

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Εκτίμηση της συνδυασμένης επίδρασης Cu και συνθετικών
οργανικών ενώσεων σε φυτοπλαγκτόν**

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΗΣ Δ. ΛΕΚΚΑΣ

ΑΘΑΝΑΣΑΚΗ ΚΑΛΟΜΟΙΡΑ
ΚΟΚΚΩΝΗΣ ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΣ
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2005

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά όλους όσους μας βοήθησαν και μας συμπαραστάθηκαν κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Αρχικά θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον κύριο Θεμιστοκλή Δ. Λέκκα, Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μηχανικής του Πανεπιστημίου Αιγαίου, ο οποίος μας ανέθεσε τη συγκεκριμένη εργασία.

Θα θέλαμε επίσης να ευχαριστήσουμε τον κύριο Νίκο Θωμαΐδη, Λέκτορα Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών για τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης αυτής της εργασίας.

Ακόμη θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τους κυρίους Στασινάκη Αθανάσιο και Τσιρτσή Γεώργιο για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή. Ευχαριστούμε τον κύριο Τσιρτσή και για την παροχή του προγράμματος υπολογισμού των συγκεντρώσεων της χλωροφύλλης, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κυρία Γεωργία Γατίδου για την πολύτιμη βοήθειά της χωρίς την οποία δεν θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθούν τα πειράματα.

Επίσης ευχαριστούμε τους κυρίους Ατσικμπάση Σπύρο και Καραντανέλλη Γιώργο για την παροχή αναλώσιμων απαραίτητων για τη διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και τον κύριο Καρύδη για την προσφορά των μικροοργανισμών και του επωαστικού θαλάμου.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κύριο Κουλουσαρή Μιχάλη για την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1 ΥΦΑΛΟΧΡΩΜΑΤΑ	8
1.1 Εισαγωγή.....	8
1.2 Ιστορία των υφαλοχρωμάτων.....	9
1.3 Κατηγορίες των υφαλοχρωμάτων.....	11
1.3.1 Συμβατικά υφαλοχρώματα.....	11
1.3.2 Υφαλοχρώματα μακράς διάρκειας.....	11
1.3.3 Συμπολυμερή αυτολειαινόμενα υφαλοχρώματα.....	12
1.4 Συστατικά υφαλοχρωμάτων.....	13
1.4.1 Οργανοκασσιτερικές ενώσεις.....	13
1.4.2 Χαλκός.....	15
1.4.3 Οργανικές ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες.....	16
1.4.4 Φυσικές βιοκτόνες ουσίες.....	19
1.4.5 Ολισθηρά επιχρίσματα (σιλικονούχα υφαλοχρώματα).....	19
1.5 Προστασία επιφανειών με ηλεκτρικό ρεύμα.....	20
2 ΕΝΙΣΧΥΤΙΚΕΣ ΒΙΟΚΤΟΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΤΩΝ ΥΦΑΛΟΧΡΩΜΑΤΩΝ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ.ΤΥΧΗ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	22
2.1 Τύχη των ενισχυτικών βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων νέας γενιάς στο περιβάλλον.....	22
2.1.1 Διάχυση από την επιφάνεια των υφαλοχρωμάτων.....	22
2.1.2 Αποδόμηση.....	23
2.1.2. 1 Αβιοτική αποδόμηση.....	25
2.1.2. 2 Βιοτική αποδόμηση.....	26
2.1.3 Πτητικότητα.....	26
2.1.4 Βιοσυσσωρευση.....	27
2.1.5 Μεταφορά.....	27
2.1.6 Κατανομή στο ίζημα και στο νερό.....	28
2.1.7 Φυσικοχημικές ιδιότητες εξεταζόμενων ουσιών.....	29
2.1.7. 1 Φυσικοχημικές ιδιότητες diuron-DCPMU.....	29
2.1.7. 2 Φυσικοχημικές ιδιότητες Cu.....	31
2.2 Παρουσία των εξεταζόμενων ουσιών στο περιβάλλον.....	32
2.2.1 Diuron και DCPMU.....	32
2.2.2 Cu.....	34
3 ΑΡΧΕΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ	35
3.1 Εισαγωγή.....	35
3.2 Κριτήριο επιλογής οργανισμού.....	35
3.3 Δοκιμές τοξικότητας.....	36
3.4 Δοκιμές Βιοσυγκέντρωσης.....	37
3.5 Δοκιμές τοξικότητας ιζήματος.....	37
3.6 Δείκτες τοξικότητας.....	37
3.7 Συστήματα έκθεσης.....	38
3.8 Αλληλεπίδραση χημικών ουσιών.....	39

3.9	Τοξικότητα μιγμάτων χημικών ουσιών.....	39
3.9.1	Εκτίμηση της τοξικότητας μιγμάτων.....	40
3.9.2	Επιπτώσεις τοξικότητας σε μικροοργανισμούς.....	41
3.9.3	Βιοδοκιμές σε άλγη.....	41
3.10	Παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα.....	42
3.10.1	Φυσικοχημικές ιδιότητες της ουσίας που επηρεάζουν την τοξικότητα.....	42
3.10.2	Φυσικοχημικές ιδιότητες του οικοσυστήματος που επηρεάζουν την τοξικότητα.....	42
3.10.2.1	Θερμοκρασία.....	43
3.10.2.2	Διαλυμένο οξυγόνο.....	43
3.10.2.3	pH.....	43
3.10.2.4	Αλατότητα.....	43
3.10.3	Παράγοντες που σχετίζονται με τον εκτιθέμενο οργανισμό και που επηρεάζουν την τοξικότητα.....	43
3.10.4	Παραγοντες που σχετίζονται με το χρόνο έκθεσης που επηρεάζουν την τοξικότητα.....	44
3.11	Μέθοδοι εκτίμησης τοξικότητας.....	44
3.11.1	Μέθοδος εκτίμησης τοξικότητας σύμφωνα με το πρωτόκολλο ASTM (1993).....	45
3.11.2	Μέθοδος εκτίμησης τοξικότητας σύμφωνα με το πρωτόκολλο OECD (1981).....	45
3.12	Τοξικότητα των εξεταζόμενων ουσιών.....	45
4	ΦΥΤΟΠΛΑΓΚΤΟΝ	47
4.1	Εισαγωγή.....	47
4.2	Φυτοπλαγκτόν.....	47
4.2.1	Μικροφύκη.....	48
4.2.2	Κυανοβακτήρια.....	49
4.2.3	Χλωροφύκη.....	50
4.3	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	50
5	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	52
5.1	Εισαγωγή.....	52
5.2	Υλικά.....	52
5.3	Μέθοδοι καλλιέργειας.....	52
5.3.1	Παρασκευή θρεπτικού μέσου ανάπτυξης μικροοργανισμών.....	53
5.3.2	Σύσταση βιταμινών για την ανάπτυξη του φυτοπλαγκτονικού οργανισμού.....	53
5.4	Προετοιμασία καλλιεργειών.....	54
5.5	Προετοιμασία συγκεντρώσεων τοξικών ουσιών.....	54
5.6	Πειραματικά στάδια.....	54
5.7	Μέτρηση κυτταρικού αριθμού.....	55
5.8	Υπολογισμός ποσότητας χλωροφύλλης.....	57
5.9	Προσδιορισμός συγκέντρωσης χλωροφύλλης.....	58
5.10	Τοξικότητα της ακετόνης.....	59
5.11	Προσδιορισμός του εύρους των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων.....	59
6	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	63
6.11	Επίδραση της Ακετόνης στην ανάπτυξη της <i>Dunaliella tertiolecta</i>	63

6.2	Εκτίμηση της τοξικότητας της DCPMU και του Cu στη <i>Dunaliella tertiolecta</i>	64
6.2.1	Προσδιορισμός του εύρους των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων επίδρασης της DCPMU και του Cu στη <i>Dunaliella tertiolecta</i>	64
6.2.2	Πειράματα εκτίμησης της οξείας τοξικότητας της DCPMU και του Cu στη <i>Dunaliella tertiolecta</i>	65
6.3	Εξέταση της τοξικότητας των συνδυασμών DCPMU-diuron, Cu-diuron και DCPMU-Cu.....	66
6.3.1	Συνδυασμός DCPMU-diuron.....	66
6.3.2	Συνδυασμός diuron-Cu.....	68
6.3.3	Συνδυασμός DCPMU-Cu.....	70
6.3.4	Εύροι τιμών Αποτελεσμάτων.....	71
6.4	Συμπεράσματα.....	75
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	76

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή έγινε αρχικά εκτίμησης της τοξικότητας του μεταβολίτη του diuron DCPMU και του Cu , στο χλωροφύκος *Dunaliella tertiolecta*. Στη συνέχεια εκτιμήθηκε η τοξικότητα των συνδυασμών της DCPMU με το diuron, του Cu με το diuron και του Cu με τη DCPMU στον ίδιο μικροοργανισμό.

Το diuron είναι ένα φαινύλιο ζιζανιοκτόνο, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των υποκατεστημένων ουριών. Εκτός από επιλεκτικό ζιζανιοκτόνο χρησιμοποιείται και ως ενισχυτική βιοκτόνος ουσία στα υφαλοχρώματα που έχουν ως βάση το χαλκό. Η DCPMU είναι ένας από τους κύριους μεταβολίτες του diuron. Ο Cu είναι ένας από τους σημαντικότερους βιοκτόνους παράγοντες και αποτελεί το κύριο συστατικό των υφαλοχρωμάτων που δεν περιέχουν κασσίτερο.

Κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας αρχικά εκτιμήθηκε η EC_{50} της DCPMU και του Cu για τη *Dunaliella tertiolecta*. Βρέθηκε ότι η DCPMU έχει πολύ μεγαλύτερη τοξική επίδραση στο χλωροφύκος από τον Cu. Συγκεκριμένα η EC_{50} της DCPMU είναι 370 $\mu\text{g/l}$ ενώ η EC_{50} του Cu είναι 9400 $\mu\text{g/l}$.

Τέλος έγιναν πειράματα εκτίμησης της συνδυασμένης τοξικής επίδρασης της DCPMU με το diuron, του Cu με το diuron και της DCPMU με το Cu. Τα μίγματα διάφορων συγκεντρώσεων των ουσιών αυτών ήταν στις περισσότερες περιπτώσεις πιο τοξικά από ότι οι αντίστοιχες ουσίες μεμονωμένες. Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για το αν η δράση τους είναι προσθετική η συνεργιστική.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στα ύφαλα των πλοίων αναπτύσσονται θαλάσσιοι μικροοργανισμοί με αρνητικότερες συνέπειες, τόσο όσον αφορά τη διάβρωση της επιφάνειας των πλοίων όσο και την υδροδυναμική συμπεριφορά τους. Ο αποικισμός από μικροοργανισμούς είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει σε κάθε επιφάνεια στη θάλασσα, κινούμενη ή στατική, οποιουδήποτε υλικού. Για την αντιμετώπιση της επικάλυψης των υφάλων των πλοίων χρησιμοποιούνται τα υφαλοχρώματα.

Αρχικά οι κυριότερες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ως δραστικά στοιχεία των υφαλοχρωμάτων ήταν οι οργανομεταλλικές ενώσεις του κασσιτέρου, με κυριότερη τον τριβούτυλο κασσίτερο (TriButylTin - TBT). Οι ενώσεις αυτές όμως και ειδικά το TBT είναι πολύ τοξικές, τόσο στον άνθρωπο όσο και στους θαλάσσιους οργανισμούς.

Οι αρνητικές επιπτώσεις που επέφεραν αυτές οι τοξικές ενώσεις στην ανθρώπινη υγεία, στους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς και έμμεσα στην οικονομία, δημιούργησαν την ανάγκη αντικατάστασής από άλλες ουσίες, λιγότερο επιβλαβής στο περιβάλλον. Έτσι στα υφαλοχρώματα νέας γενιάς χρησιμοποιούνται κυρίως ενώσεις του χαλκού, συχνά σε συνδυασμό με ουσίες οι οποίες έχουν φυκοκτόνο δράση.

1. ΥΦΑΛΟΧΡΩΜΑΤΑ

1.1 Εισαγωγή

Η επικόλληση βακτηρίων, μικροφυκκών και άλλων θαλάσσιων οργανισμών στα ύφαλα των πλοίων, καθώς και σε οποιοδήποτε αντικείμενα υπάρχουν κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας, δημιουργεί πολλά προβλήματα. Το μεγαλύτερο πρόβλημα από αυτά, είναι η αύξηση της τριβής μεταξύ των υφάλων των πλοίων και του νερού η οποία δυσκολεύει την πλεύση τους. Έτσι λόγω της αύξησης της «τραχύτητας» και της αύξησης του βάρους στη περιοχή των πλοίων που βρίσκονται μέσα στο νερό από τις προσκολλήσεις των θαλάσσιων οργανισμών, μειώνονται οι ικανότητες τους όσον αφορά την ανάπτυξη της ταχύτητας και την πραγματοποίηση ελιγμών. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται της κατανάλωσης καυσίμων, η οποία όμως εκτός από τις οικονομικές συνέπειες που συνεπάγονται για τις πλοιοκτήτριες εταιρίες, προκαλεί και αύξηση των εκπομπών επιβλαβών ενώσεων από τις καύσεις μεγαλύτερων ποσοτήτων καυσίμων. Παράλληλα υπάρχει μια αύξηση της συχνότητας κατά την οποία τα πλοία οδηγούνται στην στεριά για συντήρηση και επισκευές των υφάλων τους. Ο χρόνος που χάνεται από την ακινησία τους και την μη λειτουργικότητα τους για όσο καιρό αυτά παραμένουν ακινητοποιημένα έχει ως αποτέλεσμα οικονομική ζημία ενώ οι πόροι οι οποίοι δαπανώνται όταν εφαρμόζονται τα επανορθωτικά μέτρα είναι πολύ μεγάλοι. Κατά την διάρκεια των επισκευών, χρησιμοποιείται ένα μεγάλο ποσό τοξικών ουσιών, που έχει ως αποτέλεσμα την επιδείνωση της κατάστασης του επιστρώματος, ώστε η διάβρωση, ο αποχρωματισμός, και η αλλαγή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του υλικού να ευνοούνται (Yebrá, 2004).

Άλλα προβλήματα που δημιουργούνται από τις προσκολλήσεις οργανισμών, είναι το φράξιμο των υποθαλάσσιων αγωγών, η μείωση της ροής του νερού διαμέσου των κλωβών στις υδατοκαλλιέργειες (μειώνεται η ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου, δημιουργούνται εστίες μόλυνσης), και η διάβρωση των επιφανειών που βρίσκονται μέσα στο νερό εξαιτίας των ουσιών που εκκρίνονται από τους οργανισμούς για να μπορέσουν να προσκολληθούν (Yebrá, 2004).

Υπάρχουν διάφοροι θαλάσσιοι οργανισμοί οι οποίοι δημιουργούν τα παραπάνω προβλήματα, όταν εγκαθίστανται στις βυθισμένες στο νερό επιφάνειες. Έχουν καταγραφεί 1746 διαφορετικά είδη, τα οποία ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες

όπως φαίνεται στον πίνακα 1.1 (Omae, 2003). Οι προσπάθειες των ανθρώπων να αποφύγουν την επικόλληση στα ύφαλα των πλοίων, των παραπάνω οργανισμών, τους οδήγησε στην χρήση τέτοιων ουσιών (τοξικών), οι οποίες αποτρέπουν την ανάπτυξη οργανισμών πάνω στις επιφάνειες. Η χρήση αυτών των ουσιών γίνεται με την εισαγωγή τους σε χρώματα, με τα οποία βάφονται οι επιφάνειες που πρέπει να προστατευτούν. Τα χρώματα αυτά καλούνται υφαλοχρώματα.

Πίνακας 1.1 Θαλάσσιοι οργανισμοί που εγκαθίστανται πάνω σε πλοία και κατασκευές που βρίσκονται μέσα στο θαλασσινό νερό.

ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	ΠΛΗΘΟΣ ΕΙΔΩΝ
ΒΑΚΤΗΡΙΑ	37
ΜΥΚΗΤΕΣ	14
ΔΙΑΤΟΜΑ	111
ΦΥΚΗ	452
ΠΡΩΤΟΖΩΑ	99
ΣΠΟΓΓΟΙ	33
ΚΝΙΔΟΖΩΑ	286
ΔΑΚΤΥΛΙΟΣΚΩΛΗΚΕΣ	108
ΚΤΕΝΟΦΟΡΑ	139
ΑΡΘΡΟΠΟΔΑ	292
ΕΧΙΝΟΔΕΡΜΑ	19
ΑΘΡΟΙΣΜΑ	1746

Πηγή: Omae, 2003

1.2 Ιστορία των υφαλοχρωμάτων

Από τις πρώτες ουσίες που χρησιμοποίησε ο άνθρωπος κατά των επικολήσεων πάνω στις βυθισμένες επιφάνειες, ήταν ο χαλκός (Cu) ο οποίος αλειφόταν με κερί, με πίσσα ή με κατράμι.

Πρώτοι οι Φοίνικες χρησιμοποίησαν την πίσσα και ενδεχομένως τον χαλκό διαλυμένο μέσα σε αυτή, στα κατώτατα σημεία του σκάφους ενώ το κερί, η πίσσα και η ασφαλτος χρησιμοποιήθηκε από άλλους αρχαίους πολιτισμούς. Κατά τον πέμπτο αιώνα π.Χ., οι ιστορικοί αναφέρουν ότι μίγμα πετρελαίου με αρσενικό και θείο χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα για τη καταπολέμηση οργανισμών που διέβρωναν

εξαιτίας της προσκόλλησης τους τα ύφαλα των πλοίων. Τον τρίτο αιώνα π.Χ., οι Έλληνες χρησιμοποίησαν αντίστοιχα, την πίσσα και το κερί με προσθήκες μολύβδου. Και οι Ρωμαίοι όπως και οι Έλληνες χρησιμοποιούσαν επίσης καρφιά χαλκού για να στερεώσουν τις προσθήκες μολύβδου (Yebrá, 2004).

Από τον 13^ο έως τον 15^ο αιώνα, η πίσσα χρησιμοποιήθηκε εκτενώς για να προστατεύσει τα σκάφη και συνδυάζονταν μερικές φορές με πετρέλαιο, ρητίνη και ζωικό λίπος. Για παράδειγμα, τα σκάφη του Κολόμβου είχαν καλυφθεί με ένα μίγμα πίσσας και ζωικού λίπους (Yebrá, 2004).

Το 1625 ο βρετανός William Beale χρησιμοποίησε ένα μίγμα τσιμέντου, κονιοποιημένου σιδήρου και πιθανώς μιας ένωσης χαλκού (σουλφίδιο χαλκού ή μετάλλευμα αρσενικού χαλκού) και ουσιαστικά αυτή η ανακάλυψη αποτέλεσε την πρώτη καταγεγραμμένη αναφορά στη χρήση του χαλκού στα υφαλοχρώματα. Περισσότερο από έναν αιώνα αργότερα, το 1728 χρησιμοποιήθηκε ένα άλλο μίγμα βασισμένο στον χαλκό με ορείχαλκο, κασσίτερο, και σίδηρο για την προστασία των επιφανειών αλλά δεν υπάρχουν αποδείξεις και αναφορές ότι χρησιμοποιήθηκε και στην προστασία των σκαφών. Το 1780, ο χαλκός χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα για την προστασία των σκαφών του βρετανικού ναυτικού λόγω της αποτελεσματικότητας του κατά τη προσθήκη του στα ύφαλα των ξύλινων σκαφών. Λόγω της μεγάλης αποτελεσματικότητας του θεωρήθηκε πολύ σπουδαίο μέταλλο γι' αυτό και η βρετανική κυβέρνηση απαγόρευσε την εξαγωγή του ως χρήσιμο "πολεμικό υλικό" (Yebrá, 2004).

Όταν ξεκίνησε η κατασκευή των πλοίων από σίδηρο στα τέλη του 18^ο αιώνα, η χρήση του χαλκού στα πλοία διακόπηκε εντελώς. Οι λόγοι ήταν ότι η αντιρρυπαντική δράση του χαλκού δεν ήταν πάντα εξασφαλισμένη και επιπλέον διέβρωνε τον σίδηρο. Διάφορες εναλλακτικές λύσεις δοκιμάστηκαν, όπως της χρήσης του ψευδάργυρου, του μολύβδου, του νικελίου, του αρσενικού, του γαλβανισμένου σιδήρου και των κραμάτων του αντιμονίου, του ψευδάργυρου και του κασσίτερου (Yebrá, 2004).

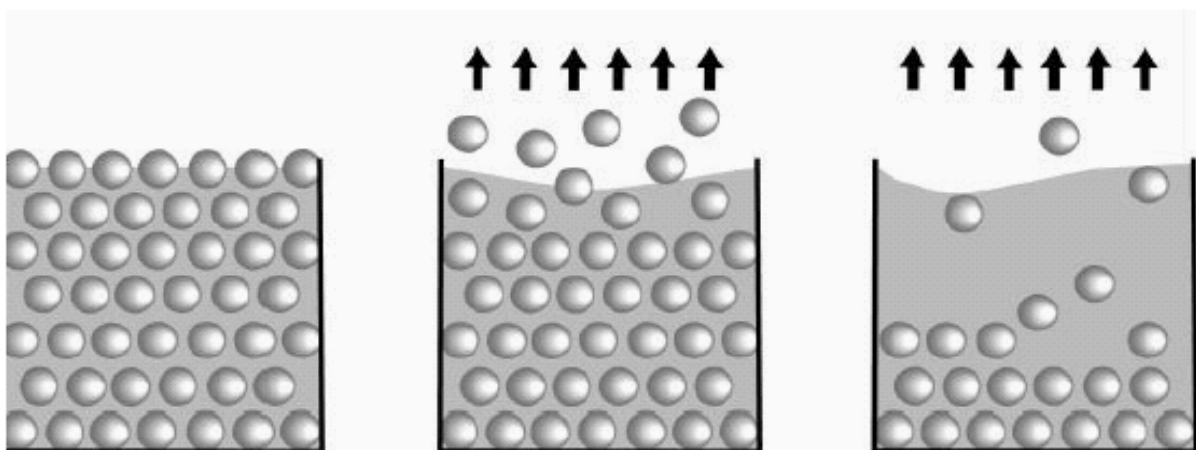
Στα μετέπειτα χρόνια άρχισε η χρήση των υφαλοχρωμάτων τα οποία στην αρχή είχαν ως βάση το οξείδιο του χαλκού (Cu_2O). Μετά τη δεκαετία του 1960 άρχισαν να χρησιμοποιούνται υφαλοχρώματα που περιείχαν οργανοκασσιτερικές ενώσεις. Εξαιτίας όμως της ρύπανσης που δημιουργούν οι ενώσεις αυτές, προτάθηκαν μορφές υφαλοχρωμάτων απαλλαγμένων από TBT.

1.3 Κατηγορίες των υφαλοχρωμάτων

Τα υφαλοχρώματα διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες ανάλογα με τις ιδιότητες που παρουσιάζουν η τοξική ουσία που περιέχουν και η βάση του χρώματος (μήτρα).

1.3.1 Συμβατικά υφαλοχρώματα.

Τα υφαλοχρώματα αυτά αποτελούνται από υδατοδιαλυτές ρητίνες μέσα στις οποίες διασπείρονται οι τοξικές ουσίες (Σχήμα 1.1). Λόγω της μη ύπαρξης χημικών δεσμών οι οποίες θα συγκρατούσαν τις τοξικές ουσίες πάνω στη ρητίνη, αυτές διαφεύγουν ελεύθερα στο περιβάλλον με ανεξέλεγκτο ρυθμό. Αρχικά διαφεύγουν με γρήγορους ρυθμούς (λόγω μεγάλης συγκέντρωσης). Στη συνέχεια καθώς μειώνεται η συγκέντρωση μειώνεται και ο ρυθμός διάχυσης των τοξικών ουσιών στο περιβάλλον, οπότε μειώνεται και η αποτελεσματικότητα του υφαλοχρώματος (Terlizzi, 2001).



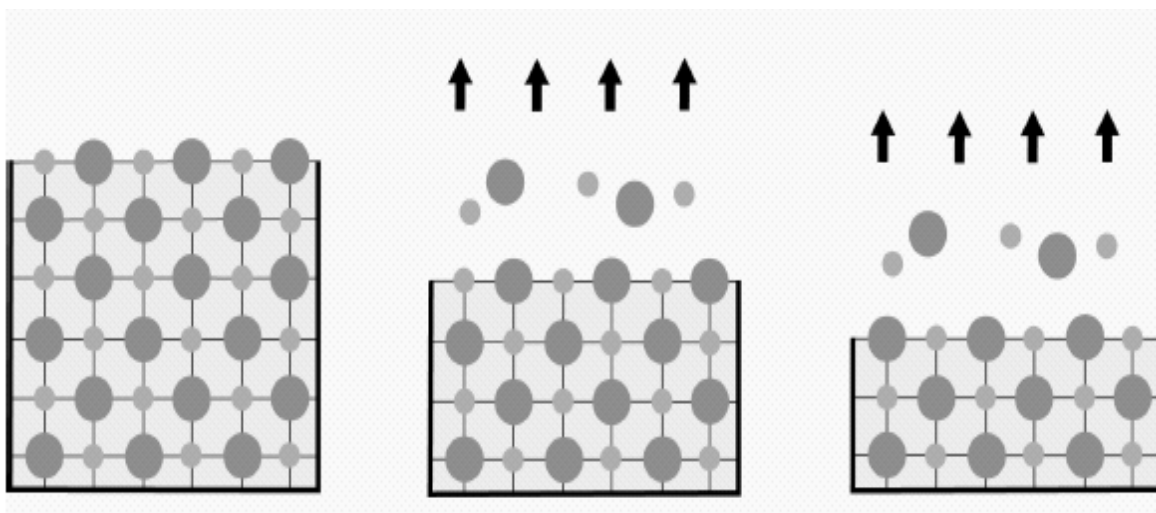
Σχήμα 1.1 Συμβατικό υφαλόχρωμα

1.3.2 Υφαλοχρώματα μακράς διαρκείας.

