

KARDITSA 2010



**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:

*“ Μελέτη της επίδρασης του φυτοφαρμάκου Dimilin
(διφθοροβενζουρόνη) στην αύξηση των μικροφυκών
Haematococcus pluvialis και Isochrysis galbana, καθώς και στην
επιβιωσιμότητα των ιχθυοδίων λαβρακιού (Dicentrarchus labrax)”*

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ

Χρήστος Μαντζούκης

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Φωτεινή Αθανασοπούλου

KARDITSA 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:

“The effects of the insecticide Dimilin (diflubenzuron) on the growth of microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Isochrysis galbana* and the viability of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles ”

POSTGRADUATE STUDENT

Mantzoukis Christos

SUPERVISOR

Foteini Athanassopoulou

Περίληψη

Η χημική ουσία διφθοροβενζουρόνη αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο εντομοκτόνο που δρα κυρίως μέσω της αναστολής της σύνθεσης της χιτίνης η οποία συμβάλει στο σχηματισμό του εξωσκελετού κυρίως των εντόμων. Στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση της ουσίας αυτής στην αύξηση δύο ειδών μικροφυκών, των *Haematococcus pluvialis* και *Isochrysis galbana*, καθώς και στην επιβιωσιμότητα των ιχθυδίων του λαβρακίου. Οι δύο πρώτοι οργανισμοί είναι πολύ σημαντικοί στην εντατική θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια, μιας και χρησιμοποιούνται ως ζωντανή τροφή στα πρώτα στάδια των ιχθυδίων, των δίθυρων μαλακίων και κάποιων καρκινοειδών. Επίσης, το λαβράκι αποτελεί μαζί με την τσιπούρα τα πιο διαδεδομένα εκτρεφόμενα ψάρια στη Μεσόγειο. Οι συγκεντρώσεις της ουσίας που εξετάστηκαν ήταν 500, 100, 50 και 25 ppm όσον αφορά στα μικροφύκη και 1500, 1000 και 500 ppm όσον αφορά στα ιχθύδια λαβρακίου. Σε κάθε πειραματισμό η επώαση των οργανισμών παρουσία της διφθοροβενζουρόνης διήρκησε τέσσερις ημέρες. Τα αποτελέσματα των πειραματισμών έδειξαν ότι στη μεγαλύτερη συγκέντρωση διφθοροβενζουρόνης αναστέλλεται σημαντικά η ανάπτυξη των μικροφυκών. Παρατηρήθηκε μεγάλη θνησιμότητα των ιχθυδίων που εκτέθηκαν στις συγκεντρώσεις 1500 και 1000 ppm, ενώ η θνησιμότητα ήταν πολύ μικρότερη στην μικρότερη συγκέντρωση (500 ppm) κατά τις πρώτες 24 ώρες. Για την σαφή ανάδειξη της δράσης της διφθοροβενζουρόνης επιλέχθησαν συγκεντρώσεις που ήταν πολύ υψηλότερες από αυτές που συνήθως απαντώνται στο περιβάλλον.

Abstract

Diflubenzuron (DFB) is a widely used insecticide that inhibits the chitin synthesis. The formation of the cuticle is disturbed because of the lack of chitin. The present experiments studied the effects of DFB on the growth of two species of microalgae, the *Haematococcus pluvialis* and the *Isochrysis galbana*, and its effect on the viability of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. The first two organisms are very

important for the intensive aquaculture, as they are used as live feeds for fish larvae, molluscan shellfish and some crustaceans. The sea bass *Dicentrarchus labrax* is one of the most widely cultured marine fish in the Mediterranean Sea. The concentrations of DFB that were examined were 500, 100, 50 and 25 ppm for the microalgae and 1500, 1000 and 500 ppm for sea bass. The incubation of the organisms in the DFB solutions lasted four days in each experiment and the results demonstrated that the highest concentration of DFB induced a significant inhibition in growth in both microalgae species. In addition, when the concentrations were 1500 and 1000 ppm almost all sea bass fish died, but when it was 500 ppm the mortality was lower. The whole mortality was observed within the first 24 hours of exposure. To magnify the effect of the DFB particularly high concentrations were used, much higher than these commonly found in the environment.

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	6
1.2 ΔΙΦΘΟΡΟΒΕΝΖΟΥΡΟΝΗ.....	12

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΦΘΟΡΟΒΕΝΖΟΥΡΟΝΗΣ ΣΤΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* ΚΑΙ *ISOCHRYSIS GALBANA* ΚΑΘΩΣ ΣΕ ΙΧΘΥΔΙΑ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ.

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	18
2.1.1. ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ.....	19
2.1.1.1. <i>Haematococcus pluvialis</i>	22
2.1.1.2. <i>Isochrysis galbana</i>	23
2.1.2. Ιχθύδια λαβρακιού.....	24
2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.2.1. Μικροφύκη.....	27
2.2.1.1. <i>Haematococcus pluvialis</i>	27
2.2.1.2. <i>Isochrysis galbana</i>	32
2.2.1.3. Ιχθύδια λαβρακιού.....	36
2.2.3. Στατιστική ανάλυση.....	37
2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
2.3.1. <i>Haematococcus pluvialis</i>	39
2.3.2. <i>Isochrysis galbana</i>	40
2.3.3. Ιχθύδια λαβρακιού.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	46

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Η σύγχρονη κοινωνία αντιλαμβάνεται όλο και περισσότερο την αξία των υγιών υδάτινων οικοσυστημάτων αλλά και την επίδραση που έχουν οι ανθρώπινες δράσεις σε αυτά. Έτσι, τα τελευταία χρόνια επικρατεί η τάση για μείωση των αστικών και βιομηχανικών λημμάτων. Παράλληλα με αυτήν την τάση, ο αγροτικός κόσμος εργάζεται προκειμένου να μειωθεί η χρήση των γεωργικών χημικών φαρμάκων, όμως, και παρά την προσπάθεια αυτή, η χρήση τους στις καλλιέργειες ακόμα αυξάνεται. Αναμένεται ότι η χρήση τους θα μειωθεί καθώς προωθούνται σοδειές γενετικά τροποποιημένες, ώστε να είναι περισσότερο ανθεκτικές (Battaglin, 2002). Κάποια ποσότητα των εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες, που υπολογίζεται από 1 έως 2%, χάνεται από αυτές και εισέρχεται σε κοντινά ρεύματα κατά τη διάρκεια των βροχοπτώσεων επιμολύνοντας έτσι τις υδάτινες συλλογές (Clark *et al.*, 1999) ενώ είναι δυνατή και η επιμόλυνση των υπόγειων υδάτινων συστημάτων (Kolpin *et al.*, 2000). Μεγαλύτερα ποσοστά αναμένονται για κάποια εντομοκτόνα που προορίζονται για ειδικές χρήσεις και καταλήγουν στους αστικούς υπονόμους. Έτσι, αυτά τα εντομοκτόνα χάνουν τον αρχικό τους στόχο, παύουν να είναι «προστάτες της σοδειάς», γίνονται μολυντές του περιβάλλοντος και ενοχοποιούνται ως πηγές στρες σε υδρόβια φυτά και ζώα.

Επικρατεί ανησυχία από την έκθεση οργανισμών, που δεν αποτελούν τους αρχικούς στόχους, σε αυτές τις χημικές ουσίες (Rao, 2006). Σε πολλές περιπτώσεις οι υδάτινοι οργανισμοί εκτίθενται σε μείγματα χημικών τα οποία οδηγούν σε απρόβλεπτους κινδύνους μεγαλύτερους από αυτούς που, με υπολογισμούς, προβλέπονται για τα απομονωμένα χημικά. Παρά τις παραπάνω ανησυχίες, υπάρχει

σχετικά μικρή έρευνα η οποία να καταδεικνύει τους κινδύνους από την ανάμειξη των εντομοκτόνων στο περιβάλλον στους μη-στόχους υδρόβιους οργανισμούς. Αυτό το κενό στην έρευνα οφείλεται σε πλήθος παραγόντων, όπως παραδείγματος χάριν, το κόστος διεξαγωγής των τοξικολογικών αναλύσεων σε χιλιάδες πιθανά μείγματα εντομοκτόνων (και θρεπτικών ουσιών) που βρίσκονται στο περιβάλλον (Battaglin, 2002).

Η χρήση ουσιών για την καταπολέμηση των ανεπιθύμητων οργανισμών και ίσως για τη βελτίωση των αποδόσεων χρονολογείται πολύ παλιά. Ήδη στον Όμηρο γίνεται αναφορά στην απομάκρυνση του εντομοκτόνου “θείο” το 800 π.χ. Ο Πλίνιος πρότεινε τη χρήση του αρσενικού ως εντομοκτόνο το 50 μ.χ. Το σουλφίδιο του αρσενικού χρησιμοποιήθηκε στην Κίνα τον 16^ο αιώνα. Μετά το 1900 εντοπίζεται η αρχή της συστηματικής και ευρείας χρήσης πλήθους εντομοκτόνων (Battaglin, 2002). Τα περισσότερα από αυτά ήταν ανόργανα άλατα όπως ο χλωριούχος υδράργυρος, ο θειικός χαλκός, διάφορες ουσίες που περιείχαν σελήνιο, ψευδάργυρο, φθόριο και άλλα. Κατά τη διάρκεια του εικοστού αιώνα, η χρήση των εντομοκτόνων και των χημικών λιπασμάτων αυξήθηκε παγκοσμίως προκειμένου να βελτιωθεί η παραγωγή (Mannion, 1995). Εντομοκτόνα όπως το DDT και οι χλωριωμένοι υδατάνθρακες, εκτός από τη χρήση τους στις καλλιέργειες, χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των μολύνσεων και στους ανθρώπους από διάφορα αρθρόποδα έντομα, όπως ψύλλους και κρότωνα. Πολλά εντομοκτόνα, που παρήχθησαν στις αρχές του περασμένου αιώνα, είχαν σχεδιαστεί ώστε να είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά. Ενώ τα περισσότερα από αυτά έχουν απαγορευτεί στην Αμερική, μικρές ποσότητες από αυτά ανευρίσκονται ακόμα στις υδάτινες συλλογές της Αμερικής (Gilliom, 1985). Με το πέρας του χρόνου έγινε αντικατάσταση αυτών των πρώτων εντομοκτόνων από άλλα σκευάσματα με διαφορετικές δραστικές ουσίες. Μέχρι το 1965 υπήρχαν από 250 έως 400 δραστικές ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνταν σε περίπου 10.000 σκευάσματα (Edwards, 1970). Μέχρι το 1980, υπολογίζεται κατά προσέγγιση ότι υπήρχαν γύρω στα 575 ενεργά συστατικά τα οποία χρησιμοποιούνταν σε περίπου 15.000 προϊόντα (Gianessi, 1992), ενώ μέχρι το 2000 τα ενεργά συστατικά που χρησιμοποιούνταν ήταν 900 σε παραπάνω από 20.000 προϊόντα (Aspelin, 1999). Επικρατεί η άποψη ότι η χρήση των εντομοκτόνων τα επόμενα χρόνια δεν θα είναι μεγάλη μιας και οι έρευνες έχουν στραφεί στην παραγωγή τέτοιων σοδειών που να είναι γενετικά τροποποιημένες και ανθεκτικές σε έντομα και ζιζάνια.

Ένας πλήρης ορισμός των εντομοκτόνων έχει διατυπωθεί από τον Οργανισμό των Ηνωμένων Εθνών για τα Τρόφιμα και τη Γεωργία (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) το 2002. Ορίζει το εντομοκτόνο ως «κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών που προορίζεται για την πρόληψη, την εξάλειψη ή τον έλεγχο οποιουδήποτε εντόμου, συμπεριλαμβανομένων των ενδιάμεσων ξενιστών, και ανεπιθύμητων ειδών φυτών ή ζώων που προκαλούν βλάβες ή αλλοιώσεις στην παραγωγή, την αποθήκευση, τη μεταφορά ή διαχείριση των τροφίμων, των αγροτικών αγαθών, της ξυλείας και των παραγώγων της ή των ζωοτροφών. Επίσης, ουσίες που χορηγούνται σε ζώα για τον έλεγχο των εντόμων, αραχνοειδών ή άλλων παράσιτων που βρίσκονται μέσα ή πάνω στο σώμα τους. Ο όρος περιλαμβάνει, τέλος, τις ουσίες που έχουν δράση ρυθμιστική, αποφυλλιστική, αφυγραντική ή προλαμβάνουν την πρόωρη πτώση του καρπού και ουσίες που χρησιμοποιούνται στη σοδειά, πριν ή μετά τη συγκομιδή, για να προστατέψουν το προϊόν από την αλλοίωση κατά την αποθήκευση ή μεταφορά (FAO, 2002).

Η τοξικότητα των εντομοκτόνων στο περιβάλλον εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί, καθώς και εκείνοι που επηρεάζουν την ευαισθησία των θαλάσσιων οργανισμών, έχουν μελετηθεί εκτεταμένα. Έχει βρεθεί ότι 58 από τα 89 είδη των εντομοκτόνων που εξετάστηκαν στους κυπρίνους και σε κάποια είδη υδρόβιων εντόμων ήταν πολύ πιο τοξικά σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Hashimoto, 1986). Σύμφωνα όμως με τον ίδιο συγγραφέα, η πλειονότητα των εντομοκτόνων μειώνει την τοξικότητα της όταν υπάρχει υψηλότερο pH. Έχει αποδειχτεί, για παράδειγμα, ότι η συγκέντρωση της πενταχλωροφαινόλης στο χρυσόψαρο μειωνόταν όταν αυξανόταν το pH κι έτσι η συγκέντρωσή της δεν έφτανε σε επίπεδα που μπορούσαν να θανατώσουν το ψάρι, με αποτέλεσμα να μειώνεται και η τοξικότητα της πενταχλωροφαινόλης στο ψάρι.

Τα ψάρια και οι υπόλοιποι υδρόβιοι οργανισμοί εκτίθενται στα εντομοκτόνα με τρεις βασικούς τρόπους:

- 1) Διαδερμικά, με απευθείας απορρόφηση από το δέρμα σε μολυσμένα με τα εν λόγω φάρμακα νερά,
- 2) Από την αναπνευστική οδό, με απευθείας απορρόφηση των εντομοκτόνων από τα βράγχια και
- 3) Μέσω της πεπτικής οδού, με την κατάποση μολυσμένου νερού ή τροφής.

Όταν η μόλυνση ενός οργανισμού είναι αποτέλεσμα της κατανάλωσης άλλων μολυσμένων οργανισμών, τότε αυτή ονομάζεται “δευτερογενής μόλυνση”. Για

παράδειγμα, ψάρια που καταναλώνουν νεκρά έντομα, που είχαν εκτεθεί σε εντομοκτόνα, είναι πιθανό να πεθάνουν, εάν η ποσότητα του εντομοκτόνου που έφεραν τα έντομα είναι μεγάλη.

Οι επιπτώσεις των εντομοκτόνων στην υγεία των ψαριών και των άλλων υδρόβιων οργανισμών μελετώνται από την τοξικολογία των υδρόβιων οικοσυστημάτων, που είναι η επιστήμη που μελετά τις επιπτώσεις των περιβαλλοντικών μολυντικών στοιχείων στους υδρόβιους οργανισμούς. Η πρόκληση βλαβών από τα εντομοκτόνα στα ψάρια και τους άλλους υδρόβιους οργανισμούς εξαρτάται από:

- 1) την τοξικότητά τους,
- 2) το χρόνο έκθεσης,
- 3) τη συχνότητα έκθεσης, και
- 4) την ανθεκτικότητα των ουσιών στο περιβάλλον (Helfrich, 1996).

Όσο περισσότερο ‘δηλητηριώδες’ είναι ένα εντομοκτόνο τόσο περισσότερο τοξικό χαρακτηρίζεται. Μερικά εντομοκτόνα είναι εξαιρετικά τοξικά, ενώ κάποια άλλα σχεδόν καθόλου. Ο χρόνος έκθεσης αναφέρεται στην διάρκεια κατά την οποία ένας οργανισμός έρχεται σε επαφή με το εντομοκτόνο. Έτσι, ενώ μια μικρής διάρκειας έκθεση σε κάποιον χημικό παράγοντα μπορεί να έχει μικρή επίδραση στα ψάρια, μια μακροχρόνια έκθεση μπορεί να προκαλέσει βλάβη. Το μέγεθος της δόσης αναφέρεται στην ποσότητα του εντομοκτόνου στην οποία ένας οργανισμός εκτίθεται (πρόσληψη δια της πεπτικής οδού, διαδερμικά, ή δια της αναπνευστικής οδού). Η έκθεση σε μια μικρή δόση ενός πολύ τοξικού παράγοντα μπορεί να προκαλέσει πιο σοβαρή βλάβη από την έκθεση σε μία μεγάλη δόση ενός λιγότερο τοξικού παράγοντα. Οι δόσεις ορίζονται από το βάρος της ουσίας ανά βάρος του οργανισμού (συνήθως mg/g δραστικής ουσίας ανά Kg σωματικού βάρους) ή ως συγκέντρωση του τοξικού παράγοντα στο νερό ή στην παρεχόμενη τροφή (συνήθως εκφραζόμενη ως μέρη στο εκατομμύριο, ή ως μέρη στο δισεκατομμύριο, ppm και ppb αντίστοιχα).

