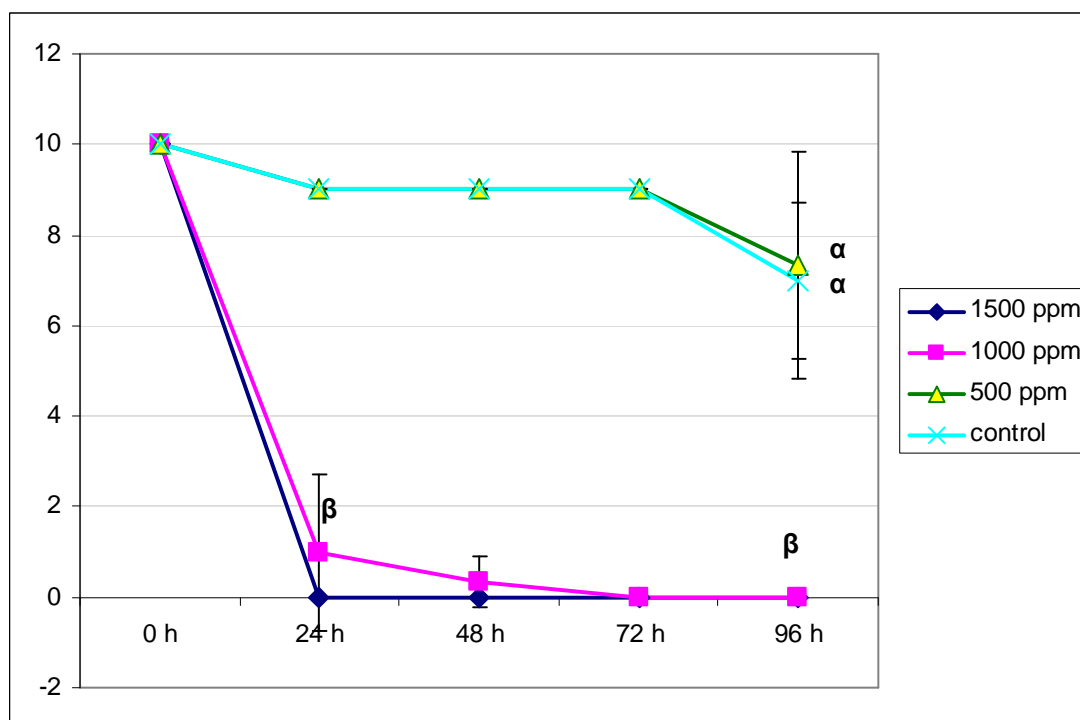
	100 ppm	50 ppm	25 ppm	control
24h	0.70 $\pm$ 0.1	0,95 $\pm$ 0,27	0,96 $\pm$ 0,27	0,78 $\pm$ 0,1
48h	0.11 $\pm$ 0.1	0,38 $\pm$ 0,2	0,35 $\pm$ 0,09	0,51 $\pm$ 0,2
72h	0.08 $\pm$ 0.07	0,08 $\pm$ 0,05	0,1 $\pm$ 0,05	0,26 $\pm$ 0,08
96h	0.05 $\pm$ 0.05	0,03 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,05



**Εικ. 16.** Επίδραση του DFB στην επιβίωση (κύτταρα/ml) του *Brachionus plicatilis*. Οι τιμές αντίπροσωπεύουν τις μέσες τιμές από τους 3 σωλήνες ανά ομάδα (4 μετρήσεις ανά σωλήνα)  $\pm$  SD.

### 2.3.3. Ιχθύδια *Sparus aurata*

Όπως παρουσιάζεται αναλυτικά και στην **Εικ. 17**, η μεγαλύτερη συγκέντρωση DFB (1500 ppm) είχε σαν αποτέλεσμα το θάνατο ολόκληρου του πληθυσμού των ιχθυδίων *Sparus aurata* μέσα σε 24 ώρες. Κάτι ανάλογο παρατηρήθηκε και στην αμέσως μικρότερη συγκέντρωση DFB (1000 ppm), όπου ο εναπομένον πληθυσμός ζωντανών ιχθυδίων τσιπούρας ήταν  $1 \pm 1.73$  SD και  $0.33 \pm 0.57$  SD ζωντανά ιχθύδια / περιέκτη στις 24 και 48 ώρες αντίστοιχα, ενώ και σε αυτή τη συγκέντρωση επήλθε θάνατος όλου του πληθυσμού μετά την τρίτη ημέρα (72 h). Αντίθετα τόσο στην συγκέντρωση των 500 ppm όσο και στα control, δεν παρατηρήθηκε καμία απώλεια ψαριών έως και την 72<sup>η</sup> ώρα, ενώ την 96<sup>η</sup> ώρα ο πληθυσμός ήταν  $7 \pm 2$  SD ζωντανά ιχθύδια / περιέκτη στα 500 ppm και  $7 \pm 1.73$  SD ζωντανά ιχθύδια / περιέκτη στα control.



Εικ. 17. Επίδραση του DFB στην επιβίωση (ζωντανά ιχθύδια/ περιέκτη) του *S. aurata*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές από τους 3 περιέκτες ανά ομάδα  $\pm$  SD.

### ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Με εξαίρεση τα βράγχια, η ιστολογική εξέταση των δειγμάτων ιστών που λήφθηκαν από τα ψάρια δεν έδειξε καμία διαφορά ανάμεσα στις ομάδες των ψαριών που εκτέθηκαν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις DFB. Όλα τα εσωτερικά όργανα παρουσίασαν φυσιολογική εμφάνιση (Εικ. 18 και 19). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι από τα ψάρια που εκτέθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση DFB λήφθηκαν νεκρά ψάρια για ιστολογική εξέταση, επειδή όλα πέθαναν σε διάστημα μικρότερο από 24 h. Επίσης δεν λήφθηκαν δείγματα ψαριών που εκτέθηκαν σε 1000 ppm DFB μετά από διάστημα 4 ημερών, επειδή όλα είχαν πεθάνει πριν την πρώτη δειγματοληψία.

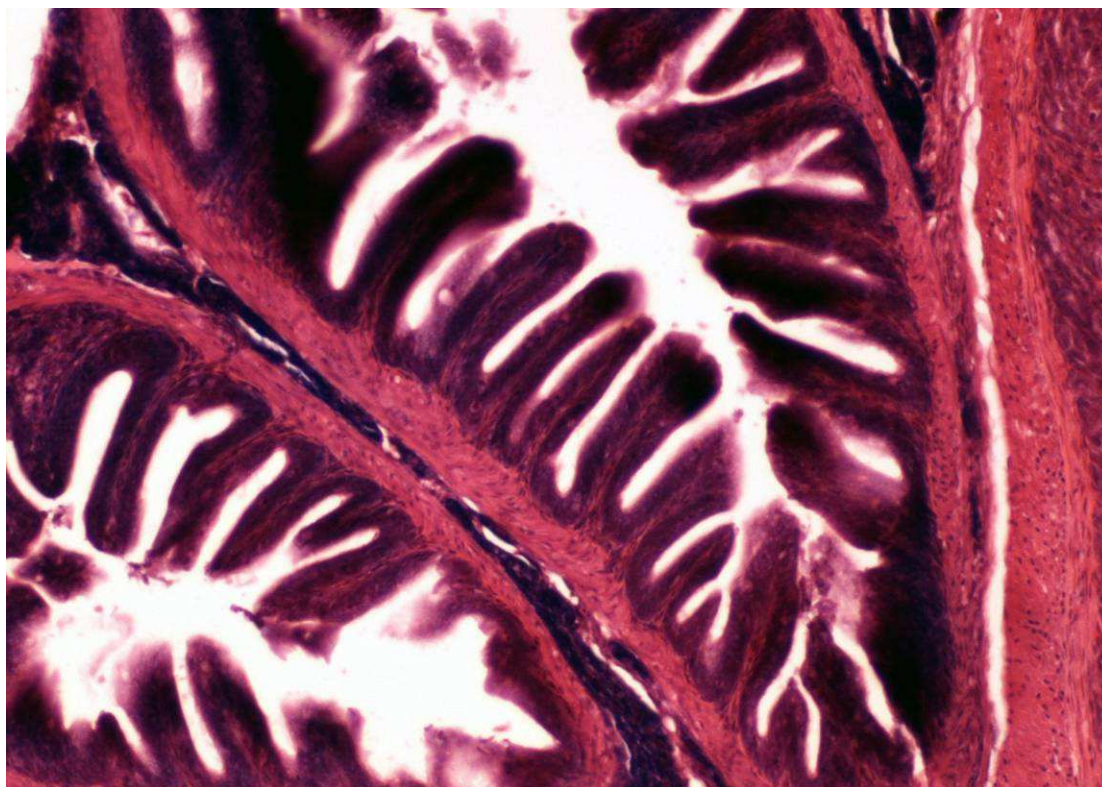
Κατά την ιστολογική εξέταση των βραγχίων παρατηρήθηκαν τα εξής :

α) Και στις δύο δειγματοληψίες, τα βράγχια των ψαριών που δεν εκτέθηκαν στο DFB (μάρτυρες) παρουσίασαν φυσιολογική εμφάνιση με ελάχιστες εστίες υπερπλασίας και υπερτροφίας του αναπνευστικού επιθηλίου (Εικ. 20).