Σε αυτή τη περίπτωση η ρητίνη που περιέχει τις τοξικές ουσίες είναι αδιάλυτη στο νερό και η τοξικές ουσίες διαχέονται στο νερό μέσω διαύλων που δημιουργούνται στη μήτρα. Οι διάλυτοι δεν είναι σταθεροί αλλά μεταβάλλονται με το πέρασμα του χρόνου μειώνοντας έτσι τον ρυθμό που αποβάλλεται η τοξική ουσία στο περιβάλλον (Terlizzi, 2001).

1.3.3 Συμπολυμερή αυτολειαινόμενα υφαλοχρώματα.

Τα υφαλοχρώματα αυτά αποτελούνται από ένα πολυμερές υλικό που έχει πάνω του την τοξική ουσία (Σχήμα 1.2). Η τοξική ουσία απελευθερώνεται στο περιβάλλον με τον μηχανισμό της υδρόλυσης ο οποίος «λύει» τους χημικούς δεσμούς μεταξύ ουσίας και ρητίνης. Έτσι με την κίνηση του νερού πραγματοποιείται συνέχεια υδρόλυση και απελευθερώνεται συνεχώς η τοξική ουσία στο περιβάλλον με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προσκολληθεί τίποτα στην επιφάνεια. Ο ρυθμός απελευθέρωσης της τοξικής ουσίας σε αυτή την περίπτωση είναι ελεγχόμενος και σταθερός (Σχήμα 1.3). Η διάρκεια ζωής του υφαλοχρώματος αυτού του τύπου εξαρτάται από το πάχος του στρώματος του χρώματος (Terlizzi, 2001).



Σχήμα 1.2 Συμπολυμερές αυτολειαινόμενο υφαλόχρωμα



Σχήμα 1.3 Ρυθμός απελευθέρωσης τοξικής ουσίας σε συμπολυμερές αυτολειαινόμενο υφαλόχρωμα.

1.4 Συστατικά υφαλοχρωμάτων

Τα δραστικά συστατικά των υφαλοχρωμάτων είναι οι ουσίες, στις οποίες οφείλεται η αποτελεσματικότητά τους. Παρακάτω αναφέρονται οι πιο συνηθισμένες.

1.4.1 Οργανοκασσιτερικές ενώσεις

Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις έχουν γενικό τύπο $R_nSnX_{(4-n)}$, όπου R είναι ένα αλκύλιο ή φαινύλιο, συνδεδεμένο με τον κασσίτερο με ισχυρό ομοιοπολικό δεσμό Sn – C, το X είναι ένα ανιόν συνδεδεμένο με τον Sn με ετεροπολικό δεσμό, όπως αλογόνο, –OH, –OR', –SH, –SR', –OOCR', –OSnR₃', –NR₃', κ.ά., και το n κυμαίνεται από 1 μέχρι 4. Οι κυριότερες οργανικές ενώσεις του κασσιτέρου που αποδεδεσμεύονται στο περιβάλλον είναι οι μονο-βούτυλο κασσίτερος, δι-βούτυλο κασσίτερος, τρι-βούτυλο κασσίτερος, τρι-φαινύλιο κασσίτερος, δι-μέθυλο κασσίτερος, τρι-κυκλοξέξυλο κασσίτερος, δι-όκτυλο κασσίτερος.

Το μεγάλο εύρος της τοξικότητάς τους εξαρτάται από τον αριθμό ή και τον χημικό τύπο της ομάδας R που είναι ενωμένη με τον κασσίτερο. Ελάχιστα παραδείγματα στα οποία ο κασσίτερος είναι δισθενής έχουν αναφερθεί, λόγω της πολύ μικρής πρακτικής εφαρμογής του (Φυτιάνος, 1996).

Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις είναι αδιάλυτες στο νερό, λιποδιαλυτές και σταθερές στο περιβάλλον. Ξεκίνησαν να χρησιμοποιούνται στη δεκαετία του 1960 στα υφαλοχρώματα και παρά τους περιορισμούς που επέβαλαν για την χρήση τους διάφορα αναπτυγμένα κράτη και διεθνείς οργανώσεις, χρησιμοποιούνται ακόμα στα μεγάλα πλοία.

Η σημαντικότερη οργανοκασσιτερική ένωση των υφαλοχρωμάτων είναι ο τριβούτυλοκασσίτερος (TBT). Εκτός από χρήση του στα υφαλοχρώματα, έχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών ως εντομοκτόνο, βακτηριοκτόνο, μυκητοκτόνο και ως συντηρητικό ξυλείας..

Στην αρχή χρησιμοποιήθηκε ως ενισχυτική ουσία των υφαλοχρωμάτων, των οποίων ο βασικός βιοκτόνος παράγοντας ήταν ο χαλκός. Μετέπειτα χρησιμοποιήθηκε στα υφαλοχρώματα και μεμονωμένα ως βιοκτόνος παράγοντας. Εξαιτίας της καλύτερης απόδοσης από τον χαλκό, η χρήση του αυξήθηκε σε μεγάλο βαθμό ώστε στην δεκαετία του 1970 να αποτελεί το κύριο συστατικό των υφαλοχρωμάτων. Αυτή όμως ήταν και η εποχή που παρατηρήθηκαν τα πρώτα δραματικά αποτελέσματα της ρύπανσης από την ουσία, καθώς μειώθηκαν οι παραγωγές στις καλλιέργειες σιτηρών σε περιοχές γειτονικές σε κόλπους όπου λιμενίζονταν σκάφη αναψυχής

(κόλπος d' Arcachon Γαλλίας). Μετά το γεγονός αυτό ο τριβούτυλοκασσίτερος (TBT) χαρακτηρίστηκε ως η πιο τοξική ουσία που διοχετεύθηκε εσκεμμένα στο θαλάσσιο περιβάλλον με σημαντικές επιπτώσεις και διαταραχές στην ζωή των θαλάσσιων οργανισμών (Omae, 2003).

Στα μετέπειτα χρόνια διάφορα αναπτυγμένα κράτη (Γαλλία, Μ. Βρετανία, Η.Π.Α, Καναδάς κα) απαγόρεψαν την χρήση του TBT. Η Ευρωπαϊκή Ένωση εξέδωσε την οδηγία 89/677/ΕΟΚ σύμφωνα με την οποία δεν επιτρέπεται η χρήση οργανομεταλλικών ενώσεων ως δραστικές ουσίες και συστατικά παρασκευασμάτων που χρησιμοποιούνται κατά της απόθεσης ακαθαρσιών από μικροοργανισμούς φυτά ή ζώα, α) στα ύφαλα των σκάφων με εξωτερικό ολικό μήκος μικρότερο από 25m, β) στους κλωβούς, τους πλωτήρες, τα δίχτυα καθώς και σε κάθε εγκατάσταση ή εξοπλισμό που χρησιμοποιείται στις υδατοκαλλιέργειες και γ) σε εγκαταστάσεις ή εξοπλισμό που βρίσκεται ολόκληρος ή κάποιο μέρος του, κάτω από το νερό.

Η Ελλάδα εναρμονίστηκε με την παραπάνω οδηγία με την υπ. αριθμ Ν.1100/91 απόφαση του Ανωτάτου Συμβουλίου Χημείας και τον Ν.3010875/478/92 της Ελληνικής Κυβέρνησης.

Ο ΙΜΟ (Διεθνής Ναυτιλιακός Οργανισμός) πρότεινε το 2001 να ενσωματωθεί στη νομοθεσία διεθνώς η απαγόρευση της χρήσης των οργανοκασσιτερικών ενώσεων που δρουν ως βιοκτόνα στα υφαλοχρώματα από 1^η Ιανουαρίου του 2003 ώστε κανένα πλοίο από το 2008 να μη χρησιμοποιεί τέτοιου είδους υφαλοχρώματα.

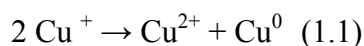
Παρά τις απαγορεύσεις ή τους περιορισμούς της χρήσης του TBT σε κάποιες χώρες, η ρύπανση συνεχίζεται στο υδάτινο περιβάλλον και οι περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις παραμένουν αρκετά υψηλές. Αυτό πιθανόν να οφείλεται, ως ένα βαθμό στο γεγονός ότι σε μερικές χώρες δεν υπάρχουν ακόμη νομικοί περιορισμοί που έχουν σχέση με τα υφαλοχρώματα που περιέχουν TBT, και τα πλοία που ανήκουν σε αυτές, πλέουν κοντά στις θάλασσες που αντιμετωπίζουν τα συγκεκριμένα προβλήματα ρύπανσης.

Ο περιορισμός του TBT στα υφαλοχρώματα και γενικά στα φυτοφάρμακα αποτελεί μια χρήσιμη «υπόθεση εργασίας» στην μετάδοση κινδύνου. Οι αρχικοί περιορισμοί που επέβαλαν την χρήση του βασίστηκε στις ανθρώπινες παρατηρήσεις και στις μελέτες στα ζώα. Ωστόσο, οι απαγορεύσεις που εφαρμόστηκαν βασίστηκαν στους μη ανθρώπινους οργανισμούς, χωρίς καμία ένδειξη ότι οι άνθρωποι διέτρεχαν κάποιον κίνδυνο. Τα είδη που επηρεάστηκαν ήταν ασπόνδυλα και επομένως ούτε παρόμοια με τους ανθρώπους ήταν, ούτε έμοιαζαν αισθητικά. Η δημόσια αποδοχή

της ρυθμιστικής ενέργειας υποδηλώνει ότι οι άνθρωποι καθορίζουν τα ενδιαφέροντα τους ευρέως και είναι πιθανοί να δουν τις συνέπειες για τους ακόμα και πιο απλούς, βιολογικά, οργανισμούς, ιδιαίτερα εάν τα αποτελέσματα είναι εμφανή. Αυτό προτείνει ότι η μετάδοση του κινδύνου για όλες τις χημικές ουσίες πρέπει να παρουσιάζει κινδύνους για την υγεία και την οικολογία ολοκληρωμένα. Εάν οι αξιολογητές κινδύνου δεν εξηγούν τις σχέσεις με ολοκληρωμένο τρόπο, το κοινό είναι πιθανό να εξάγει λανθασμένα συμπεράσματα. Παραδείγματος χάριν, εάν οι επιπτώσεις του TBT στη σεξουαλική ανάπτυξη των μαλακίων δεν υπονοεί τα ανάλογα αποτελέσματα στους ανθρώπους, εκείνες οι διαφορές πρέπει να διευκρινιστούν (Παππάς και Χανδρινού 2003).

1.4.2 Χαλκός

Ο χαλκός είναι ένας από τους σημαντικότερους βιοκτόνους παράγοντες και αποτελεί το κύριο συστατικό των υφαλοχρωμάτων που δεν περιέχουν κασσίτερο. Η δραστηριότητα του χαλκού οφείλεται στην ικανότητα σχηματισμού ιόντων (Cu^+ , Cu^{2+}) με την είσοδο του στο νερό. Ο δισθενής χαλκός (Cu^{2+}) είναι πιο σταθερός από τον μονοσθενή (Cu^+). Ο μονοσθενής μετατρέπεται σε μεταλλικό χαλκό και σε δισθενή ιόν χαλκού, όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση (1.1).



Τα προϊόντα αυτής της αντίδρασης δεν παράγονται στη ίδια αναλογία.

Η χρήση του χαλκού στα υφαλοχρώματα, έχει πολύ καλά αποτελέσματα απέναντι σε θαλάσσιους οργανισμούς όπως είναι τα οστρακοειδή, οι προνύμφες, και μια πληθώρα φυτοπλαγκτονικών οργανισμών που επικολλούνται πάνω στις διάφορες επιφάνειες. Εντούτοις, υπάρχουν διάφορα φυκώδη είδη (π.χ., *Enteromorpha ssp*, *Ectocarpus ssp* και *Achnanthes ssp*) τα οποία παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα στον χαλκό. Για να επιτευχθεί η προστασία που θα έπρεπε να παρέχουν τα υφαλοχρώματα απέναντι σε αυτά τα ανθεκτικά είδη, χρησιμοποιούνται διάφορες οργανικές βιοκτόνες ουσίες από κοινού με το χαλκό, ώστε να ελεγχθεί η ανθεκτικότητα των παραπάνω οργανισμών.

Οι βιοκτόνοι παράγοντες των υφαλοχρωμάτων με βάση τον χαλκό, είναι:

α) ο μεταλλικός χαλκό (Cu),

β) κράματα χαλκού: Cu-Ni, Cu-Ni-M (όπου M= Cr, Fe, Co, Ti, Zr, Nb, Ta, V, P, Ga, In, Ag), Cu-As, Cu-Al, Cu-Zn-Al.

γ) Ανόργανες ενώσεις χαλκού: Cu₂O, CuO, μίγμα Cu₂O και CuS, CuSCN

δ) Οργανικές ενώσεις χαλκού: PhCu, Me(CH₂=CH)CuLi, EtCu(CN)Li, BuCuBF₃

ε) Αρωματικές ενώσεις του χαλκού (copper pyriothine, copper picolinic acid amide, Acetylaceton copper aluminum, ethylenediamine copper aluminum) (Omae 2003).

1.4.3 Οργανικές ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω υπάρχουν αρκετοί θαλάσσιοι οργανισμοί οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στον χαλκό. Για να μπορέσουν τα υφαλοχρώματα με βάση τον χαλκό να αντιμετωπίσουν όλα αυτά τα είδη χρειάζεται να τους γίνει προσθήκη και άλλων βιοκτόνων ουσιών. Αυτά τα βιοκτόνα καλούνται ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες και ανήκουν συνήθως στις εξής ακόλουθες κατηγορίες ενώσεων: ετεροκυκλικές αμίνες, αρωματικά αλογονίδια και καρβαμιδικές ενώσεις. Αυτές οι ενώσεις περιέχουν συνήθως, άζωτο, οξυγόνο, αλογόνα, θείο και βόριο. Χρησιμοποιούνται κυρίως στη γεωργία ως ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα και βακτηριοκτόνα. Έχει παρατηρηθεί ότι οι τοξικές ιδιότητες των οργανικών συμπληρωματικών βιοκτόνων χάνουν τη δραστηριότητά τους ευκολότερα, και γίνονται πιο ακίνδυνοι για τους γύρω ζωντανούς οργανισμούς, σε σχέση με τις οργανοκασσιτερικές βιοκτόνες ουσίες και επομένως είναι καταλληλότερες για την χρήση τους στο περιβάλλον (Omae, 2003).

Παρακάτω στο Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται οι κύριες οργανικές ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες που χρησιμοποιούνται στα υφαλοχρώματα σήμερα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2 Οι κύριες οργανικές ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες που χρησιμοποιούνται στα υφαλοχρώματα

ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΕΝΙΣΧΥΤΙΚΗ ΒΙΟΚΤΟΝΟΣ ΟΥΣΙΑ	ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ
ΕΤΕΡΟΚΥΚΛΙΚΕΣ ΑΜΙΝΕΣ	
Zinc complex of 2-mercaptopyridine- 1-oxide	Zinc pyrithione

Συνέχεια Πίνακα 1.2

2- methylthio-4-butylamino-6-cyclopropylamine-s-triazine	Irgarol 1051
2,3,5,6-tetrachloro-4-(methylsulfonyl)pyridine	TCMSpyridine
(2-thiocyanomethylthio)benzothiazole	TCMTB
(4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothazolin-3-one)	Sea-Nine 211, Kathon 5287
Pyridine triphenylborane complex	KH101
ΑΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΛΟΓΟΝΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	
(2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile)	Chlorothalonil
3-(3,4-dischlorophenyl)1,1-dimethylurea	Diuron
2,4,6- trichlorophenylmaleimide	
ΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	
Zinc bis (dimethyl thiocarbamate)	Ziram
Zinc ethylene bisdithiocarbamate	Zineb
Bis(dimethylthiocarbamoyl)disulfide	Thiram
3-iodo-2-propynylbutylcarbamate	
manganese ethylene bisdithiocabamate	Maneb
ΑΛΛΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	
N,N-dimethyl-N'-phenyl(N'-fluorodichloromethyl-thiosulfamide	Dichlorofluanid
N-(fluorodichloromethylthio)phthalimide	
diiodomethyl-p-tolysulfone	

Πηγή : Omae, 2003

Από τις παραπάνω ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες, το irgarol 1051 και το Diuron δεν επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται στα υφαλοχρώματα, στα ύφαλα των πλοίων με μήκος μικρότερο των 25 μέτρων, σε ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες (Ηνωμένο Βασίλειο, Σουηδία, Δανία). Ιδιαίτερα το Diuron έχει απαγορευτεί σύμφωνα με την οδηγία πλαίσιο για το νερό (Water Framework Directive) 2000/60/EC, από τα υφαλοχρώματα, κατατάσσοντας το στις ουσίες προτεραιότητας.

Εκτός από τις παραπάνω κύριες ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες υπάρχουν και δευτερεύουσες οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.3.

Πίνακας 1.3 Οι δευτερεύουσες οργανικές ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες που χρησιμοποιούνται στα υφαλοχρώματα

ΕΤΕΡΟΚΥΚΛΙΚΕΣ ΑΜΙΝΕΣ
5,6-dihydroxy-3-(2-thienyl)-1,4,2-oxathiazine, 4-oxide
2,5,6-tribromo-1-methylgramine
(3-dimethylaminomethyl-2,5,6-tribromo-1-methylindole)
2,3-dibromo-N-(6-chloro-3-pyridyl)succinimide
Thiazoleureas
3-(3,4-dichlorophenyl)-5,6-dihydroxy-1,4,2-oxathiazine oxide
2-trifluoromethyl-3-bromo-4-cyano-5-parachlorophenyl pyrrole
ΑΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΛΟΓΟΝΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ
2-bromo-4' chloroacetanilide
ΦΑΙΝΟΛΕΣ
2,6-bis(2',4'-dihydroxybenzyl)-4-methylphenyl
2,2-bis(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)propane
acylphloroglucinols: 2,6-diacyl-1,3,5-trihydroxybenzene
ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΦΑΙΝΥΛΟΒΟΡΙΚΩΝ ΑΜΙΝΩΝ
triphenylboron pyridine complex
alkyldiphenylboron isoquinoline complexes
triphenylboron octadecylamine complex
triphenylboron ethylenediamine complex
ΆΛΛΕΣ ΑΜΙΝΕΣ
guanidines: 1,3-dicyclohexyl-2-(3-chlorophenyl)guanidine
alkylamines: auryldimethylamine
ΕΝΩΣΕΙΣ ΦΩΣΦΟΡΟΥ
Dialkylphosphonates: phosphoric acid di(2-ethylhexylester)
ΕΝΩΣΕΙΣ ΘΕΙΟΥ
alkyl haloalkyl disulfides: <i>n</i> -octylchloromethyl disulfide
4,5-dicyano-1,3-dithiole-2-thione
ΆΛΛΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ
enzymes: endopeptidase

Πηγή : Omae, 2003

Στην Ελλάδα, σε έρευνες που έχουν γίνει, βρέθηκαν να χρησιμοποιούνται οι ουσίες Irgarol 1051, Diuron, Diclofluanid, Clorothalonil, Ziram και Folpet καθώς και οξείδια του χαλκού (Albanis et. al., 2002).

1.4.4 Φυσικές βιοκτόνες ουσίες

Οι θαλάσσιοι οργανισμοί όπως τα κοράλλια, τα σφουγγάρια, τα θαλάσσια φυτά, και τα δελφίνια, κ.λπ., αποτρέπουν την επικόλληση πάνω τους ανεπιθύμητων οργανισμών εκκρίνοντας ουσίες που παίζουν προστατευτικό ρόλο και οι οποίες δεν προκαλούν περιβαλλοντικά προβλήματα. Αυτές οι ουσίες έχουν αναισθητική και απωθητική δράση και διατηρούν τις επιφάνειες καθαρές. Τέτοιες ουσίες βρίσκονται και σε οργανισμούς που ζουν στη στεριά, όπως στο πράσινο τσάι και σε δρύινα φύλλα δέντρων. Έχει παρατηρηθεί ότι μερικές από αυτές τις φυσικές βιοκτόνες ουσίες έχουν καλύτερα αποτελέσματα στα υφαλοχρώματα σε σχέση με εκείνες των οργανοκασσιτερικών ενώσεων και των ενώσεων του χαλκού (Omae, 2003).

Γενικά, τα περισσότερα φυσικά προϊόντα δεν είναι εύκολο να συντεθούν. Εντούτοις, μερικές ενώσεις (όπως το nicotineamide και 2,5,6-tribromo-1-methylgramine) συνθέτονται σχετικά εύκολα. Στο μέλλον πρέπει να αναμένεται η παρασκευή υφαλοχρωμάτων από αυτές τις ουσίες οι οποίες θα είναι φιλικές ως προς το περιβάλλον και θα έχουν προσιτό κόστος χρήσης.

1.4.5. Ολισθηρά επιχρίσματα (σιλικονούχα υφαλοχρώματα)

Έκτός από τα υφαλοχρώματα που περιέχουν τοξικές ουσίες, υπάρχουν και τα υφαλοχρώματα τα οποία έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς απομάκρυνσης των προσκολληθέντων οργανισμών πάνω στις επιφάνειες. Σε αυτά ανήκουν και τα χρώματα που περιέχουν οργανοπυριτικές ενώσεις (σιλικόνες). Οι πολύ καλές ιδιότητες τους οφείλονται α) στις μικρές διαμοριακές δυνάμεις και β) στους ισχυρούς δεσμούς ανάμεσα στο Si και στο O.

Οι χαμηλές διαμοριακές δυνάμεις οφείλονται στους ιδιαίτερα πολωμένους δεσμούς, εξαιτίας της μεγάλης διαφοράς ηλεκτροαρνητικότητας μεταξύ του Si και του O, με αποτέλεσμα να πολώνονται τα μόρια και να εξασθενούν οι μεταξύ τους δυνάμεις. Παράλληλα οι δεσμοί των μεθυλίων (Si-CH₃) έχουν μικρή ιοντική ισχύ. Από τον συνδυασμό αυτών των ιδιοτήτων (μικρές διαμοριακές δυνάμεις και ασθενείς δεσμοί με τα μεθύλια) οι σιλικόνες παρουσιάζουν υψηλή απόθεση ύδατος,

ανθεκτικές ιδιότητες στο νερό, στις καιρικές συνθήκες, και πολύ καλές λιπαντικές ιδιότητες.

Με τις ιδιότητες αυτές τα σιλικονούχα υφαλοχρώματα θα ήταν ιδανικά για την χρήση τους στα πλοία, αλλά στη πραγματικότητα δεν δίνουν ικανοποιητική προστασία εξαιτίας του βάρους των ουσιών, των οργανισμών που προσκολλώνται και της κίνησης του πλοίου μέσα στο νερό, που καταστρέφει τα "αντικολλητικά" επιστρώματα και μειώνει την απόδοσή τους (Omae 2003).

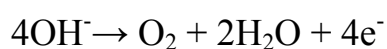
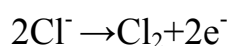
1.5 Προστασία επιφανειών με ηλεκτρικό ρεύμα

Το ηλεκτρικό ρεύμα έχει χρησιμοποιηθεί στα αντιρρυπαντικά συστήματα για τα αντικείμενα που υπάρχουν στην θάλασσα. Αυτά τα συστήματα αποτελούνται από δύο τύπους αντιρρυπαντικών συστημάτων.

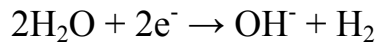
Το πρώτο ονομάζεται σύστημα ηλεκτρικής απολύμανσης. Η επιφάνεια των κυττάρων θαλασσιών βακτηρίων είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένη. Επομένως, ένα θετικό ηλεκτρόδιο έλκει τα κύτταρα στην επιφάνειά του και είναι σε θέση να τα σκοτώσει από το ηλεκτρικό ρεύμα με μια χαμηλή ηλεκτρική τάση περίπου 1-1,5 V. Η πρόληψη της συσσώρευσης κυττάρων βακτηρίων στη επιφάνεια του ηλεκτροδίου μπορεί να αποφευχθεί με την εφαρμογή εναλλασσόμενης τάσης. Αυτό το ηλεκτρικό σύστημα ελέγχου δεν παράγει χλώριο και δεν αλλάζει το pH του θαλασσινού νερού, ως ένα ηλεκτρικό σύστημα που πραγματοποιεί ηλεκτρόλυση, επειδή απαιτείται υψηλότερη ηλεκτρική τάση για να πραγματοποιηθεί ηλεκτρόλυση στο θαλασσινό νερό (Omae, 2003).