Η θανατηφόρος δόση είναι η ποσότητα (δόση) του εντομοκτόνου που επιφέρει θάνατο. Το LC 50 είναι η συγκέντρωση της ουσίας που θανατώνει το 50% του προς εξέταση πληθυσμού σε ένα προκαθορισμένο χρόνο, συνήθως μεταξύ 24 μέχρι 96 ωρών (Helfrich, 1996).

Πίνακας 1: Κλίμακα επικινδυνότητας εντομοκτόνων (Virginia State University)

Κλίμακα επικινδυνότητας	
Τοξικότητα	LC50(mg/l)
Ελάχιστη	>100
Μικρή	10 – 100
Μεσαία	1 – 10
Υψηλή	0.1 – 1.0
Πολύ υψηλή	0.01 - 0.1
Εξαιρετικά υψηλή	< 0,01

Η έκθεση των υδρόβιων οργανισμών σε ένα εντομοκτόνο εξαρτάται από τη βιοδιαθεσιμότητα, τη βιοσυγκέντρωση, τη βιομεγέθυνση και την ανθεκτικότητά του στο περιβάλλον. Η βιοδιαθεσιμότητα αναφέρεται στην ποσότητα του εντομοκτόνου στο περιβάλλον που είναι διαθέσιμη στους υδρόβιους οργανισμούς. Μερικά εντομοκτόνα διασπώνται ταχύτατα στο περιβάλλον, ενώ άλλα δεσμεύονται από σωματίδια που αιωρούνται στη στήλη του νερού ή στον πυθμένα μειώνοντας, έτσι, τη διαθεσιμότητά τους. Μερικά διαλύονται ταχύτατα στο νερό ή εξατμίζονται στον αέρα και, για το λόγο αυτό, η βιοδιαθεσιμότητά τους μειώνεται. Η βιοσυγκέντρωση αναφέρεται στην συσσώρευση των εντομοκτόνων στους ιστούς των οργανισμών σε επίπεδα μεγαλύτερα από αυτά που υπάρχουν στο νερό ή στο μέσο που εφαρμόζονται.

Μερικά ψάρια μπορούν να βιοσυγκεντρώσουν συγκεκριμένα εντομοκτόνα στους ιστούς τους ή σε συγκεκριμένα όργανα (ειδικά στον λιπώδη ιστό) σε επίπεδα έως και δέκα εκατομμύρια φορές μεγαλύτερα από αυτά του νερού. Η βιομεγέθυνση είναι η συσσώρευση των εντομοκτόνων στα διαδοχικά επίπεδα της τροφικής αλυσίδας. Έτσι, για παράδειγμα, αν ένα εντομοκτόνο υπάρχει σε μικρές ποσότητες στο νερό, μπορεί να απορροφηθεί από τα υδρόβια φυτά, τα οποία με την σειρά τους καταναλώνονται από έντομα και μικρά ιχθύδια, ενώ, στη συνέχεια, αυτά καταναλώνονται από μεγαλύτερα ψάρια. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι αύξηση της συγκέντρωσης του εντομοκτόνου στα τελευταία επίπεδα της τροφικής αλυσίδας. Ψάρια όπως το λαβράκι, η πέστροφα και άλλα, καταναλώνοντας μολυσμένες με εντομοκτόνα τροφές βιοσυγκεντρώνουν υψηλά επίπεδα των φαρμάκων στον λιπώδη ιστό τους. Η κατανάλωση των ιχθυδίων αυτών είναι επικίνδυνη για την δημόσια υγεία αφού τα εντομοκτόνα αυτά μπορούν να περάσουν και στους ανθρώπους.

1.2. ΔΙΦΘΟΡΟΒΕΝΖΟΥΡΟΝΗ

Μία από τις κατηγορίες εντομοκτόνων είναι αυτή που στοχεύει στη ρύθμιση της ανάπτυξης των εντόμων. Σε αυτήν ανήκουν ουσίες που μιμούνται νεανικές ορμόνες (ορμόνες των άωρων μορφών των εντόμων), ουσίες ανάλογες των αντί-νεανικών ορμονών και αναστολείς της σύνθεσης της χιτίνης. Από την τελευταία ομάδα ουσιών η πιο γνωστή και ευρέως μελετημένη ουσία είναι η διφθοροβενζουρόνη. Η χημική ουσία διφθοροβενζουρόνη, αποτελεί τη δραστική ουσία του εμπορικού προϊόντος Dimilin[®] (Christiansen, 1986) (Chemtura Europe Limited, Berkshire UK) και χρησιμοποιείται ευρέως και, κατά κύριο λόγο, στη γεωργία στα περισσότερα είδη καλλιεργειών καθώς και στα δάση, για την καταπολέμηση διαφόρων εντόμων, που προκαλούν σοβαρά προβλήματα στα φυτά και στον άνθρωπο, όπως για παράδειγμα τα κουνούπια. Στην Ελλάδα η διφθοροβενζουρόνη χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην καταπολέμηση των κουνουπιών και η εφαρμογή της γίνεται με αεροψεκασμούς των περιαστικών περιοχών και των ορυζώνων. Η ουσία αυτή αναστέλλει το σχηματισμό της χιτίνης κατά την φάση της έκδυσης των εντόμων και είναι δραστική στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των εντόμων (Marx, 1977). Ευαίσθητα είναι έντομα που ανήκουν στις οικογένειες των Λεπιδόπτερων, Κολεόπτερων και Δίπτερων. Η χιτίνη είναι ένα σημαντικό συστατικό του εξωσκελετού των εντόμων και της επιδερμίδας άλλων οργανισμών. Δεν απαντά στα σπονδυλωτά, αλλά σε αυτά υπάρχουν ουσίες ανάλογες με την χιτίνη όπως το υαλουρονικό οξύ. Στα πλεονεκτήματα της διφθοροβενζουρόνης περιλαμβάνονται η εξειδικευμένη της δράση στα έντομα, η χαμηλή βιοσυγκέντρωση στο περιβάλλον και ο γοργός ρυθμός διάσπασης (Meola, 1980). Η δράση της όμως δεν είναι ειδική κατά των συγκεκριμένων εντόμων. Εκτός των εντόμων, τα οποία για τους λόγους που περιγράφηκαν παραπάνω είναι ανεπιθύμητα, υπάρχουν και άλλα έντομα τα οποία είτε είναι αδιάφορα είτε είναι χρήσιμα, όπως, για παράδειγμα, οι μέλισσες οι οποίες είναι ευαίσθητα στην δράση της διφθοροβενζουρόνης. Επίσης, υπάρχουν και κάποιοι οργανισμοί που συνθέτουν χιτίνη, στους οποίους η δράση της διφθοροβενζουρόνης είναι δυσμενής π.χ κάποια αρθρόποδα, διάφορα κωπήποδα, κάποια μαλακόστρακα και άλλα, ενώ άλλοι οργανισμοί είναι ανθεκτικοί, όπως κάποιοι μύκητες και κάποια θαλάσσια διάτομα.

Η διφθοροβενζουρόνη διασπάται είτε με υδρόλυση, είτε με διάσπαση του εδάφους, είτε με το μεταβολισμό από φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς (Eisler, 2007). Η διάσπασή της γίνεται με καταστροφή του δεσμού μεταξύ της καρβονλικής και της

αμίδικης ομάδας της ουρίας. Τα συνήθη προϊόντα της διάσπασης είναι το 2,6-διφθοροβενζοϊκό οξύ και 4-χλωροφαινυλουρία. Επίσης, είναι δυνατό να προκύπτουν και άλλοι μεταβολίτες όπως τα 2,6-διφθοροβενζαμίδη και 4-χλωροανιλίνη. Τα προϊόντα αυτά είτε δεσμεύονται από άλλες διαλυτές στο νερό ουσίες είτε μεθυλιώνονται ή ακετυλιώνονται με βιολογικούς μηχανισμούς (γίνεται προσθήκη μεθυλίου ή ακετυλίου αντίστοιχα), (Metcalf et al. 1975). Ο ρυθμός διάσπασης της διφθοροβενζουρόνης στο νερό και στο έδαφος εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων της ουσίας, τη θερμοκρασία, το pH και την παρουσία μικροοργανισμών και οργανικής ύλης. Πιο συγκεκριμένα, ο ρυθμός διάσπασής της είναι ταχύτερος όταν το μέγεθος των σωματιδίων της ουσίας είναι μικρότερο ή όταν υπάρχει άνοδος της θερμοκρασίας, άνοδος του pH, ή αύξηση της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών και της οργανικής ύλης (Ivie et al. 1980, Pritchard and Bourquin 1979, Hansen, 1982). Ο χρόνος ημίσειας ζωής της στο γλυκό νερό είναι 3 ημέρες σε pH ίσο με 10 και σε θερμοκρασία 36° Κελσίου. Σε pH ίσο με 6 και στην ίδια θερμοκρασία η διφθοροβενζουρόνη είναι πιο ανθεκτική και ο χρόνος ημίσειας ζωής υπολογίζεται στις 9 ημέρες. Είναι σταθερή υπό την ηλιακή ακτινοβολία και σε συνθήκες αποθήκευσης. Δε διεισδύει στους ιστούς των φυτών και δεν έχει κάποια συστηματική επίδραση σε αυτά. Κατά συνέπεια, τα έντομα που τρέφονται απομυζητικά από τα φυτά, γενικά, δεν επηρεάζονται από τη διφθοροβενζουρόνη και έτσι παρατηρείται η επιλεκτική δράση της. Επίσης, απομακρύνεται δύσκολα από την επιφάνεια των φυτών. Η επίδραση όμως των φυσικών φαινομένων όπως οι βροχές, οι άνεμοι καθώς και η φυσική απόπτωση των φύλλων, έχουν ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση της ουσίας από τα φυτά. Το εντομοκτόνο αυτό, όπως και άλλες ουσίες που χρησιμοποιούνται στη γεωργία, μέσω διαφόρων οδών, καταλήγει τελικά στα υδάτινα οικοσυστήματα, επηρεάζοντας τη ζωή των υδρόβιων οργανισμών που ζουν εκεί.

Η τοξικότητα της διφθοροβενζουρόνης στα θηλαστικά, φαίνεται να είναι πολύ μικρή αν και δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα. Δεν προκαλεί μεταλλάξεις, καρκινογένεση ή τερατογενέσεις. Βέβαια, έχει καταδειχτεί ότι κάποιοι μεταβολίτες του όπως η 4-χλωροανιλίνη, σχετίζεται με καρκινογένεση στους ανθρώπους (EPA, 2006). Ωστόσο, σε πειράματα έχει παρατηρηθεί μεθαιμοσφαιριναιμία καθώς και άλλες διαταραχές του αίματος, ύστερα από δερματική, από το στόμα ή από το αναπνευστικό έκθεση στη διφθοροβενζουρόνη, σε πολλά είδη. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί και βλάβες στο ήπαρ ορισμένων ειδών, ενώ σε πειράματα σε ποντικούς και αρουραίους, που λάμβαναν την ουσία για 2 χρόνια, παρατηρήθηκε διόγκωση του

ήπατος και της σπλήνας. Σε άλλες έρευνες βρέθηκε πτώση της τεστοστερόνης σε κάποια θηλαστικά όπως ταύρους και ποντίκια, καθώς και σε κάποια πτηνά (ETN, 2006).

Άλλες μελέτες έχουν ήδη καταδείξει την τοξικότητα της διφθοροβενζουρόνης στους διάφορους υδρόβιους οργανισμούς, όπως κάποια ψάρια, διάφορα καρκινοειδή και άλλα (Fischer, 1992). Αυτή φαίνεται να ποικίλει και να εξαρτάται από το είδος του οργανισμού, την ηλικία ή το στάδιο του βιολογικού κύκλου του, καθώς και την σύνθεση του σώματός του (π.χ. αν υπάρχει εξωσκελετός ή όχι). Σε γενικές γραμμές, τα οστρακοειδή φαίνεται να είναι οι πιο ανθεκτικοί οργανισμοί, στη συνέχεια ακολουθούν τα ψάρια, ενώ τα πιο ευαίσθητα είναι διάφορα υδρόβια καρκινοειδή (κυρίως τα μαλακόστρακα) και έντομα (Eisler, 2007). Τα μαλακόστρακα είναι οι πιο ευαίσθητοι οργανισμοί που δεν αποτελούν στόχο της ουσίας. Σε αυτά συγκαταλέγονται και σημαντικοί οργανισμοί όπως η αρτέμια, η γαρίδα, ο αστακός, η караβίδα και άλλα. Η δυσμενής επίδραση της διφθοροβενζουρόνης και σε αυτούς τους οργανισμούς αφορά στην ανάπτυξη, την επιβίωση, την αναπαραγωγή τους, την συμπεριφορά τους, την αναγέννηση άκρων και άλλα. (Eisler, 1992). Καθώς η τοξικότητα της διφθοροβενζουρόνης είναι παρόμοια στα έντομα και στα καρκινοειδή, θα πρέπει να δοθεί μεγάλη προσοχή όταν χρησιμοποιείται τόσο 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).

Έρευνες που έγιναν για την τοξικότητα της διφθοροβενζουρόνης σε διάφορα είδη ψαριών, κατέδειξαν ότι η τοξικότητά της είναι σχετικά μικρή (το LC_{50} για 96 ώρες ήταν μεγαλύτερο από 50 mg/L (Fisher and Hall, 1992). Παρόλ' αυτά, τα ψάρια μπορούν να συγκεντρώσουν την ουσία αυτή στο σώμα τους έως και 160 φορές περισσότερο από τη συγκέντρωσή της στο νερό, αλλά η συγκέντρωσή της στους ιστούς των ψαριών σταδιακά μειώνεται (Schaefer et al., 1980). Το LC_{50} (δηλαδή η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί τον θάνατο στο 50% του υπό εξέταση πληθυσμού) για ορισμένα είδη ψαριών φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: LC₅₀ της ουσίας διφθοροβενζουρόνης για ορισμένα είδη ψαριών (πηγή extonet)

Φεγγαρόψαρο (<i>Bluegill sunfish</i>)	660 ppm
Φοξίνος αλμυρού νερού (<i>Saltwater minnow</i>)	255 ppm
Ιριδίζουσα πέστροφα (<i>Rainbow trout</i>)	240 ppm
Γατόψαρο (<i>Channel catfish</i>)	180 ppm

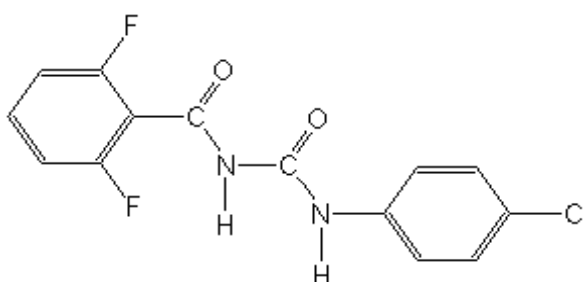
Σε επιτόπιες έρευνες δεν έχουν αναφερθεί θάνατοι σε ψάρια . Εκτός από την ίδια τη διφθοροβενζουρόνη, τοξικοί είναι και διάφοροι μεταβολίτες της, όπως η 4 χλωροανιλίνη, η οποία είναι πιο τοξική και από την ίδια την διφθοροβενζουρόνη (Eisler, 1992). Ο μεταβολίτης αυτός, σύμφωνα με έρευνες σε ψάρια, φαίνεται ότι έχει πολύ μικρότερο LC₅₀ σε σύγκριση με τη διφθοροβενζουρόνη. Συγκεκριμένα, το φεγγαρόψαρο είναι το πιο ευαίσθητο ψάρι στην 4-χλωροανιλίνη με τιμή LC₅₀ (96 h) 2.3 mg/L (Julin and Sanders, 1978). Βέβαια, η συγκέντρωση αυτή στο περιβάλλον είναι εξαιρετικά απίθανο να παρατηρηθεί με τις τωρινές πρακτικές εφαρμογής της διφθοροβενζουρόνης.