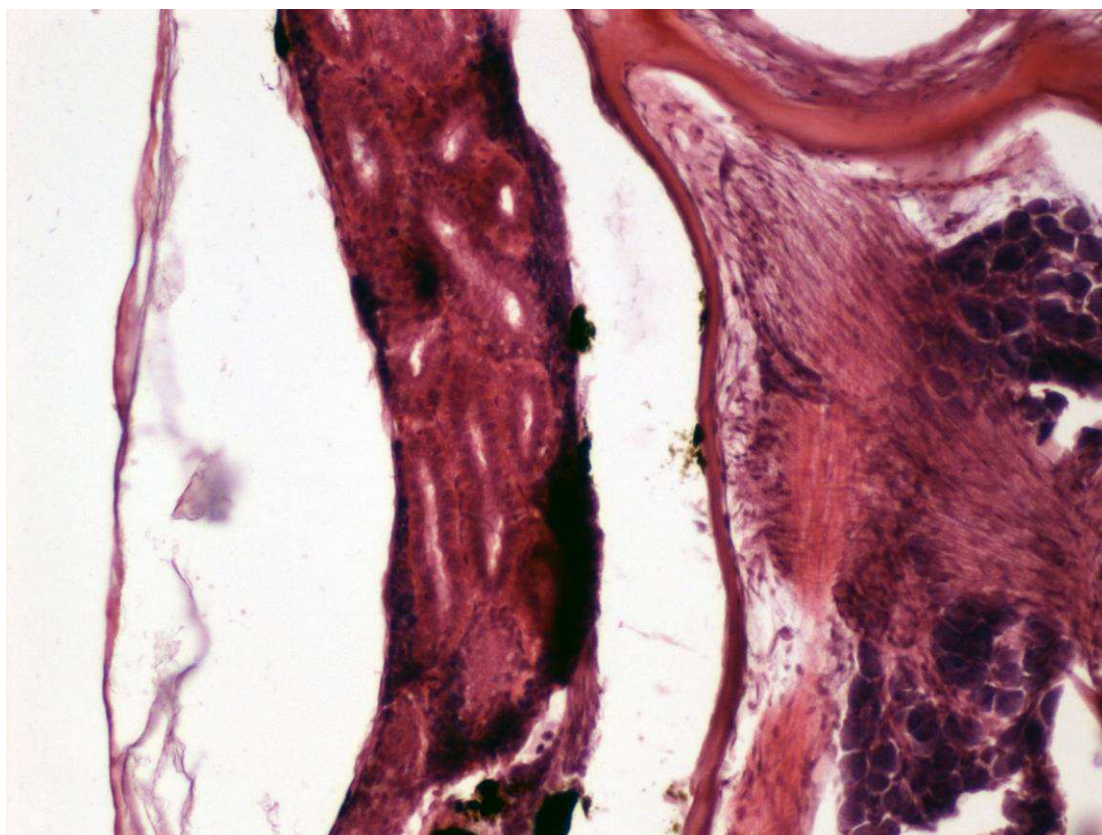
β) Τα βράγχια όλων των ψαριών που εκτέθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση DFB παρουσίασαν έντονες μεταθανάτιες αλλοιώσεις, με αποτέλεσμα να μην ήταν δυνατό να εκτιμηθεί η τυχόν επίδραση του εντομοκτόνου (Εικ. 21)

γ) Τα βράγχια όλων των ψαριών που εκτέθηκαν σε 1000 ppm DFB και που συλλέχτηκαν κατά την πρώτη δειγματοληψία, παρουσίασαν εκτεταμένες περιοχές με έντονη υπερπλασία και υπερτροφία του αναπνευστικού επιθηλίου, ενώ σε κάποιες περιοχές παρατηρήθηκε και αποκόλλησή του.

δ) Τα βράγχια όλων των ψαριών που εκτέθηκαν σε 500 ppm DFB και που συλλέχτηκαν κατά την πρώτη δειγματοληψία, παρουσίασαν φυσιολογική εμφάνιση με αρκετές εστίες υπερπλασίας και υπερτροφίας του αναπνευστικού επιθηλίου (Εικ. 22). Στην δεύτερη δειγματοληψία, οι εστίες αυτές παρατηρήθηκαν αυξημένες.



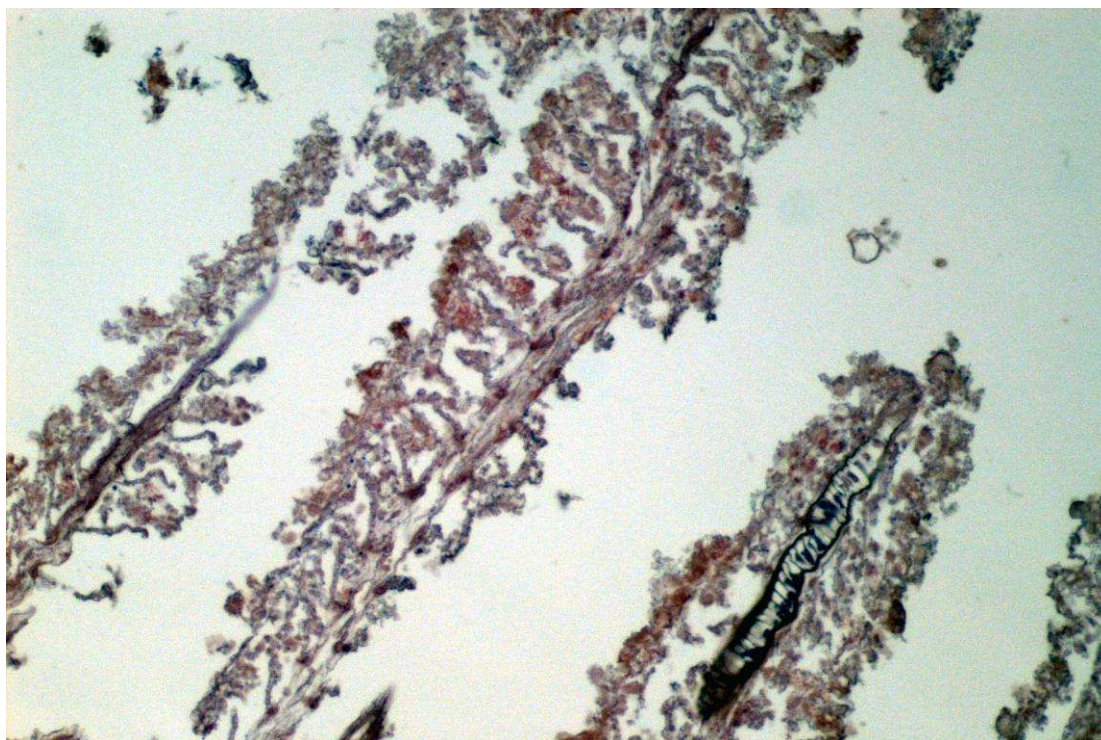
Εικ. 18. Έντερο τσιπούρας που δεν εκτέθηκε σε DFB, δεύτερη δειγματοληψία. Φυσιολογική εμφάνιση εντερικών λαχνών. Μεγέθυνση  $\times 200$