Το άλλο ηλεκτρικό συστήματα είναι το ηλεκτρολυτικό αντιρρυπαντικό σύστημα. Το νερό της θάλασσας περιέχει περίπου 35 g άλατα ανά 35kg νερού με τα ιόντα του χλωρίου και του νατρίου να αποτελούν το 86% περίπου των αλάτων. Η κύρια ηλεκτρολυτική αντίδραση στο νερό της θάλασσας (ένα αδύνατο αλκαλικό διάλυμα ύδατος σε pH 8) είναι ως εξής:

Στην άνοδο:



Στην κάθοδο:



Στην άνοδο παράγεται το χλώριο και το υποχλωριώδες οξύ, τα οποία αποτρέπουν την προσκόλληση των οργανισμών, αφού λειτουργούν ως μυκητοκτόνα. Το ρεύμα που χρησιμοποιείται είναι συνήθως εντάσεως $0,3 \text{ A m}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

Το σύστημα αυτό δεν προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον γιατί τα ιόντα του υποχλωριώδους οξέος με την βοήθεια της υπεριώδους ακτινοβολίας από τον ήλιο μετατρέπονται ξανά σε ιόντα χλωρίου (Omae, 2003).

2. ΕΝΙΣΧΥΤΙΚΕΣ ΒΙΟΚΤΟΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΤΩΝ ΥΦΑΛΟΧΡΩΜΑΤΩΝ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ. ΤΥΧΗ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

2.1. Τύχη των ενισχυτικών βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων νέας γενιάς στο περιβάλλον

Η τύχη και η συμπεριφορά μιας ουσίας που ελευθερώνεται στο περιβάλλον καθορίζεται από ένα σύνολο σύνθετων διεργασιών. Οι κύριες διεργασίες που ενδέχεται να επηρεάσουν την τύχη και τη συμπεριφορά των ενισχυτικών βιοκτόνων ουσιών είναι η μεταφορά, η μετατροπή, η διάσπαση, η κατανομή μεταξύ φάσεων και η βιοσυσσώρευση. Οι ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες ποικίλουν σημαντικά όσον αφορά τα χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά τους. Συνεπώς, οι διεργασίες που ελέγχουν την τύχη και τη συμπεριφορά τους θα διαφέρουν και, αναπόφευκτα, θα οδηγήσουν σε διαφορές στην παρουσία των ουσιών αυτών στο περιβάλλον, ενώ συγχρόνως ενδέχεται να βλάψουν και είδη τα οποία δεν αποτελούν στόχο (Thomas, 2001).

2.1.1. Διάχυση από την επιφάνεια των υφαλοχρωμάτων

Ο ρυθμός απελευθέρωσης της ενισχυτικής βιοκτόνου ουσίας από τη βαμμένη επιφάνεια προς το νερό με την πάροδο του χρόνου καθορίζει την εισροή της χημικής ουσίας στο περιβάλλον. Αμέσως μετά τη διάλυσή της η βιοκτόνος ουσία θα κατανεμηθεί μεταξύ του ιζήματος και του νερού, ανάλογα με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ουσίας και τα χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος. Η συμπεριφορά της βιοκτόνου ουσίας είναι δυνατόν να επηρεαστεί από ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών χαρακτηριστικών, συμπεριλαμβανομένων των χαρακτηριστικών του ιζήματος, της παρουσίας αιωρούμενων σωματιδίων ιζήματος και των χημικών χαρακτηριστικών της στήλης του νερού (Comber et al., 2002).

Ο ρυθμός απελευθέρωσης των ενισχυτικών βιοκτόνων ουσιών στο υδάτινο περιβάλλον, από μια βαμμένη επιφάνεια, αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για την εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου που προέρχεται από τις ουσίες αυτές. Για τον προσδιορισμό του ρυθμού απελευθέρωσης μιας ουσίας υπάρχουν δύο πρότυπα πρωτόκολλα. Η USEPA έχει υιοθετήσει τη μέθοδο D5108-80 της American Society

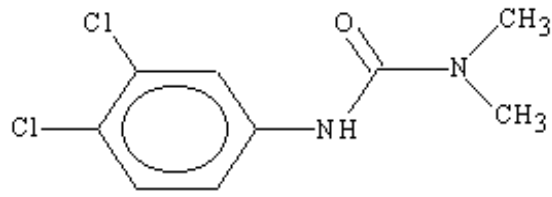
of Testing Materials (ASTM), ενώ ο οργανισμός Health and Safety Executive (HSE) του Ηνωμένου Βασιλείου, καθώς και άλλοι οργανισμοί σε διάφορες χώρες της Ευρώπης, χρησιμοποιούν τη μέθοδο ISO/DIS 15181-1,2 του International Standards Organization (ISO). Και τα δύο συστήματα αποτελούνται από ένα κύλινδρο από πολυκαρβονικό πολυμερές ο οποίος βάφεται με χρώμα που περιέχει την υπό εξέταση ουσία. Ο κύλινδρος περιστρέφεται με ρυθμό 60 rpm σε ένα δοχείο το οποίο περιέχει συνθετικό θαλασσινό νερό, ενώ περιοδικά μετρούνται οι συγκεντρώσεις της βιοκτόνου ουσίας ώστε να υπολογιστεί ο ρυθμός απελευθέρωσής της σε μικρογραμμάρια ουσίας ανά τετραγωνικό εκατοστό βαμμένης επιφάνειας ανά ημέρα ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{d}^{-1}$). Η μέθοδος σχεδιάστηκε έτσι ώστε να μπορεί να γίνεται έλεγχος του pH, της θερμοκρασίας και της αλατότητας και να παρέχονται συγκρίσιμες εργαστηριακές μετρήσεις για τις διάφορες ουσίες (Thomas, 2001).

Ο ρυθμός απελευθέρωσης του diuron στο περιβάλλον κυμαίνεται μεταξύ 0,8 και $4,64 \mu\text{g cm}^{-2} \text{d}^{-1}$ (Thomas et al. 1999, Boxall et al, 2000).

Έχει παρατηρηθεί ότι ο ρυθμός απελευθέρωσης μιας ουσίας στο περιβάλλον μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες όπως αλλαγές στην αλατότητα, τη θερμοκρασία, την ταχύτητα του σκάφους, το pH και τη συγκέντρωση της αιωρούμενης σωματιδιακής ύλης, καθώς και από τον τύπο του υφαλοχρώματος, την ποσότητα της ουσίας που αποδομείται και το ρυθμό επιφανειακής διάβρωσης της βαμμένης επιφάνειας. Έχει βρεθεί ότι αλλαγές του pH για μικρά χρονικά διαστήματα έχουν πολύ μικρή επίδραση στο ρυθμό απελευθέρωσης του diuron. Παρόλα αυτά στην περίπτωση μεταβολών στο pH ή τη θερμοκρασία του συστήματος του πειράματος παρατηρήθηκε αύξηση της διακύμανσης του ρυθμού απελευθέρωσης του diuron σε σύγκριση με την αμελητέα επίδραση που είχαν οι μεταβολές στην αλατότητα και την ταχύτητα του σκάφους (Thomas et al. 1999).

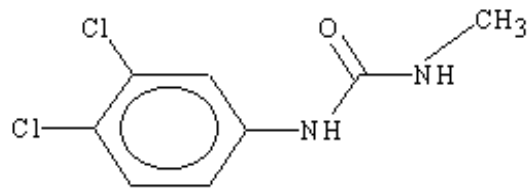
2.1.2. Αποδόμηση

Μετά την διάχυσή της στο περιβάλλον, μια χημική ένωση μπορεί να υποστεί διάφορες χημικές αντιδράσεις (αβιοτική αποδόμηση) ή βιοχημικές αντιδράσεις (βιοτική αποδόμηση) ή συνδυασμό και των δύο.



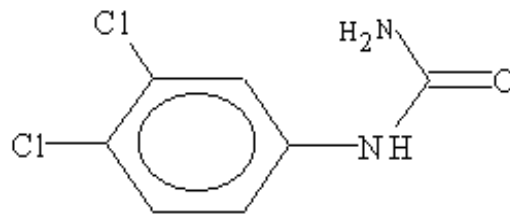
Diuron

[1-(3,4 dichlorophenyl) 3,3 dimethyl urea]



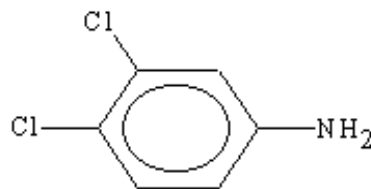
DCPMU

[1-(3,4 dichlorophenyl)-3 methyl urea]



DCPU

[1-(3,4 dichlorophenyl) urea]



DCA

(3,4 dichloroaniline)

Σχήμα 2.1 Συντακτικοί τύποι και χημική ονομασία του diuron και των μεταβολιτών του.

2.1.2.1 Αβιοτική αποδόμηση

Οι κύριες αβιοτικές διαδικασίες αποδόμησης είναι η φωτοδιάσπαση ή φωτόλυση και η υδρόλυση.

Η φωτόλυση διακρίνεται σε άμεση και έμμεση. Άμεση φωτόλυση καλείται η διαδικασία της απορρόφησης του φωτός από το χημικό μόριο, η οποία ακολουθείται από μια σειρά χημικών αντιδράσεων που σπάζουν το μόριο σε μικρότερα τμήματα. Αντίθετα, κατά την έμμεση φωτόλυση το ηλιακό φως δεν απορροφάται απευθείας από τη χημική ένωση. Υπάρχουν δύο τύποι έμμεσης φωτόλυσης. Κατά τον πρώτο τύπο η ηλιακή ακτινοβολία απορροφάται από ένα άλλο μόριο, συχνά κάποιο συστατικό της διαλυμένης οργανικής ύλης το οποίο διεγείρεται και έπειτα αντιδρά με τη χημική ένωση σχηματίζοντας νέα προϊόντα. Κατά το δεύτερο τύπο έμμεσης φωτόλυσης η χημική ένωση αντιδρά με κάποιο χημικό οξειδωτικό το οποίο έχει σχηματιστεί από την αλληλεπίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας με τις χουμικές ενώσεις και το διαλυμένο οξυγόνο (Burns and Baughman, 1985).

Το *diuron* διασπάται σε πολύ μικρό βαθμό υπό την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας, κάτι που επιβεβαιώνεται και από το μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής της ουσίας που κυμαίνεται από ένα μήνα έως ένα χρόνο (Okamura, 2002; Wauchope et al, 1992).

Υδρόλυση ονομάζεται κάθε αντίδραση του ύδατος μ' έναν ηλεκτρολύτη, που έχει σαν αποτέλεσμα τη μεταβολή της συγκεντρώσεως των ιόντων υδρογόνου του διαλύματος (Μανουσάκης, 1999). Επομένως η ταχύτητα της υδρόλυσης εξαρτάται από το pH νερού, δεδομένου ότι μεταβολές της τιμής του επιφέρουν αλλαγή στις συγκεντρώσεις των υδρογονοκατιόντων και των υδροξυλιόντων. Η υδρόλυση είναι κοινή σε οργανικά στοιχεία με εστέρες, εποξειδία, αλκυλικά αλογονίδια, καρβαμιδικά άλατα ή οργανοφωσφορικές ομάδες (HSE, 2001; Burns and Baughman, 1985).

Η υδρόλυση του *diuron* είναι φαινόμενο μη αναστρέψιμο, με μοναδικό προϊόν τη DCA, ενώ η διαλυμένη οργανική και ανόργανη ύλη που υπάρχουν στο νερό είναι δυνατόν να δράσουν καταλυτικά, βοηθώντας έτσι την υδρόλυση της ουσίας. Γενικά όμως ο ρυθμός υδρόλυσης του *diuron* είναι πολύ αργός όταν το pH του νερού είναι ουδέτερο και η θερμοκρασία 25 °C, με σταθερά ρυθμού υδρόλυσης ίση με 2 (Salvestrini et al, 2002).

2.1.2.2 Βιοτική αποδόμηση

Η βιοαποδόμηση από μικροοργανισμούς μπορεί να παίξει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των οργανικών ρυπαντών από το περιβάλλον. Ιδιαίτερα στο θαλάσσιο περιβάλλον, όπου η επίδραση του ηλιακού φωτός είναι ελάχιστη λόγω της μικρής διείσδυσής του μέσω του νερού, η μικροβιακή δραστηριότητα είναι η κύρια διεργασία μέσω της οποίας διασπώνται οι βιοκτόνες ουσίες (Callow and Finlay, 1995). Στη στήλη του νερού όπου η τιμή του οξυγόνου είναι υψηλή καθώς και στα οξειδωτικά επιφανειακά ιζήματα, η βιοαποδόμηση γίνεται με αερόβιες διαδικασίες. Παρόλα αυτά σε ανοξικά ιζήματα, η αναερόβια βιοαποδόμηση είναι η πιο σημαντική διεργασία. Για να ποσοτικοποιήσουμε τη βιοαποδόμηση ενός χημικού στοιχείου σε ένα υδατικό σύστημα είναι απαραίτητο να προσδιοριστούν οι ρυθμοί της αναερόβιας και αερόβιας διάσπασης και να καθοριστεί η κατανομή του στοιχείου ανάμεσα στην στήλη του νερού, στην επιφάνεια του ιζήματος και στα βαθύτερα στρώματα του ιζήματος (HSE, 2001).

Σε εργαστηριακές μετρήσεις, το diuron δεν βιοαποδομήθηκε μετά από 42 μέρες σε θαλασσινό νερό στους 15 °C. Αντίθετα, σε ανάλογη εργασία, τα προϊόντα της διάσπασής του ήταν λιγότερο σταθερά (Thomas et al, 2002). Η βιοαποδόμηση του diuron συντελείται κυρίως στο έδαφος, όπου εμπλέκονται κατά Gram θετικά και αρνητικά βακτήρια, ακτινομύκητες και μύκητες, τόσο σε αερόβιο όσο και σε αναερόβιο περιβάλλον (Giacomazzi and Cochet, 2004). Το diuron αρχικά μετατρέπεται σε DCPMU, με την απώλεια της μιας μεθυλομάδας από το μόριό του και έπειτα σε DCPU με την απώλεια και της δεύτερης μεθυλομάδας. Τέλος, με υδρόλυση του αμιδικού δεσμού στο μόριο της DCPU σχηματίζεται DCA, η οποία είναι και το κύριο τελικό προϊόν της βιοαποδόμησης του diuron στις περισσότερες περιπτώσεις (Cullington and Walker, 1999; Tixier et al, 2001). Υπάρχουν όμως και ορισμένα μικρόβια τα οποία μπορούν και αποδομούν το diuron χωρίς το σχηματισμό μεταβολιτών (Giacomazzi and Cochet, 2004).

Η DCPMU βιοαποδομείται γρήγορα κάτω από αναερόβιες συνθήκες, με χρόνο ημίσειας ζωής 1 ημέρα (Thomas et al, 2003).

2.1.3. Πτητικότητα

Η πτητικότητα ενδέχεται να είναι μια σημαντική οδός προς το περιβάλλον για πολλές από τις οργανικές ενώσεις. Η εξάτμιση εξαρτάται από ένα αριθμό παραγόντων συμπεριλαμβανοντας την τάση ατμών της ένωσης και την διαλυτότητα

της, η οποία συνήθως υπολογίζεται από τη σταθερά του νόμου του Henry, μία μέτρηση κατανομής ανάμεσα στον αέρα και στο νερό. Ουσίες με σταθερά του νόμου του Henry $< 10^{-7} \text{ atm m}^3 \text{ mole}^{-1}$ είναι λιγότερο πτητικές από το νερό, κάτι που σημαίνει ότι η συγκέντρωσή τους θα αυξάνεται καθώς το νερό θα εξατμίζεται, ενώ ουσίες με σταθερά του νόμου του Henry $=10^{-3} \text{ atm m}^3 \text{ mole}^{-1}$ εξατμίζονται γρήγορα. Έτσι λοιπόν, ουσίες με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και υψηλή τάση ατμών θα εμφανίζουν μεγαλύτερη τάση κατανομής στην αέρια φάση από τις ευδιάλυτες ενώσεις με χαμηλή τάση ατμών (HSE, 2001; Montgomery, 1997). Το diuron και η DCPMU, λόγω των χαμηλών τιμών της σταθεράς του νόμου του Henry που εμφανίζουν δεν αναμένεται να εξατμίζονται σε σημαντικό βαθμό από τη στήλη του νερού στις συνήθεις συνθήκες.

2.1.4. Βιοσυσσώρευση

Όσον αφορά τη βιολογική απορρόφηση και την βιοσυσσώρευση των ενισχυτικών βιοκτόνων των υφαλοχρωμάτων έχουν γίνει πολύ λίγες σχετικές εργασίες. Αναμενόμενες τιμές συντελεστών βιοσυσσώρευσης ίσες με 75 και 22 για το diuron υποδηλώνουν ότι η ουσία δε θα βιοσυσσωρευτεί σε υδάτινους οργανισμούς (Kenaga, 1980). Για τη DCPMU δεν υπάρχουν στοιχεία που να αφορούν την πιθανή βιοσυσσώρευσή της.

Όσο αφορά στη βιοσυσσώρευση του Cu υπάρχουν ελάχιστες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία. Σε σχετικές εργασίες αναφέρεται, ότι τα μικρότερα κύτταρα έχουν αναλογικά μεγαλύτερη επιφάνεια και μπορούν να αποθηκεύσουν ευκολότερα μέταλλα από ότι τα μεγαλύτερα κύτταρα, επομένως η συσσώρευση του Cu στα μικρότερα κύτταρα αναμένεται να είναι μεγαλύτερη από ότι στα μεγαλύτερου μεγέθους κύτταρα (Khoshmanesh, 1997). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται σε έρευνα των Yan και Pan (2002) για την τοξικότητα και τη βιοσυσσώρευση του Cu στα χλωροφύκη του γλυκού νερού *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella pyrenoidosa* και *Closterium lunula*, όπου παρατηρήθηκε μεγαλύτερη βιοσυσσώρευση του Cu στα είδη των οποίων τα κύτταρα ήταν μικρότερου μεγέθους.

2.1.5. Μεταφορά

Μια ένωση μπορεί να μεταφερθεί στο υδατικό περιβάλλον με τρεις βασικές διεργασίες : διασπορά, ιζηματοποίηση και διάχυση. Η μεταφορά με διασπορά αναφέρεται στην διασπορά και διάλυση μιας ένωσης σε έναν όγκο νερού. Η

ιζηματοποίηση αναφέρεται στην μεταφορά μιας ένωσης καθώς σχετίζεται με τον βυθό και τα αιωρούμενα σωματίδια. Τέλος η διάχυση αναφέρεται στην κίνηση των μορίων από περιοχές με μεγάλη συγκέντρωση σε περιοχές με μικρή συγκέντρωση. Πολύ λίγες πληροφορίες δίνονται για τις τρεις αυτές διαδικασίες για τις εξεταζόμενες ουσίες. Από τα στοιχεία που υπάρχουν για τις συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών στο περιβάλλον συμπεραίνεται ότι οι ενώσεις αυτές υπάρχουν κυρίως σε περιοχές με έντονη δραστηριότητα σκαφών και περιορισμένη ανανέωση του νερού και, καθώς μεταφέρονται σε περιοχές με βαθύτερα νερά πραγματοποιείται διάλυση, δεδομένου ότι οι συγκεντρώσεις των βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων στις περιοχές αυτές είναι χαμηλότερες (Thomas, 2001a).

2.1.6. Κατανομή στο ίζημα και στο νερό

Η διαλυτότητα ενός ρυπαντή εκτός από το να επηρεάζει την πτητικότητα του επηρεάζει και την κατανομή του ανάμεσα στην στήλη του νερού και στο ίζημα. Ενώ οι υδρόφιλες ενώσεις τείνουν να διαλύονται στο νερό, οι υδρόφοβες ενώσεις τείνουν να κατανέμονται και να συσσωρεύονται στο ίζημα. Το ποσοστό της συγκέντρωσης ενός στοιχείου στην στερεή φάση (Cs) προς τη συγκέντρωση ενός στοιχείου στη υγρή φάση (Cw) είναι ο συντελεστής κατανομής Kp: $Kp = Cs/Cw$

Η τιμή της Kp εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ιζήματος και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ένωσης. Για μια οργανική ένωση ο Kp εξαρτάται αρχικά από το κλάσμα του οργανικού άνθρακα στο ίζημα (foc) και από ένα συντελεστή κατανομής του οργανικού άνθρακα στο νερό (Koc) που προσφέρει μια καλύτερη ένδειξη της κατανομής: $Kp = foc * Koc$

Παρόλα αυτά και άλλοι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την κατανομή όπως ο τύπος του οργανικού άνθρακα, το pH του ιζήματος και η περιεκτικότητα διαλυμένου οξυγόνου. Εκτός από την κατανομή στα θαλάσσια ιζήματα, οι ρυπαντές μπορούν ακόμη να κατανεμηθούν σε αιωρούμενα σωματίδια που μπορεί να μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις πριν καθιζήσουν. Οι συγκεντρώσεις των ρυπαντών στη στήλη του νερού μπορούν ακόμη να επηρεαστούν από την επαναιώρηση και την διαδικασία απόθεσης, που αυξάνουν τον χρόνο παραμονής και την βιοδιαθεσιμότητα των ρυπαντών στη στήλη του νερού. Ένας άλλος παράγοντας που σχετίζεται με τις ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες των υφαλοχρωμάτων είναι ότι τα βιοκτόνα ενδέχεται να ενσωματωθούν στα ιζήματα σε μορφή τμημάτων μογιάς που προέρχεται από τον καθαρισμό της επιφάνειας των υφάλων των πλοίων προτού να

εφαρμοστούν ξανά τα υφαλοχρώματα. Στις περιπτώσεις αυτές οι συντελεστές που αναφέρθηκαν παραπάνω έχουν ελάχιστη επίδραση στην παρουσία των ενισχυτικών βιοκτόνων στα ιζήματα (Thomas, 2001a).

Το diuron είναι μια σχετικά υδατοδιαλυτή ουσία με διαλυτότητα 42 mg/l στους 25 °C και Log Kow 2,85 επίσης στους 25 °C. Έτσι βρίσκεται κυρίως στην διαλυτή φάση και πολύ δύσκολα προσροφάται από το ίζημα. Στο συμπέρασμα αυτό έχουν καταλήξει και μελέτες που έχουν γίνει από τους Boxall et al. (2000) και Voulvoulis et al. (2002).

2.1.7. Φυσικοχημικές ιδιότητες εξεταζόμενων ουσιών

2.1.7.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες diuron-DCPMU

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των οργανικών ουσιών επηρεάζουν τη συμπεριφορά και την τύχη τους στο περιβάλλον παίζοντας σημαντικό ρόλο στις διεργασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Στον Πίνακα 2.1 αναφέρονται οι βασικές φυσικοχημικές ιδιότητες για όποιες από τις ουσίες υπάρχουν δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία.

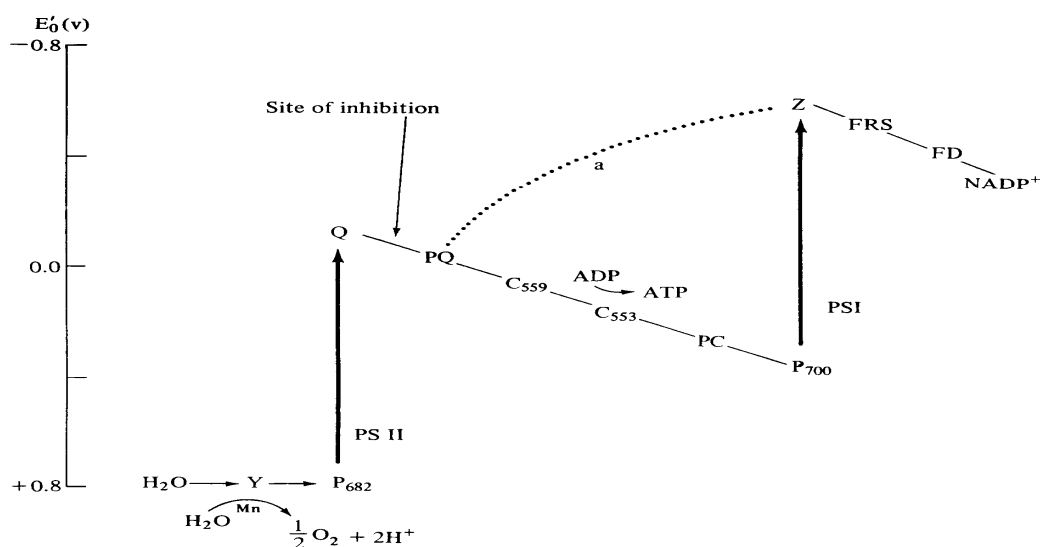
Το diuron είναι ένα φαινύλιο ζιζανιοκτόνο, το οποίο χρησιμοποιείται από το 1950 και η χρήση του σχετίζεται κυρίως με τον έλεγχο των ζιζανίων σε μη αγροτικές

Πίνακας 2.1 Κυριότερες φυσικοχημικές ιδιότητες των εξεταζόμενων ουσιών.