Η δράση της διφθοροβενζουρόνης στα υδρόβια ασπόνδυλα ποικίλει. Τα μαλάκια είναι ελάχιστα ευαίσθητα (το LC₅₀ είναι μεγαλύτερο από 200 mg/l). Σε άλλα ασπόνδυλα το LC₅₀ ποικίλει από 1 έως >1000μg/l, αντανακλώντας τις επιδράσεις των διάφορων μειγμάτων στους νεαρούς οργανισμούς. Οι διάφορες άλγες φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές. Οι υδρόβιοι φυτοπλανκτονικοί οργανισμοί, βέβαια, απορροφούν και κατακρατούν τη διφθοροβενζουρόνη και την απελευθερώνουν κατά διαστήματα (Fisher, 1992).

Σύμφωνα με τα παραπάνω η τοξικότητα και η παραμονή της διφθοροβενζουρόνης στο υδρόβιο περιβάλλον εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως τη μορφή της, τη συχνότητα της εφαρμογής, την ποσότητα της οργανικής ύλης, το είδος του ιζήματος, το pH και τη θερμοκρασία του νερού. Οι βιολογικοί παράγοντες είναι πιο

σημαντικοί από τους φυσικούς στην εκτίμηση της τοξικότητας της παραπάνω ουσίας. Αναφορικά, το στάδιο ανάπτυξης των εξεταζόμενων οργανισμών, η συχνότητα και ο συγχρονισμός της εκκόλαψης τους κατά την περίοδο δράσης του εντομοκτόνου αποτελούν μερικούς από αυτούς (Cunningham, 1986).

Ανήκει στην οικογένεια των βενζουλφαινολών (Benzoylphenyl urea). Η ονομασία κατά IUPAC είναι 1-(4-χλωροφαινυλ)-3-(2,6-διφθοροβενζοϋλ)ουρία [1-(4-chlorophenyl-3-(2,6- difluorobenzoyl) urea].



Εικόνα 1: Χημική δομή της διφθοροβενζουρόνης

Η διφθοροβενζουρόνη είναι ένα αποτελεσματικό εντομοκτόνο που δρα στο σχηματισμό της επιδερμίδας εμποδίζοντας την σύνθεση της χιτίνης (Deul et al 1978). 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 N-ακετυλογλυκοζαμίνης στη χιτίνη (Nakagawa *et al.*, 1993). Πιο συγκεκριμένα, δρα εμποδίζοντας τη δράση του ενζύμου συνθετάση της χιτίνης, το οποίο είναι το τελευταίο ένζυμο κατά τη διαδικασία σχηματισμού της χιτίνης από γλυκόζη (Muzzarelli, 1986). Ενεργεί κατά το στάδιο της εκκόλαψης των αυγών ή της έκδυσης των προνυμφών. Για το λόγο αυτό, η διφθοροβενζουρόνη είναι πιο δραστική κατά την ανάπτυξη των νεαρών σταδίων των ευπαθών οργανισμών και κυρίως κατά την διαδικασία της έκδυσης). Σε γενικές γραμμές, τα πιο ευαίσθητα είδη έχουν συγκριτικά σύντομες προνυμφικές και νυμφικές περιόδους και οι οργανισμοί πραγματοποιούν έκδυση συχνά (Rodrigues and Kaushik, 1986).

Η διφθοροβενζουρόνη είναι μια λευκή, κρυσταλλική ουσία. Το σημείο τήξης της καθαρής ουσίας είναι 230-232 °C, ενώ των φαρμακοτεχνικών μορφών είναι περίπου

210-230 °C. Το σκεύασμα είναι ελάχιστα διαλυτό στο νερό (0,2 mg/l στους 20 °C). Σε ιονισμένους διαλύτες η διαλυτότητά της είναι αρκετά καλή και εξαρτάται από το βαθμό της πολικότητας (ιονισμού) του κάθε διαλύτη. Οι συνήθεις φαρμακοτεχνικές μορφές που απαντώνται στο εμπόριο είναι υδατοδιαλυτή σκόνη (25% w/w), ελαιώδες συμπυκνωμένο σκεύασμα (45% w/v), συμπυκνωμένο εναιώρημα (48% w/v) ή μία κοκκώδης μορφή που χρησιμοποιείται σε συγκεκριμένες περιπτώσεις.

Η διφθοροβενζουρόνη 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 0,015 mg/L, που δεν επηρεάζουν τα βιολογικά φίλτρα (Αθανασοπούλου, 2006). Άλλα εξωπαρασίτια, στα οποία είναι αποτελεσματική η διφθοροβενζουρόνη, είναι τα crustaceans *Lernaea cyprinacea* και *Dolops carvalhoi* (Schalch et al., 2005). Η διφθοροβενζουρόνη είναι μία από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες ουσίες για τον έλεγχο των εξωπαρασίτιων στις ιχθυοκαλλιέργειες στην Βραζιλία (Mabilia and Souza, 2006). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί και ως συμπλήρωμα στα σιτηρέσια των κοτόπουλων, των βοοειδών και των χοίρων για τον έλεγχο των εντόμων στα κόπρανά τους ή ψεκάζεται απευθείας στα κόπρανα (Giga 1987).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΦΘΟΡΟΒΕΝΖΟΥΡΟΝΗΣ ΣΤΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* ΚΑΙ *ISOCHRYSIS* *GALBANA* ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΣΕ ΙΧΘΥΔΙΑ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην επίδραση του εντομοκτόνου διφθοροβενζουρόνη στην αύξηση του μικροφύκου *Haematococcus pluvialis* και του *Isochrysis galbana* που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην εντατική θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια. Μελετήθηκε επίσης, η επίδραση αυτής της ουσίας και στο λαβράκι του οποίου η εντατική καλλιέργεια είναι ευρέως διαδεδομένη στη Μεσόγειο θάλασσα.

Οι καλλιέργεια των μικροφυκών αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι των δραστηριοτήτων σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς αφού αποτελούν τροφή είτε του ζωοπλακτού (τροχόζωα, αρτέμια) που χρησιμοποιείται με την σειρά του ως τροφή των λαρβών των εκτρεφόμενων ιχθύων, είτε των ίδιων των λαρβών. Επίσης, χρησιμοποιούνται και για την διατροφή μαλάκιων και καρκινοειδών. Παρόλο που γίνονται προσπάθειες αντικατάστασής τους από τεχνητές τροφές με σκοπό τη μείωση του κόστους παραγωγής, αυτό δεν κατέστη δυνατό λόγω των σημαντικών ωφελειών που παρουσιάζουν στην επιβιωσιμότητα και ανάπτυξη των νυμφών των ιχθύων.

Το λαβράκι αποτελεί μαζί με την τσιπούρα τα βασικότερα εκτρεφόμενα είδη ιχθύων στην Ελλάδα αλλά και στις περισσότερες χώρες της Ευρώπης. Οι πρώτες προσπάθειες εξασφάλισης άγριου γόνου για εντατική καλλιέργεια στην Ελλάδα, έγιναν στην δυτική Ελλάδα την περίοδο 1987-1990. Από τις προσπάθειες αυτές προέκυψαν σημαντικές πληροφορίες για την οικολογία και τη συμπεριφορά του γόνου λαβρακίου και γενικά των ευρύαλων ψαριών (Κλαδάς *et al.*, 1989).

2.1.1 Μικροφύκη

Τα πλαγκτονικά μονοκύτταρα φύκη είναι αυτότροφοι οργανισμοί. Αντιπροσωπεύουν την αφετηρία της τροφικής αλυσίδας και συνιστούν το πρώτο επίπεδο της πρωτογενούς παραγωγής (Muller-Feuga, 1977). Κατά συνέπεια, τα μικροφύκη, αποτελούν τη βάση της διατροφής των υδρόβιων οικοσυστημάτων και παίζουν ζωτικό ρόλο στην εκτροφή των υδρόβιων οργανισμών, όπως τα μαλάκια, τα καρκινοειδή και τα ψάρια. Επιπλέον, υπάρχουν πολυάριθμες εφαρμογές των φωτοτροφικών μικροοργανισμών στη διατροφή των ανθρώπων και των ζώων, την υγεία και την κοσμετολογία. Χρησιμοποιούνται επίσης στην παραγωγή ανανεώσιμης ενέργειας (Muller-Feuga, 1977). Τελευταίες έρευνες αναφέρουν την παραγωγή βιοκαυσίμων από μικροφύκη. Τα βιοκαύσιμα αυτά θεωρούνται μάλιστα βιοκαύσιμα 3^{ης} γενιάς και φαίνεται να εμφανίζουν καλύτερες ιδιότητες από αυτά της πρώτης (ενεργειακές καλλιέργειες) και της δεύτερης γενιάς (λιγνοκυτταρινικά υλικά) (Παπαγιαννάκος, 2009).

Τα μικροφύκη *Haematococcus pluvialis*. και *Isochrysis galbana* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα φυσικά υδάτινα οικοσυστήματα την άνοιξη και το φθινόπωρο, περίοδοι κατά τις οποίες οι συνθήκες της θερμοκρασίας και της αλατότητας είναι οι ευνοϊκότερες για την ανάπτυξή τους και όπου οι συγκεντρώσεις των διαλυμένων μεταλλικών αλάτων στο νερό είναι σημαντικές (Κλαδάς, 2006). Τα μικροφύκη χαρακτηρίζονται ως μικροσκοπικά βιολογικά εργοστάσια που χρησιμοποιούν τη φωτοσύνθεση για να μετατρέψουν το διοξείδιο του άνθρακα και το φως του ήλιου σε ενέργεια, τόσο αποτελεσματικά που μπορούν να διπλασιάσουν το βάρος τους πολλές φορές μέσα σε μια ημέρα. Για την ανάπτυξή τους, κυρίως, απαιτείται ηλιακή ενέργεια και διοξείδιο του άνθρακα. Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η γρήγορη ανάπτυξη και η μεγάλη πληθυσμιακή πυκνότητα. Ταξινομικά, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός οικογενειών, ο οποίος προσδιορίζεται σύμφωνα με διάφορα κριτήρια (Κλαδάς, 2006):

- φωτοσυνθετικές χρωστικές,
- δομή της μεμβράνης,
- ύπαρξη μαστιγίων,
- σύνθεση των κυττάρων κ.τ.λ.

Παρόλο που η τροφική αλυσίδα έχει πολλά επίπεδα, μόνο τα μαλάκια και κάποιοι ακόμα οργανισμοί είναι πραγματικοί πλαγκτονοφάγοι για όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Άλλοι οργανισμοί είναι πλακτονοφάγοι σε πρώιμα στάδια (νύμφες ψαριών ή προνύμφες άλλων οργανισμών) και στα επόμενα στάδια γίνονται σαρκοφάγα ή παμφάγα. Παρόλ' αυτά, τα φύκη είναι απαραίτητα για τη διατροφή των λαρβών για μια σύντομη περίοδο, είτε έμμεσα ως τροφή για τη ζωντανή λεία τους (τροχόζωα, αρτέμια), είτε για άμεση κατανάλωση, όπως στην περίπτωση των μαλάκιων και κάποιων καρκινοειδών όπως π.χ. των γαρίδων. Στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς τα μικροφύκη καθώς και τα τροχόζωα και η αρτέμια παράγονται στην ίδια τη μονάδα. Η 'τεχνική των πράσινων νερών', δηλαδή του εμπλουτισμού των νερών με φύκη σε τέτοιο βαθμό που να εμφανίζονται πράσινα, είναι μέρος της ευρέως χρησιμοποιούμενης τεχνικής για την εκτροφή λαρβών ψαριών της θάλασσας. Με τα φύκη αυτά τρέφονται τα τροχόζωα και στη συνέχεια με τα τροχόζωα τρέφονται οι λάρβες των ψαριών. Για παράδειγμα, για την εκτροφή των νυμφών τσιπούρας (*Sparus aurata*) οι τελικές συγκεντρώσεις των κυττάρων των μικροφυκών του *Isochrysis* spp. και του *Chlorella* spp. μέσα στο νερό εκτροφής θα πρέπει να είναι της τάξεως των 50.000 και 400.000 κύτταρα/ml αντίστοιχα. Για την εκτροφή των νυμφών του καλκανιού (*Scophthalmus maximus*) απαιτούνται 60.000 κύτταρα/ml *Tetraselmis* spp. ή 130.000 κύτταρα/ml *I. galbana* (FAO, 1992).

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν εξεταστεί αρκετά είδη μικροφυκών για τη χρήση τους ως τροφή. Από αυτά όμως λιγότερα από είκοσι χρησιμοποιούνται ευρέως. Για τη χρήση τους αυτή πρέπει να πληρούν κάποιες προϋποθέσεις, όπως να έχουν το κατάλληλο μέγεθος και σχήμα, να αναπτύσσονται ταχύτατα σε μαζικές καλλιέργειες και επίσης να είναι ανθεκτικά σε μεταβολές της θερμοκρασίας, της έντασης του φωτός καθώς και σε μεταβολές των θρεπτικών συστατικών που μπορούν να συμβούν σε συνθήκες καλλιέργειας. Τέλος, πρέπει η βιοχημική τους σύσταση και επομένως η θρεπτική τους αξία να είναι η επιθυμητή, ενώ θα πρέπει, ακόμα, να είναι ελεύθερα τοξινών που θα μπορούσαν να μεταφερθούν διαμέσου της τροφικής αλυσίδας. Είναι αξιοσημείωτο ότι, ακόμα και τώρα, μετά από πολλές έρευνες, οι ιχθυοπαραγωγικές μονάδες χρησιμοποιούν ακόμα τα ίδια είδη μικροφυκών (Brown, 2002).

Τα διάφορα είδη μικροφυκών διαφέρουν ως προς τη θρεπτική τους αξία η οποία εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό συνήθως επιλέγεται ένα μείγμα από φύκη. Τα είδη των μικροφυκών που χρησιμοποιούνται ευρέως και έχουν

υψηλή θρεπτική αξία είναι τα *C. calcitrans*, *C. muelleri*, *P. lutheri*, *Isochrysis* sp. (T.ISO), *T. suecica*, *S. costatum* και *Thalassiosira pseudonana* (Brown *et al.*, 1997).

Η θρεπτική αξία των μικροφυκών εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την περιεκτικότητά τους σε λιπαρά οξέα. Η βιοχημική τους σύνθεση στη φάση της προχωρημένης λογαριθμικής αύξησης τυπικά έχει ως εξής : 30-40% πρωτεΐνη, 10-20% λίπος και 5-15% υδατάνθρακες (Renaud, Thinh & Parry, 1999). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που παράγονται από τα μικροφύκη, όπως το εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA) και το αραχιδονικό οξύ (AA) είναι απαραίτητα για τις περισσότερες λάρβες (Sergeant, McEvoy & Bell, 1997). Η αναλογία των λιπαρών οξέων διαφέρει από είδος σε είδος και οι διαφορές αυτές σχετίζονται με την τάξη της συστηματικής κατάταξης στην οποία ανήκουν τα φύκη, παρόλο που υπάρχουν παραδείγματα σημαντικών διαφορών ακόμα και μεταξύ μικροφυκών του ίδιου είδους. Τα περισσότερα είδη μικροφυκών έχουν αυξημένα ποσοστά EPA όπως π.χ. το *Isochrysis* sp και το *Pavlova* sp ενώ κάποια είδη είναι πλούσια σε άλλα λιπαρά οξέα όπως π.χ. μικροφύκη που ανήκουν στις κρυπτομονάδες, έχουν αυξημένα ποσοστά DHA εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (C22:6) (0,2 έως 11%). Συνήθως, τα είδη μικροφυκών που έχουν χαμηλά ποσοστά σε είκωσι και εικοσιδιοπενταενοϊκό οξύ έχουν χαμηλή θρεπτική αξία και γι' αυτό και δεν χρησιμοποιούνται ως αποκλειστική διατροφή (Brown *et al.*, 1997). Παρόλο που η σημασία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων έχει αναγνωριστεί, δεν έχει σαφώς εξακριβωθεί ποια είναι η απαιτούμενη ποσότητα στη διατροφή των λαρβών και νεαρών οργανισμών που τρέφονται άμεσα με μικροφύκη. Οι Thompson, Guo & Harrison (1993) βρήκαν ότι η διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε κορεσμένα λιπαρά ήταν πιο ευεργετική για τις ταχέως αναπτυσσόμενες λάρβες, καθώς η ενέργεια απελευθερώνεται πιο αποτελεσματικά από τα κορεσμένα παρά από τα ακόρεστα λιπαρά.