Εικ. 19. Νεφρός τσιπούρας που δεν εκτέθηκε σε DFB, δεύτερη δειγματοληψία. Φυσιολογική εμφάνιση. Μεγέθυνση  $\times 200$



Εικ. 20. Βράγχια τσιπούρας που δεν εκτέθηκε σε DFB, 2<sup>η</sup> δειγματοληψία. Φυσιολογική εμφάνιση βραγχιικών νηματίων με εστίες υπερπλασίας και υπερτροφίας (βέλη). Μεγέθυνση ×200



Εικ. 21. Βράγχια τσιπούρας που εκτέθηκε σε 1500 ppm DFB, πρώτη δειγματοληψία. Εκτεταμένες μεταθανάτιες αλλοιώσεις του ιστού. Μεγέθυνση ×200



Εικ. 22. Βράγχια τσιπούρας που εκτέθηκε σε 1000 ppm, πρώτη δειγματοληψία. Έντονη υπερπλασία και υπερτροφία αναπνευστικού επιθηλίου δευτερογενών βραγχιακών νημάτων. Μεγέθυνση  $\times 200$

### 3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η χημική ουσία diflubenzuron ή Dimilin αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο εντομοκτόνο που δρα μέσω της αναστολής της σύνθεσης της χιτίνης που σε ορισμένους οργανισμούς συμβάλλει στον σχηματισμό του εξωσκελετού, κατά τη διαδικασία της έκδυσης. Αν και γενικά η χρήση της σε οργανισμούς που δεν είναι οι κύριοι στόχοι θεωρείται ασφαλής, πολλές μελέτες (Eisler 2007) έχουν δείξει τις αρνητικές συνέπειες που προκαλούνται σε ολόκληρη την τροφική αλυσίδα και κυρίως στο υδάτινο οικοσύστημα. Είναι μια ουσία πολύ σταθερή στη φύση αφού παραμένει στο θαλάσσιο ίζημα για τουλάχιστον 204 ημέρες στους 4 έως 14°C, όπως οι Selvik *et al.*, (2002) απέδειξαν. Ο μεταβολίτης της 4 - κλωροανιλίνη, η οποία έχει καταχωρηθεί και σαν μεταλλαξιογόνος ουσία (EPA(2006) και Schaefer *et al.*, (1980)), είναι πολύ πιο τοξική για τα ψάρια από ότι το DFB. Ο πιο ευαίσθητος οργανισμός στον παραπάνω μεταβολίτη είναι το *Lepomis macrochirus* (Julin and Sanders 1978). Το ίδιο το diflubenzuron δεν είναι μεταλλαξιογόνο και δεν προκαλεί οξείες δηλητηριάσεις ενώ υφίσταται υδρόλυση και φωτόλυση από μικρόβια και ο χρόνος ημίσειας ζωής του είναι μια εβδομάδα (Jin 2005). Στην Ελλάδα το (DFB) αν και χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην καταπολέμηση των κουνουπιών και η εφαρμογή του γίνεται με αεροψεκασμούς των περιαστικών περιοχών και των ορυζώνων, δεν είναι γνωστές αρνητικές συνέπειες στα υδρόβια ζώα.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δράση του DFB στην αύξηση ενός από τα πλέον διαδεδομένα είδη υδρόβιων μικροφυκών, του *Pavlova lutheri*, το οποίο αποτελεί πολύτιμη πηγή τροφής για όλα τα στάδια ανάπτυξης των δίθυρων μαλακίων, για τα προνυμφικά είδη ορισμένων ειδών καρκινοειδών και για κάποια πρώιμα στάδια ανάπτυξης συγκεκριμένων ειδών ψαριών, ενώ συνήθως καλλιεργείται και σαν καθαρό στέλεχος (μονοκαλλιέργεια) σε εντατικά συστήματα. Τα πρώτα αυτά αποτελέσματα δείχνουν ότι υψηλές συγκεντρώσεις αυτής της ουσίας στο νερό μειώνουν σημαντικά την αύξηση του μικροφύκου αυτού. Οι Savitz *et al.* (1994) αναφέρουν παραπλήσια δράση στο κωπήποδο *Eurytemora affinis*, η οποία μάλλον λαμβάνει χώρα διαμέσου της τροφής τους. Οι Antia *et al.* (1985) με τη σειρά τους δεν