Ουσία	Υδατοδιαλυτότητα (mg L ⁻¹) (20 ή 25 οC)	Χρόνος ημίσειας ζωής στο νερό (ημέρες)	Συντελεστής κατανομής κανονικοποιημένος προς τον οργανικό άνθρακα (logK _{oc})	Συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού (logK _{ow})	Τάση ατμών (mm Hg) (20-25 °C)	Σταθερά νόμου Henry (Pa m ³ mol ⁻¹)	Σταθερά ιοντισμού pK _a ή pK _b
Diuron	42 (Hornsby et al., 1996)	-	2,68 (Hornsby et al., 1996)	2,68 (Hornsby et al., 1996)	6,9x10 ⁻⁸ (Hornsby et al., 1996)	51x10 ⁻⁶ (Spencer , 1982)	-
DCPM U	107 (SRC organization)	50 (Thomas et al., 2002)	-	2,65 (SRC organization)	2,02x10 ⁻⁵ (SRC organization)	2,55x10 ⁻⁶ (SRC organization)	-

εφαρμογές. Ανήκει στην κατηγορία των υποκατεστημένων ουριών οι οποίες προκύπτουν από την αντικατάσταση των υδρογόνων της ουρίας από διάφορους υποκαταστάτες.

Το diuron χρησιμοποιείται σαν επιλεκτικό ζιζανιοκτόνο σε αρκετά είδη καλλιεργειών. Εκτός από τη γεωργία όμως το diuron χρησιμοποιείται ως ενισχυτική βιοκτόνος ουσία στα υφαλοχρώματα νέας γενιάς. Η ουσία αυτή δρα ως αναστολέας της φωτοσύνθεσης εμποδίζοντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο φωτοσύστημα II P680 αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την αντίδραση Hill της φωτοσύνθεσης όπως παρουσιάζεται και στο Σχήμα 2.2 (Ciba, 1999). Παρόλα αυτά πιστεύεται ότι η τοξική δράση του diuron δεν οφείλεται μόνο στην αλληλεπίδρασή του με τη φωτοσύνθεση αλλά και στο σχηματισμό τοξικών προϊόντων κατά τη διάρκεια αναστολής της αντίδρασης Hill τα οποία συνεισφέρουν στο θάνατο των εκτεθειμένων οργανισμών (Ελευθεροχωριανός, 1996).



Σχήμα 2.2 Βιοχημικός τρόπος δράσης τριαζινών και υποκατεστημένων ουριών (Ciba, 1999).

2.1.7.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες Cu

Ο χαλκός έχει ατομικό βάρος 63,54 και ατομικό αριθμό 29. Η πυκνότητα του είναι $8,9g/cm^3$, και έχει σημείο τήξεως $1083,4\ ^\circ C$ και σημείο βρασμού τους $2595\ ^\circ C$. Έχει κρυσταλλική δομή και κοκκινωπό χρώμα με βαθμό οξείδωσης +1 και +2. Σαν μέταλλο είναι ελατός, όλκιμος και καλός αγωγός της θερμότητας και του ηλεκτρισμού (Friberg et al, 1990).

Ο μεταλλικός χαλκός δεν οξειδώνεται στο καθαρό νερό, αλλά το θειικό οξύ μπορεί να τον διαλύσει σχηματίζοντας θειικό άλας χαλκού (με Cu^{+2}). Το ιόν του μονοσθενή χαλκού δεν είναι σταθερό και μετατρέπεται σε μεταλλικό χαλκό και σε δισθενή ιόν χαλκού (Friberg et al, 1990).

Η κυριότερη χρήση του χαλκού αφορά την κατασκευή των ηλεκτρικών συσκευών. Αποτελεί επίσης σημαντικό συστατικό πολλών κραμάτων μαζί με άλλα μέταλλα όπως το ασήμι, το κάδμιο, τον κασσίτερο και τον ψευδάργυρο. Άλλες περιπτώσεις στις οποίες χρησιμοποιείται ο χαλκός είναι στις επιμετάλλωσης, στις υδραυλικές κατασκευές, και στις εγκαταστάσεις θέρμανσης. Τα άλατα του χαλκού χρησιμοποιούνται και στα φυτοφάρμακα. Για παράδειγμα στη Γαλλία χρησιμοποιείται ένα διάλυμα, που περιέχει 1 με 2 % θειικό άλας του χαλκού εξουδετερωμένο με ένυδρες ασβεστούχες ενώσεις, σε ψεκασμούς κατά των μυκήτων στα αμπελοστάφυλλα. Το Cu_2O επίσης βρίσκει εφαρμογή στα υφαλοχρώματα των πλοίων όπως έχει προαναφερθεί (Friberg et al, 1990).

Σε διάλυμα 1% με εστέρα γλυκερίνης χρησιμοποιείται κατά της ψωρίασης. Η κλινική χρήση του θειικού χαλκού σαν εμετικό έχει μειωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Πολυσύνθετες ενώσεις χαλκού χρησιμοποιούνται επίσης σε θεραπείες κατά της ρευματικής αρθρίτιδας, όμως δεν έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες πάνω στο αντικείμενο αυτό (Friberg et al, 1990).

2.2. Παρουσία των εξεταζόμενων ουσιών στο περιβάλλον

2.2.1 Diuron και DCPMU

Το diuron έχει ανιχνευθεί στο υδατικό περιβάλλον σε πολλές χώρες όπως το Ηνωμένο Βασίλειο, τη Σουηδία, την Ολλανδία, την Ισπανία, την Πορτογαλία και την Ιαπωνία, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2.2. Βλέπουμε λοιπόν ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του diuron έχουν ανιχνευθεί στο Ηνωμένο Βασίλειο, στην Ιαπωνία, και στην Ισπανία. Γενικά οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της ουσίας παρατηρούνται την περίοδο κατά την οποία η δραστηριότητα των σκαφών είναι έντονη (Lamoree et al., 2002) και ελαττώνονται αισθητά με την έναρξη του φθινοπώρου, οπότε τελειώνει και η τουριστική περίοδος (Thomas et al., 2001b).

Πίνακας 2.2 Συγκεντρώσεις του diuron σε δείγματα νερού και ιζήματος προερχόμενα από διάφορες περιοχές.

Περιοχή δειγματοληψίας	Ημερομηνία	Νερό (ng L ⁻¹)	Ίζημα (ng g ⁻¹)	Αναφορά
Ηνωμένο Βασίλειο				
Sutton Harbour	4-10/1998	1-334	*	Thomas et al. (2001b)
Orwell	9/1998-2/1999	21,9-768	<12-395	Boxall et al. (2000)
Hamble	9/1998-2/1999	58,3-247,2	<12	Boxall et al. (2000)
5 μαρίνες	1/1998	3-117	*	Thomas (1998)
<i>Εκβολές ποταμών</i>				
Hamble	9/1998-2/1999	10,5-36,3	<12	Boxall et al. (2000)
Hamble	4-10/1998	1-613	*	Thomas et al. (2001b)
River Crouch	4-10/1998	5-305	*	Thomas et al. (2001b)
Southampton Water	4-10/1998	<1-6742	*	Thomas et al. (2001b)
	10/1998	*	<100-1420	Thomas et al. (2000)
	Καλοκαίρι 2000	16-1005	0,4-2,3	Thomas et al. (2002)
Ισπανία				
Mediterranean coast (Mansou marina and EbreDelta ports)	1996-1997	10-180	*	Ferrer et al. (1997)
	1-8/1999	5-2000	*	Martinez et al. (2000)
	4/1996-1/1999	5-200	*	Ferrer and Barceló (1999)
	6/2000	*	<0,4-136	Martinez and Barceló (2001)
Ολλανδία				
Μαρίνες	4-11/2000	90-1130	*	Lamoree et al. (2002)
Rotterdam coastal area	10/1998	*	<100	Thomas et al. (2000)
Πορτογαλία				
River water (Ponte Aranha)	4-7/1999	10-1240	*	De Almeida Azevedo et al. (2000)
Σουηδία				
Μαρίνες (West coast)	6/1993-9/1994	10-100	*	Dahl and Blanck (1996)
Ιαπωνία				

Συνέχεια Πίνακα 2.2

<i>Seto Inland Sea</i>				
Μαρίνες, αλιευτικές περιοχές	8/1999	έως 3054	*	Okamura et al. (2003)
Λιμάνια	8/1999	έως 710	*	Okamura et al. (2003)

* : δεν λήφθηκε δείγμα

Για την DCPMU υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία στη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά την παρουσία της στο περιβάλλον. Συγκεκριμένα έχει ανιχνευτεί στο Ηνωμένο Βασίλειο σε δείγματα νερού σε συγκεντρώσεις μεταξύ <1 και 78 ng l⁻¹ (Thomas et al., 2002), ενώ έχει προσδιοριστεί και στο ίζημα σε συγκεντρώσεις < 25 ng g⁻¹ (Martinez and Barceló, 2001).

2.2.2. Cu

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία στο θαλασσινό νερό οι συγκεντρώσεις του χαλκού κυμαίνονται από 1 – 5 μg l⁻¹. Στα αμερικάνικα ποτάμια η συγκέντρωση του χαλκού κυμαίνεται από 0,83 έως 105 μg l⁻¹. Στο πόσιμο νερό υπάρχουν μεγάλες διακυμάνσεις στην περιεκτικότητά του, που οφείλονται στον είδος του νερού στη σκληρότητα, στο pH, στους τύπους των σωλήνων που μεταφέρεται το νερό κα. Έτσι έχουν παρατηρηθεί διακυμάνσεις από μερικά μικρογραμμάρια έως περισσότερο από 1mg/l, δείχνοντας με αυτό τον τρόπο ότι το πόσιμο νερό μπορεί να αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες πρόσληψης χαλκού από τον ανθρώπινο οργανισμό (Friberg et al, 1990).

Ίχνη μετάλλων έχουν προσδιοριστεί σε σημαντικές ποσότητες σε ιζήματα, μετά από έρευνες που έγιναν σε λιμάνια και σε μαρίνες, σε περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών. Ανιχνεύτηκαν αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις χαλκού, με τις μέγιστες τιμές να ξεπερνούν τα 10⁴mg Cu ανά kg ξηρού ιζήματος ενώ σε πολλές περιπτώσεις ο διαλυμένος χαλκός, στην υδάτινη στήλη πάνω από το ίζημα υπερβαίνει το όριο που ισχύει στις Η.Π.Α και αφορά την ποιότητα του θαλασσινού νερού (3,0 μg l⁻¹). Οι συγκεντρώσεις του χαλκού και γενικά των μετάλλων, σε λιμάνια είναι μεγάλες λόγω ότι συχνά δέχονται τα αστικά λύματα και βιομηχανικά απόβλητα και κυρίως λόγω των πλοίων που υπάρχουν στην περιοχή. Ο χαλκός που περιέχεται στα υφαλοχρώματα που εφαρμόζεται στα πλοία είναι η κύρια πηγή ρύπανσης από χαλκό. Έτσι στις θαλάσσιες περιοχές που χρησιμοποιούνται για προστασία των πλοίων από τις θαλασσοταραχές, αυξάνονται συνεχώς οι συγκεντρώσεις των μετάλλων εντείνοντας το πρόβλημα της ρύπανσης, λόγω της δυσκολίας στην ανάδευση αλλά και της διασποράς του νερού στους ωκεανούς (Schiff et al., 2004).

3. ΑΡΧΕΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

3.1 Εισαγωγή

Η μελέτη της τοξικότητας μιας ουσίας πάνω στους οργανισμούς δίνει πληροφορίες για το εάν η ουσία είναι θανατηφόρα ή για τις αλλαγές που συμβαίνουν στον εκτιθέμενο οργανισμό, στην ανάπτυξη, στην αναπαραγωγή, τη φυσιολογία, τη βιοχημεία και τη συμπεριφορά του γενικότερα.

Η τοξικότητα μπορεί να μετρηθεί σε όλους τους οργανισμούς, είτε αυτοί ανήκουν στα χερσαία είτε στα υδατικά οικοσυστήματα. Η βασική διαφορά στη μελέτη τοξικότητας μεταξύ των δύο αυτών κατηγοριών βρίσκεται στον τρόπο έκθεσης της τοξικής ουσίας. Στα χερσαία οικοσυστήματα οι οδοί έκθεσης στις χημικές ουσίες των πειραματόζωων, είναι στο αναπνευστικό σύστημα, επιδερμικά, στοματικά και ενέσιμα διότι η τοξική ουσία εμφανίζει το μεγαλύτερο τοξικό αποτέλεσμα όταν εισαχθεί ενδοφλέβια. Αντίθετα οι οργανισμοί των υδατικών οικοσυστημάτων εκτίθενται κυρίως μέσω του δέρματος και άλλων επιφανειών επαφής του οργανισμού με το νερό παρά μέσω της τροφής (Ακριώτης, 2001).

3.2 Κριτήριο επιλογής οργανισμού

Για την επιλογή του καταλληλότερου είδους οργανισμού στα πειράματα τοξικότητας υπάρχουν ορισμένα σημαντικά κριτήρια τα οποία πρέπει να εκπληρώνονται ώστε τα αποτελέσματα να μας βοηθήσουν για να βγάλουμε χρήσιμα συμπεράσματα.

Το σημαντικότερο είναι ότι το είδος που θα χρησιμοποιήσουμε πρέπει να έχει ένα ευρύ φάσμα ευαισθησίας στις τοξικές ουσίες, ώστε να αντιπροσωπεύει πολλούς οργανισμούς. Πρέπει να βρίσκεται σε αφθονία και αν είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται είδη που είναι ενδογενή και χαρακτηρίζουν το οικοσύστημα της περιοχής που δέχεται την επίδραση των τοξικών ουσιών. Σημαντικό ακόμα θα ήταν τα αποτελέσματα των πειραμάτων, να αναφέρονται σε τέτοιους οργανισμούς, ώστε να είναι σημαντικά από οικολογική, οικονομική ή άλλη άποψη. Τέλος θα πρέπει να είναι δυνατή η καλλιέργεια του οργανισμού στο εργαστήριο (σύλληψη, μεταφορά, αναπαραγωγή), δίχως απαιτήσεις ιδιαίτερων συνθηκών, ώστε να γίνεται η καλλιέργεια χωρίς προβλήματα. Η ύπαρξη σχετικών βιβλιογραφικών δεδομένων θα διευκόλυνε στο να μπορούν να ερμηνευτούν ευκολότερα τα αποτελέσματα και να βγουν τα συμπεράσματα. (Rand and Petrocelli, 1985)

3.3 Δοκιμές τοξικότητας

Οι κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται οι δοκιμές τοξικότητας είναι οι οξείες δοκιμές τοξικότητας, οι υποχρόνιας δοκιμές τοξικότητας, και οι χρόνιες δοκιμές τοξικότητας.

Δοκιμές οξείας τοξικότητας. Οι δοκιμές αυτές διεξάγονται σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα για να εκτιμηθεί η 24- ή 96- h LC₅₀ ή η 48- hEC₅₀. Η χορήγηση γίνεται μόνο μια φορά ή και περισσότερες όταν η τοξική ουσία είναι ελαφρά τοξική. Ο σκοπός των δοκιμών αυτών είναι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης μιας ουσίας ή του επιπέδου ενός παράγοντα (πχ του pH) που προκαλεί επιβλαβή επίπτωση. (Rand and Petrocelli, 1985)

Δοκιμές υποχρόνιας τοξικότητας. Σε αυτές τις τοξικές δοκιμές η έκθεση του οργανισμού στην τοξική ουσία είναι επαναλαμβανόμενη για έναν έως τρεις μήνες και εξετάζονται οι δυσμενείς επιπτώσεις μιας χημικής ουσίας σε αυτόν στα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του. (Rand and Petrocelli, 1985)

Δοκιμές χρόνιας τοξικότητας. Σε αυτές τις τοξικές δοκιμές η έκθεση του οργανισμού στην τοξική ουσία είναι επαναλαμβανόμενη περισσότερο από τρεις μήνες και έχουν ως στόχο την εκτίμηση των επιπτώσεων της συγκέντρωσης μιας ουσίας ή του επιπέδου ενός παράγοντα κατά την διάρκεια ενός σημαντικού σταδίου της ζωής του εκτιθέμενου οργανισμού. (Rand and Petrocelli, 1985)

Οι παραπάνω δείκτες δεν είναι σταθεροί αλλά εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως το είδος, το φύλλο και η ηλικία του πειραματόζωου, αλλά και από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η έκθεση σε άλλες χημικές ουσίες, κ.τ.λ.

Στην εκτίμηση τοξικότητας ουσιών στα υδατικά οικοσυστήματα, οι μέθοδοι ποικίλλουν από δοκιμές οξείας τοξικότητας, στις οποίες οι πειραματικοί οργανισμοί εκτίθενται στην υπό εξέταση ουσία για 24-96 ώρες έως δοκιμές χρόνιας τοξικότητας. Οι δοκιμές χρόνιας τοξικότητας καλύπτουν τουλάχιστον το 1/10 της διάρκειας ζωής των πειραματικών ειδών. Η διαφορά από την αντίστοιχη δοκιμή στα χερσαία σπονδυλωτά (τυπικά διάρκειας ενός έτους) είναι ότι η διάρκεια ζωής σε υδατικούς οργανισμούς μπορεί να διαφέρει τάξεις μεγέθους ενώ των σπονδυλωτών κυμαίνεται σε πολύ στενότερα όρια.

Εξαιτίας των σημαντικών διαφορών που υπάρχουν ανάμεσα στον τρόπο αναπαραγωγής των υδατικών οργανισμών σε σχέση με τα χερσαία σπονδυλωτά (συχνά εξωτερική γονιμοποίηση, πλαγκτονικά εμβρυϊκά στάδια κ.ο.κ) χρησιμοποιείται μια ειδική κατηγορία δοκιμών, οι δοκιμές μερικού κύκλου ζωής (partial life cycle, ονομάζονται και υποχρόνιες). Σ' αυτήν την κατηγορία, οι οργανισμοί εκτίθενται συνεχώς κατά το πιο

ευαίσθητο στάδιο του κύκλου ζωής τους (π.χ. έμβρυα ψαριών) και εκτιμώνται μεταβλητές όπως ο ρυθμός επιβίωσης, η ανάπτυξη και η συμπεριφορά αλλά όχι η αναπαραγωγή. Αντίθετα, στις χρόνιες δοκιμές εξετάζονται οι επιπτώσεις στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη, καθώς και υποθανάτιες επιδράσεις (π.χ. στη συμπεριφορά και στο επίπεδο φυσιολογικών και βιοχημικών αλλοιώσεων).

3.4 Δοκιμές βιοσυγκέντρωσης

Οι δοκιμές βιοσυγκέντρωσης (bioconcentration tests) έχουν σαν σκοπό στο να μετρήσουν το ρυθμό με τον οποίο τοξικές ουσίες συγκεντρώνονται μέσα στο σώμα των οργανισμών. Έχουν κυρίως αναπτυχθεί για ψάρια και δίθυρα, είδη από τα οποία μπορεί ευκολότερα να εκτεθεί ο άνθρωπος σε επικίνδυνες συγκεντρώσεις τοξικών ουσιών.

Η μέτρηση του βαθμού βιοσυγκέντρωσης μιας ουσίας επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης (BCF). Σε περίπτωση που οι ουσίες είναι μη πολικές, ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης μπορεί να υπολογιστεί βάσει του συντελεστή οκτανόλης /νερού (Kow) της ουσίας αφού η οκτανόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο των λιπιδιακών ιστών ενός οργανισμού.

Ειδικές παραλλαγές έχουν αναπτυχθεί για είδη από τη στήλη του νερού και το ίζημα.

3.5 Δοκιμές τοξικότητας ιζήματος

Στις δοκιμές τοξικότητας ιζήματος εξετάζεται η τοξικότητα των ουσιών που είναι προσροφημένες ή απορροφημένες στο ίζημα. Εάν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι ο χρόνος παραμονής των ουσιών στο περιβάλλον αυξάνεται όταν είναι προσροφημένες στο ίζημα, και ότι το ρυπασμένο ίζημα αποτελεί σημαντική και μεγάλης διάρκειας πηγή ρύπανσης, συμπεραίνεται εύκολα η σπουδαιότητα αυτού του είδους των δοκιμών για να υπάρχει μία όσο το δυνατόν πιο ολοκληρωμένη μελέτη της τοξικής συμπεριφοράς των ουσιών.(Thomas et all, 2003).

3.6 Δείκτες τοξικότητας

Οι δείκτες τοξικότητας που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι οι παρακάτω:

LD₅₀ (Lethal Dose). Είναι η δόση της τοξικής ουσίας (σε mg τοξικής ουσίας / Kgr σωματικού βάρους), που προκαλεί το θάνατο στο 50% του πληθυσμού που έρχεται σε επαφή με την τοξική ουσία.

ED₅₀ (Effective Dose). Είναι η δόση μιας ουσίας που προκαλεί κάποιο επιθυμητό αποτέλεσμα (πχ. Αναισθησία), στο 50% των ζώων που εκτίθενται σ' αυτήν.

TD₅₀ (Toxic Dose). Είναι η δόση της ουσίας που προκαλεί κάποιο τοξικό αποτέλεσμα (π.χ. βλάβη στο συκώτι), στο 50% του πληθυσμού που εκτίθεται σε αυτή.

LT₅₀ (Lethal time). Είναι ένας δείκτης που δείχνει το χρόνο που απαιτείται για το θάνατο του 50% των ζώων που εκτίθενται σε τοξική ουσία. Η LT₅₀ δείχνει το χρόνο δράσης μιας χημικής ουσίας αλλά δε δείχνει αν μια χημική ουσία είναι τοξικότερη μιας άλλης. Όταν τα ζώα εκτίθενται στις χημικές ουσίες μέσω του αέρα που αναπνέουν ή του νερού που διαβιώνουν (π.χ. ψάρια), η δόση που λαμβάνουν δεν είναι εύκολο να προσδιοριστεί. Στις περιπτώσεις αυτές καθορίζεται η συγκέντρωση της χημικής ουσίας στο νερό ή στον αέρα.

LC₅₀ (Lethal concentration). Είναι η συγκέντρωση της τοξικής ουσίας (σε μονάδες συγκέντρωσης) που προκαλεί το θάνατο στο 50% του πληθυσμού που εκτίθεται στην τοξική ουσία.

EC₅₀ (Effective concentration). Η συγκέντρωση δραστικής ουσίας στην τροφή που προκαλεί ορατά συμπτώματα. Τα συμπτώματα που καταγράφονται είναι κυρίως βιοχημικά και ιστολογικά (νεκροψία επιζώντων) (Ακριώτης Τ., 2001).

3.7 Συστήματα έκθεσης

Οι δοκιμές στα υδατικά οικοσυστήματα μπορούν να διακριθούν σε στατικές δοκιμές (static), δοκιμές ανακυκλοφορίας, ανανεώσιμες δοκιμές και συνεχούς ροής.

Στις στατικές δοκιμές προστίθεται η υπό εξέταση ουσία στο νερό του πειραματικού δοχείου και στη συνέχεια δεν ανανεώνεται ούτε το νερό ούτε η συγκέντρωση της τοξικής ουσίας. Οι στατικές δοκιμές είναι κατάλληλες για σταθερές ουσίες, που δεν προσροφώνται στο δοχείο, δεν είναι πτητικές και δεν δεσμεύουν οξυγόνο. Παραλλαγές είναι οι δοκιμές στατικής ανανέωσης (static renewal) κατά τις οποίες το νερό ανανεώνεται και αποκαθίσταται η αρχική συγκέντρωση της υπό εξέτασης ουσίας περιοδικά, συνήθως μέρα παρά μέρα.

Οι δοκιμές ανακυκλοφορίας είναι παρόμοιες με τις στατικές δοκιμές, με τη διαφορά ότι το νερό αντλείται από το θάλαμο, διηθείται και επιστρέφεται σε αυτόν χωρίς να μεταβληθεί η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας.

Επίσης παρόμοιες με τις στατικές δοκιμές είναι και οι ανανεώσιμες δοκιμές, γιατί πραγματοποιείται σε ακίνητο νερό, που ανανεώνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας.

Τέλος κατά τις δοκιμές συνεχούς ροής (flow-through) το νερό ανανεώνεται συνεχώς και η συγκέντρωση της υπό εξέταση ουσίας παραμένει σταθερή.

3.8 Αλληλεπίδραση χημικών ουσιών

Οι χημικές ουσίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με μια ποικιλία τρόπων ώστε η τελική δράση να είναι (Klassen 1986):

- **Προσθετική**, όταν η τελική τοξική δράση είναι το άθροισμα των τοξικών δράσεων των επιμέρους ουσιών. Για παράδειγμα όταν δύο οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα χορηγούνται ταυτόχρονα, η αναχαίτιση της χολινεστεράσης είναι συνήθως προσθετική.
- **Συνέργια**, όταν το συνδυασμένο τοξικό αποτέλεσμα των δύο χημικών ουσιών, είναι μεγαλύτερο από το άθροισμα των αποτελεσμάτων των δύο χημικών ουσιών ξεχωριστά.
- **Ενεργοποίηση**, όταν μια ουσία που από μόνη της δεν προκαλεί κανένα τοξικό αποτέλεσμα στον οργανισμό, προστίθεται σε μια τοξική ουσία αυξάνοντας κατά πολύ την τοξικότητά της δεύτερης. Τέτοιο παράδειγμα είναι η Σεσαμίνη, που αυξάνει την τοξική δράση των συνθετικών πυρεθρινοειδών όταν αναμειχθεί με αυτά.
- **Ανταγωνισμός**, όταν υπάρχει αλληλεπίδραση δυο τοξικών ουσιών κατά την οποία το τοξικό αποτέλεσμα όταν χορηγηθούν και οι δύο είναι μικρότερο από το άθροισμα του τοξικού αποτελέσματος της κάθε μιας ξεχωριστά. Ο ανταγωνισμός είναι μια πολύ ενδιαφέρουσα τοξικολογική ιδιότητα και χρησιμοποιείται στην παρασκευή αντιδότην.