Η περιεκτικότητα σε βιταμίνες ποικίλει ανάμεσα στα διάφορα είδη μικροφυκών. Το ασκορβικό οξύ είναι εκείνο που έχει τις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις. Η συγκέντρωση των άλλων βιταμινών συνήθως εμφανίζει μια διαφοροποίηση της τάξης του 2 προς 4 φορές ανάμεσα στα είδη, παραδείγματος χάριν, το β-καροτένιο από 0.5 έως 1.1 mg ανά g, η νιασίνη από 0.11 ως 0.47 mg ανά g (Brown & Miller, 1992). Για να μελετηθεί η περιεκτικότητα των βιταμινών στα μικροφύκη και να βγουν συμπεράσματα, θα πρέπει να συγκριθούν τα δεδομένα με τις διατροφικές ανάγκες του κάθε οργανισμού που τις καταναλώνει. Δυστυχώς, αυτές οι ανάγκες δεν είναι σαφώς κατανοητές όταν πρόκειται για λάρβες ή νεαρούς οργανισμούς που τρέφονται

απευθείας με μικροφύκη. Είναι, όμως, γνωστές οι αντίστοιχες ανάγκες των ενήλικων οργανισμών και αυτές χρησιμοποιούνται ως οδηγός και για τις λάρβες, ελλείπει άλλων στοιχείων. Από αυτά τα δεδομένα, λοιπόν, προκύπτει ότι μία προσεκτικά επιλεγμένη διατροφή με μείγμα μικροφυκών θα παρέχει ικανοποιητική συγκέντρωση βιταμινών για την τροφική αλυσίδα. Στην περίπτωση των αμινοξέων, η σύνθεσή τους και ο σχηματισμός των πρωτεϊνών των μικροφυκών δεν έχει μεγάλες διαφοροποιήσεις και πολύ λίγο επηρεάζεται από τη φάση της ανάπτυξης και τις συνθήκες φωτός (Brown *et al.*, 1993). Η ποιότητα, λοιπόν, της πρωτεΐνης δεν είναι παράγοντας που επηρεάζει τη διατροφική αξία των διαφόρων μικροφυκών.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η χρήση των μικροφυκών στα πρώτα στάδια της εκτροφής των υδρόβιων οργανισμών είναι απαραίτητη. Η επίδραση της παρουσίας των μικροφυκών στις δεξαμενές των νυμφών των ιχθύων δεν είναι πλήρως κατανοητή. Φαίνεται, όμως, ότι είναι ιδιαίτερα ευεργετική αφού, όπως είναι γνωστό, συμβάλλει στη σταθεροποίηση των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού σε στάσιμα υδάτινα συστήματα (απομάκρυνση των μεταβολικών παραπροϊόντων, παραγωγή οξυγόνου). Επίσης, τα μικροφύκη φαίνεται ότι επιδρούν και μέσω των παρακάτω μηχανισμών:

1. Αποτελούν άμεση πηγή τροφής εφοδιάζοντας τις λάρβες με χρήσιμους πολυσακχαρίτες που υπάρχουν στα κυτταρικά τοιχώματα ενεργοποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα,
2. Είναι παράλληλα έμμεση πηγή θρεπτικών συστατικών για τις λάρβες των ψαριών μέσω της ζωντανής τροφής (αυξάνοντας, για παράδειγμα, τη θρεπτική αξία της ζωντανής τροφής),
3. Κάνουν πιο εύκολη την πρόσληψη τροφής ενισχύοντας την οπτική αντίθεση και τη διασπορά του φωτός, και
4. Ελέγχουν το μικροβιακό φορτίο των δεξαμενών με διάφορες εκκρίσεις τους στο νερό ή και στο πεπτικό των λαρβών (FAO, 1992).

2.1.1.1. *Haematococcus pluvialis*

Ο αιματοκόκκος είναι ένα πράσινο μικροφύκος του γλυκού νερού που ανήκει στο είδος χλωρόφυτα και στην οικογένεια των Haematococcaceae. Η συστηματική κατάταξή του έχει ως εξής:

Βασίλειο	: Viridiplantae
Φύλο	: Chlorophyta
Κλάση	: Chlorophyceae
Τάξη	: Chlamydomonadales
Οικογένεια	: Haematococcaceae
Γένος	: <i>Haematococcus</i>
Είδος	: <i>Haematococcus pluvialis</i>

Είναι μονοκύτταρος οργανισμός ο οποίος φέρει δύο μαστίγια. Έχει σχήμα σφαιρικό, ελλειψοειδές ή σχήμα αχλαδιού. Το είδος είναι γνωστό για την υψηλή περιεκτικότητα σε ασταξανθίνη, η οποία ευθύνεται για τον κόκκινο χρωματισμό των κυττάρων του αιματόκοκκου. Η ασταξανθίνη είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό (β-καροτένιο) το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην φαρμακολογία, την αισθητική και την ιχθυολογία. Επίσης, έχει αναφερθεί η χρήση της ασταξανθίνης ως συμπλήρωμα στην διατροφή των ανθρώπων. Η συγκέντρωση της ασταξανθίνης στα κύτταρα του αιματόκοκκου αυξάνεται όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες γίνουν δυσμενείς για την ανάπτυξη των κυττάρων (M. R. Suseela, 2005). Παραδείγματα δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών είναι η υψηλή αλατότητα, η χαμηλή συγκέντρωση θρεπτικών ουσιών, η υψηλή ακτινοβολία και η υψηλή θερμοκρασία.

2.1.1.2. *Isochrysis galbana*

Το *Isochrysis galbana* είναι ένα πράσινο μικροφύκος του θαλασσινού νερού. Ανήκει στην οικογένεια Scarabaeoidea και στο είδος *Isochrysis galbana*. Η συστηματική του κατάταξη έχει ως εξής:

Βασίλειο	: Chromalveolata
Φύλο	: Haptophyta
Κλάση	: Prymnesiophyceae
Τάξη	: Isochridales
Οικογένεια	: Isochrysidacea
Γένος	: <i>Isochrysis</i>
Είδος	: <i>Isochrysis galbana</i>

Είναι μονοκύτταρος οργανισμός ο οποίος φέρει δύο μαστίγια και έχει σχήμα σφαιρικό ή ελλειψοειδές. Η μικροάλλη αυτή χρησιμοποιείται ευρέως στην εκτροφή ιχθύων θαλασσινού νερού λόγω της μεγάλης περιεκτικότητάς του σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και κυρίως το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA, C22:6) (Jeffrey et al., 1994). Η περιεκτικότητα καθώς και το είδος του λιπαρού οξέος που περιέχεται στα κύτταρα του *Isochrysis galbana* εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης του, καθώς και από άλλους παράγοντες όπως η αλατότητα, η θερμοκρασία, το pH, η περιεκτικότητα σε θρεπτικές ουσίες κ.α. Το DHP παίζει σπουδαίο ρόλο στην υγεία των ανθρώπων αφού έχει βρεθεί ότι εμποδίζει την εμφάνιση νόσων όπως η στεφανιαία καρδιακή νόσος και η αρτηριοσκλήρυνση, κάποιες μορφές καρκίνου κ.α.

2.1.2. Ιχθύδια λαβρακιού

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) μαζί με την τσιπούρα αποτελούν τα δύο αρχαιότερα και ευρύτερα διαδεδομένα εκτρεφόμενα είδη ψαριών σε Ελλάδα και άλλες ευρωπαϊκές χώρες. Η συνολική ετήσια παραγωγή λαβρακιού και τσιπούρας στην ΕΕ ανέρχεται στους 75.000 τόνους και 55.000 τόνους αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, το 2007 η παραγωγή του λαβρακιού ήταν 57.893 τόνοι, αριθμός που αντιστοιχεί στο 92% της παγκόσμιας παραγωγής (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2009).

Οι κύριες χώρες παραγωγής του είναι η Ελλάδα, η Ισπανία, η Τουρκία, η Ιταλία, η Γαλλία και η Κροατία. Η Ελλάδα είναι ο κύριος παραγωγός του στην Ευρωπαϊκή Ένωση, με ποσοστό 67% επί της συνολικής ευρωπαϊκής παραγωγής λαβρακιού (ακολουθεί η Ισπανία με 20%). Η Ελλάδα είναι επίσης, ο μεγαλύτερος παραγωγός λαβρακιού (περίπου 50.000 τόνοι ετησίως), με μερίδιο 57% επί της παγκόσμιας παραγωγής το 2005. Η συστηματική κατάταξή του είναι η εξής:

Βασίλειο : Ζώα (Animalia)
Φύλο : Χορδωτά (Chordata)
Κλάση : Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)
Τάξη : Περκόμορφα (Perciformes)
Οικογένεια : Μορονίδες (Moronidae)
Γένος : *Dicentrarchus*
Είδος : *Dicentrarchus labrax*

Απαντάται από το βορειότερο τμήμα της Αγγλίας έως το βορειότερο τμήμα της Αφρικής και κυρίως στη Μεσόγειο και την Μαύρη θάλασσα (Wheeler, 1975). Είναι ευρύαλο και ευρύθερμο ψάρι. Επίσης, ανήκει στα γονοχωριστικά είδη. Αναπαράγεται με εξωτερική γονιμοποίηση. Διαθέτει πολύ ανεπτυγμένη όραση, η οποία φαίνεται να είναι έγχρωμη. Το μέγιστο μέγεθος που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία είναι τα 103 cm και τα 12 Kg βάρος (IGFA, 2001). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι το μακροβιότερο λαβράκι έφτασε την ηλικία των 15 ετών (Encyclopedia of Life). Το σώμα του έχει σχήμα επίμηκες, αρκετά συμπίεσμένο, αδύνατο, όπως όλα τα ψάρια ταχύτητας. Το κεφάλι του είναι τυπικό αρπακτικού και τα μάτια του ζωντανά και κινητικά. Το στόμα του είναι πλατύ, οπλισμένο με δόντια. Στη ράχη του υπάρχει ένα πρώτο πτερύγιο που στηρίζεται από αγκαθωτές ακτίνες, ενώ το δεύτερο πτερύγιο είναι μαλακό, αλλά δυνατό. Το ουραίο πτερύγιο είναι δίλοβο με κοίλο άκρο. Το σώμα του καλύπτεται από μεγάλα ομοιόμορφα λέπια. Ο χρωματισμός του ποικίλει και εξαρτάται από την περιοχή προέλευσής του. Τα εκτρεφόμενα ψάρια φέρουν ασημί χρωματισμό πλευρικά, το οποίο είναι πιο σκούρο ραχιαία και πιο ανοιχτό κοιλιακά. Τα νεαρά άτομα φέρουν σκουρόχρωμες κηλίδες στο σώμα τους και κυρίως στη ράχη, οι οποίες προοδευτικά εξαφανίζονται μέχρι το πρώτο έτος της ηλικίας τους ενώ σε μερικά ψάρια παραμένουν (Wheeler 1975, Pickett and Pawson, 1994). Οι άγριοι πληθυσμοί, που ζουν σε περιοχές με πολλά φύκια και σε λιμνοθάλασσες, χρωματίζονται με σκούρο καφέ ή πράσινο στη ράχη και χρυσό στα πλευρά.

Τα θηλυκά στη Μεσόγειο ωριμάζουν σεξουαλικά κατά τον τρίτο χρόνο της ζωής τους ενώ τα αρσενικά από τον δεύτερο χρόνο. Στη φάση αυτή το μέγεθος των θηλυκών φτάνει περίπου τα 37- 40 cm ενώ των αρσενικών τα 27-30 cm. Τα θηλυκά παράγουν κατά μέσο όρο 200.000 (μέχρι και 500.000) αυγά / κιλό σωματικού βάρους (Haffrey, 2006). Οι δύο πιο σημαντικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες κατά την διάρκεια της αναπαραγωγής είναι η θερμοκρασία του νερού και η φωτοπερίοδος. Η ιδανική θερμοκρασία αναπαραγωγής είναι 13 με 15 °C. Συνήθως, στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς χρησιμοποιείται η τεχνητή αναπαραγωγή. Η φωτοπερίοδος ρυθμίζεται τεχνητά έτσι ώστε να επιμηκύνεται ο κύκλος αναπαραγωγής λόγω της εποχικής σεξουαλικής συμπεριφοράς του ψαριού. Επιλέγονται γεννήτορες που διαθέτουν τα κατάλληλα φαινομενικά και γενοτυπικά χαρακτηριστικά. Επίσης, συνήθως ακολουθείται και πρόγραμμα γενετικής βελτίωσης

για τη μεταβίβαση στους απογόνους επιθυμητών χαρακτηριστικών, όπως είναι ο ρυθμός ανάπτυξης, η μετατρεψιμότητα, τα εξωτερικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και άλλα. Από αυτούς, με κατάλληλες μεθόδους, συλλέγονται τα γεννητικά προϊόντα τα οποία, αφού γίνει η γονιμοποίηση, μεταφέρονται σε κατάλληλες δεξαμενές. Μετά το πέρας 2 έως 9 ημερών, ανάλογα τη θερμοκρασία, πραγματοποιείται η εκκόλαψη.

Στη φύση τους επόμενους 2-3 μήνες οι αναπτυσσόμενες λάρβες μετακινούνται από τις παράκτιες περιοχές στις ακτές και τελικά καταλήγουν σε κολπίσκους και εκβολές ποταμών. Η παραμονή τους στις παραπάνω περιοχές συνεχίζεται για τα επόμενα 4-5 χρόνια της ζωής τους μέχρι να ωριμάσουν και να ξεκινήσουν τη μεταναστευτική δραστηριότητα (Pickett, 1994). Αντίθετα, στα εκκολαπτήρια οι προνύμφες μεταφέρονται σε κατάλληλες δεξαμενές ή, αν γίνεται φυσική γονιμοποίηση, απομακρύνονται οι γεννήτορες. Οι προνύμφες μετά το πέρας 6 ημερών από την εκκόλαψη και την απορρόφηση του λεκιθικού σάκου τρέφονται με ειδική ζωντανή τροφή που αποτελείται από μικροφύκη, τροχόζωα (ζωοπλακτόν) και στη συνέχεια από αρτέμιες (μικρό μαλακόστρακο). Ακολουθεί ο απογαλακτισμός μετά από 40 έως 50 ημέρες οπότε και η διατροφή σταδιακά αλλάζει σε βιομηχανοποιημένη τροφή (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2009).

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Μικροφύκη

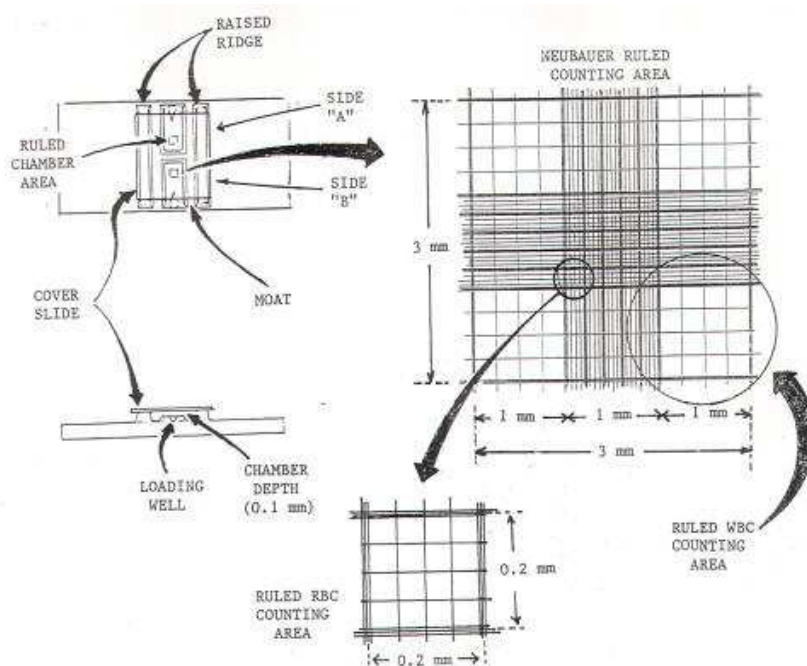
Τα μικροφύκη που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν τα *Haematococcus pluvialis* και *Isochrysis galbana*. Επιλέχθηκαν να μελετηθούν τέσσερις συγκεντρώσεις διφθοροβενζουρόνης: 25, 50, 100 και 500 ppm. Από το κάθε είδος μικροφύκους αρχικά ελήφθησαν καθαρές καλλιέργειές τους σε θρεπτικό υλικό Wallne (1970) (πίνακας 3), μετά από επώασή τους επί τρεις ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου, υπό το φως 2 λαμπτήρων 36 W έκαστος. Μετά το πέρας των 3 ημερών, για κάθε ένα είδος ελήφθησαν κατάλληλες ποσότητες από τις καλλιέργειες και τοποθετήθηκαν σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, που περιείχαν κατάλληλο καλλιεργητικό υλικό στο οποίο υπήρχε διαλυμένη η ουσία διφθοροβενζουρόνη (Dimilin[®] δραστική ουσία - Chemtura Europe Limited, Berkshire UK) σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα: Α) στους πρώτους 3 σωλήνες η τελική συγκέντρωση διφθοροβενζουρόνης ήταν 500 ppm, Β) στους επόμενους τρεις 100 ppm, Γ) στους επόμενους τρεις 50 ppm και Δ) στους επόμενους τρεις 25 ppm. Για κάθε ένα είδος, υπήρχαν και τρεις δοκιμαστικοί σωλήνες που περιείχαν την ίδια συγκέντρωση κυττάρων αλλά στο καλλιεργητικό υλικό δεν προστέθηκε διφθοροβενζουρόνη (μάρτυρες). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν επί 4 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου ($23\pm 0,5$ °C) κάτω από φωτισμό δύο λαμπτήρων 36 W, που βρίσκονταν σε απόσταση 20 cm από τους σωλήνες.