αναφέρουν αρνητική δράση του DFB επί 14 μέρες στα φύκη *Cyclotella cryptica* και *Skeletonema costatum*. Τα υπολείμματα DFB που μπορεί να υπάρχουν στο έδαφος είναι δυνατό να απορροφηθούν από τα φυτά (Jin 2005), ενώ σε εργαστηριακές μελέτες που έχουν γίνει με το DFB έχει παρατηρηθεί και αυξημένη συσσώρευση της ουσίας αυτής σε υδρόβια φυτά κατά την έκθεση τους σε συγκεντρώσεις 100 µg/l.

Στην συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκε η επίδραση του DFB στην επιβίωση του *Brachionus plicatilis*, που αποτελεί τον πλέον γνωστό αντιπρόσωπο των τροχόζων του θαλασσινού νερού. Το είδος αυτό είναι ένας πολύ σημαντικός κρίκος της υδρόβια τροφικής αλυσίδας καθώς χρησιμοποιείται ως πρώτη ζωντανή τροφή (θήραμα) των νυμφών πολλών ειδών θαλασσινών ψαριών ενώ οι καλλιέργειες του έχουν την ικανότητα να φτάνουν σε πολύ μεγάλες πυκνότητες (Hirata, 1979). Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε λοιπόν, τάση αρνητικής επίδρασης στην επιβίωση του συγκεκριμένου τροχόζου, κυρίως στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (100ppm) που χρησιμοποιήθηκε. Ανάλογες εργαστηριακές μελέτες (Cunningham 1976) για το είδος *Artemia salina*, έδειξαν σημαντική μείωση της αναπαραγωγής με 2, 5, και 10 µg/L κατά την έκθεση των οργανισμών για 90 ημέρες, ενώ στην ίδια μελέτη οι ναύπλιοι αυτού του είδους ήταν όλοι νεκροί μέσα σε 30 ημέρες στα 100 µg/L και η επιβιωσιμότητα ήταν ίδια με τους μάρτυρες με 1 και 10 µg/L. Πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τους *Cunningham et al* (1986) τα καρκινοειδή είναι η πιο ευαίσθητη ομάδα οργανισμών στην δράση του diflubenzuron, ενώ δυσμενής επίδραση παρατηρήθηκε και στην ανάπτυξη, την αναπαραγωγή, και την συμπεριφορά των κωπήποδων, της αρτέμιας, της δάφνιας, των αμφίποδων και των καβουριών σε συγκεντρώσεις DFB μεταξύ 0.062 και 2.0 µg/L.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε επίσης η δράση του DFB στην επιβίωση των ιχθυδίων τσιπούρας *Sparus aurata*. Παρατηρήθηκε λοιπόν έντονη αρνητική επίδραση του DFB στην επιβίωση των παραπάνω ψαριών στις μεγάλες συγκεντρώσεις (1500 και 1000ppm) καθώς επήλθε θάνατος σχεδόν σε όλα τα ιχθύδια μέσα στις πρώτες 24 ώρες, ενώ στη συγκέντρωση (500ppm) και στους μάρτυρες τα ψάρια παρέμειναν σχεδόν ανεπηρέαστα. Εργαστηριακή μελέτη των Mayer and Eilersieck (1986) σχετικά με την

επίδραση του DFB στο σολωμό του Ατλαντικού, *Salmo salar*, έδειξε ότι σε συγκέντρωση DFB 50.000 μg/L επιτυγχάνεται η LC50 σε 96 ώρες, ενώ στην ίδια μελέτη παρατηρείται ότι τα ψάρια είναι συγκριτικά πιο ανθεκτικά από άλλους οργανισμούς και ο θάνατος επέρχεται συνήθως σε επίπεδα DFB >33,000 μg/L. Σε κάποια ψάρια η δράση του DFB προκαλεί βλάβες στην ηπατική λειτουργία, όπως στο είδος *Prochilodus lineatus* (Fischer και Wall 1992). Η ιστολογική εικόνα των ψαριών, του πειραματισμού, δείχνει ότι το DFB επιδρά στα βράγχια των ψαριών. Πιθανότατα στις αλλοιώσεις που προκαλεί η DFB στα βράγχια των ψαριών να οφείλεται και ο θάνατος των ψαριών που εκτέθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου και στις οποίες είναι δυνατό να προκλήθηκε ασφυξία. Θα πρέπει να σημειωθεί όμως ότι μιας και χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Dimilin, το οποίο περιέχει αρκετά έκδοχα, η δράση κάποιων από αυτά στα βράγχια των ψαριών δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Συμπερασματικά η παρούσα εργασία αναδεικνύει την αρνητική επίδραση του DFB στο μικροφύκος (*P.lutheri*) ενώ φαίνεται να υπάρχει και τάση αρνητικής επίδρασης στην επιβίωση του τροχόζωου *B.plicatilis*. Ο πειραματισμός με τα ιχθύδια τσιπούρας ανέδειξε ( $P \leq 0,05$ ) αρνητική επίδραση του DFB (στις υψηλές συγκεντρώσεις, 1500, 1000 ppm) στην επιβιωσιμότητα των ιχθυδίων. Πρέπει όμως να υπογραμμισθεί ιδιαίτερα ότι οι επιδράσεις αυτές παρατηρήθηκαν σχεδόν μόνο στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον πειραματισμό αυτό (500 ppm για τα μικροφύκη, 100 ppm για τα τροχόζωα και 1500 ppm για τα ψάρια). Επίσης παρ'όλο που η συγκέντρωση ήταν πολύ υψηλή δεν διακόπηκε εντελώς ο πολλαπλασιασμός του μικροφύκου *P.lutheri* και του τροχόζωου *B.plicatilis*. Γενικά, οι υψηλές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη θεωρείται αδύνατον να βρεθούν στη φύση σε κάποια φυσική υδατοσυλλογή. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις αυτές για να διερευνηθούν τα όρια αντοχής των οργανισμών που μελετήθηκαν. Παρατηρείται λοιπόν και βάσει της παραπάνω σχετικής βιβλιογραφίας ότι αν και το diflubenzuron είναι μια σχετικά σταθερή ουσία, η τοξικότητα της είναι χαμηλή έως και ασήμαντη ιδίως για τους οργανισμούς που δεν έχουν ανάγκη να συνθέσουν χιτίνη. Οι μεταβολίτες της πιθανότατα