Οι αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν μάλλον μεταξύ των φυσιολογικών συστημάτων των οργανισμών και των χημικών ουσιών παρά μεταξύ των χημικών ουσιών. Οι περισσότερες αλληλεπιδράσεις είναι πολύπλοκες και ο μηχανισμός τους παραμένει άγνωστος. Είναι πάντως σίγουρο ότι η απλή καταγραφή και περιγραφή αυτών υποβοηθά την κατανόησή τους.

Η μελέτη της τοξικότητας του συνδυασμού φυτοφαρμάκων ή φυτοφαρμάκων και άλλων χημικών ουσιών αποτελεί ένα πεδίο που δεν έχει διερευνηθεί αρκετά, ίσως λόγω του μεγάλου αριθμού των δυνατών συνδυασμών.

3.9 Τοξικότητα μιγμάτων χημικών ουσιών.

Καθημερινά απελευθερώνονται στο περιβάλλον πλήθος χημικών ουσιών βιομηχανικής, γεωργικής, οικιακής ή άλλης προέλευσης. Οι ζωντανοί οργανισμοί λοιπόν

εκτίθενται σε μίγματα ουσιών ποικίλης δράσης και συγκέντρωσης. Τα αποτελέσματα της δράσης αυτής είναι απαραίτητα να εκτιμηθούν για όσο το δυνατό περισσότερους συνδυασμούς περιβαλλοντικά σημαντικών ουσιών, αλλά και περιβαλλοντικών παραμέτρων.

3.9.1 Εκτίμηση της τοξικότητας μιγμάτων

Η προσπάθεια εκτίμησης της τοξικής δράσης μιγμάτων χημικών ουσιών είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία διαγραμμάτων, δεικτών, και μαθηματικών σχέσεων, με σκοπό την απεικόνιση και ποσοτικοποίηση των εννοιών αλληλεπίδρασης.

Ορισμένοι ερευνητές αποδέχτηκαν τις υπάρχουσες έννοιες, μεθόδους και ορολογία σχετικά με την αλληλεπίδραση χημικών ουσιών και τις επέκτειναν με τη δημιουργία μιας μαθηματικής έκφρασης. Δημιούργησαν τον αθροιστικό δείκτη S (sum or additive index), ο οποίος υπολογίζεται για κάποια συγκεκριμένη απόκριση του δείγματος (π.χ. LC20, LC50 κλπ) και ισούται:

$$S = CA / ECA + CB / ECB$$

όπου:

CA, CB είναι οι συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών A και B στο μίγμα και ECA, ECB οι συγκεντρώσεις της κάθε μιας ουσίας χωριστά που επιφέρει την συγκεκριμένη απόκριση του δείγματος.

Όταν το μείγμα αποτελείται από περισσότερες των δυο χημικές ουσίες, ο αθροιστικός δείκτης γίνεται :

$$S = CA / ECA + CB / ECB + CF / ECF + \dots$$

Αν $S = 1$, η αλληλεπίδραση των χημικών ουσιών είναι αθροιστική. Αν $S > 1$, υπάρχει ανταγωνισμός, ενώ αν $S < 1$, υπάρχει συνέργια.

Ο αθροιστικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της τοξικότητας μιγμάτων ουσιών μόνος ή σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αναπτύχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν και άλλοι δείκτες για την εκτίμηση της τοξικότητας μιγμάτων.

3.9.2 Επιπτώσεις τοξικότητας σε μικροοργανισμούς.

Υπάρχουν διάφοροι ενδεχόμενοι μηχανισμοί κατά τους οποίους οι τοξικές ουσίες επηρεάζουν και τελικά θανατώνουν τους μικροοργανισμούς. Οι τοξικές ουσίες μπορούν να βλάψουν το γενετικό υλικό ή μπορεί να οδηγήσουν σε πρωτεϊνική μετουσίωση όπως για παράδειγμα τα αλογόνα. Μπορεί επίσης να προκαλούν ανωμαλίες στις μεμβράνες των κυττάρων (π.χ. φαινόλη και τεταρτογενές αμμωνιακά μίγματα) που έχουν ως αποτέλεσμα διαρροή των πρωτεϊνών του DNA και RNA και άλλων οργανικών στοιχείων. Κάποια τοξικά χημικά μπορεί να μετακινήσουν κατιόντα (π.χ. Na⁺, Ca⁺) από την θέση της προσρόφησης στα κύτταρα των μικροοργανισμών, π.χ. οξέα και αλκάλια.

Μια πιο δυσδιάκριτη ενέργεια των τοξικών μολυντών είναι η ικανότητά τους να μπλοκάρουν τους χημικούς υποδοχείς των μικροοργανισμών, οδηγώντας τους έτσι στην αναστολή της οργανικής απόθεσης στη διαδικασία αυτοκαθαρισμού σε εργοστάσια καθαρισμού λυμάτων και σε ύδατα που δέχονται υλικά από λύματα.

Πιστεύεται ότι μια από τις πιο σημαντικές επιπτώσεις των τοξικών στους μικροοργανισμούς είναι στις λειτουργίες των ενζύμων. Παρόλα αυτά, σε κάθε μελέτη τοξικότητας, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι φυσικοχημικές μεταβλητές (παρουσία άλλων κατιόντων, pH, η δυνατότητα οξειδωσης και μείωσης, η θερμοκρασία, η οργανική ύλη, ανόργανα αργιλικά, κ.τ.λ.) που ελέγχουν τις τοξικές δράσεις έναντι των μικροοργανισμών.

Με βιοχημικές εξετάσεις να μετράται η επίπτωση των τοξικών ουσιών στα κύτταρα των μικροοργανισμών. Οι εξετάσεις αυτές συμπεριλαμβάνουν μετρήσεις των δραστηριοτήτων των ενζύμων, του περιεχόμενου του ATP και τη βιοφωταύγειας. Για τον προσδιορισμό της μικροβιακής βιομάζας σε περιβαλλοντικά δείγματα χρησιμοποιούνται βιοχημικοί δείκτες όπως για παράδειγμα ATP, λιποπολυσακχαρίτες κ.ά..

3.9.3. Βιοδοκιμές σε άλγη

Οι βιοδοκιμές σε άλγη αποτελούν συνήθως την μέθοδο για τον προσδιορισμό των επιπτώσεων των θρεπτικών και των τοξικών ουσιών που εισέρχονται στα υδατικά οικοσυστήματα.

Το μεγάλο πλεονέκτημα που έχουν οι βιοδοκιμές σε άλγη σχετίζεται με το γεγονός ότι είναι σχετικά απλές και οικονομικές συγκρινόμενες με τις βιοδοκιμές σε ψάρια. Αυτά τα πειράματα μπορούν να λάβουν χώρα κάτω από εργαστηριακές συνθήκες χρησιμοποιώντας μια σειρά ή συνεχόμενες καλλιέργειες αλγών.

Ορισμένοι επιστήμονες όμως δε συμφωνούν με αυτές τις εργαστηριακές μεθόδους επειδή δεν αναπαριστούν ικανοποιητικά το φυσικό περιβάλλον. Για το λόγο αυτό κάποιοι

ερευνητές προτείνουν τη χρήση ανάμεικτων φυσικών πληθυσμών από άγλη σε πειράματα τοξικότητας.

Οι βιοδοκιμές σε άγλη για πειράματα τοξικότητας βασίζονται σε ένα ευρύ φάσμα παραμέτρων που συμπεριλαμβάνει μέτρηση κυττάρων, δραστηριότητα της νιτροποίησης κ.α..

3.10 Παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα.

Η τύχη και η συμπεριφορά μιας ουσίας αμέσως μετά την εισαγωγή της στο περιβάλλον ελέγχεται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ουσίας, από τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες του οικοσυστήματος και από τις πηγές και το ρυθμό εισροής της ουσίας στο περιβάλλον.

3.10.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες της ουσίας που επηρεάζουν την τοξικότητα.

Οι κύριες φυσικοχημικές ιδιότητες της ουσίας που επηρεάζουν την τύχη της στο περιβάλλον είναι η μοριακή δομή, η υδατοδιαλυτότητα, η τάση ατμών, οι σταθερές ταχύτητας των διαδικασιών υδρόλυσης, φωτόλυσης, βιολογικής αποδόμησης, εξάτμισης, ρόφησης, πρόσληψης και απέκκρισης από τους οργανισμούς και οι συντελεστές κατανομής μεταξύ των διαφόρων φάσεων.

Επίσης ο τρόπος δράσης της ουσίας επηρεάζει την τοξικότητα της. Έτσι όταν μια ουσία είναι μη-εκλεκτική μπορεί να προκαλεί ανεπιθύμητα αποτελέσματα για τους οργανισμούς που δεν αποτελούν στόχο. Αντίθετα όταν μια ουσία παρουσιάζει έντονη εκλεκτική δράση, μπορεί να βλάπτει μόνο ένα είδος οργανισμού, αφήνοντας ανεπηρέαστους τους γύρω οργανισμούς. Γι' αυτό και τυχόν αλλαγές που μπορούν να συμβούν εξαιτίας χημικών και βιολογικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ουσίας και στόχου μπορούν να μεταβάλλουν την «εκλεκτική» δράση της, και επομένως και την τοξικότητα της.

3.10.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες του οικοσυστήματος που επηρεάζουν την τοξικότητα.

Οι κυριότεροι παράγοντες που μπορούν να μεταβάλλουν την τοξικότητα μιας ουσίας είναι:

- η θερμοκρασία
- το διαλυμένο οξυγόνο
- το pH

- και η αλατότητα.

3.10.2.1 Θερμοκρασία

Για την εξάρτηση της τοξικότητας από την θερμοκρασία δεν υπάρχει κανένας γενικός κανόνας σχετικός με το πως επηρεάζει η θερμοκρασία την τοξικότητα. Ανάλογα με το είδος του εκτιθέμενου οργανισμού και ανάλογα με την χημική ουσία, οι αλλαγές της θερμοκρασίας μπορούν να αυξήσουν ή να μειώσουν ή να μην επηρεάσουν καθόλου την τοξικότητα.

3.10.2.2 Διαλυμένο οξυγόνο

Η μείωση της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου αυξάνει σημαντικά την τοξικότητα μιας ουσίας, διότι επηρεάζεται αρνητικά ο ρυθμός αναπνοής του οργανισμού και επομένως να γίνεται πιο ευάλωτος, με αποτέλεσμα χαμηλές συγκεντρώσεις της ουσίας να είναι ικανές να επιφέρουν δυσμενείς επιπτώσεις (Sprague,1985).

3.10.2.3 pH

Με τις μεταβολές του pH επηρεάζεται κυρίως η τοξικότητα των ουσιών που μπορούν να ιονιστούν και των οποίων η αδιάστατη μορφή είναι περισσότερο τοξική. Παράδειγμα αύξησης τοξικότητας εξαιτίας του pH αποτελούν τα ιόντα αμμωνίου, τα οποία είναι ελάχιστα τοξικά από μόνα τους, όμως η αύξηση του pH συνεπάγεται τη μετατροπή τους σε αμμωνία, η οποία είναι πολύ πιο τοξική. Το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση των μετάλλων, όπου η ελεύθερη μορφή του μετάλλου είναι η πιο τοξική και είναι αυτή που εμφανίζεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε χαμηλές τιμές του pH (Sprague,1985).

3.10.2.4 Αλατότητα

Η αλατότητα δεν έχει σημαντική επίδραση στην τοξικότητα. Έχει παρατηρηθεί ότι τόσο οι θαλάσσιοι οργανισμοί όσο και οι οργανισμοί του γλυκού νερού, όταν βρίσκονται στο φυσικό τους περιβάλλον παρουσιάζουν αντίστοιχη ανθεκτικότητα στην επίδραση μιας συγκεκριμένης τοξικής ουσίας (Sprague,1985).

3.10.3. Παράγοντες που σχετίζονται με τον εκτιθέμενο οργανισμό και που επηρεάζουν την τοξικότητα.

Οι τοξικές ουσίες δεν επηρεάζουν το ίδιο όλους τους οργανισμούς γιατί οι εκτιθέμενοι οργανισμοί παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία. Από οργανισμό σε

οργανισμό υπάρχει μια διαφοροποίηση ως προς το ρυθμό και τον τρόπο μεταβολισμού της ουσίας, όπως και του ρυθμού απέκκρισης της και επομένως μεταβάλλεται και η τοξικότητα της (Rand and Petrocelli, 1985).

Εκτός από την διαφορετική ευαισθησία που παρουσιάζουν οι οργανισμοί, σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα είναι η ηλικία και οι διατροφικές συνήθειες. Οι νέοι σε ηλικία οργανισμοί είναι πιο ευπαθή σε τοξικές ουσίες σε σχέση με τους ενήλικες, ενώ οι διαιτητικές συνήθειες επηρεάζουν την τοξικότητα, διότι επηρεάζουν την φυσιολογία και τις βιοχημικές λειτουργίες ενός οργανισμού (Rand and Petrocelli, 1985).

3.10.4. Παράγοντες που σχετίζονται με το χρόνο έκθεσης που επηρεάζουν την τοξικότητα.

Οι παράγοντες που σχετίζονται με την έκθεση ενός οργανισμού σε μια τοξική ουσία, έχουν να κάνουν με το είδος της έκθεσης, την διάρκεια, την συχνότητα της έκθεσης αλλά και τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας.

Στην περίπτωση που υπάρχει οξεία έκθεση, η επαφή του οργανισμού με την τοξική ουσία έχει διάρκεια μερικών ωρών ή ημερών, και υπάρχουν συνήθως άμεσα αποτελέσματα. Σε χρόνια έκθεση ο οργανισμός εκτίθεται σε χαμηλά επίπεδα τοξικής ουσίας συνεχώς ή σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα για αρκετό χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από μερικές εβδομάδες μέχρι και χρόνια. Εδώ τα αποτελέσματα μπορεί να είναι γρήγορα και άμεσα όπως στην οξεία έκθεση, ή να γίνονται εμφανή με αργούς ρυθμούς (Rand and Petrocelli, 1985).

Σημαντικό επίσης ρόλο παίζει και η συχνότητα της έκθεσης στην τοξικότητα μιας ουσίας. Την πρώτη φορά που θα εκτεθεί ένας οργανισμός σε μια τοξική ουσία θα υποστεί μια δυσμενή επίπτωση. Αυτό όμως δεν σημαίνει ότι τη δεύτερη φορά που θα εκτεθεί στην τοξική ουσία θα υπάρχουν χειρότερα αποτελέσματα. Αυτό γίνεται γιατί στο χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο εκθέσεων ο οργανισμός, είτε προσαρμόζεται στην τοξική ουσία, είτε μπορεί να την μεταβολίσει, οπότε η τοξικότητα της ουσίας επηρεάζεται. Σε περιπτώσεις όπου δεν μεταβολίζεται η τοξική ουσία, αυτή συσσωρεύεται στον οργανισμό και προκαλεί χρόνια αποτελέσματα (Rand and Petrocelli, 1985).

3.11 Μέθοδοι εκτίμησης τοξικότητας

Για την εκτίμηση της τοξικότητας εφαρμόζονται δύο κυρίως πρωτόκολλα, τα οποία είναι α) η μέθοδος εκτίμησης τοξικότητας σύμφωνα με το πρωτόκολλο ASTM(1993) και β) η μέθοδος εκτίμησης τοξικότητας σύμφωνα με το πρωτόκολλο OECD(1981).

3.11.1 Μέθοδος εκτίμησης τοξικότητας σύμφωνα με το πρωτόκολλο ASTM (1993)

Η μέθοδος εκτίμησης τοξικότητας σύμφωνα με το πρωτόκολλο του ASTM, είναι μία στατιστική μέθοδος εκτίμησης τοξικότητας και διαρκεί 96-h, (4 ημέρες). Τα πειράματα 96-h με άλγη δίνουν πληροφορίες για την τοξικότητα των ουσιών στην υδατική χλωρίδα και πανίδα και μπορούν να επιδείξουν αν μεγαλύτερα πειράματα είναι απαραίτητα.

Τα αποτελέσματα της τοξικότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την σύγκριση ευαισθησίας που έχουν δύο ειδών άλγη, την τοξικότητα διαφορετικών υλικών στα άλγη και τις επιπτώσεις που έχουν οι διάφοροι περιβαλλοντικοί παράμετροι στα αποτελέσματα τέτοιων πειραμάτων.

Επίσης με τα αποτελέσματα τέτοιων πειραμάτων διεξάγονται συμπεράσματα σε ότι αφορά την επίπτωση διάφορων ουσιών στους υδατικούς οργανισμούς και στο να διεξαχθούν κριτήρια ποιότητας του νερού για τους υδατικούς οργανισμούς.

3.11.2 Μέθοδος εκτίμησης τοξικότητας σύμφωνα με το πρωτόκολλο OECD (1981)

Κατά το πρωτόκολλο αυτό, ένα είδος μονοκύτταρων πράσινων αλγών χρησιμοποιείται ως ένα πρότυπο σύστημα με το οποίο αρχικά υπολογίζουμε τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας η οποία μπορεί να επηρεάσει την πρωτογενή παραγωγικότητα των φυτών. Επειδή η περίοδος των γενεών για τα άλγη μετριέται σε ώρες, αυτή η σχετικά μικρή δοκιμή μπορεί να εκτιμήσει τα αρχικά συμπτώματα στους οργανισμούς από μικρού μήκους εκθέσεις και να δώσουν μια ένδειξη για τις επιπτώσεις στα πράσινα άλγη.

3.12. Τοξικότητα των εξεταζόμενων ουσιών

Όσον αφορά την τοξικότητα του χαλκού, ο άνθρωπος αντέχει σε σχετικά μεγάλες ποσότητες χαλκού χωρίς επιπτώσεις στην υγεία του, έχοντάς τον χρησιμοποιήσει ακόμα και σε διάφορες θεραπείες (χρησιμοποιείται σαν εμετικό).

Για να αξιολογηθεί ο κίνδυνος που προκαλείται από τα υφαλοχρώματα έγιναν αρκετά πειράματα χρησιμοποιώντας τα πιο τοξικά συστατικά των υφαλοχρωμάτων. Σε ένα

από αυτά χρησιμοποιήθηκαν το Irgarol 1051, ο χαλκός και το TBTO, πάνω στον σημαντικά για εμπορικούς λόγους, βακαλάο. Βρέθηκε ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις χαλκού και TBT (11,5 $\mu\text{g Cu/l}$ και 5 $\mu\text{g TBTO/l}$) η θνησιμότητα των μικρών σε ηλικία βακαλάων αυξήθηκε. Αντίθετα με την υψηλότερη συγκέντρωση του Irgarol 1051 (40 $\mu\text{g/l}$) δεν υπήρχε καμιά σημαντική αύξηση της θνησιμότητας. Ακόμα παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχαν ούτε συνεργιστικά ούτε ανταγωνιστικά φαινόμενα μεταξύ των τριών αυτών ουσιών στα ψάρια με τα οποία έγιναν τα πειράματα. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις όμως, όπως αυτές που υπάρχουν στα ρυπασμένα νερά των λιμανιών (TBTO από 0,1 μέχρι 0,2 $\mu\text{g/l}$ και Cu περίπου στα 3 $\mu\text{g/l}$), δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στην θνησιμότητα των ψαριών (συμπεριλαμβανομένων και των αρχικών σταδίων ανάπτυξης τους). Επομένως δεν αναμένεται να προκληθούν προβλήματα στην ανάπτυξη των ψαριών, με τις ήδη υπάρχουσες γνωστές συγκεντρώσεις των τοξικών ουσιών των υφαλοχρωμάτων, στις θάλασσες (Granmo, 2002).

Σε άλλου είδους έρευνες παρατηρήθηκε ότι η αυξημένη συγκέντρωση του χαλκού στα δίκτυα των ιχθυοκαλλιεργειών σολομού, από τις ουσίες που χρησιμοποιούνται κατά της απόθεσης οργανισμών πάνω σε αυτά, επηρεάζει την αμοιβαδική ασθένεια βραγχίων των σολομών και είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για αυτούς (Douglas-Helders, 2002).

Βρέθηκε ακόμα ότι ορισμένα υφαλοχρώματα με βάση το χαλκό (πυριθιόνη χαλκού CPT) έχουν διαφορετική δράση ανάλογα με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες δρουν. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε στα φιόρδ του Roskilde της Δανίας, για το φυτοπλαγκτόν της περιοχής αυτής. Η χρονική διάρκεια της έρευνας αφορούσε την χρονική περίοδο από τον Μάρτιο μέχρι τον Αύγουστο όπου οι φυτοπλαγκτονικές κοινότητες παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις στον πληθυσμό τους και στα είδη τους. Τα συμπεράσματα που βγήκαν ανέφεραν ότι η τοξική δράση ήταν ανάλογη με τις διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων των φωσφορικών αλάτων στα κύτταρα. Έτσι σε μικρές συγκεντρώσεις φωσφορικού άλατος στα κύτταρα των φυτοπλαγκτονικών οργανισμών, η τοξική δράση της πυριθιόνης χαλκού ήταν αρκετά μεγάλη, ενώ αντίθετα σε μεγάλες συγκεντρώσεις φωσφορικών αλάτων, μειωνόταν αρκετά. Αυτό γίνεται γιατί τα ιόντα του χαλκού έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν τα φωσφορικά άλατα μέσα από τα κύτταρα και να αποβάλλονται από αυτά μαζί με τις πρωτεΐνες. Έτσι οι μεγάλες συγκεντρώσεις φωσφορικών αλάτων δημιουργούν συνθήκες ενάντια της τοξικότητας του χαλκού κατά την φωτοσύνθεση (Maraldo and Dahllöf, 2004).

4. ΦΥΤΟΠΛΑΓΚΤΟΝ

4.1 Εισαγωγή

Από τους κυριότερους οργανισμούς που συνέβαλλαν στην εξέλιξη της ζωής πάνω στον πλανήτη είναι οι οργανισμοί που αποτελούν το φυτοπλαγκτόν. Ανεξάρτητα από την κατηγορία στην οποία ανήκουν (προκαρυωτικοί οργανισμοί, μικροφύκη, κτλ), έχουν διαδραματίσει ουσιαστικό ρόλο στην εξέλιξη και τη διατήρηση της ζωής στον πλανήτη μας. Μετατρέποντας την ηλιακή ενέργεια σε χημική, την κάνουν διαθέσιμη για ένα μεγάλο αριθμό οργανισμών που την έχουν ανάγκη ως τροφή, αποτελώντας όμως και τα ίδια βάση της τροφικής αλυσίδας στη θάλασσα. Παράλληλα το οξυγόνο που παράγουν χρησιμοποιείται από άλλους οργανισμούς που ζουν στην θάλασσα, καθώς και στην ξηρά.

Από τα παραπάνω εύκολα συμπεραίνεται η χρησιμότητα του φυτοπλαγκτού σε όλες τις περιοχές και το σημαντικό ρόλο τον οποίο παίζει στις θαλάσσιες βιοκοινότητες. Γι' αυτό κρίνεται απαραίτητη η προστασία του από οποιαδήποτε μορφή ρύπανσης και μόλυνσης ώστε να διατηρείται η ισορροπία στο θαλάσσιο οικοσύστημα.

4.2 Φυτοπλαγκτόν

Το φυτοπλαγκτόν αποτελείται από πλαγκτονικούς οργανισμούς οι οποίοι είναι κυρίως μικροσκοπικοί φυτικοί οργανισμοί που έχουν την ικανότητα να φωτοσυνθέτουν, δηλαδή να παράγουν οργανικές ενώσεις από ανόργανες με την βοήθεια της ηλιακής ενέργειας (Κουτσούμπας 2003). Οι μικροοργανισμοί αυτοί ζουν ελεύθεροι στο νερό και εξαιτίας της περιορισμένης ικανότητας τους για κίνηση, μεταφέρονται από τις διάφορες μορφές κινήσεως του νερού στο οποίο βρίσκονται. Φυτοπλαγκτονικοί οργανισμοί είναι τα μικροφύκη, τα κυανοβακτήρια και τα πράσινα χλωροφύκη (green algae) (Levinton, 1995).

Οι οργανισμοί που αποτελούν το φυτοπλαγκτόν παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία και διαφορετικούς αναπαραγωγικούς μηχανισμούς, αλλά έχουν όλοι τους ίδιους βιοχημικούς μηχανισμούς. Για παράδειγμα όλοι τους φωτοσυνθέτουν με χλωροφύλλη α, και τα τελικά προϊόντα αφομοίωσης τους είναι υδατάνθρακες και πρωτεΐνες.