Καθημερινά, με τη βοήθεια μιας πιπέτας λαμβάνονταν 4 δείγματα των 100 μl από κάθε σωλήνα (μετά από ανάμειξη) και αφού γινόταν προσθήκη 5 μl φορμόλης με στόχο την ακινητοποίησή τους, γινόταν καταμέτρηση των κυττάρων με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου (Neubauer plate).

2.2.1.1. *Haematococcus pluvialis*

Για το μικροφύκος *H. pluvialis*, αρχικά, δημιουργήθηκε καθαρή καλλιέργεια στο εργαστήριο σε θρεπτικό υλικό Wallne (1970) (πίνακας 3). Η καλλιέργεια επώαστηκε επί τρεις ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου, υπό το φως δύο λαμπτήρων 36 W έκαστος. Μετά το πέρας τριών ημερών και αφού η ανάπτυξη του πληθυσμού ήταν σε εκθετική φάση, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του μικροφύκους στην καλλιέργεια με

τον εξής τρόπο : ελήφθησαν 4 δείγματα όγκου 100 μl και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς περιέκτες τύπου erpendorf. Έπειτα, προστέθηκαν 5 μl εξουδετερωμένης φορμόλης σε κάθε περιέκτη με στόχο την ακινητοποίηση των κυττάρων. Στη συνέχεια, κατάλληλη ποσότητα από κάθε περιέκτη τοποθετήθηκε σε αιμοκυττόμετρο (πλάκα Neubauer) (εικόνα 2) και έγινε καταμέτρηση των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο. Από τις τιμές που προέκυψαν υπολογίστηκε η μέση τιμή του αριθμού των κυττάρων και, στη συνέχεια, έγινε υπολογισμός της συγκέντρωσης του μικροφύκους στην καλλιέργεια η οποία ισοδυναμούσε με $15,8 \times 10^4$ κύτταρα/ml.



Εικόνα 2: Αιμοκυτταρόμετρο-πλάκα Neubauer

Σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες ελήφθησαν κατάλληλες ποσότητες από την καλλιέργεια και παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα, τα οποία είχαν όλα τελικό όγκο 10 ml ενώ η συγκέντρωση του μικροφύκους στα νέα διαλύματα παρέμεινε ίδια με την αρχική ($15,8 \times 10^4$ κύτταρα/ml) :

Στους 12 από αυτούς τους σωλήνες προστέθηκε η ουσία διφθοροβενζουρόνη έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι :

α) Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες η τελική συγκέντρωση της διφθοροβενζουρόνης ήταν 500 ppm.

β) Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες η τελική συγκέντρωση της διφθοροβενζουρόνης ήταν 100 ppm.

γ) Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες η τελική συγκέντρωση της διφθοροβενζουρόνης ήταν 50 ppm.

δ) Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες η τελική συγκέντρωση της διφθοροβενζουρόνης ήταν 25 ppm.

ε) Στους τελευταίους τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 10 ml καλλιέργειας *Haematococcus pluvialis* και καθόλου διφθοροβενζουρόνη και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Το στόμιο των σωλήνων κλείστηκε με αποστειρωμένο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες διατηρήθηκαν επί 4 ημέρες σε θερμοκρασία $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$ και υπό συνεχή φωτισμό δύο λαμπτήρων 36 W, που βρίσκονται σε απόσταση 20 cm από τους σωλήνες (εικόνα 3-4). Κάθε ημέρα γινόταν καταμέτρηση κυττάρων (εικόνα 5-6) και υπολογισμός της συγκέντρωσης των διαλυμάτων σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω:

Από κάθε σωλήνα λαμβάνονταν με τη βοήθεια ενός σιφωνίου και μετά από έντονη ανάμειξη του περιεχομένου, 4 δείγματα των 100 μl και αφού τοποθετούνταν σε πλαστικούς περιέκτες τύπου erpendorf προσθέτονταν 5 μl εξουδετερωμένης φορμόλης με στόχο την ακινητοποίησή τους. Κατόπιν, με νέο σιφώνιο λαμβανόταν μικροποσότητα του δείγματος και τοποθετούταν στην πλάκα Neubauer. Η μέθοδος καταμέτρησης σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, περιλαμβάνει τη μέτρηση των κυττάρων σε 5 τουλάχιστον από τα 25 τετραγωνάκια και αφού βγει μια μέση τιμή, επιτρέπεται η εκτίμηση του μέσου αριθμού κυττάρων για ολόκληρο το μεγάλο πλαίσιο του αιμοκυτταρόμετρου, σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

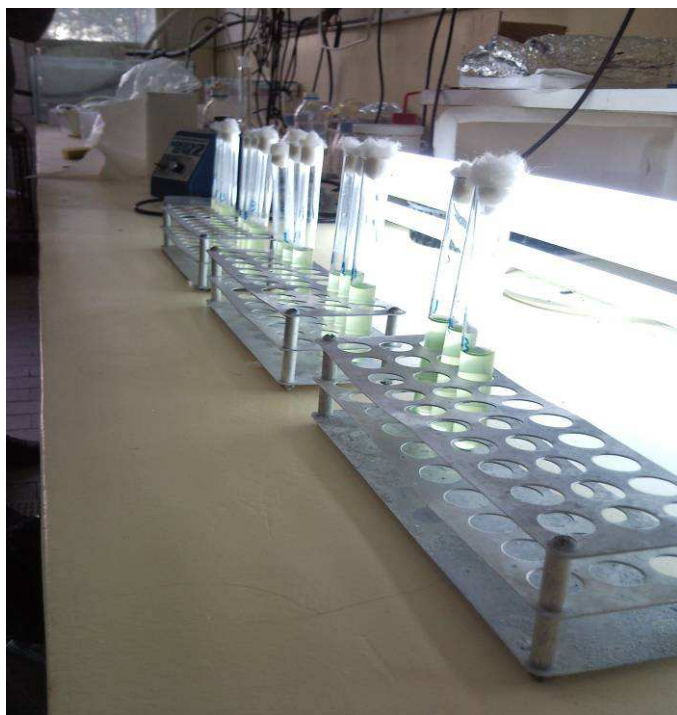
$$a \times 9 / 0.0025 = \text{αριθμός κυττάρων}$$

όπου a είναι ο αριθμός των κυττάρων που βρέθηκε καταμετρώντας τα κύτταρα στα ελάχιστα τετραγωνάκια των 0.0025 mm^2 και το κλάσμα $9/0.0025$ είναι ο συντελεστής

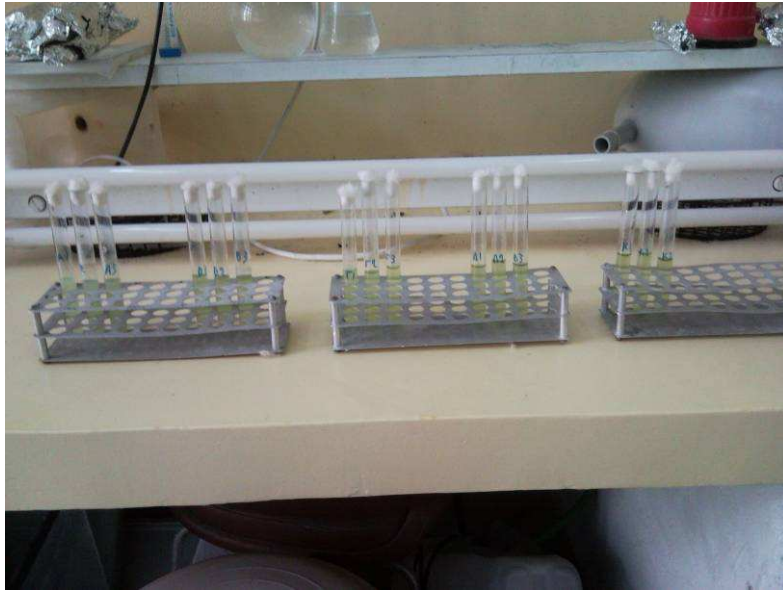
ή καλύτερα ο αριθμός των ελάχιστων τετραγωνιδίων των 0.0025 mm^2 που αντιστοιχούν στην επιφάνεια του μεγάλου πλαισίου εμβαδού 9 mm^2 . Στη συνέχεια, αφού πολλαπλασιάστηκε ο αριθμός των κυττάρων, που υπολογίστηκε προηγουμένως, με το 1 ml και διαιρέθηκε με το 0.0009 ml που αντιπροσωπεύει τον όγκο δείγματος επάνω στο πλαίσιο, ο αριθμός κυττάρων / ml δείγματος είναι :

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

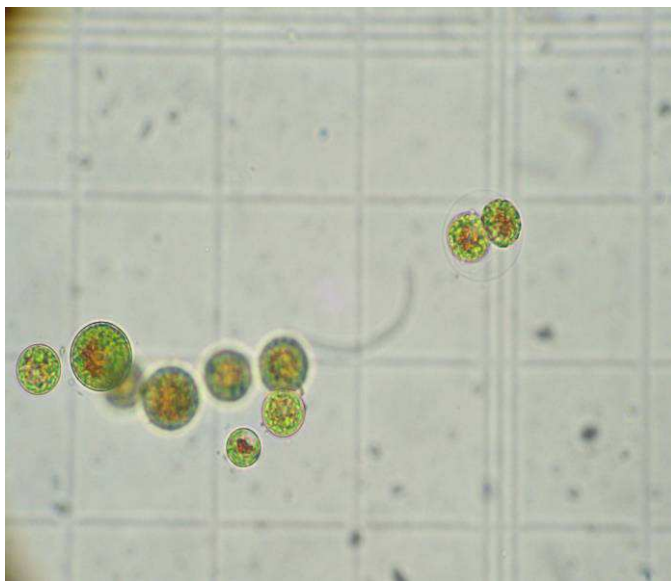
Η διαδικασία επαναλαμβάνονταν άλλη μία φορά. Έτσι προέκυπταν 4 τιμές, από τις οποίες υπολογιζόταν η μέση τιμή. Αφού ολοκληρωνόταν η διαδικασία σε όλα τα δείγματα, γινόταν με κατάλληλες αναγωγές ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των κυττάρων σε κάθε σωλήνα.



Εικόνα 3. Οι τριάδες των δοκιμαστικών σωλήνων που περιέχουν τα μικροφύκη *Haematococcus pluvialis* με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις διφθοροβενζουρόνης, (Φωτογραφία Μαντζούκης Χρήστος).



Εικόνα 4: Οι τριάδες των δοκιμαστικών σωλήνων που περιέχουν τα μικροφύκη *Haematococcus pluvialis* με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις διφθοροβενζουρόνης, (Φωτογραφία Μαντζούκης Χρήστος).



Εικόνα 5: Κύτταρα *Haematococcus pluvialis* σε συγκέντρωση διφθοροβενζουρόνης 25 ppm, κατά την καταμέτρηση τους σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer plate, με οπτικό μικροσκόπιο (25X) στις 72 ώρες, (Φωτογραφία Μαντζούκης Χρήστος).



Εικόνα 6: Κύτταρα *Haematococcus pluvialis* σε συγκέντρωση διφθοροβενζουρόνης 100 ppm, κατά την καταμέτρηση τους σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer plate, με οπτικό μικροσκόπιο (25X) στις 72 ώρες, (Φωτογραφία Μαντζούκης Χρήστος).

2.2.1.2 *Isochrysis galbana*

Για το μικροφύκος *Isochrysis galbana*, αρχικά, δημιουργήθηκε καθαρή καλλιέργεια στο εργαστήριο σε θρεπτικό υλικό Wallne (1970). Η καλλιέργεια επώαστηκε για τρεις ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου, υπό το φως δύο λαμπτήρων 36 W έκαστος. Μετά το πέρας τριών ημερών και αφού η ανάπτυξη του πληθυσμού ήταν σε εκθετική φάση, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του μικροφύκους στην καλλιέργεια με τον εξής τρόπο : ελήφθησαν 4 δείγματα όγκου 100 μl και τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς περιέκτες τύπου erpendorf . Έπειτα, προστέθηκαν 5 μl εξουδετερωμένης φορμόλης σε κάθε περιέκτη με στόχο την ακινητοποίηση των κυττάρων. Στη συνέχεια κατάλληλη ποσότητα από κάθε περιέκτη τοποθετήθηκε σε αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) και έγινε καταμέτρηση των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο. Από τις τιμές που προέκυψαν υπολογίστηκε η μέση τιμή του αριθμού των κυττάρων και στην συνέχεια έγινε υπολογισμός της συγκέντρωσης του μικροφύκους στην καλλιέργεια η οποία ισοδυναμούσε με $8,9 \times 10^6$ κύτταρα/ml. Σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες ελήφθησαν κατάλληλες ποσότητες από την καλλιέργεια και παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα τα οποία είχαν όλα τελικό όγκο 10 ml.

Στους 12 από αυτούς τους σωλήνες προστέθηκε η ουσία διφθοροβενζουρόνη έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι :

α) Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες η τελική συγκέντρωση της διφθοροβενζουρόνης ήταν 500 ppm.

β) Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες η τελική συγκέντρωση της διφθοροβενζουρόνης ήταν 100 ppm.

γ) Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες η τελική συγκέντρωση της διφθοροβενζουρόνης ήταν 50 ppm.

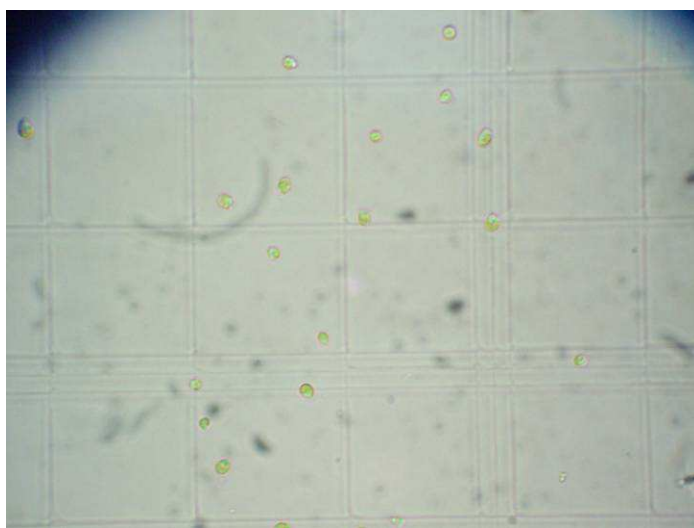
δ) Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες η τελική συγκέντρωση της διφθοροβενζουρόνης ήταν 25 ppm.

ε) Στους τελευταίους τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 10 ml καλλιέργειας *Isocrysis galbana* και καθόλου διφθοροβενζουρόνη και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Η τελική συγκέντρωση των νέων διαλυμάτων ήταν $4,45 \times 10^5$. Το στόμιο των σωλήνων κλείστηκε με αποστειρωμένο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε στατό όπου διατηρήθηκαν επί 4 ημέρες σε θερμοκρασία $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$ και υπό συνεχή φωτισμό δύο λαμπτήρων 36 W, που βρίσκονται σε απόσταση 20 cm από τους σωλήνες (εικόνα 7). Κάθε ημέρα γινόταν καταμέτρηση των κυττάρων (εικόνες 8) της συγκέντρωσης των διαλυμάτων σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω για το μικροφύκος αιματόκοκκο.