αποτελούν σοβαρότερο πρόβλημα για τους οργανισμούς από την ίδια την ουσία.

## BIBLIOΓΡΑΦΙΑ

### ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

**A.L. McMinn & T.R. Roberts, 1983.** The fate of pesticides in soils. Department of Environment and Conservation. Australia

**Antia, N. J., P. J. Harrison, D. S. Sullivan, and T. Bisalputra. 1985.** Influence of the insecticide diflubenzuron (dimilin) on the growth of marine diatoms and a harpacticoid copepod in culture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42: 1272-1277.

**Aquacop., 1983.** Algal food cultures at the Centre Ocanologique Du Pacifique, in Mc Vey J.P. (ed), *CRC Handbook of Mariculture*. Volume 1. Crustacean Aquaculture, Boca Raton FL, CRC Press, pp 3-15

**Booth, G. M., and D. Ferrell. 1977.** Degradation of dimilin by aquatic foodwebs. Pages 221-243 in M. A. Q. Khan, editor. *Pesticides in aquatic environments*. Plenum Press, New York.

**Borowitzka, M.A., 1997.** Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.* 9, 393-401.

**Brown, M., Robert, R., 2002.** Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 207, 289-309.

**Bull, D. L. 1980.** Fate of diflubenzuron after application to cotton and the boll weevil. *The Southwestern Entomologist*, Supplement 1:2-7.

**Christiansen, M. E. 1986.** Effect of diflubenzuron on the cuticle of crab larvae. Pages 175-181 in International conference on chitin and chitosan. Plenum Press, New York.

**Costlow, J. D. 1979.** Effect of dimilin on development of larvae of the stone crab *Menippe mercenaria*, and the blue crab, *Callinectes sapidus*. Pages 355-363 in W. B. Vernberg, A. Calabrese, F. P. Thurberg, and F. J. Vernberg, editors. Marine pollution: functional responses. Academic Press, New York.

**Coutteau, P. 1992.** Bakers's yeast as substitute for microalgae in the culture of filter-feeding organisms. PhD thesis, University of Ghent, Belgium.

**Cunningham, P. A. 1986.** A review of toxicity testing and degradation studies used to predict the effects of diflubenzuron (dimilin) on estuarine crustaceans. Environmental Pollution 40A:63-86.

**Cunningham, P. A., and L. E. Myers. 1986.** Dynamics of diflubenzuron (dimilin) concentrations in water and sediment of a supratidal saltmarsh site following repetitive aerial applications for mosquito control. Environmental Pollution 41A:63-88.

**Dajoz R. 1969.** Les insecticides, Coll que sais - je 2e edition.

**De Pauw, N. and Persoone, G. 1988.** Micro-algae for aquaculture. In: Micro-algal Biotechnology. Borowitzka, M.A. and L.J. Borowitzka (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, U.K., pp 197-221.

**Erehse H. 1974.** Problems and aspects of present day residue analysis, IUPAC, Pest. Chem., 3:17, Helsinki.

**Eisler, R. 1992.** Diflubenzuron hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. U.S Fish and Wildlife Service. Biological Report, Cont. Haz. Rev. 4:1-36

**Eisler, R. 2007.** Eisler's Encyclopedia of Environmentally Hazardous Priority Chemicals. 1<sup>st</sup> ed. ELSEVIER, 986 pp.

**Farlow, J.E. 1976.** Dimilin [1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)-urea] on the aquatic fauna of a Louisiana coastal marsh. Ph.D. thesis, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge. 144 pp.

**Fukusho, K. 1989.** Biology and mass production of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. Int. J. Aq. Fish. Technol., 1:232-240.