4.2.1 Μικροφύκη

Τα μικροφύκη είναι απλοί υδρόβιοι οργανισμοί οι οποίοι δεν έχουν τους εξειδικευμένους ιστούς που έχουν τα ανώτερα φυτά, και είναι κυρίως φωτοσυνθετικοί οργανισμοί. Τα κύτταρά τους έχουν οργανίδια που περιβάλλονται από μεμβράνες. Το χρώμα τους εξαρτάται από την συγκέντρωση και το είδος των χρωστικών που περιέχουν. Τη φωτοσύνθεση την επιτυγχάνουν με τους χλωροπλάστες. Αυτά είναι μικρά πράσινα, καφέ ή κόκκινα οργανίδια με στρώματα εσωτερικών μεμβρανών. Έτσι παράγουν οργανικές ενώσεις, όπως σάκχαρα, από ανόργανες ενώσεις με την βοήθεια της ηλιακής ενέργειας (μετατροπή ηλιακής ενέργειας σε χημική) (Castro and Huber, 1999).

Με αυτόν τον τρόπο έχουν διαδραματίσει ουσιαστικό ρόλο στην εξέλιξη και διατήρηση της ζωής στον πλανήτη μας, τόσο για την παραγωγή οξυγόνου όσο και για την διατήρηση της τροφικής αλυσίδας. Το οξυγόνο που παράγουν χρησιμοποιείται από άλλους οργανισμούς που ζουν στον ωκεανό καθώς και στην ξηρά.

Οι βιολόγοι κατατάσσουν συνήθως τα μικροφύκη μαζί με τα φυτά. Πολλά όμως μικροφύκη εμφανίζουν χαρακτηριστικά ζώων. Όπως για παράδειγμα μερικά κολυμπούν κινώντας το μαστίγιο τους. Ο διαχωρισμός γίνεται ακόμα πιο δύσκολος αφού μερικά είδη φωτοσυνθέτουν όπως τα φυτά ενώ άλλα παρόμοια κινούνται και τρώνε τροφή όπως τα ζώα. Έτσι ο διαχωρισμός τους σε κατηγορίες είναι πολύ δύσκολος και για αυτόν τον λόγο έγινε μια ομαδοποίηση των μονοκύτταρων μορφών σε ξεχωριστή κατηγορία, τα πρώτιστα. (Castro and Huber, 1999).

Ένα από τα κυριότερα είδη των μικροφύκων είναι τα διάτομα (Diatoms). Είναι μονοκύτταροι οργανισμοί, αλλά πολλές φορές συνδέονται μεταξύ τους δημιουργώντας αλυσίδες ή αστερόμορφους σχηματισμούς. Αποτελούν συνήθως το κύριο μέρος του πλαγκτού και είναι οι πιο σημαντικοί πρωτογενείς παραγωγοί των ψυχρών νερών της ανοικτής θάλασσας αφού είναι τα ίδια τροφή για τους άλλους οργανισμούς, και παράγουν οξυγόνο φωτοσυνθέτοντας. Τα κυτταρικά τους τοιχώματα έχουν ως κύριο συστατικό το διοξείδιο του πυριτίου μια χημική ένωση που μοιάζει με γυαλί, σχηματίζοντας έτσι γυάλινα όστρακα. Οι υαλώδεις θήκες των νεκρών διατόμων είναι πολύ ανθεκτικές στην αποσύνθεση και αποθέτονται στο βυθό της θάλασσας σχηματίζοντας παχιές αποθέσεις πυριτικού υλικού οι οποίες καλύπτουν μεγάλες εκτάσεις του βυθού. Αυτές είναι γνωστές και ως ιλύς διατόμων (Castro and Huber, 1999). Σημαντική κατηγορία μικροφυκών είναι και τα δινομαστιγωτά (Dinoflagellates). Αποτελούν μια μεγάλη ομάδα πλαγκτονικών, μονοκύτταρων οργανισμών,

πολύ σημαντική για την οικονομία των ωκεανών. Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η παρουσία δύο άνισων μαστιγίων, το ένα περιελιγμένο, στο κύτταρο μέσα σε μια αύλακα και το άλλο ελεύθερο. Το μαστίγιο αυτά κατευθύνουν την κίνηση, πρακτικά προς κάθε κατεύθυνση. Βρίσκονται κυρίως στις θάλασσες και συνήθως στις τροπικές περιοχές. Μερικά χαρακτηρίζονται από εκπομπή φωτός, ενώ άλλα είναι στενά συνδεδεμένα με διάφορα θαλάσσια ζώα και ιδιαίτερα με κοράλλια που σχηματίζουν υφάλους (Castro and Huber, 1999).

Άλλες κατηγορίες μικροφύκων που βρίσκονται σε αφθονία σε ορισμένες θάλασσες είναι:

- τα πυριτιομαστιγωτά (Silicoflagellates) που χαρακτηρίζονται από ένα αστερόμορφο εσωτερικό σκελετό φτιαγμένο από πυρίτιο και ένα μαστίγιο (Castro and Huber, 1999).
- τα κοκκολιθοφόρα (Coccolithophores) που έχουν μαστίγιο και σφαιρικά κύτταρα που καλύπτονται από ασβεστολιθικές κατασκευές σχήματος κουμπιού και ονομάζονται κοκκόλιθοι (Castro and Huber, 1999).
- και οι κρυπτομονάδες (Cryptomonad Flagellates) που έχουν δυο μαστίγια αλλά στερούνται σκελετού. Τα μέλη αυτής της ομάδας είναι τόσο μικρά που εκατοντάδες από αυτά μπορούν να χωρέσουν στον όγκο ενός μεγάλου διατόμου ή ενός κυττάρου δινομαστιγωτού (Castro and Huber, 1999).

4.2.2 Κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια είναι από τους πιο πρωτόγονους φυτόμορφους οργανισμούς. Πρόκειται για προκαρυωτικούς οργανισμούς που μπορούν να φωτοσυνθέσουν. Εκτός από την χλωροφύλλη περιέχουν και μια υποκυανή χρωστική ουσία την φυκοκυανίνη, από την οποία πήραν και την ονομασία τους. Τα περισσότερα κυανοβακτήρια είναι μικροσκοπικά, αν και μερικά σχηματίζουν επιμήκη νήματα, ταινίες, ή χοντρές κρούστες ορατές με γυμνό μάτι. Αρκετοί βιολόγοι τα θεωρούν βακτήρια, εξαιτίας της προκαρυωτικής κυτταρικής οργάνωσης και γι' αυτόν τον λόγο τα ονομάζουν κυανοβακτήρια (Castro and Huber, 1999).

Πιστεύεται ότι ήταν οι πρώτοι από τους πρώτους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς στη γη και ότι συνέβαλαν ουσιαστικά στη συσσώρευση του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα. Απολιθώματα από κυανοβακτήρια που έχουν βρεθεί, εκτιμώνται ότι έχουν ηλικία τριών δισεκατομμυρίων ετών.

Η φωτοσύνθεση τους λαμβάνει χώρα στις πτυχωμένες μεμβράνες των κυανοβακτηρίων, αντί στους χλωροπλάστες όπως συμβαίνει στα ευκαριωτικά φυτά. Έχουν

όμως αρκετές ομοιότητες με τους πολύπλοκους πρωτογενείς φωτοσυνθετικούς οργανισμούς όπως τα φύκη διότι χρησιμοποιούν τον ίδιο τύπο χλωροφύλλης α και απελευθερώνουν αέριο οξυγόνο (Castro and Huber, 1999).

4.2.3 Χλωροφύκη

Τα χλωροφύκη που ανήκουν στους φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς είναι μονοκύτταροι οργανισμοί και ανήκουν στην κατηγορία των μακροφυκών.

Είναι μονοκύτταρα ή νηματοειδή και πολλά από αυτά είναι μικροσκοπικά. Έχουν από ένα ως τέσσερα μαστίγια, τα οποία τα χρησιμοποιούν για να κολυμπούν. Οι χρωστικές όμως και οι αποθηκευμένες ουσίες που περιέχουν είναι ίδιες με αυτές των ανώτερων φυτών, γι' αυτό πιστεύεται ότι τα φυτά της ξηράς εξελίχθηκαν κατευθείαν από τα χλωροφύκη, όμοια με αυτά που βλέπουμε σήμερα. Η χλωροφύλλη που περιέχουν δεν επικαλύπτεται από άλλες χρωστικές και έτσι παρουσιάζονται με ανοικτό πράσινο χρώμα (Castro and Huber, 1999).

Τα χλωροφύκη συνήθως συναντώνται σε χερσαία περιβάλλοντα. Μόνο το 10% περίπου των γνωστών 7.000 ειδών είναι θαλάσσια. Αλλά και στη θάλασσα έχουν μεγάλη παρουσία ιδίως σε περιβάλλοντα με ευρείες μεταβολές της αλατότητας, ειδικότερα αργά το καλοκαίρι και το φθινόπωρο. Τέτοια είναι οι κόλποι και οι εκβολές των ποταμών καθώς και οι απομονωμένες παλιρροιακές υδατοσυλλογές σε βραχώδεις περιοχές. Είναι όμως πολύ περισσότερο σημαντικοί στο βένθος της θάλασσας και επικρατούν έναντι των άλλων φυκών σε αμμώδεις παλιρροιακές περιοχές (Levinton, 1995).

4.3 *Dunaliella tertiolecta*

Στην παρούσα εργασία για τη διεξαγωγή των πειραμάτων τοξικότητας χρησιμοποιήθηκε το χλωροφύκος *Dunaliella tertiolecta*.

Η *Dunaliella tertiolecta* είναι χλωροφύκος (green algae) και ανήκει στην οικογένεια των *Polyblepharidaceae* της τάξης των *Volvocales*. Η τάξη των *Volvocales* περιλαμβάνει μονοκύτταρα φύκη τα οποία κινούνται με την βοήθεια των μαστιγίων που έχουν. Με αυτόν τον τρόπο κινούνται προς το φως συγκεκριμένου μήκους κύματος και έντασης.



Σχήμα 4.1 Φωτογραφία της *Dunaliella tertiolecta*

(πηγή: http://www.bio.utexas.edu/research/utex/photogallery/d-l/Dunaliella_tertiolecta_999.htm)

Η *Dunaliella tertiolecta* έχει σχήμα ωοειδές και έχει δύο μαστίγια τα οποία τα χρησιμοποιεί για την κίνηση της μέσα στο νερό. Το κύτταρο της καταλαμβάνει όγκο περίπου $227 \mu\text{m}^3$ και έχει μήκος 6 με 9 μm . Φωτογραφία της *Dunaliella tertiolecta* παρουσιάζεται στο σχήμα 4.1.

Αναπαράγεται με σχάση του μητρικού κυττάρου ή με τη σύντηξη δύο γαμετών. Βρίσκεται συνήθως σε θαλασσινά νερά και έχει χαρακτηριστεί ως «πρωταθλητής της ωσμωρρύθμισης». Αυτό το πετυχαίνει μεταβάλλοντας την ποσότητα της γλυκερόλης που περιέχει μέσα στο κύτταρο της ώστε να διατηρεί οσμωτική ισορροπία με το υγρό που την περιβάλλει. Έτσι μπορεί να επιβιώνει από σχεδόν γλυκά νερά μέχρι και υπέραλα τα οποία παρουσιάζουν εννιά φορές υψηλότερη αλατότητα από εκείνη των θαλασσινών νερών. Στις μεγάλες τιμές αλατότητας, το μεγαλύτερο μέρος του όγκου του κυττάρου της καταλαμβάνεται από την γλυκερόλη.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια εκτίμησης της οξείας τοξικότητας των ουσιών DCPU και Cu. Παράλληλα έγινε προσπάθεια να εξεταστεί ο συνδυασμένη τοξική δράση του diuron και του Cu, καθώς και DCPMU με diuron. Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα ήταν η *Dunaliella tertiolecta*.

Για την εκτίμηση της τοξικότητας εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο του OECD (1981) με κάποιες τροποποιήσεις. Παρακάτω περιγράφεται η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε.

5.2 Υλικά

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν, για τη διεξαγωγή των πειραμάτων τοξικότητας, είναι οι εξής:

- Πρότυπη ουσία Diuron, αναλυτικής καθαρότητας 99%, (Dr Ehrenstorfer, Γερμανία).
- Πρότυπη ουσία DCPMU αναλυτικής καθαρότητας 99%, (Dr Ehrenstorfer, Γερμανία).
- Για κάθε οργανική ουσία παρασκευάστηκε πυκνό διάλυμα, συγκέντρωσης $1,979 \cdot 10^6$ $\mu\text{g/l}$ για τη DCPMU και $1,406 \cdot 10^6$ $\mu\text{g/l}$ για το diuron σε ακετόνη.
- Διάλυμα Cu 10^6 $\mu\text{g/l}$ από την Merck

Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου χρησιμοποιήθηκε υπερκαθαρό νερό που παράγεται στο εργαστήριο (με τη συσκευή Milli-Ro/Milli-Q της MilliPore, USA).

Το χλωροφύκος (*Dunaliella tertiolecta*) ήταν προσφορά του εργαστηρίου Θαλάσσιας Βιολογίας και Οικολογίας, του Τμήματος Επιστημών της Θάλασσας του Πανεπιστημίου Αιγαίου.

5.3 Μέθοδοι καλλιέργειας

Ο φυτοπλαγκτονικός οργανισμός (*Dunaliella tertiolecta*) καλλιεργήθηκε σε σφαιρικές φιάλες χωρητικότητας 250 ml. Η κάθε φιάλη της καλλιέργειας περιείχε 95 ml θρεπτικού μέσου και 5 ml μικροοργανισμών και διατηρούνταν σε επωαστικό θάλαμο συνεχούς φωτισμού 3000 Lux με σταθερή θερμοκρασία 20 °C.

Καθημερινά γινόταν χειρωνακτική ανάδευση των σφαιρικών φιαλών μέσα στο θάλαμο ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση κυττάρων στον πυθμένα των φιαλών.

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια του φυτοπλαγκτονικού οργανισμού λέγεται Medium f. Η σύστασή του φαίνεται στον πίνακα 5.1:

Πίνακας 5.1 Σύσταση Medium f

Θρεπτικά	Παραγωγή Medium	Για το Medium f
NaNO ₃	15 gr/100 ml	20 ml
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1,77gr/100 ml	10 ml
EDTA (Fe)	2 gr/100 ml	10 ml
Na ₂ SiO ₃ 5H ₂ O	2,3 gr/100 ml	20 ml
Μέταλλα	Παραγωγή Medium	Για το Medium f
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,144gr/100ml	5 ml
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,0078gr/100ml	5 ml
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,0176gr/100ml	5 ml
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,008gr/100ml	5 ml
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,005gr/100ml	5 ml

5.3.1 Παρασκευή θρεπτικού μέσου ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml τοποθετήθηκαν οι κατάλληλες ποσότητες των αλάτων και προστέθηκε απιονισμένο νερό στην ογκομετρική, μέχρι να συμπληρωθεί ο όγκος των 100 ml.

Στην πράξη χρησιμοποιήθηκε αραιώση f/2. Για την παρασκευή του Medium f/2 αραιώθηκαν 2,5 ml medium f σε 1 lit φιλτραρισμένου γηρασμένου θαλασσινού νερού.

5.3.2 Σύσταση βιταμινών για την ανάπτυξη του φυτοπλαγκτονικού οργανισμού

Στις καλλιέργειες εκτός από θρεπτικό μέσο προστίθεται και βιταμίνες Η σύσταση των οποίων είναι η εξής:

- Βιοτίνη (0.05 g/200 ml)

- Υδροχλωρική Θειαμίνη (1 g/100 ml)
- B₁₂ (0,05 g/100 ml)

Για την παρασκευή μίγματος βιταμινών χρησιμοποιήθηκαν 2 ml Βιοτίνης, 10 ml Υδροχλωρικής Θειαμίνης και 1 ml B₁₂ (σύνολο 13 ml). Οι όγκοι αυτοί τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη χωρητικότητας 100 ml και προστέθηκαν 87 ml απιονισμένου νερού.

5.4 Προετοιμασία καλλιιεργειών

Το θρεπτικό μέσο τοποθετήθηκε σε σφαιρικές φιάλες χωρητικότητας 250 ml. Το άνοιγμα των σφαιρικών φιαλών καλύφθηκε με πώματα από υδρόφοβο βαμβάκι και έπειτα με αλουμινόχαρτο και αποστειρώθηκε σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης στους 120 °C για 20 min. Η αποστείρωση αυτή έγινε τουλάχιστον 24 ώρες πριν από τον εμβολιασμό με τα μικροφύκη έτσι ώστε να έρθει σε ισορροπία το CO₂ του αέρα μέσα και έξω από τις φιάλες.

Ο εμβολιασμός των καλλιιεργειών έγινε με πιπέττα Transferpette της εταιρίας Brand στην οποία τοποθετήθηκαν αποστειρωμένα ρύγχι μιας χρήσης. Ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε καλλιέργεια αμέσως μετά τον εμβολιασμό ήταν περίπου 40.000 cells/ml. Ο εμβολιασμός των καλλιιεργειών έγινε από προκαλλιέργειες, οι οποίες βρίσκονταν στην εκθετική φάση της ανάπτυξής τους και άρχισαν να προετοιμάζονται τέσσερις μέρες νωρίτερα. Προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν βρέθηκε ότι τα μικροφύκη βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης την τέταρτη μέρα μετά από την ανανέωση.

Αρχικά λοιπόν γινόταν προσθήκη μιας σταγόνας βιταμινών σε κάθε σφαιρική που περιείχε 95 ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου και στη συνέχεια προσθέτονταν η προκαλλιέργεια. Στο τέλος οι καλλιέργειες τοποθετούταν σε επωαστικό θάλαμο.

5.5 Προετοιμασία συγκεντρώσεων τοξικών ουσιών

Αρχικά ζυγίστηκαν κατάλληλες ποσότητες πρότυπων ουσιών σε ακετόνη για τη δημιουργία πυκνών διαλυμάτων. Από τα διαλύματα αυτά με κατάλληλη αραιώση παρασκευάζονταν τα διαλύματα εργασίας. Ο υπολογισμός της επιθυμητής συγκέντρωσης γινόταν με τη βοήθεια του τύπου $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$.

Στην περίπτωση του διαλύματος του χαλκού που προστέθηκε, δεν χρειάστηκε η προσθήκη της ακετόνης για την παρασκευή του διαλύματος, επειδή ο χαλκός σαν ανόργανη ουσία δεν διαλύεται στην ακετόνη.

5.6 Πειραματικά στάδια

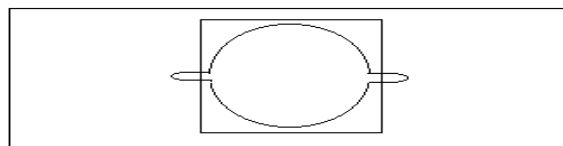
Πραγματοποιήθηκαν οι εξής βιοδοκιμές στη *Dunaliella tertiolecta*:

- Προσδιορισμός του εύρους των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων της DCPMU .
- Προσδιορισμός του εύρους των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων του Cu.
- Εκτίμηση της EC_{50} της DCPMU (εις διπλούν).
- Εκτίμηση της EC_{50} του Cu (εις διπλούν).
- Εξέταση της συνδυασμένης τοξικής δράσης DCPMU – Diuron (εις διπλούν).
- Εξέταση της συνδυασμένης τοξικής δράσης Diuron - Cu (εις διπλούν).
- Εξέταση της συνδυασμένης τοξικής δράσης DCPMU - Cu (εις διπλούν).

Όλες οι βιοδοκιμές είχαν διάρκεια 4 ημερών, με μηδενική χρονική στιγμή την ημέρα του εμβολιασμού και της προσθήκης της τοξικής ουσίας. Καθημερινά (ακριβώς κάθε 24 ώρες) λαμβανόταν δείγμα και μετρούταν ο κυτταρικός αριθμός των μικροοργανισμών.

5.7 Μέτρηση κυτταρικού αριθμού

Η μέτρηση του κυτταρικού αριθμού έγινε με τη βοήθεια μικροσκοπίου και φακού PL Fluotar L25/0.35, 6.30/0.20, ολικής μεγέθυνσης x400 και κυβέτας Palmer – Maloney διαμέτρου 18mm, βάθους 0,45 mm και όγκου 0,1ml (Palmer – Maloney, 1945). Η κυβέτα Palmer-Maloney παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.1.



κυβέτα Palmer-Maloney

Σχήμα 5.1 Χαρακτηριστικά κυβέτας Palmer-Maloney

Καθημερινά, λαμβανόταν δείγμα (1 ml) από τις καλλιέργειες, με πιπέττα στην οποία τοποθετούνταν αποστειρωμένα ρύγχη μιας χρήσης. Το δείγμα της καλλιέργειας τοποθετούταν σε φιαλίδιο, όπου και γινόταν η θανάτωση των κυττάρων με την προσθήκη μιας σταγόνας διαλύματος Lugol αραιωμένο με γηρασμένο θαλασσινό νερό (αναλογία 0,5/100).

Η σύσταση του Lugol, το οποίο πρέπει να αποθηκεύεται σε σκούρου χρώματος μπουκάλια, είναι:

- 10 g καθαρού ιωδίου
- 20 g ιωδιούχου καλίου
- 20 g παγώμορφου οξικού οξέος
- 200 ml απιονισμένο νερό

Το δείγμα πάνω στην κυβέτα αφήνονταν σε ηρεμία για 2 min περίπου ώστε να κατακαθίσουν όλα τα κύτταρα και ακολουθούσε καταμέτρηση του κυτταρικού αριθμού στις εννιά περιοχές του μικροσκοπίου.

Η μέτρηση κάθε δείγματος γινόταν σε τόσες περιοχές ώστε ο συνολικός αριθμός κυττάρων να είναι ≥ 400 οπότε και το σφάλμα της μέτρησης να είναι 10 %. Στον πίνακα 5.2 δίνονται οι συντεταγμένες και ο πολλαπλασιαστικός παράγοντας για κάθε μια από τις εννιά περιοχές στις οποίες γινόταν η μέτρηση του κυτταρικού αριθμού.

Ο αριθμός των κυττάρων της κάθε μέτρησης πολλαπλασιαζόταν με τον αντίστοιχο παράγοντα, ανάλογα με τον αριθμό των περιοχών στις οποίες γινόταν η μέτρηση έτσι ώστε να υπολογιστεί αρχικά ο αριθμός των κυττάρων που υπήρχαν στην κυβέτα και αυτός ο αριθμός διαιρούταν με 0,1, που είναι ο όγκος της κυβέτας έτσι ώστε να υπολογιστεί ο αριθμός κυττάρων/ml.

Πίνακας 5.2 Οι συντεταγμένες και ο πολλαπλασιαστικός παράγοντας των εννιά περιοχών στις οποίες γινόταν η μέτρηση του κυτταρικού αριθμού.

Περιοχές	Συντεταγμένες	Παράγοντας f(m)
1	135 57	1151
2	135 52	576
3	135 47	384
4	140 57	288
5	140 52	230
6	140 47	192
7	145 57	165
8	145 52	144
9	145 47	128

Ο ρυθμός ανάπτυξης k υπολογίστηκε στην εκθετική φάση ανάπτυξης από τον τύπο:

$$k = 3.322x\left(\frac{\log N_2 - \log N_1}{t_2 - t_1}\right),$$

όπου N_1 και N_2 είναι ο κυτταρικός αριθμός στους χρόνους $t_1=0$ h $t_2=96$ h αντίστοιχα. Η ποσοστιαία αναχαίτιση στην εκθετική φάση ανάπτυξης υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{αναχαίτιση} = 100x\left(\frac{k_{control} - k_{herbicide}}{k_{control}}\right),$$

Η εκτίμηση της EC_{50} , έγινε με εφαρμογή γραμμικής παλινδρόμησης στη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης σε συνάρτηση με τον χρόνο, με χρήση του προγράμματος Excel.

5.8 Προσδιορισμός συγκέντρωσης χλωροφύλλης

Για να γίνει αντιστοίχιση των αποτελεσμάτων που βρέθηκαν από την μέτρηση των μονοκυττάρων οργανισμών στο μικροσκόπιο μετρήθηκε η ποσότητα της χλωροφύλλης που είχαν στα κύτταρα τους, ώστε αναλογικά να εξακριβωθεί η ορθότητα των αποτελεσμάτων.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων λήφθηκαν δείγματα 2ml από τις σφαιρικές φιάλες την στιγμή που τοποθετήθηκαν οι μικροοργανισμοί ($t=0$) και στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας ($t= 96h$). Οι χρονικές στιγμές αυτές επιλέχθηκαν έτσι ώστε να παρατηρηθεί η μεταβολή της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης και κατά συνέπεια η μεταβολή του πληθυσμού των κυττάρων. Κατά την μηδενική μέρα τα δείγματα λήφθηκαν μόνο από τις καλλιέργειες αναφοράς.

Στην συνέχεια τα δείγματα για την διήθηση χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα της Millipore MF, membrane Filters 0,45HA). Το κάθε διηθητικό μέσο τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα των 10ml και αφού προστέθηκαν 5 ml διαλύματος ακετόνης (90% καθαρή ακετόνη, 10% υπερκαθαρό νερό) αναδεύτηκε έως ότου να διαλυθεί το φίλτρο. Αφού κλείστηκαν οι σωλήνες με τα πώματα τους ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση της ακετόνης, λόγω της πτητικότητας της, τοποθετήθηκαν τα δείγματα για 24 ώρες ακριβώς σε σκοτάδι στους -18 °C.