Εικόνα 7: Οι τριάδες των δοκιμαστικών σωλήνων που περιέχουν τα μικροφύκη *Isochrysis galbana* με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις διφθοροβενζουρόνης, (Φωτογραφία Μαντζούκης Χρήστος).



Εικόνα 8: Κύτταρα *Isochrysis galbana* σε συγκέντρωση διφθοροβενζουρόνης 25 ppm, κατά την καταμέτρηση τους σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer plate, με οπτικό μικροσκόπιο (25X) στις 48 ώρες, (Φωτογραφία Μαντζούκης Χρήστος).

Πίνακας 3: Προετοιμασία θρεπτικού υποστρώματος Wallne (πηγή :aquasop 1983, σελ 6-7)

Προετοιμασία του μέσου Wallne	
Διάλυμα No 1	
Na ₂ EDTA	45.00 g
H ₃ BO ₃	33.60 g
NaNO ₃ (KNO ₃)	100.00 g (116 g)
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	20.00g
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,36g
FeCl ₃ , 6H ₂ O	1.30g
Διάλυμα No 2	1.00 ml
Στα παραπάνω συμπληρώνεται αποσταγμένο νερό μέχρι ο όγκος να γίνει 1 λίτρο	
Διάλυμα No 2 (ιχνοστοιχεία)	
ZnCl ₂	2.1g
CoCl ₂ , 6H ₂ O	2.0g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	0.9g
CuSO ₄ , 5H ₂ O	2.0g
Στα παραπάνω συμπληρώνεται αποσταγμένο νερό και HCl για καλύτερη διάλυση, μέχρι ο όγκος να γίνει 100ml	
Διάλυμα No 3 (βιταμίνες)	
Θειαμίνη ένυδρη υδροχλωρική	200mg
Κυανοκοβαλαμίνη	10mg
Στα παραπάνω συμπληρώνεται αποσταγμένο νερό μέχρι ο όγκος να γίνει 100ml	
Εκτός από διάλυμα No 3 (βιταμίνες), τα άλλα δύο τοποθετούνται σε αυτόκαυστο για 30 λεπτά στους 125 °C	
Για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε τοποθετήθηκε 1 ml ανά λίτρο από το διάλυμα No 1 και 0,1 ml ανά λίτρο από το διάλυμα No 3	

2.2.2. Ιχθύδια λαβρακιού

Επιλέχτηκε γόνος λαβρακιού ηλικίας επτά εβδομάδων και μέσου βάρους $0,25 \pm 0,05$ g Τυπική απόκλιση (SD). Τα ιχθύδια δεν έλαβαν τροφή την ημέρα της μεταφοράς. Η μεταφορά τους έγινε μέσα σε μεγάλες πλαστικές σακούλες οι οποίες περιείχαν υπεροξυγονομένο νερό από τη μονάδα που ελήφθησαν τα ψάρια και μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Ιχθυολογίας της Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ.. 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. Η θερμοκρασία του νερού ήταν ίδια με την θερμοκρασία του νερού της μεταφοράς των ιχθυδίων, η οποία σταδιακά αυξήθηκε σε $23 \pm 0,5$ °C. Σε κάθε περιέκτη τοποθετήθηκαν ομάδες των 10 ατόμων. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια δοσομετρητή έγινε προσθήκη της ουσίας διφθοροβενζουρόνης έτσι ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων που σχηματίστηκαν ήταν οι εξής:

α) Σε τρεις πλαστικούς περιέκτες η τελική συγκέντρωση ήταν 1500 ppm (ομάδα Α)

β) Σε τρεις πλαστικούς περιέκτες η τελική συγκέντρωση ήταν 1000 ppm (ομάδα Β)

γ) Σε τρεις πλαστικούς περιέκτες η τελική συγκέντρωση ήταν 500 ppm (ομάδα Γ)

δ) Και σε τρεις πλαστικούς περιέκτες δεν προστέθηκε διφθοροβενζουρόνη (ομάδα Κ) και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Όλοι οι περιέκτες τοποθετήθηκαν κάτω από χαμηλό φωτισμό, υπό συνεχή αερισμό με την μορφή μικροφουσαλίδων και σε σταθερή θερμοκρασία ($23 \pm 0,5$ °C).

Ο πειραματισμός διήρκησε 8 ημέρες. Κάθε ημέρα γινόταν καταμέτρηση των ζωντανών ιχθύων ενώ ταυτόχρονα γινόταν λήψη δειγμάτων για ιστολογική εξέταση. Τα δείγματα αυτά των ιχθύων μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10% .

Μετά την λήξη του πειράματος τα δείγματα που ελήφθησαν, τοποθετήθηκαν σε ιστοκινέτα για τον εγκλεισμό τους σε παραφίνη. Κατόπιν, με τη βοήθεια μικροτόμου έγιναν ιστολογικές τομές. Τέλος, οι ιστολογικές τομές βάφθηκαν με χρώση ηωσίνη-αιματοξυλίνη (πίνακας 4) και εξετάστηκαν με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου.

Πίνακας 4: 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) ... Η Αιματοξυλίνη Gill (αναλόγως για σκεύασμα 2 ή 3)4-8 λεπτά .2-5 λεπτά
9	Διάλυμα Πλύσης Αποσταγμένου Νερού	.1-2 λεπτά
10	Nu-Clear I ... Η Nu-Clear 11	.10 δευτερόλεπτα .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 ... Η Ηωσίνη, υδατική	.10 δευτερόλεπτα ως 1 λεπτό .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	

2.2.3 Στατιστική ανάλυση

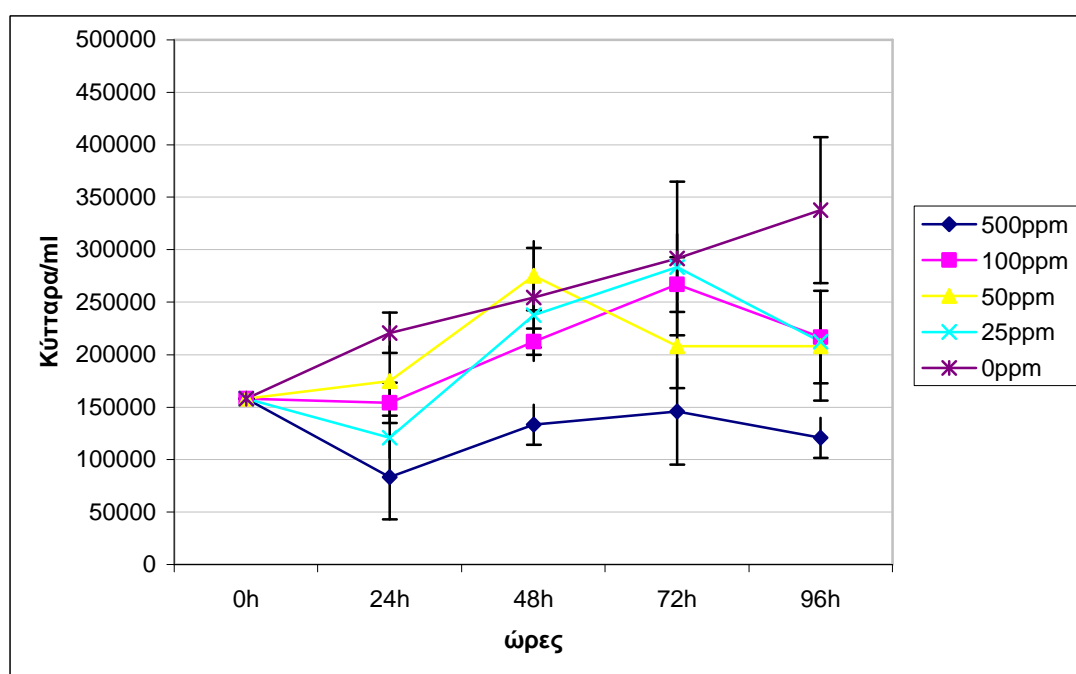
Η σύγκριση των μέσων όρων των συγκεντρώσεων των κυττάρων των μικροφυκών ελέγχθησαν με την ανάλυση διακύμανσης μια κατεύθυνσης (one way ANOVA), χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα STATGRAPHICS PLUS 3. Η μέθοδος Tukey χρησιμοποιήθηκε για να εντοπιστούν οι στατιστικές διαφορές ($P \leq 0.05$).

Η σύγκριση της επιβιωσιμότητας των ιχθυδίων λαβρακίου έγινε με τη μέθοδο Kaplan – Meier και χρησιμοποιήθηκε το test Breslow, και οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές όταν $p \leq 0.05$.

2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.3.1. *Haematococcus pluvialis*

Στο είδος *Haematococcus pluvialis* στις τέσσερις μετρήσεις που έγιναν σε 24, 48, 72 και 96 h η μικρότερη ($p \leq 0,005$) αύξηση παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση διφθοροβενζουρόνης (500 ppm) (εικόνα 9). Αναλυτικότερα τα αποτελέσματα των μετρήσεων των μικροφυκών, για όλες τις συγκεντρώσεις της διφθοροβενζουρόνης και για όλες τις ημέρες, παραθέτονται στον πίνακα 5.



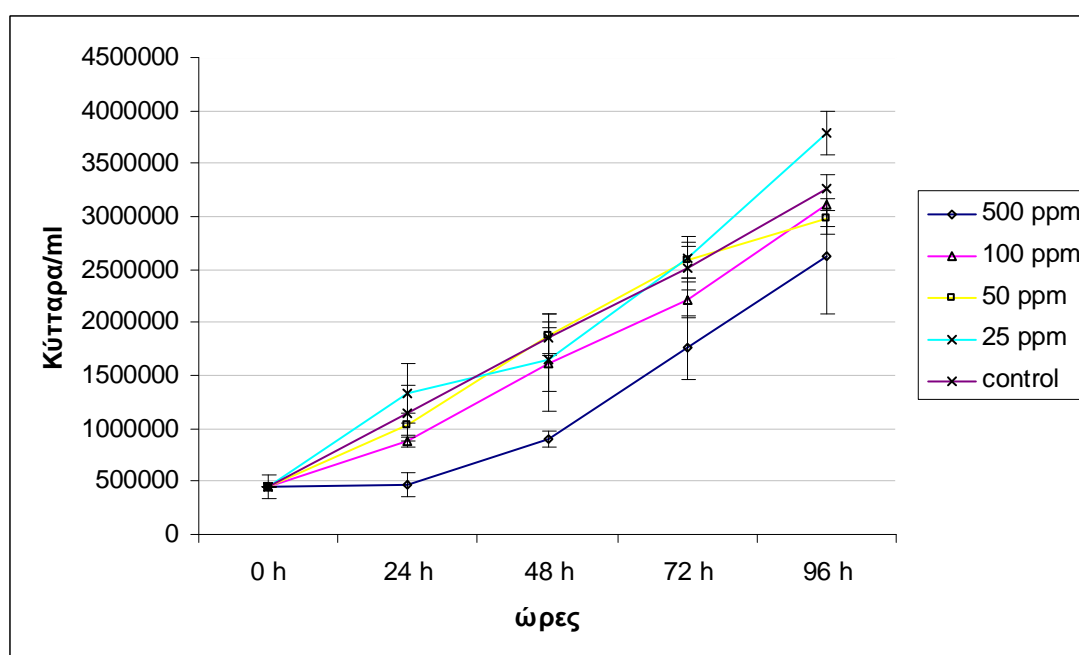
Εικόνα 9. Επίδραση της διφθοροβενζουρόνης στην αύξηση (κύτταρα/ml) του *Haematococcus pluvialis*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές (κύτταρα/ml) από 4 μετρήσεις ανά σωλήνα \pm SD.

Πίνακας 5. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων διφθοροβενζουρόνης στην αύξηση του μικροφύκου *Haematococcus pluvialis*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές των κυττάρων/ml \pm SD από τις 3 επαναλήψεις ανά ομάδα και ανά ημέρα, ενώ διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες σε ένα ορισμένο χρόνο ($p \leq 0,05$). Οι τιμές είναι $\times 10^4$ κύτταρα/ml.

	500 ppm	100 ppm	50 ppm	25 ppm	Μάρτυρες
0 h	15,8	15,8	15,8	15,8	15,8
24 h	8,3 \pm 4 ^a	15,4 \pm 1,9 ^{a,γ}	17,5 \pm 3,3 ^{β,γ}	12 \pm 1,9 ^{β,γ}	22 \pm 1,9 ^{β,γ}
48 h	13,3 \pm 1,9 ^a	2,1 \pm 1,2 ^{a,γ}	27,5 \pm 3,3 ^{β,γ}	23,7 \pm 4,3 ^{β,γ}	25,4 \pm 4,7 ^{β,γ}
72 h	14,5 \pm 5 ^a	26,6 \pm 2,6 ^{a,γ}	20,8 \pm 4 ^{a,γ}	28,3 \pm 3,1 ^{β,γ}	29,1 \pm 7,3 ^{β,γ}
96 h	12 \pm 1,9 ^a	21,6 \pm 4,3 ^a	20,8 \pm 5,2 ^a	21,2 \pm 1,2 ^a	33,7 \pm 6,9 ^β

2.3.2. *Isochrysis galbana*

Στο είδος *Isochrysis galbana* 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 διφθοροβενζουρόνης (500ppm) (εικόνα 10). Αναλυτικότερα τα αποτελέσματα των μετρήσεων των μικροφυκών, για όλες τις συγκεντρώσεις της διφθοροβενζουρόνης και για όλες τις ημέρες, παραθέτονται στον παρακάτω πίνακα 6.



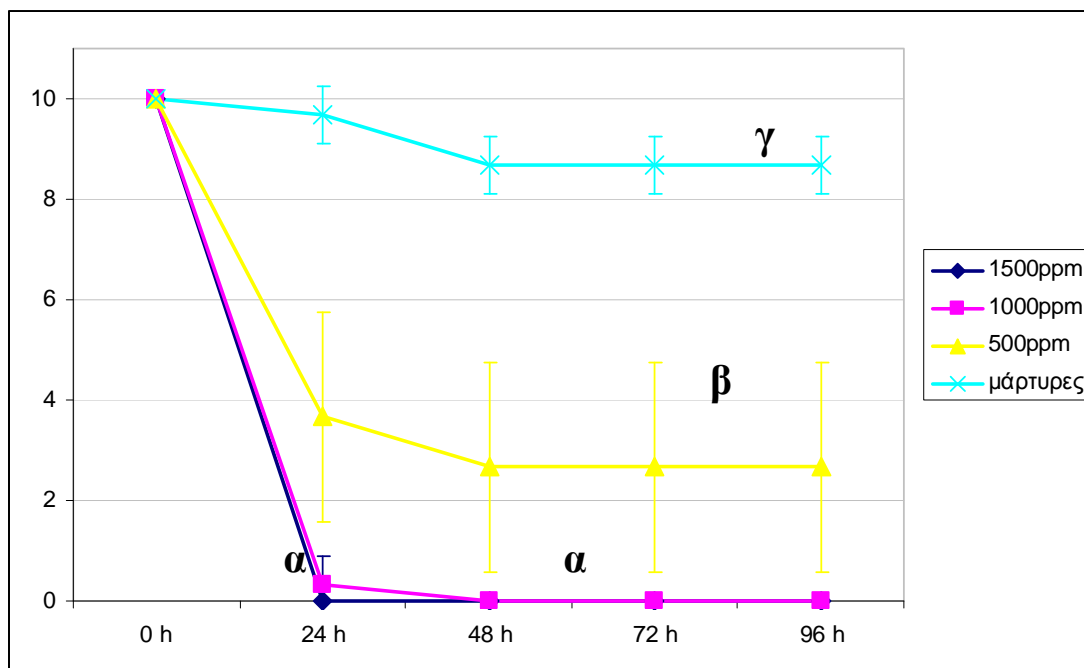
Εικόνα 10. Επίδραση της διφθοροβενζουρόνης στην αύξηση (κύτταρα/ml) του *Isochrysis galbana*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές (κύτταρα/ml) από 4 μετρήσεις ανά σωλήνα \pm SD.

Πίνακας 6. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων διφθοροβενζουρόνης στην αύξηση του μικροφύκου *Isochrysis galbana*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές κυττάρων/ml \pm SD από τις 3 επαναλήψεις ανά ομάδα και ανά ημέρα. Διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες σε ένα ορισμένο χρόνο ($p \leq 0,05$). Οι παρακάτω τιμές είναι $\times 10^5$ κύτταρα/ml .