**Fu, Y, Hirayama, K. and Natsukari, Y. 1991.** Morphological differences between two types of the rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 151:29-41.

**Gartrell, M. 1981.** Diflubenzuron. U.S. Food and Drug Administration, Bureau of Foods, HFF-420.8 pp.

**Gattavecchia, E., A. M. Di Pietra, D. Tonelli, and A. Borgatti. 1981.** Effect of diflubenzuron and its major degradation products on the growth of *Euglena gracilis* Z. and incorporation of glycine-U-14C in protein. Journal of Environmental Science and Health B16:159-166.

**Giga, D. P. 1987.** Evaluation of the insect growth regulators cyromazine and diflubenzuron as surface sprays and feed additives for controlling houseflies *Musca domestica* (L.) in chicken manure. International Pest Control 29:66-69.

**Gladue, R. 1991.** 'Heterotrophic microalgae production: Potential for application to aquaculture feeds' in Fulks W and Main K L (eds), *Rotifer and Microalgae Culture Systems*, Proceedings of a US-Asia Workshop, Honolulu, Hawaii, January 28-31, 1991, Hawaii HI, The Oceanic Institute, pp 276-86.

**Granett, J., S. Morang, and R. Hatch. 1978.** Reduced movement of precocious male Atlantic salmon parr into sublethal dimilin-GI and carrier concentrations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 19:462-464.

**Heasman, M.P., Diemar, J., O'Connor, W., Sushames, T., Foulkes, L., 2000.** Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs - a summary. *Aquac. Res.* 31, 637-659.

**Hirata, H., 1979.** Rotifer Culture in Japan. *Spec Publ Eur Maricult Soc*, No 4, pp 361-75.

**Hudson, R. H., R. K. Tucker, and M. A. Haegele. 1984.** Handbook of toxicity of pesticides to wildlife. U.S. Fish and Wildlife Service Resource Publication 153.90 pp.

**Johnson, W. W., and M. T. Finley. 1980.** Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. U.S. Fish and Wildlife Service Resource Publication 137.98 pp.

**Julin, A. M., and H. O. Sanders. 1978.** Toxicity of the IGR, diflubenzuron, to freshwater invertebrates and fishes. *Mosquito News* 38:256-259.

**Kanazawa, A., Teshima, S., Ono, K., 1979.** Relationships between the essential fatty acid requirement of aquatic animals and their capacity for bioconversion of linoleic acid to highly unsaturated fatty acid. *Comp. Biochem. Physiol.* 63B, 295-298

**Linnaeus, C. 1758.** *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis.* Editio decima, reformata. Laurentius Salvius: Holmiae. ii, 824 pp.

**Lubzens, E. 1987.** Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia*, 147:245-255.

**Madder, D. J., and W. L. Lockhart. 1980.** Studies on the dissipation of diflubenzuron and methoprene from shallow prairie pools. *The Canadian Entomologist* 112:173-177.

**Martinat, P. J., C. C. Coffman, K. Dodge, R. J. Cooper, and R. C. Whitmore. 1988.** Effect of diflubenzuron on the canopy arthropod community in a central Appalachian forest. *Journal of Economic Entomology* 81:261-267.

**Mayer, F. L., Jr. 1987.** Acute toxicity handbook of chemicals to estuarine organisms. U.S. Environmental Protection Agency, Report 600/8-87/017. 274 pp.

**Mayer, F. L., Jr., and M. R. Ellersieck. 1986.** Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. U.S. Fish and Wildlife Service Resource Publication 160. 579 pp.



**Metcalf, R. L., P. Y. Lu, and S. Bowlus. 1975.** Degradation and environmental fate of l-(2,6-difluorobenzoyl)-3-(4-chlorophenyl) urea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23:359-364.

**Muzzarelli, R. 1986.** Chitin synthesis inhibitors: effects on insects and on nontarget organisms. *CRC Critical Reviews in Environmental Control* 16: 141-146.

**Nebeker, A. V., P. McKinney, and M. A. Cairns. 1983.** Acute and chronic effects of diflubenzuron (dimilin) on freshwater fish and invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2:329-336.

**Nell, J.A., O'Connor, W.A., 1991.** The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley). *Aquaculture* 99, 277-284.

**Opdycke, J. C., R. W. Miller, and R. E. Menzer. 1982b.** In vivo and liver microsomal metabolism of diflubenzuron by two breeds of chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30: 1227-1233.

**Opdycke, J. C., and R. E. Menzer. 1984.** Pharmacokinetics of diflubenzuron in two types of chickens. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 13:721-733.

**Poplyk, J., editor. 1989.** Diflubenzuron. Page C102 *in* Farm chemicals handbook '89. Meister Publishing Company, 37841 Euclid Ave., Willoughby, Ohio.

**Rao, D. R., and G. Paul. 1988.** Growth regulatory activity of dimilin against *Mesocyclops thermocyclopides*. *Current Science* 57:399-400.

**Rico-Villa, B., Le Coz, J.R., Mingant, C., Robert, R., 2006.** Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256, 377-388.