Μετά τις 24 ώρες τα δείγματα αποψύχθηκαν αφήνοντας τα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προστέθηκαν σε καθένα από αυτά άλλα 3ml του ίδιου με το παραπάνω διαλύματος ακετόνης και τοποθετήθηκαν σε συσκευή φυγόκεντρο για 30 λεπτά στις 2000rpm.

Η φυγόκεντρος που χρησιμοποιήθηκε είναι της MLW, μοντέλο T 52.2.

Αμέσως μετά την φυγοκέντρηση των δειγμάτων, όπου γίνεται ο διαχωρισμός της υγρής από την στερεή φάση του φίλτρου, τα δείγματα οδηγήθηκαν στο φθορισόμετρο όπου και έγιναν οι τελικές μετρήσεις.

Η συσκευή του φθορισίμετρου είναι της PERKIN ELMER, μοντέλο LS50B.

Η κάθε μέτρηση στο φθορισόμετρο βασίστηκε σε έξι ζεύγη τιμών μήκους κύματος εκπομπής διέγερσης. Τα έξι ζεύγη τιμών είναι: 432/667, 412/669, 430/655, 437/655, 463/652 και 451/633.

Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις επεξεργάστηκαν με ένα πρόγραμμα H/Y, που στηρίζεται στη γλώσσα προγραμματισμού Fortran, το οποίο μας παρουσιάζει την συγκέντρωση της χλωροφύλλης στα δείγματα σε $\mu\text{g/l}$.

5.9 Μέτρηση απωλειών του χαλκού

Παράλληλα με τις βιοδοκιμές που έγιναν για την εύρεση της τοξικότητας του χαλκού σε φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την εύρεση των τυχόν απωλειών του χαλκού λόγω προσρόφησης του στις γυάλινες επιφάνειες των σφαιρικών φιαλών κατά την διάρκεια των όποιων πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ο χαλκός. Οι απώλειες του χαλκού που πιθανώς να υπήρχαν θα οφείλονταν στην προσρόφηση του χαλκού στα γυάλινα τοιχώματα των σφαιρικών φιαλών.

Έτσι ταυτόχρονα με την διεξαγωγή των πειραμάτων τοξικότητας του χαλκού, χρησιμοποιήθηκαν δύο επιπλέον σφαιρικές φιάλες την κάθε φορά, οι οποίες περιείχαν μόνο θρεπτικό μέσο (95ml) και το διάλυμα χαλκού. Το πείραμα αυτό εκτελέστηκε δύο φορές (αντίστοιχα με δύο πειράματα τοξικότητας του χαλκού) με διαφορετικές συγκεντρώσεις χαλκού την κάθε φορά. Την πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/l}$ Cu ενώ την δεύτερη φορά χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 5000 $\mu\text{g/l}$ Cu. Οι σφαιρικές φιάλες παρέμειναν για το ίδιο χρονικό διάστημα (96h) και στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτός με τις σφαιρικές φιάλες των βιοδοκιμών.

Κατά τον εμβολιασμό των σφαιρικών φιαλών με τις τοξικές ουσίες την πρώτη μέρα του πειράματος καθώς και κατά την τελευταία μέρα του πειράματος, λήφθηκε δείγμα των

5ml από τις σφαιρικές φιάλες και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του χαλκού που υπήρχε σε αυτό με την βοήθεια της φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσρόφηση του χαλκού κατά τη διάρκεια των τεσσάρων ημερών ήταν αμελητέα και επομένως δεν μεταβάλλει την συγκέντρωση του σε βαθμό που να αλλοιώνει τα αποτελέσματα των πειραμάτων.

5.10 Τοξικότητα της ακετόνης

Σε προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε προηγούμενη έρευνα (Γατίδου, 2005) εξετάστηκε η τοξικότητα της ακετόνης στη *Dunaliella tertiolecta* ώστε να διαπιστωθεί η μέγιστη ποσότητα του διαλύτη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και η οποία δεν δημιουργεί κανένα πρόβλημα στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν στα πειράματα αυτά ήταν 20, 50, 80, 100 και 120 ml ακετόνης.

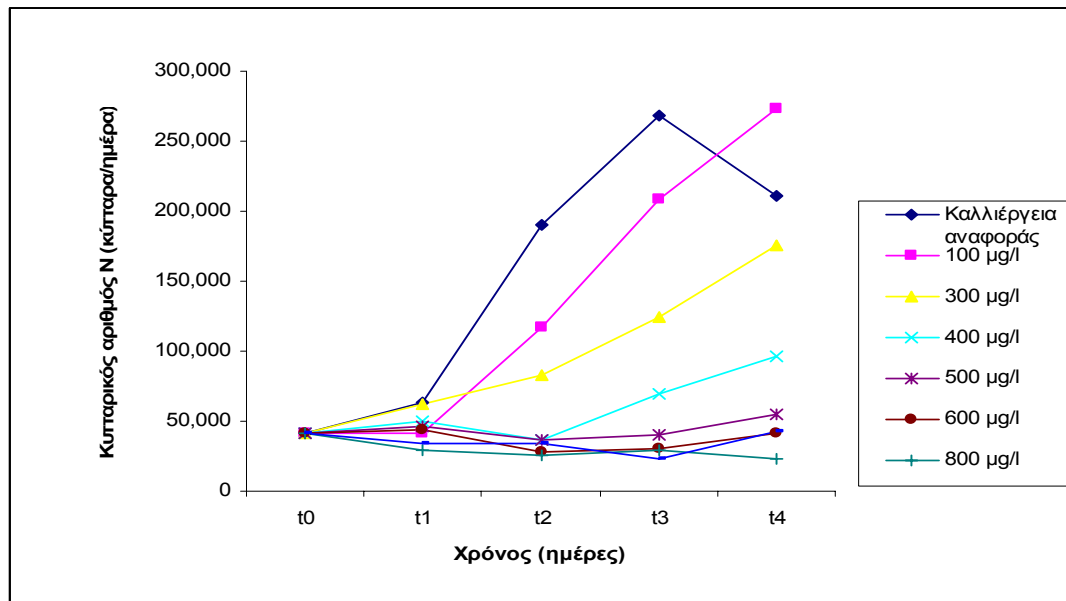
5.11 Προσδιορισμός του εύρους των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων

Πριν την έναρξη των πειραμάτων εκτίμησης της οξείας τοξικότητας της DCPMU και του Cu πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σκοπό να προσδιοριστεί το εύρος των συγκεντρώσεων που στη συνέχεια έπρεπε να εξεταστεί ώστε να προσδιοριστεί η τιμή της EC_{50} για κάθε ουσία. Στα πειράματα αυτά η DCPMU και ο Cu προστέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις με διαφορά τάξης μεγέθους. Το εύρος των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων μιας ουσίας θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ μιας συγκέντρωσης η οποία να μην επιφέρει καμία απολύτως αναχαίτιση στην ανάπτυξη των εξεταζόμενων μικροοργανισμών και μιας άλλης η οποία να αναχαίτζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε ποσοστό μεγαλύτερο από 50 %, όπως αναφέρει και το πρωτόκολλο του OECD (1981). Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στα συγκεκριμένα πειράματα κυμάνθηκαν από 0,1 έως 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ για τη DCPMU και από 0,05 έως 500 $\mu\text{g l}^{-1}$ για το Cu.

5.12 Εκτίμηση της οξείας τοξικότητας των εξεταζόμενων ουσιών

Ο προσδιορισμός της EC_{50} της κάθε ουσίας για τη *Dunaliella tertiolecta* πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της καμπύλης αναχαίτισης (%) – συγκέντρωσης.

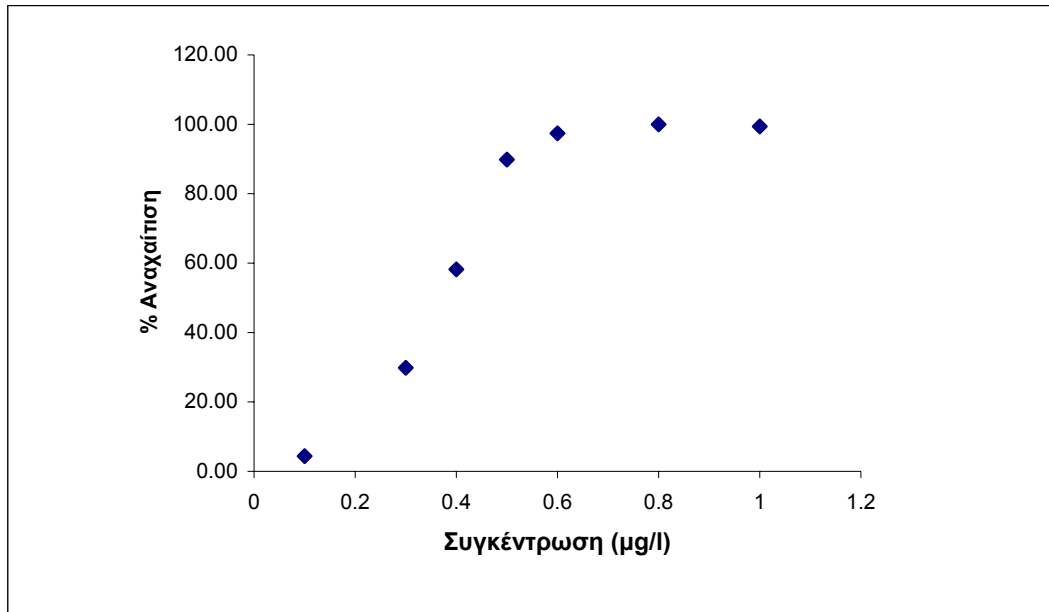
Στο Σχήμα 5.2 παρουσιάζεται ενδεικτικά ο κυτταρικός αριθμός N του μικροοργανισμού σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων της DCPMU.



Σχήμα 10.2 Ανάπτυξη της *Dunaliella tertiolecta* (κύτταρα/ημέρα) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων της DCPMU.

Μέσω του κυτταρικού αριθμού προσδιορίστηκε η % αναχαίτιση ανάπτυξης του μικροοργανισμού για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης των εξεταζόμενων ουσιών. Η γραφική παράσταση της % αναχαίτισης του ρυθμού ανάπτυξης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της τοξικής ουσίας ήταν σιγμοειδούς μορφής για όλες τις εξεταζόμενες ουσίες.

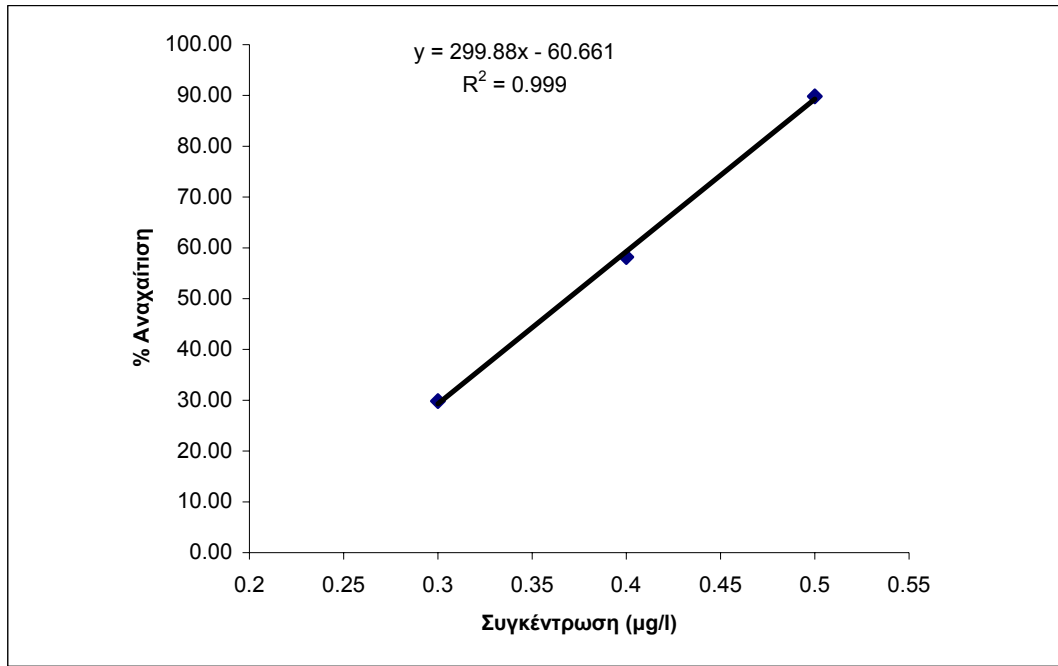
Στο Σχήμα 5.3 παρουσιάζεται ενδεικτικά η καμπύλη %αναχαίτισης – συγκέντρωσης της DCPMU για τη *Dunaliella tertiolecta*.



Σχήμα 5.3 Αναχαίτιση (%) του ρυθμού ανάπτυξης της *Dunaliella tertiolecta* εξαιτίας της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων της DCPMU.

Από την καμπύλη αναχαίτισης (%) – συγκέντρωσης της κάθε ουσίας, για κάθε μικροοργανισμό, δημιουργήθηκε μια δεύτερη καμπύλη η οποία περιλάμβανε μόνο τις συγκεντρώσεις εκείνες οι οποίες προκάλεσαν αναχαίτιση (%) του ρυθμού ανάπτυξης της *Dunaliella tertiolecta* σε ποσοστό που κυμάνθηκε από 16 έως 84 %. Με τον τρόπο αυτό από τη σιγμοειδή καμπύλη απομονώθηκε το ευθύγραμμο τμήμα της (Rand and Petroceli, 1985). Η τιμή της EC_{50} της κάθε ουσίας πάνω στους δύο μικροοργανισμούς προσδιορίστηκε από την εξίσωση της γραμμικής παλινδρόμησης του ευθύγραμμου αυτού τμήματος της καμπύλης αναχαίτισης (%) – συγκέντρωσης.

Στο σχήμα 5.4 παρουσιάζεται η καμπύλη αναχαίτισης (%) - συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της EC_{50} της DCPMU για τη *Dunaliella tertiolecta*.



Σχήμα 5.4 Εκτίμηση της EC50 για 96 h έκθεσης της *Dunaliella tertiolecta* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της DCPMU.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

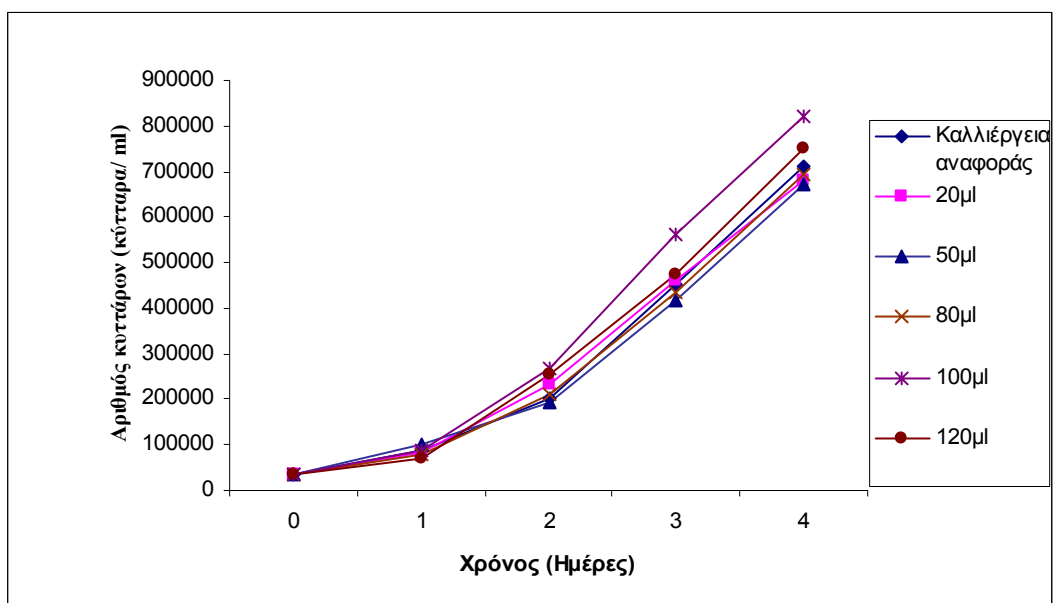
Στην εργασία αυτή έγινε αρχικά εκτίμησης της τοξικότητας του μεταβολίτη του diuron DCPMU και του Cu , στο χλωροφύκος *Dunaliella tertiolecta*. Στη συνέχεια εκτιμήθηκε η τοξικότητα των συνδυασμών της DCPMU με το diuron, του Cu με το diuron και του Cu με τη DCPMU στον ίδιο μικροοργανισμό.

Η εκτίμηση της τοξικότητας των δύο ουσιών, έγινε με τη βοήθεια του δείκτη EC_{50} , δηλαδή τη συγκέντρωση της τοξικής ουσίας που προκάλεσε 50% μείωση του ρυθμού ανάπτυξης της καλλιέργειας σε σχέση με την καλλιέργεια αναφοράς.

6.1 Επίδραση της Ακετόνης στην ανάπτυξη της *Dunaliella tertiolecta*

Σύμφωνα με τον OECD (1981), χημικές ουσίες με υδατοδιαλυτότητα μικρότερη από 1000 mg/l μπορεί να διαλυθούν σε κατάλληλο διαλύτη, η συγκέντρωση του οποίου δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,01% (v/v). Οι συγκεντρώσεις της ακετόνης που εξετάστηκαν δεν επηρέασαν την ανάπτυξη της *Dunaliella tertiolecta*. Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο, αλλά αναγκαίο να επιβεβαιωθεί, αφού οι συγκεντρώσεις της ακετόνης που εξετάστηκαν είναι κατά πολύ μικρότερες από αυτές που, όπως αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία, αναχαιτίζουν την ανάπτυξη φυτοπλακτονικών οργανισμών. Συγκεκριμένα οι Okamura et al., (2001) αναφέρουν ότι η ακετόνη δεν επηρεάζει την ανάπτυξη της *Dunaliella tertiolecta* σε συγκέντρωση πάνω από 10.000 mg/l. Για την εισαγωγή των χημικών ουσιών στις καλλιέργειες επιλέχθηκε ένας τελικός όγκος 50 μl του διαλύτη. Ο όγκος αυτός συμμορφώνεται και με τις συστάσεις της ASTM (American Society for Testing and Materials) σύμφωνα με τις οποίες η συγκέντρωση του διαλύτη στις καλλιέργειες κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων τοξικότητας δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,5 ml/l (ASTM, 1993).

Στο σχήμα 6.1 δίνονται οι καμπύλες ανάπτυξης για την καλλιέργεια αναφοράς και τις καλλιέργειες στις οποίες πραγματοποιήθηκε προσθήκη ακετόνης.



Σχήμα 6.1 Η επίδραση των διαφορετικών όγκων της ακετόνης στην ανάπτυξη της *Dunaliella tertiolecta*.

6.2. Εκτίμηση της τοξικότητας της DCPMU και του Cu στη *Dunaliella tertiolecta*.

6.2.1. Προσδιορισμός του εύρους των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων επίδρασης της DCPMU και του Cu στη *Dunaliella tertiolecta*.

Από τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων πειραμάτων συμπεραίνεται ότι το εύρος των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων της DCPMU για τον προσδιορισμό της EC_{50} , πρέπει να βρίσκεται μεταξύ των συγκεντρώσεων 100 και 1000 $\mu\text{g/l}$. Όσον αφορά στο Cu, η μεγαλύτερη από τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν στο πείραμα για τον προσδιορισμό των αποτελεσματικών συγκεντρώσεών του στο χλωροφύκος *Dunaliella tertiolecta* δεν κατάφερε να αναχαιτίσει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Δυστυχώς όμως λόγω του περιορισμένου χρόνου δεν ήταν δυνατή η επανάληψη του συγκεκριμένου πειράματος με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, με αποτέλεσμα μετά το συγκεκριμένο πείραμα να ακολουθήσουν τα πειράματα εκτίμησης της EC_{50} με τη χρήση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων Cu. Πάντως, από τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων ήταν δυνατή μια πρώτη εκτίμηση της αναμενόμενης τοξικότητας των υπό εξέταση ουσιών πάνω στη *Dunaliella tertiolecta*. Συγκεκριμένα, αναμένεται η EC_{50} των δύο ουσιών να διαφέρει τουλάχιστον κατά μία τάξη μεγέθους, με τη DCPMU να εμφανίζει τη μεγαλύτερη τοξικότητα στη *Dunaliella tertiolecta*.

6.2.2. Πειράματα εκτίμησης της οξείας τοξικότητας της DCPMU και του Cu στη *Dunaliella tertiolecta*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκτίμησης της οξείας τοξικότητας της DCPMU και του Cu πάνω στη *Dunaliella tertiolecta*, η DCPMU είναι πιο τοξική για το χλωροφύκος από το Cu. Στον Πίνακα 6.1. αναφέρονται οι EC_{50} της DCPMU και του Cu για τη *Dunaliella tertiolecta*.

Πίνακας 6.1. Οξεία τοξικότητα της DCPMU και του Cu στη *Dunaliella tertiolecta* εκφρασμένη ως μέση τιμή EC_{50} (mg/l) των δύο επαναλήψεων . Στις παρενθέσεις αναφέρονται οι τιμές της EC_{50} που προσδιορίστηκαν για τις δύο επαναλήψεις.

Ουσία	EC_{50} (μg /l)
DCPMU	340 (370 και 310)
Cu	9400 (10700 και 8100)

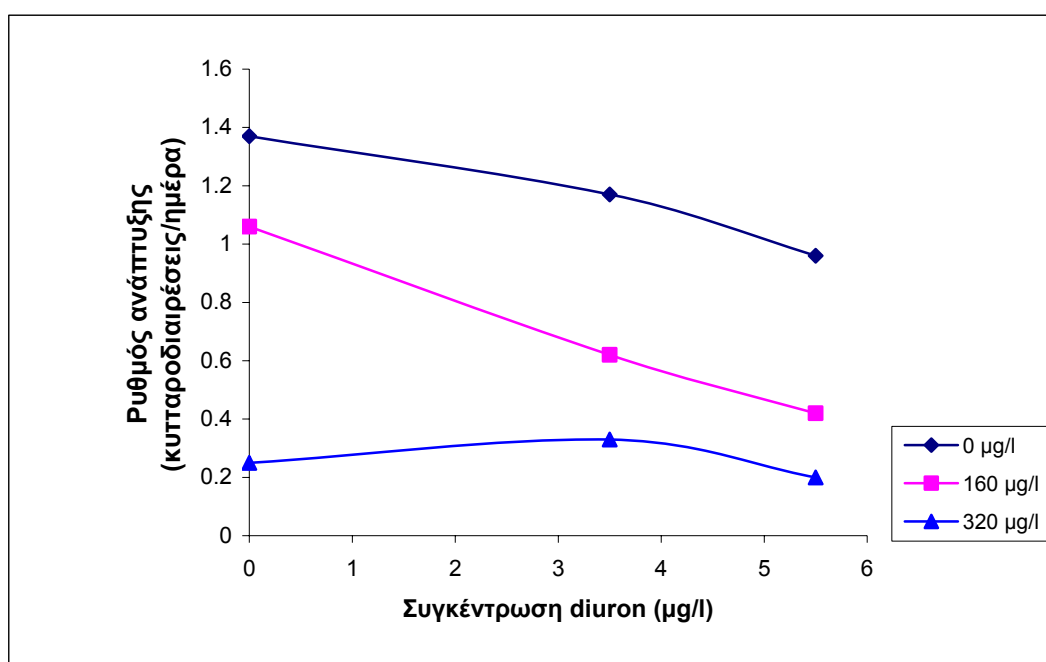
Η DCPMU αποδείχτηκε λιγότερο τοξική ουσία από το diuron, του οποίου αποτελεί μεταβολίτη, με EC_{50} των δύο ουσιών 340 μg/l και 5,9 μg/l αντίστοιχα (Γατίδου, 2005). Όπως προέκυψε από τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, ο Cu είναι λιγότερο τοξικός από τη DCPMU, με EC_{50} ίση με 9400 μg/l. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ο Cu προκάλεσε αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης του χλωροφύκου. Έχει άλλωστε αποδειχθεί ότι, για τους φυτικούς οργανισμούς, ο Cu αποτελεί απαραίτητο θρεπτικό ιχνοστοιχείο σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ είναι τοξικός σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (Bengtson-Nash et al., 2005). Σε δοκιμές τοξικότητας που πραγματοποίησαν οι Yan και Pan (2002) στους μικροοργανισμούς του γλυκού νερού *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella pyrenoidosa* και *Closterium lunula*, ο Cu ανέστειλε την ανάπτυξή τους κατά 50% σε συγκεντρώσεις 50, 68 και 200 μg/l αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές της EC_{50} είναι πολύ μικρότερες της EC_{50} που εκτιμήθηκε στην παρούσα εργασία. Επίσης σε πειράματα τοξικότητας του Cu που έγιναν με τη χρήση φυτοπλαγκτονικών οργανισμών του γλυκού νερού και της θάλασσας, παρατηρήθηκε αυξημένη ευαισθησία των μικροοργανισμών του γλυκού νερού στο Cu σε σχέση με τους θαλάσσιους μικροοργανισμούς (Bengtson-Nash et al., 2005). Οι συγκεκριμένοι ερευνητές καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι είναι πολύ πιθανό οι οργανισμοί του γλυκού νερού να

εμφανίζουν γενικά αυξημένη ευαισθησία στο Cu σε σχέση με τους θαλάσσιους οργανισμούς, δεδομένου ότι οι χημικές μορφές του Cu στο θαλασσινό νερό τον καθιστούν λιγότερο βιοδιαθέσιμο.