	500 ppm	100 ppm	50 ppm	25 ppm	Μάρτυρες
0 h	4,45	4,45	4,45	4,45	4,45
24 h	4,6 \pm 1,1 ^α	8,8 \pm 0,6 ^β	10,2 \pm 1,1 ^{β,γ}	13,3 \pm 2,7 ^γ	11,4 \pm 1 ^{β,γ}
48 h	4,6 \pm 1,1 ^α	16,2 \pm 4,5 ^{α,γ}	18,7 \pm 1,9 ^{β,γ}	16,5 \pm 2,9 ^{α,γ}	18,5 \pm 2,6 ^{β,γ}
72 h	4,6 \pm 1,1 ^α	22,1 \pm 1,6 ^{α,γ}	25,8 \pm 1,7 ^{β,γ}	26,1 \pm 1,9 ^{β,γ}	25,1 \pm 1,5 ^{β,γ}
96 h	4,6 \pm 1,1 ^α	31 \pm 2,8 ^{α,γ}	29,8 \pm 0,7 ^{α,γ}	37,9 \pm 2 ^{β,γ}	32,7 \pm 2 ^{α,γ}

2.3.3. Ιχθύδια λαβρακιού

Όπως παρουσιάζεται αναλυτικά και στο πίνακα 9, η μεγαλύτερη συγκέντρωση διφθοροβενζουρόνης (1500 ppm) είχε ως αποτέλεσμα το θάνατο ολόκληρου του πληθυσμού των ιχθυδίων *Dicentrarchus labrax* μέσα σε 24 ώρες. Κάτι ανάλογο παρατηρήθηκε και στην αμέσως μικρότερη συγκέντρωση διφθοροβενζουρόνης (1000 ppm), όπου μετά το πέρας των 24 ωρών, μόνο ένα ιχθύδιο παρέμεινε ζωντανό ($1 \pm 0,57$ SD). Το ιχθύδιο αυτό τοποθετήθηκε σε φορμόλη για ιστολογική εξέταση. Στην συγκέντρωση των 500 ppm σημειώθηκαν κάποιες απώλειες ιχθυδίων στο πρώτο εικοσιτετράωρο ($3,66 \pm 2,08$ SD ζωντανά ιχθύδια / περιέκτη). Από τα εναπομείναντα ιχθύδια ελήφθησαν τρία για ιστολογική εξέταση ενώ ο υπόλοιπος πληθυσμός παρέμεινε σταθερός μέχρι τις 72 ώρες. Στα ιχθύδια που δεν εκτέθηκαν στο φάρμακο παρατηρήθηκε η απώλεια ενός ατόμου το πρώτο εικοσιτετράωρο ($9,66 \pm 0,57$ SD ζωντανά ιχθύδια / περιέκτη), ενώ ο πληθυσμός τους παρέμεινε σταθερός τις επόμενες ημέρες του πειραματισμού.



Εικόνα 11. Επίδραση της διφθοροβενζουρόνης στην επιβίωση (ζωντανά ιχθύδια/ περιέκτη) του *D.labrax*. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές από τους 3 περιέκτες ανά ομάδα \pm SD. Τα διαφορετικά γράμματα απεικονίζουν διαφορές στατιστικά σημαντικές ($p \leq 0,05$) μεταξύ των τεσσάρων καμπυλών.

ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Κατ' αρχην θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την πρώτη δειγματοληψία (24 h) τα ψάρια που εκτέθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση διφθοροβενζουρόνης, πέθαναν προτού ληφθούν δείγματα ιστών, γι' αυτό και λήφθηκαν δείγματα ιστών από νεκρά ψάρια. Από την συγκέντρωση των 1000 ppm, ελήφθη ένα ζωντανό ψάρι και δύο νεκρά.

Η ιστολογική εξέταση των εσωτερικών οργάνων που λήφθηκαν από όλα τα ψάρια, και στις δύο δειγματοληψίες, δεν έδειξε καμία διαφορά ανάμεσα στις ομάδες των ψαριών που εκτέθηκαν στις διαφορετικές δόσεις διφθοροβενζουρόνης, συγκριτικά με τους μάρτυρες. Όλα τα όργανα παρουσίασαν φυσιολογική εμφάνιση. Αντίθετα, η ιστολογική εξέταση των βραγχίων των ψαριών που εκτέθηκαν σε όλες τις συγκεντρώσεις διφθοροβενζουρόνης παρουσίασε κάποια ενδιαφέροντα ευρήματα σε σχέση με αυτά που λήφθηκαν από τους μάρτυρες.

Τα ευρήματα της ιστολογικής εξέτασης των βραγχίων συνοπτικά περιγράφονται παρακάτω.

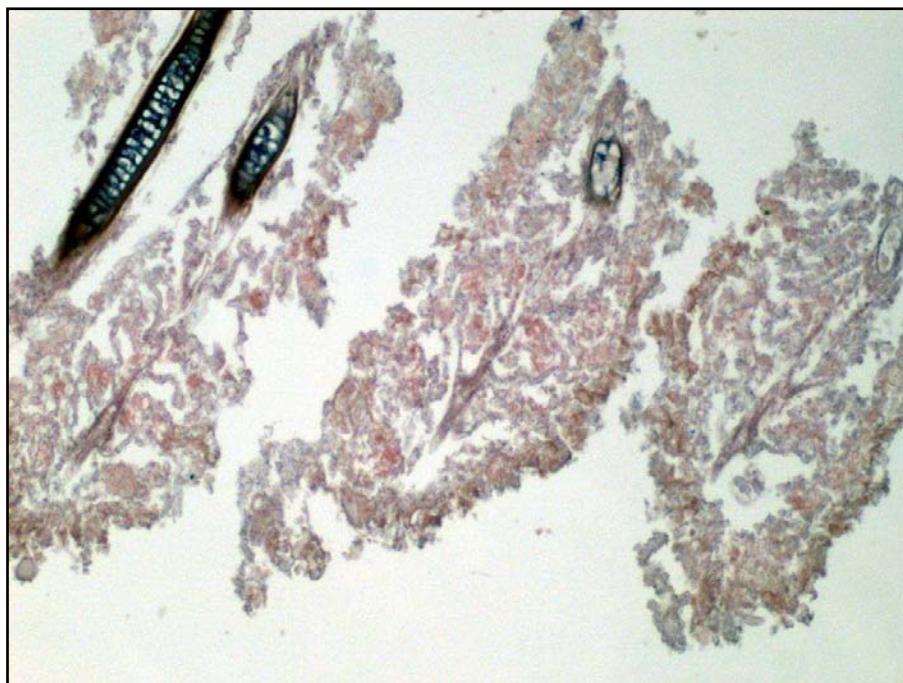
α) Και στις δύο δειγματοληψίες, τα βράγχια των ψαριών που δεν εκτέθηκαν στη διφθοροβενζουρόνη (μάρτυρες) παρουσίασαν φυσιολογική εμφάνιση με ελάχιστες

εστίες αποκόλλησης του αναπνευστικού επιθηλίου (Εικ.13) και υπερπλασίας / υπερτροφίας του.

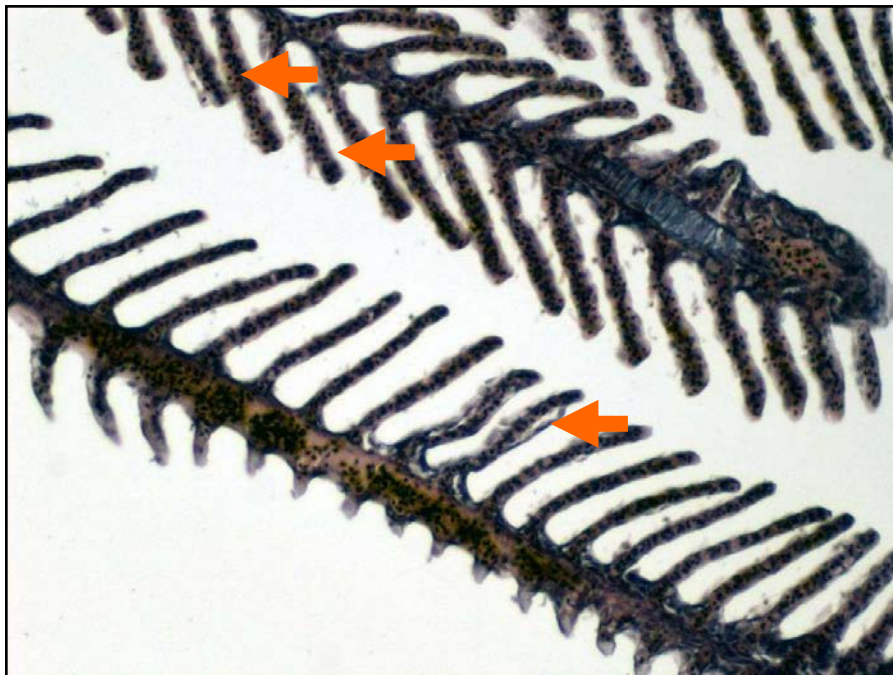
β) Τα βράγχια όλων των ψαριών που εκτέθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση διφθοροβενζουρόνης παρουσίασαν έντονες μεταθανάτιες αλλοιώσεις, με αποτέλεσμα να μην ήταν δυνατό να εκτιμηθεί η τυχόν επίδραση του εντομοκτόνου (Εικ.12)

γ) Τα βράγχια όλων των ψαριών που εκτέθηκαν σε 1000 ppm διφθοροβενζουρόνης και που συλλέχθηκαν κατά την πρώτη δειγματοληψία, παρουσίασαν εκτεταμένες περιοχές με έντονη υπερπλασία και υπερτροφία του αναπνευστικού επιθηλίου, ενώ σε κάποιες περιοχές παρατηρήθηκε και αποκόλλησή του (Εικ. 14).

δ) Τα βράγχια όλων των ψαριών που εκτέθηκαν σε 500 ppm διφθοροβενζουρόνης και που συλλέχθηκαν κατά την πρώτη δειγματοληψία, παρουσίασαν φυσιολογική εμφάνιση με αρκετές εστίες υπερπλασίας και υπερτροφίας του αναπνευστικού επιθηλίου (Εικ. 15). Στην δεύτερη δειγματοληψία, οι εστίες αυτές παρατηρήθηκαν αυξημένες.



Εικόνα 12. Βράγχια λαβρακιού που εκτέθηκε σε 1500 ppm διφθοροβενζουρόνης, πρώτη δειγματοληψία (24h). Εκτεταμένες μεταθανάτιες αλλοιώσεις του ιστού. Μεγέθυνση X 200.



Εικόνα 13. Βράγχια λαβρακιού που δεν εκτέθηκε σε διφθοροβενζουρόνη, 2^η δειγματοληψία (96h). Φυσιολογική εμφάνιση βραγχιακών νηματίων με εστίες αποκόλλησης του αναπνευστικού επιθηλίου (βέλη). Μεγέθυνση X200.



Εικόνα 14. Βράγχια λαβρακιού που εκτέθηκε σε 1000 ppm διφθοροβενζουρόνης, πρώτη δειγματοληψία. Έντονη εκτεταμένη υπερπλασία και υπερτροφία των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων. Μεγέθυνση X200.



Εικόνα 15. Βράγχια λαβρακιού που εκτέθηκε σε 500 ppm διφθοροβενζουρόνης, δεύτερη δειγματοληψία. Έντονη εκτεταμένη υπερπλασία και υπερτροφία των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων. Μεγέθυνση $\times 100$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην σύγχρονη κοινωνία επικρατεί ανησυχία για τις επιπτώσεις που έχουν τα εντομοκτόνα στους διάφορους οργανισμούς και κατ' επέκταση στο περιβάλλον. Οι επιστημονικές μελέτες προσανατολίζονται στην αναζήτηση ουσιών με τις λιγότερες δυνατές επιπτώσεις στο περιβάλλον. Η παρούσα εργασία μελετά τις επιπτώσεις από τη χρήση της χημικής ουσίας διφθοροβενζουρόνης σε δύο είδη φυκιών (*Haematococcus pluvialis* και το *Isochrysis galbana*) και σε νύμφες λαβρακίου. Η διφθοροβενζουρόνη ανήκει σε μια κατηγορία εντομοκτόνων που δρουν ως ρυθμιστές της ανάπτυξης των εντόμων και τα τελευταία χρόνια βρίσκει ευρεία εφαρμογή. Συγκεκριμένα, η διφθοροβενζουρόνη δρα αναστέλλοντας την σύνθεση της χιτίνης, η οποία αποτελεί βασικό συστατικό της επιδερμίδας των εντόμων, συμμετέχοντας στην κατασκευή του εξωσκελετού (Marx, 1977). Μέχρι στιγμής, οι περισσότερες έρευνες (Eisler, 2007) δείχνουν ότι η διφθοροβενζουρόνη επηρεάζει ελάχιστα τα θηλαστικά, έχει μικρή συγκέντρωση στην τροφική αλυσίδα (Schooley and Quistad 1979), παραμένει σταθερή στα φυλλώματα και σπάνια παραμένει για μεγάλες περιόδους στο χώμα ή το νερό (Marx 1977, Ivie 1978, Schaefer *et al.*, 1980). Παρ' όλα αυτά υπάρχουν και άλλοι οργανισμοί, εκτός των εντόμων, όπως τα μαλακόστρακα, που συνθέτουν χιτίνη και δεν αποτελούν στόχους του συγκεκριμένου εντομοκτόνου, επηρεάζονται, όμως, αρνητικά (ανάπτυξη, επιβίωση, αναπαραγωγή, συμπεριφορά, αναγέννηση άκρων και άλλα. (Eisler, 1992) είτε από την ίδια τη διφθοροβενζουρόνη (Marx 1977, Christiansen 1986), είτε από τους μεταβολίτες της ουσίας (2,6-διφθοροβενζοϊκό οξύ, 4-χλωροφαινυλοϋρία, 2,6-διφθοροβενζαμίδη και 4-χλωροανιλίνη). Επίσης, δεν είναι γνωστές οι επιδράσεις των παραπάνω ουσιών σε πλήθος οργανισμών, με αποτέλεσμα να προκύπτει η ανάγκη μελέτης των επιδράσεων αυτών.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η επίδραση της διφθοροβενζουρόνης σε δύο μικροφύκη που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στις θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες, το *Haematococcus pluvialis* και το *Isochrysis galbana*. Και τα δύο είδη μικροφυκών που

μελετήθηκαν χρησιμοποιούνται ως τροφή 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 καλλιεργούνται και ως καθαρά στελέχη (μονοκαλλιέργεια) σε εντατικά συστήματα. Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι υψηλές συγκεντρώσεις της διφθοροβενζουρόνης στο νερό (500 ppm), μειώνουν ($p \leq 0.05$) την αύξηση των προαναφερθέντων μικροφυκών. Συγκεκριμένα για τον αιματόκοκκο στις 24 h, ο αριθμός των κυττάρων στη συγκέντρωση των 500 ppm διφθοροβενζουρόνης ήταν 83.333 κύτταρα/ml ενώ στους μάρτυρες ήταν 22.083 κύτταρα/ml. Αντίστοιχα, στις 96 h στην συγκέντρωση των 500 ppm διφθοροβενζουρόνης, ο αριθμός των κυττάρων ήταν 12.083 κύτταρα/ml ενώ στους μάρτυρες ήταν 33.750 κύτταρα/ml. Για το *Isocrysis galbana* στις 24 h, ο αριθμός των κυττάρων στην συγκέντρωση των 500 ppm διφθοροβενζουρόνης ήταν 46.250 κύτταρα/ml, ενώ ο αριθμός κυττάρων στα control ήταν 11.430 κύτταρα/ml. Μεγαλύτερη διαφορά του αριθμού των κυττάρων ανάμεσα στην συγκέντρωση των 500 ppm διφθοροβενζουρόνης και στα control φαίνεται στις 48 h, όπου ο αριθμός κυττάρων στη συγκέντρωση των 500 ppm διφθοροβενζουρόνης ήταν 90.275 κύτταρα/ml, ενώ για τους μάρτυρες ήταν 18.583 κύτταρα/ml. Στη συγκέντρωση των 500 ppm και στα δύο μικροφύκη, παρατηρήθηκαν παραμορφωμένα κύτταρα, καθώς και πολυάριθμα κυτταρικά ράκη, τα οποία είναι τμήματα των κατεστραμμένων κυττάρων. Παράλληλα, αρκετά κύτταρα του *Haematococcus pluvialis* χρωματίστηκαν κόκκινα από την συγκέντρωση ασταξανθίνης, η οποία παράγεται όταν υπάρχουν συνθήκες δυσμενείς για την ανάπτυξη του αιματόκοκκου και προσδίδει το κόκκινο χρώμα στα κύτταρά του (Suseela, 2005). Το τελευταίο γεγονός αποδεικνύει την δυσμενή επίδραση της διφθοροβενζουρόνης στο συγκεκριμένο μικροφύκος στις πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (500 ppm). Στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (25 ppm έως 100 ppm) δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στην αύξηση των κυττάρων των δύο μικροφυκών. Οι Rouabhi *et al.*, (2007) ισχυρίζονται ότι η διφθοροβενζουρόνη ελαττώνει την αύξηση του μικροφύκου *Tetraselmis suecica* και αυτό οφείλεται στην ενσωμάτωση της ουσίας στο RNA του κυττάρου του μικροφύκου. Επίσης, οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι σε μεγάλες συγκεντρώσεις διφθοροβενζουρόνης μειωνόταν η κατανάλωση οξυγόνου από τα μικροφύκη, γεγονός που ενισχύει την άποψή τους για ελάττωση της αύξησης του μικροφύκου *Tetraselmis suecica*. Οι Soltani *et al.*, (1996) βρήκαν ότι στο *Tenebrio molitor* η διφθοροβενζουρόνη δρα

μειώνοντας την αύξηση και την αναπαραγωγή του. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η επίδραση της διφθοροβενζουρόνης στα εξεταζόμενα μικροφύκη της παρούσας εργασίας φαίνεται να είναι όμοια με εκείνη του *Tetraselmis suecica*.