**Rodrigues, C. S., and N. K. Kaushik. 1986.** Laboratory evaluation of the insect growth regulator diflubenzuron against black fly (Diptera: Simuliidae) larvae and its effects on nontarget stream invertebrates. *The Canadian Entomologist* 118: 549-558.

**Rouabhi R, Djebar-Berrebah H and M.R. Djebar. 2007.** The impact of two pesticides diflubenzuron and flucycloxuron, on a microalgae *Tetraselmis suecica*, *Malays. Appl. Biol.* T 36(1), 7-13.

**Schaefer, C. H., E. F. Dupras, Jr., R. J. Stewart, L. W. Davidson, and A. E. Colwell. 1979.** The accumulation and elimination of diflubenzuron by fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 21:249-254.

**Schaefer, C. H., A. E. Colwell, and E. F. Dupras, Jr. 1980.** The occurrence of p-chlorophenylurea from the degradation of diflubenzuron in water and fish. *Proceedings of the California Mosquito Control Association* 48:84-89.

**Scott, T. W., R. W. Miller, and F. W. Knapp. 1986.** Field evaluation of diflubenzuron boluses with and without flucythrinate ear tags for control of horn flies, *Haematobia irritans* and face flies, *Musca autumnalis*, on pastured cattle. *Journal of Agricultural Entomology* 3: 105-113.

**Selvik, A., P.K. Hansen, A. Ervik, and O.B. Samuelsen. 2002.** The stability and persistence of diflubenzuron in marine sediments studied under laboratory conditions and the dispersion to the sediment under a fish farm following medication. *Sci.Total Environ.* 285(1-3): 237-245

Vinten A. J. A., Howard R. S. & Redman M. H. (1991). Measurement of nitrate leaching losses from arable plots under different nitrogen input regimes. *Soil Use Magmt.* 7: 3-14.

Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I., Garland, C.D., 1989. Fatty acid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128, 219-240.

Wallne, P.R. 1974. Culture of Bivalve Molluscs. 50 years' experience at Conway

Webb, D. P., and K. B. Wildey. 1986. Evaluation of the larvicide diflubenzuron for the control of a multi-insecticide resistant strain of housefly (*Musca domestica*) on a UK pig farm. *International Pest Control* 28:64-66.

Webb, K.L., Chu, F.L.E., 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. *Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition.* World Mariculture Society Sp. Publ. No. 2. Louisiana State University, pp. 272-291.

Wikfors, G.H., Ohno, M., 2001. Impact of algal research in aquaculture. *J. Phycol.* 37, 968-974.

Wilson, J. E. H., and J. D. Costlow. 1987. Acute toxicity of diflubenzuron (DFB) to various life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Water, Air, and Soil Pollution* 33:411-417.

Yu *et al* , (1988) . Vitamin B12 - producing bacteria as a nutritive complement for a culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, vol 54, no 34, pp 1873-80

## Ελληνική Βιβλιογραφία

**Αγγελίδης Μ. 1982.** Γενικές Οικολογικές Έννοιες. "Ρύπανση και Προστασία Περιβάλλοντος", Έκδοση Ένωσης Ελλήνων Χημικών. σελ.11. Αθήνα.

**Αθανασοπούλου Φ. 2006.** Παρασιτικά Νοσήματα Των Εκτρεφόμενων Ψαριών στην Ελλάδα. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Κτηνιατρικής. Καρδίτσα.

**Γιούργα Χ., Λούμου Α. και Δούμα Κ., 2000.** Ανάπτυξη εκπαιδευτικού υλικού για την περιβαλλοντική εκπαίδευση. Γεωργία και Περιβάλλον (Οδηγός εκπαιδευτικών). Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων. Διεύθυνση Σπουδών Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης. Αθήνα.

**Κλαδάς Ι. 2006.** Παραγωγή ιχθυδίων θαλασσινών ειδών : Καλλιέργειες Τροχόζων (Rotifers), εργαστηριακές σημειώσεις, σελ. 3 - 7 . Ανώτατο Τεχνολογικό εκπαιδευτικό Ίδρυμα Ηπείρου, Τμήμα Ιχθυοκομίας- Αλιείας. Ηγουμενίτσα.

**Κουϊμτζής Θ., Σαμαρά Κ., Σκλαβούνος Σ., Αλμπάνης Τ., Βουτσά Δ. και Ζαχαριάδης Γ. 1993.** Αναλυτικοί προσδιορισμοί και χαρακτηρισμός της ποιότητας επιφανειακών νερών - περίπτωση Αλιάκμονα. Συνολική έκθεση πεπραγμένων ερευνητικού έργου του Εργαστηρίου Ελέγχου Ρύπανσης Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.

**Συμεωνίδης Χ. 2003.** Εκτροφή ευρύαλων ψαριών, εργαστηριακές σημειώσεις, σελ. 30. Ανώτατο Τεχνολογικό εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης., Παράρτημα Νέων Μουδανιών.

## Ιστοσελίδες

[www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=51789](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=51789)

[www.fishportal.gr](http://www.fishportal.gr)

[eol.org/pages/3391](http://eol.org/pages/3391)

[knusun.kangnung.ac.kr/~livefood/ph-speci.htm](http://knusun.kangnung.ac.kr/~livefood/ph-speci.htm)