Το λαβράκι μαζί με την τσιπούρα αποτελούν τα δύο πιο σημαντικά εκτρεφόμενα είδη της θαλάσσιας υδατοκαλλιέργειας και η Ελλάδα μία από τις σημαντικότερες παραγωγούς χώρες. Η εξέταση της επίδρασης της διφθοροβενζουρόνης σε γόνο λαβρακίου, κατέδειξε αρνητικές επιπτώσεις στις πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις της ουσίας (1.500 ppm και 1.000 ppm), αφού επήλθε θάνατος όλων των ατόμων του πληθυσμού κατά τη διάρκεια του πρώτου εικοσιτετραώρου. Αρνητικές επιπτώσεις παρατηρήθηκαν και στη μικρότερη συγκέντρωση (500 ppm), κυρίως στο πρώτο εικοσιτετράωρο, ενώ τις επόμενες ημέρες δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές. Από ανάλογες έρευνες, που μελέτησαν την επίδραση της διφθοροβενζουρόνης σε νύμφες ιριδιζουσας πέστροφας και σολομού, προέκυψε ότι σε συγκέντρωση 150.000 ppb και σε θερμοκρασία νερού 11 ± 1 °C, δεν παρατηρήθηκαν θάνατοι μετά από 96 ώρες έκθεσης στη διφθοροβενζουρόνη (McKague and Pridmore, 1978). Επίσης, οι ίδιοι ερευνητές δεν διαπίστωσαν θανάτους των ίδιων ψαριών ακόμα και σε συγκέντρωση 1 g/l διφθοροβενζουρόνης επί 15 λεπτά. Οι Julin and Sanders (1978) μελέτησαν την επίδραση της διφθοροβενζουρόνης σε νύμφες πέστροφας βάρους 1,2 g, όταν αυτές εκτέθηκαν σε διφθοροβενζουρόνη με συγκέντρωσης 240.000 ppb στο νερό θερμοκρασίας 12 °C. Οι ίδιοι ερευνητές στην ίδια εργασία αναφέρουν ότι ο μισός πληθυσμός πέθανε στις 96 ώρες (96 h-LC₅₀) με δόση διφθοροβενζουρόνης ίση με 240.000 ppb. Επίσης, είναι γνωστό ότι τα ψάρια μπορούν να συγκεντρώνουν στο σώμα τους τη διφθοροβενζουρόνη έως και 160 φορές περισσότερο από την συγκέντρωσή της στο περιβάλλον νερό, αλλά την αποβάλλουν πολύ γρήγορα (Schaefer et al, 1980). Η ιστολογική εικόνα των βραγχίων των ψαριών, της παρούσας μελέτης, που εκτέθηκαν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις διφθοροβενζουρόνης, δείχνει ότι η ουσία προκαλεί αλλοιώσεις στα βράγχια των ψαριών και πιθανότατα σε αυτές να οφείλεται και ο θάνατος των ψαριών που εκτέθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου. Θα πρέπει να σημειωθεί, όμως, ότι μιας και χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Dimilin, το οποίο περιέχει και έκδοχα, η δράση κάποιων από αυτά στα βράγχια των ψαριών δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία αναδεικνύει αρνητική επίδραση της διφθοροβενζουρόνης στην ανάπτυξη του πληθυσμού των μικροφυκών που μελετήθηκαν (*Haematococcus pluvialis* και *Isochrysis galbana*) και στην

επιβιωσιμότητα των νυμφών του λαβρακίου, στις υψηλές συγκεντρώσεις διφθοροβενζουρόνης. 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 και 1500 – 1000 ppm για τα ψάρια). Επίσης, παρόλο που η συγκέντρωση ήταν πολύ υψηλή, δεν διακόπηκε εντελώς ο πολλαπλασιασμός των φυκιών. Γενικά, τόσο υψηλές συγκεντρώσεις θεωρείται αδύνατον να βρεθούν στη φύση σε εκτεταμένη έκταση κάποιας φυσικής υδατοσυλλογής. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις αυτές για να διερευνηθούν τα όρια αντοχής των οργανισμών που μελετήθηκαν. Παρατηρείται, λοιπόν, και βάσει της σχετικής βιβλιογραφίας, ότι, αν και η διφθοροβενζουρόνη 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.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αθανασοπούλου, Φ. (2006) Σημειώσεις β' εξαμήνου, ΠΜΣ Ιχθυοπαθολογίας, Κτηνιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Κλαδάς, Ι. (2006), *Παραγωγή Ιχθυδίων Θαλασσιών Ειδών: Καλλιέργειες Μικροφυκών*, Τμήμα Ιχθυοκομίας-αλιείας, Ηγουμενίτσα.

Κλαδάς, Ι., Ρογδάκης, Γ., Μπαλάς, Θ. (1989), *Η αλιεία άγριου γόνου*, Αλιευτικά νέα 61-68 σελ

Παπαγιαννάκος, Ν. (2009), *Παραγωγή καυσίμου ντίζελ από ανανεώσιμες πρώτες ύλες*

Aspelin, A.L., and Grube, A.H. (1999) Pesticides industry sales and usage—1996 and 1997 market estimates: U.S. Environmental Protection Agency, *Pesticide Industry Sales and Usage Report 733-R-99-001*, 39 p.

Battaglin, W and Fairchild, J. (2002) Potential toxicity of pesticides measured in Midwestern streams to aquatic organisms, *Water Science and Technology*, Vol. 45, No. 9, pp. 95-103, US Government

Brown, M. R., Miller, K. A. (1992) The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture, *Journal of Applied Phycology*, 4: 205-215

Brown, M. R., Garland, C. D., Jeffrey, S. W., Jameson, I. D., Leroi, J. M. (1993) The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*, *Journal of Applied Phycology*, Vol. 5, pp. 285-296.

Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., Dunstan, G. A., (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture, *Aquaculture*, Vol. 151: 315-331.

Brown, M. R. (2002) Nutritional Value and Use of Microalgae in Aquaculture In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002*, Cancún, Quintana Roo, México.

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.

Clark, G.M., Goolsby, D.A. and Battaglin, W.A. (1999). Seasonal and annual load of herbicides from the Mississippi River basin to the Gulf of Mexico. *Environ. Sci. Technol.*, **33**(7), 981–986.

Deul, DH, Dejong, BJ., Kortenbach JAM (1978) Inhibition of chitin synthesis by two 1- (2, 6-disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Vol. 8, pp. 98-105

Edwards, C.A. (1970). *Persistent Pesticides in the Environment*. CRC Press, Cleveland, OH, p. 78

Eisler, R. (2000) *Handbook of chemical risk assessment: health hazards to humans, plants, and animals*, Lewis Publishers, USA

Eisler, R. (1992) *Diflubenzuron Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review*, Biological Report 4, Contaminant Hazard Reviews, Report no 25.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), (2002), *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides*, Rome: FAO Council.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), (1996) *Manual on the production and use of live food for aquaculture*, ed. by Lavens, P. and Sorgeloos, P. In FAO Fisheries Technical Paper (FAO), no. 361

Fisher, S. A., Hall, L. W. (1992) Environmental Concentrations and Aquatic Toxicity Data on Diflubenzuron (Dimilin), *Critical Reviews on Toxicology*, Vol. 22, Is. 1, pp. 45-79.

Foreman, W.T., Majewski, M.S., Goolsby, D.A., Wiebe, F.W. and Coupe, R.H. (2000). Pesticides in the atmosphere of the Mississippi River Valley, Part II – air. *Science of the Total Environment*, Vol. 248, 213–216.

Giannessi, L.P. (1992). *U.S. Pesticide Use Trends: 1966–1989*: Washington, D.C. *Resources for the Future*, Inc., 22p.

Gilliom, R.J. (1985). Pesticides in Rivers of the United States. In: *National Water Summary 1984 – Hydrologic Events Selected Water-Quality Trends and Ground-Water Resources*. U.S. Geological Survey, Water-Supply Paper 2275, p. 85–92.

Haffray, P., Tsigenopoulos, C. S., Bonhomme, F., Chatain, B., Magoulas, A., Rye, M., Triantafyllidis, A. and Triantaphyllidis, C. (2006) European sea bass - *Dicentrarchus labrax*. In: Genetic effects of domestication, culture and breeding of fish and shellfish, and their impacts on wild populations. In Svaasand, T., Crosetti, D., Garcia-Vazquez, E., Verspoor, E. (eds). Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations. A European network. GENIMPACT Final Report.

Hansen, S. R., Garton, R. R. (1982a) The Effects of Diflubenzuron on a Complex Laboratory Stream Community, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 11, pp. 1-10.

Hansen, S. R., and Garton, R. R., (1982b) Ability of standard toxicity tests to predict the effects of the insecticide diflubenzuron on laboratory stream communities, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39:1273-1288.

Hashimoto, Y. (1982) Effects of Pesticides on Aquatic Organisms and their Environment, *Journal of Pesticide Science*, Vol. 7, pp. 281-287.

Helfrich, L. A., Weigmann, D. L., Hipkins, P. and Stinson, E. R. (1996) *Pesticides and aquatic animals: A guide to reducing impacts on aquatic systems*, Virginia State University, Publication number 420-013.

Ivie, G. W., D. L. Bull, and J. A. Veech (1980) Fate of diflubenzuron in water, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 28, 330.

Johnson, W. W., and Finley, M. T., (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 Sanders, H. O. (1978) Toxicity of the IGR, diflubenzuron, to freshwater invertebrates and fishes, *Mosquito News* 38:256-259.

Kolpin, D.W., Thurman, E.M. and Linhart, S.M. (2000). Finding minimal herbicide concentrations in ground water? Try looking for their degradates, *Science of the Total Environment*, Vol. 248, 115-122.

Mabilia, R.G., Souza, S.M.G., (2006) Effect of the treatment with diflubenzuron in the hematology of jundiás *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) infected by *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) in 24-hour immersion baths, *Acta Science*, Vol. 28, pp.159–163.

Maduenho, L. P.,Martinez, C. B. R. (2008) Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 148, 265–272.

Mannion, A.M. (1995). *Agriculture and Environmental Change: Temporal and Spatial Dimensions*, John Wiley and Sons, Chichester, UK.

Marx, J. L. (1977) Chitin synthesis inhibitors: new class of insecticides, *Science*, 197:1170-1172.

McKague, A. B., and Pridmore, R. B. (1978) Toxicity of altosid and dimilin to juvenile rainbow trout and coho salmon, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 20:167-169.

Meola, S. M., and R. T. Mayer (1980) Inhibition of cellular proliferation of imaginal epidermal cells by diflmbenzuron in pupae of the stable fly, *Science*, Vol. 207, 985.

Metcalf, R. L., Lu, P. Y. and Bowlus, S. (1975) Degradation and environmental fate of 1-(2,6-difluorobenzoyl)-3-(4-chlorophenyl) urea, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23:359-364.

Muller-Feuga, A. (2000) The role of microalgae in aquaculture: situation and trends, *Journal of Applied Phycology*, Vol. 12 (3-5), pp. 527-534.

Pickett, G. D., Pawson, M. G. (1994) *Sea Bass-Biology, Exploitation, and Conservation*, Chapman & Hall, London.

Rao, J.V. (2006) Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on biochemical parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, C 143, 492–498.

Renaud, S. M., Thinh, L.V., Parry, D. L., (1999) The gross composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, 170: 147-159.

Rouabhi R, Djebbar-Berrebah H. ,Djebbar M.R. (2007) The impact of two pesticides diflubenzuron and flucyclixuron, on a microalgae *Tetraselmis suecica*, *Malaysian Applied Biology*, 36 (1), pp. 7-13.

Sargent, J. R., McEvoy, L. A., Bell., J. G. (1997) Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds, *Aquaculture*, 155: 117-127.

Schalch, S.H.C., Belo, M.A.A., Soares, V.E., Moraes, J.R.E., Moraes, F.R. (2005) Diflubenzuron effectiveness in *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) control in juveniles pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturally infected, *Acta Science*, Vol. 27, pp. 297–302.

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.

Schooley, D. A., and G. B. Quistad. (1979) Metabolism of insect growth regulators in aquatic organisms. Pages 161-176 in M.A.Q. Khan, J. J. Lech, and J. J. Menn, editors. Pesticide and xenobiotic metabolism in aquatic organisms. American Chemical Society, Symposium Series 99, Washington, D.C.

Soltani, N., Chebira, S., Pitoizet, N., Delbecq, J.P., Delachambre, J. (1995). Effect of Flucycloxiuron, a novel benzoylphenylurea derivate, on the *in vivo* and *in vitro*, production of ecdysteroids in *Tenebrio molitor*. *Medical Faculty Landbouww. University of Gent*, 607(3b): 1017.

Soltani, N., Soltani-Mazouni, N., Quenedey, B., Delachambre, J. (1996). Protein synthesis in developing ovaries of mealworm under *in vivo* and *in vitro* conditions: effects of Diflubezuron. *Journal of Stored Products Research*, 32(3): 205.

Sundaram, K. M. A, Holmes, S. B., Kreutzweiser, D. P., Sundaram, A. and Kingsbury, P. D. (1991) Environmental Persistence and Impact of Diflubenzuron in a

Forest Aquatic Environment Following Aerial Application, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 20, pp. 313-324.

Suseela, M. R. (2005) *Haematococcus pluvialis* – A green alga, richest natural source of astaxanthin, *Current Science*, Vol. 90, No. 12, pp. 1602-1603.

Thompson, P. A., Guo, M.-X., Harrison, P. J. (1993) The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional value for larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), *Marine Biology*, 117: 259-268.

Yu-yun, T., Thumm, W., Jobelius-Korte, M., Attar, A., Freitag, D. and Kettrup, A. (1993) Fate of two phenylbenzoylurea insecticides in an algae culture system (*Scenedesmus subspicatus*), *Chemosphere*, vol. 26, 5, pp. 955-962.

Wheeler, Al. (1975) *Fishes of the World*, Macmillan Publishing Co., Inc., New York.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ:

Ευρωπαϊκή Επιτροπή, Αλιεία (2009), Το λαβράκι,

link: http://ec.europa.eu/fisheries/cfp/aquaculture_processing/aquaculture/seabass_el.htm

Encyclopedia of Life, *Dicentrarchus labrax*,

link: <http://www.eol.org/pages/224729>

EPA (Environmental Protection Agency) (2006) *Diflubenzuron, Pesticide tolerances. Rules and Regulation.* Federal Register, 71 (229)

Link: <http://www.epa.gov/EPA-PEST/2006/November/Day-29/p20147.pdf> N.

IGFA, (2001) Database of IGFA angling records until 2001, IGFA, Fort Lauderdale, USA, link:

<http://www.fishbase.org/references/FBRefSummary.php?id=40637&speccode=943>

ETN (Extension Toxicology Network), (1996) *Pesticide Information Profiles:*
Diflubenzuron, Link: <http://extoxnet.orst.edu/>