6.3. Εξέταση της συνδυασμένης τοξικής δράσης DCPMU-diuron, Cu-diuron και DCPMU-Cu

6.3.1 Συνδυασμός DCPMU-diuron.

Στο σχήμα 6.2 φαίνεται η τοξική επίδραση του diuron στη *Dunaliella tertiolecta* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων της DCPMU.



Σχήμα 6.2 Η τοξική επίδραση του diuron στη *Dunaliella tertiolecta* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων της DCPMU.

Στον πίνακα 6.2 δίνεται ο ρυθμός ανάπτυξης της *Dunaliella tertiolecta* που δέχθηκε την επίδραση του συνδυασμού των δύο τοξικών ουσιών, diuron και DCPMU, καθώς και η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης.

Πίνακας 6.2. Επίδραση ενός μίγματος diuron – DCPMU στην ανάπτυξη της *Dunaliella tertiolecta*. Οι καταχωρήσεις είναι ο ρυθμός ανάπτυξης (κυτταροδιαιρέσεις/ημέρα) και μέσα σε παρένθεση η % μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των καλλιεργειών.

Συγκέντρωση diuron (μg/l)	Συγκέντρωση DCPMU (μg/l)		
	0	160	320
0	1,37 (-)	1,06 (22,7)	0,25 (79,8)
3,5	1,17 (15,1)	0,62 (68,8)	0,33 (75,1)
5,5	0,96 (31,4)	0,42 (80,2)	0,2 (85)

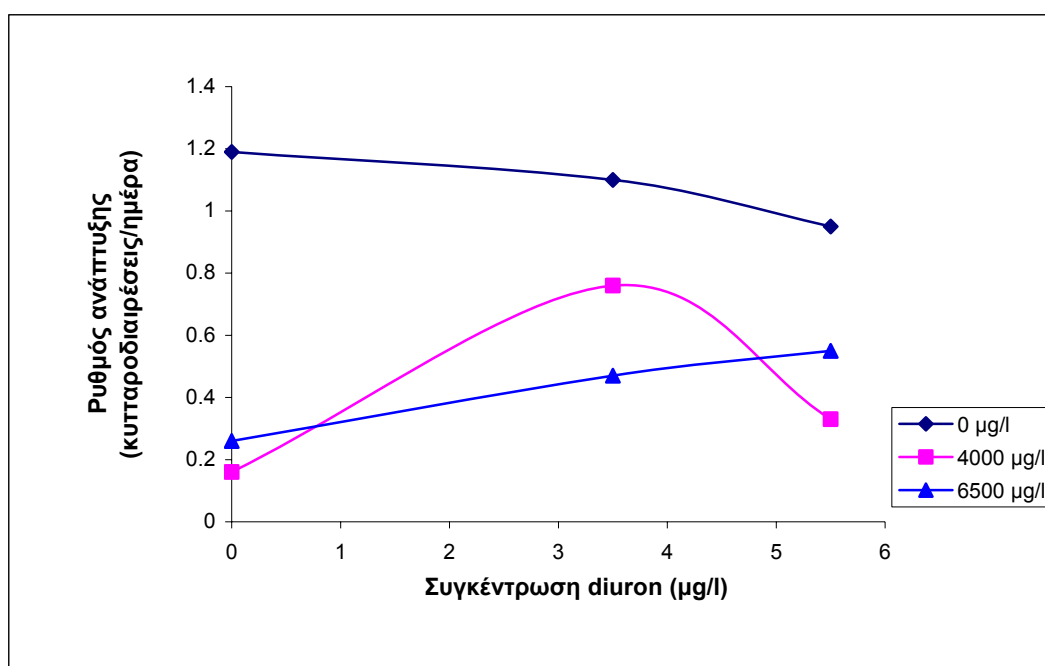
Παρατηρείται ότι στις καλλιεργείες όπου έχει προστεθεί μόνο DCPMU παρουσιάστηκε λίγο μεγαλύτερη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης για τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις από αυτή που αναμενόταν βάσει των αποτελεσμάτων των πειραμάτων εκτίμησης της EC₅₀. Συγκεκριμένα, ενώ έχει βρεθεί ότι η EC₅₀ της DCPMU είναι 340 μg/l, συγκέντρωση ίση με 320 μg/l αναχαίτισε το ρυθμό αύξησης της *Dunaliella tertiolecta* σε ποσοστό 79,8 %. Επίσης στις καλλιεργείες όπου έχει προστεθεί μόνο diuron, η μείωση του ρυθμού αύξησης του χλωροφύκου ήταν λίγο μικρότερη από την αναμενόμενη. Αν και βρέθηκε ότι η EC₅₀ της ουσίας για τη *Dunaliella tertiolecta* είναι ίση με 5,9 μg/l, συγκέντρωση 5,5 μg/l προκάλεσε αναχαίτιση του ρυθμού ανάπτυξης κατά 31,4 %. Τα αποτελέσματα αυτά για τις δύο ουσίες ενδέχεται να οφείλονται σε προβλήματα που υπήρξαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, τα οποία δεν ήταν δυνατό να ξεπεραστούν σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις στη θερμοκρασία και στο φωτισμό στον επωαστικό θάλαμο, κάτι που πιθανώς να επηρέασε την ευαισθησία του μικροοργανισμού στις συγκεκριμένες ουσίες.

Παρόλα αυτά σχεδόν σε όλες τις καλλιεργείες που επιφορτίστηκαν και με τις δύο ουσίες παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης της *Dunaliella tertiolecta* από αυτή που προκαλείται από τη συγκέντρωση κάθε ουσίας χωριστά. Συγκεκριμένα, στις καλλιεργείες που επιφορτίστηκαν με τη μικρότερη συγκέντρωση της DCPMU παρατηρείται ότι η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης είναι λίγο μεγαλύτερος από το άθροισμα των αναχαίτισεων που προκλήθηκαν όταν οι ουσίες προστέθηκαν μεμονωμένα στις

καλλιέργειες. Συγχρόνως, στις καλλιέργειες που επιφορτίστηκαν με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση της DCPMU, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αναχαίτιση πιθανότατα να οφείλεται κυρίως σε αυτήν την ουσία. Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία για τη συνδυασμένη δράση των δύο αυτών ενώσεων.

6.3.2 Συνδυασμός diuron-Cu.

Στο σχήμα 6.3. φαίνεται η τοξική επίδραση του diuron στη *Dunaliella tertiolecta* για διαφορετικές συγκεντρώσεις του Cu.



Σχήμα 6.3 Η τοξική επίδραση του diuron στη *Dunaliella tertiolecta* για διαφορετικές συγκεντρώσεις του Cu.

Στον πίνακα 6.3 δίνεται ο ρυθμός ανάπτυξης της *Dunaliella tertiolecta* που δέχθηκε την επίδραση του συνδυασμού των δύο τοξικών ουσιών, diuron και Cu, καθώς και η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης.

Πίνακας 6.3. Επίδραση ενός μίγματος diuron-Cu στην ανάπτυξη της *Dunaliella tertiolecta*. Οι καταχωρήσεις είναι ο ρυθμός ανάπτυξης (κυτταροδιαιρέσεις/ημέρα) και μέσα σε παρένθεση η % μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των καλλιεργειών.

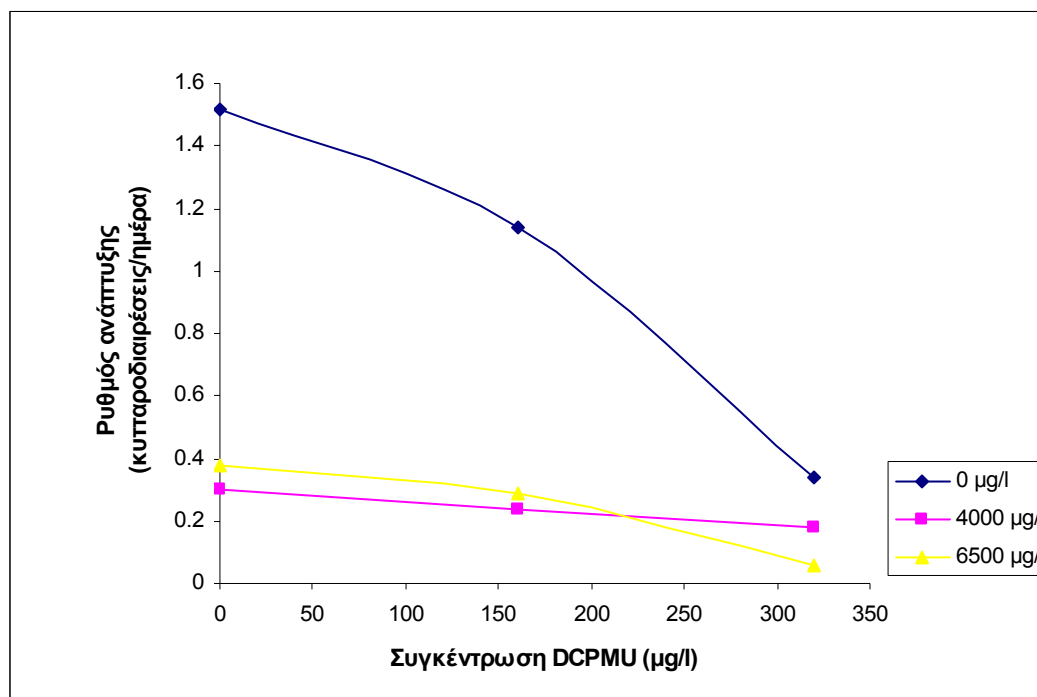
	Συγκέντρωση Cu (μg/l)		
Συγκέντρωση diuron (μg/l)	0	4000	6500
0	1,19 (-)	0,16(88,1)	0,26 (79,9)
3,5	1,1 (16,5)	0,76 (34,6)	0,47 (64)
5,5	0,95 (27,9)	0,33 (75)	0,55 (56,1)

Στο πείραμα αυτό εξετάστηκαν συγκεντρώσεις του diuron ίδιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν και κατά το πείραμα που αφορούσε στη διερεύνηση της συνδυασμένης τοξικής δράσης του diuron και της DCPMU. Παρόλα αυτά η αναχαίτιση του ρυθμού ανάπτυξης της *Dunaliella tertiolecta* ήταν λίγο μικρότερη από αυτή που παρατηρήθηκε στο προηγούμενο πείραμα. Επίσης η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των μικροοργανισμών στις καλλιεργείες που επιφορτίστηκαν μόνο με Cu ήταν μη αναμενόμενη. Συγκεκριμένα, αν και βρέθηκε ότι η EC₅₀ του Cu για αυτό το χλωροφύκος είναι ίση με 9400 μg/l, συγκεντρώσεις του Cu ίσες με 4000 και 6500 μg/l προκάλεσαν πολύ μεγαλύτερη αναχαίτιση του ρυθμού ανάπτυξης, έως και 88,1 %. Επίσης το μίγμα των δύο ουσιών προκάλεσε μεγαλύτερη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης της *Dunaliella tertiolecta* από αυτή που προκαλείται από τις συγκεντρώσεις του diuron και μικρότερη μείωση από αυτή που προκαλείται από τις συγκεντρώσεις του Cu μεμονωμένα, υποδηλώνοντας ότι η τοξική δράση των ουσιών στο μικροοργανισμό οφείλεται κυρίως στο Cu. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι, από όλες τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα, η περισσότερο τοξική για τη *Dunaliella tertiolecta* ήταν η μικρότερη από τις συγκεντρώσεις του Cu που χρησιμοποιήθηκαν μεμονωμένα, η οποία προκάλεσε 88,1 % αναχαίτιση του ρυθμού ανάπτυξης.

Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές για τη συνδυασμένη τοξική δράση του diuron και του Cu.

6.3.3 Συνδυασμός DCPMU-Cu.

Στο σχήμα 6.4 φαίνεται η τοξική επίδραση της DCPMU στη *Dunaliella tertiolecta* για διαφορετικές συγκεντρώσεις του Cu.



Σχήμα 6.4 Η τοξική επίδραση της DCPMU στη *Dunaliella tertiolecta* για διαφορετικές συγκεντρώσεις του Cu.

Στον πίνακα 6.4 δίνεται ο ρυθμός ανάπτυξης της *Dunaliella tertiolecta* που δέχθηκε την επίδραση του συνδυασμού των δύο τοξικών ουσιών, diuron και Cu, καθώς και η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης.

Πίνακας 6.4 Επίδραση ενός μίγματος DCPMU-Cu στην ανάπτυξη της *Dunaliella tertiolecta*. Οι καταχωρήσεις είναι ο ρυθμός ανάπτυξης (κυτταροδιαίρεσεις/ημέρα) και μέσα σε παρένθεση η % μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των καλλιεργειών.

Συγκέντρωση DCPMU (µg/l)	Συγκέντρωση Cu (µg/l)		
	0	4000	6500
0	1,52 (-)	0,3 (80,4)	0,38 (75,3)
160	1,14 (24,6)	0,24 (84,3)	0,29 (80,9)
320	0,34 (77,4)	0,18 (88,4)	0,06 (96)

Στο πείραμα αυτό, οι συγκεντρώσεις του Cu και της DCPMU στις καλλιέργειες όπου προστέθηκαν μεμονωμένα προκάλεσαν αναχαιτίσεις ανάλογες με αυτές που είχαν προκαλέσει και στα προηγούμενα πειράματα εκτίμησης της συνδυασμένης τοξικής δράσης των ουσιών στη *Dunaliella tertiolecta*. Επίσης στις καλλιέργειες που επιφορτίστηκαν με τα μίγματα του Cu και της DCPMU παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αναχαιτίση του ρυθμού ανάπτυξης του χλωροφύκου σε σχέση με τις καλλιέργειες που επιφορτίστηκαν με τις δύο ουσίες μεμονωμένα. Παρόλα αυτά, οι τιμές της αναχαιτίσης των μιγμάτων των δύο ουσιών ήταν λίγο μεγαλύτερες από αυτές που προκλήθηκαν από τις δύο ουσίες μεμονωμένα και σε καμία περίπτωση δεν προσέγγισαν τιμές ίσες ή μεγαλύτερες από το άθροισμα των αναχαιτίσεων αυτών. Για τη συνδυασμένη τοξική δράση του Cu και της DCPMU δεν υπάρχουν δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία.

6.4 Εύροι τιμών αποτελεσμάτων

Τα αριθμητικά αποτελέσματα από όλες τις πειραματικές διαδικασίες που έγιναν δίνονται με τους παρακάτω πίνακες.

Κατά την εκτίμηση της EC_{50} του χαλκού στην *Dunaliella tertiolecta*, μετρήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών, ο ρυθμός αναχαιτίσης, ο αριθμός των κυττάρων (κύτταρα/ml), και η συγκέντρωση της χλωροφύλλης (σε $\mu\text{g/l}$). Οι ποσότητες των παραπάνω φαίνονται στο πίνακα 6.5

Πίνακας 6.5. Αποτελέσματα κατά την εύρεση της EC_{50} του χαλκού

Υπολογιζόμενες τιμές	Αποτελέσματα
Ρυθμός ανάπτυξης	0 - 1,56
% Αναχαιτίση	12,1 - 100 %
Κυτταρικός Αριθμός (Cells/ml)	12.900 - 903.680
Συγκέντρωση χλωροφύλλης ($\mu\text{g/l}$)	1,29 – 2.229,67

Παρόμοια και για τα άλλα πειράματα που έγιναν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα στους πίνακες 6.6, 6.7, 6.8, και 6.9 που αφορούν αντίστοιχα, την συνδυασμένη δράση τοξικότητας Cu – diuron, εκτίμησης EC_{50} της DCPMU, και για την συνδυασμένη δράση τοξικότητας DCPMU – diuron.

Πίνακας 6.6. Αποτελέσματα οξείας τοξικότητας Diuron με χαλκό

Υπολογιζόμενες Ποσότητες	Αποτελέσματα
Ρυθμός ανάπτυξης	0,14 - 1,48
% Αναχαίτιση	0 – 98,1 %
Κυτταρικός Αριθμός (Cells/ml)	30.720 - 549.120
Συγκέντρωση χλωροφύλλης(μg/l)	29,96 – 1.486,27

Πίνακας 6.7. Αποτελέσματα κατά την εύρεση της EC₅₀ του DCPMU

Υπολογιζόμενες Ποσότητες	Αποτελέσματα
Ρυθμός ανάπτυξης	0 – 1,28
% Αναχαίτιση	0 - 100 %
Κυτταρικός Αριθμός (Cells/ml)	17.920 - 853.760
Συγκέντρωση χλωροφύλλης(μg/l)	22,84 – 2.738,38

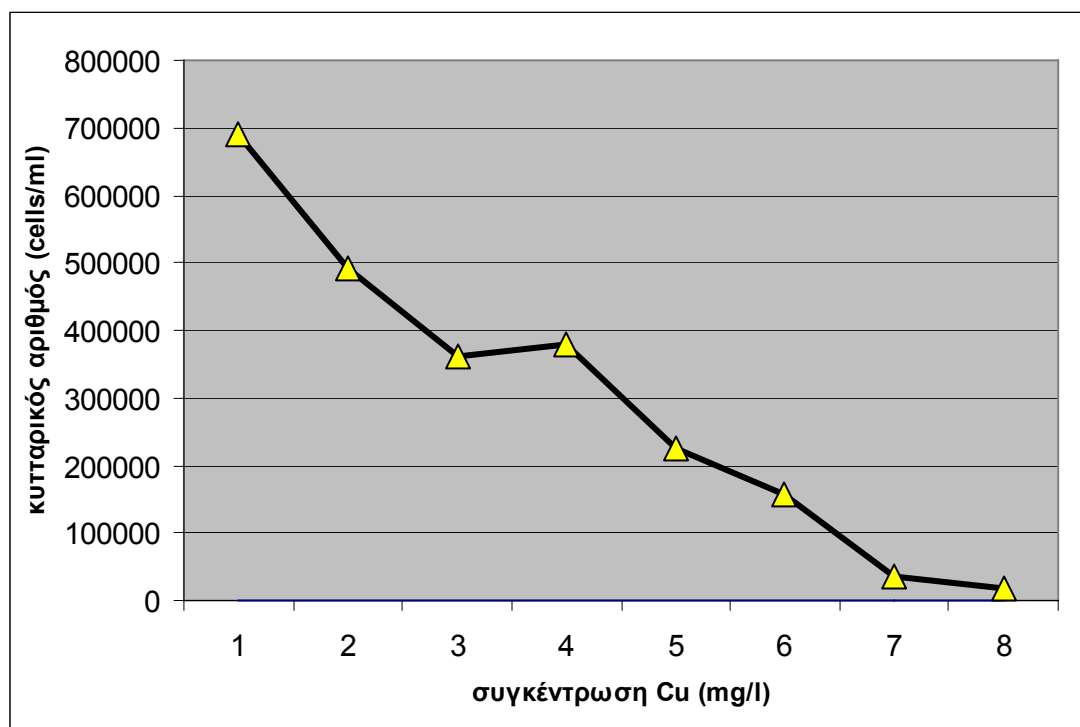
Πίνακας 6.8. Αποτελέσματα οξείας τοξικότητας Diuron με DCPMU

Υπολογιζόμενες Ποσότητες	Αποτελέσματα
Ρυθμός ανάπτυξης	0 – 1,54
% Αναχαίτιση	0 - 100 %
Κυτταρικός Αριθμός (Cells/ml)	21760- 1.045.760
Συγκέντρωση χλωροφύλλης(μg/l)	25,33 – 3.245,31

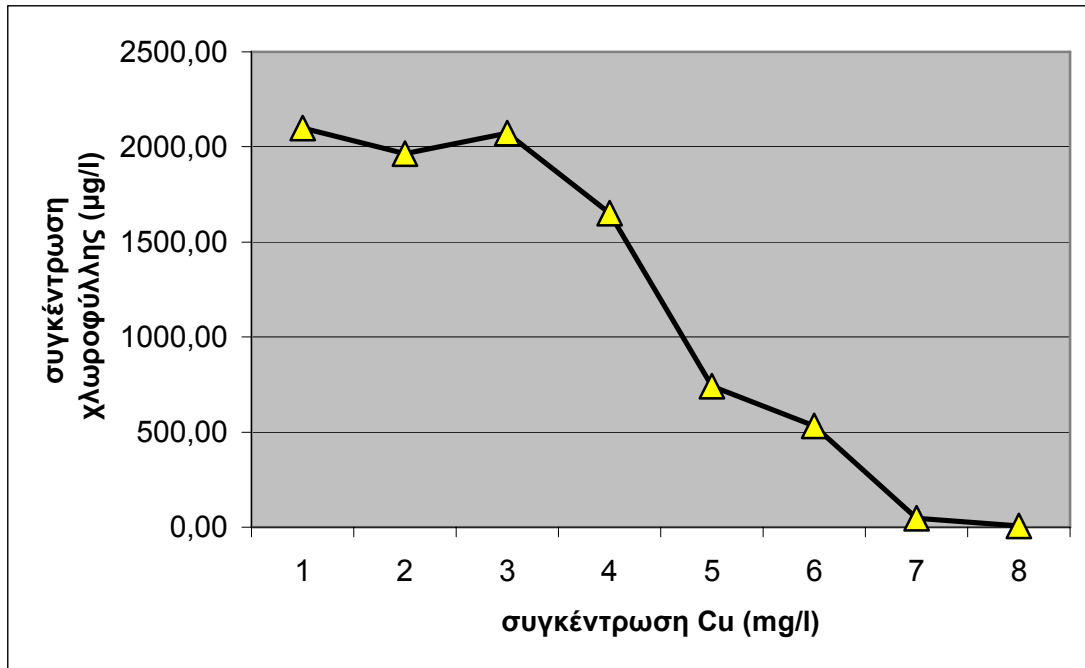
Πίνακας 6.9. Αποτελέσματα οξείας τοξικότητας χαλκού με DCPMU

Υπολογιζόμενες Ποσότητες	Αποτελέσματα
Ρυθμός ανάπτυξης	0,08 - 1,56
% Αναχαίτιση	32,3 - 94,6 %
Κυτταρικός Αριθμός (Cells/ml)	28.160 – 1.135.360
Συγκέντρωση χλωροφύλλης(μg/l)	21,68 – 3.097,13 μg/l

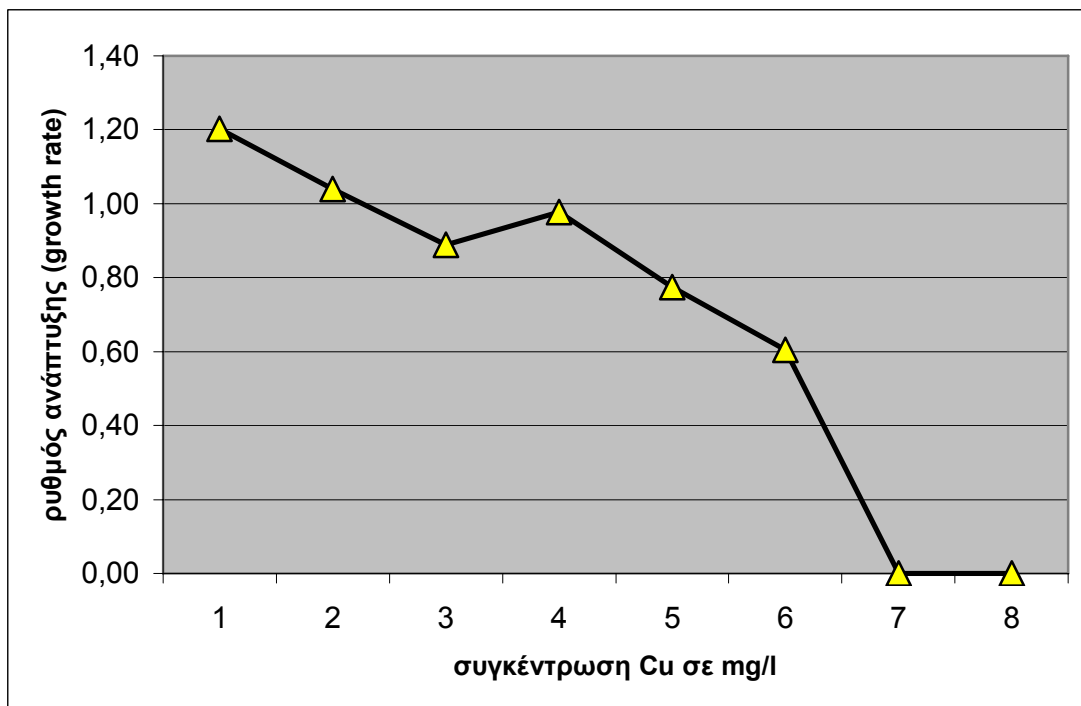
Η μέτρηση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης είχε κυρίως σαν σκοπό να επιβεβαιώσει την εγκυρότητα των μετρήσεων του πλήθους του κυτταρικού αριθμού. Στα σχήματα 6.5, 6.6, και 6.7 δίνονται η μεταβολή της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης, της μεταβολής του κυτταρικού αριθμού, του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων και της % αναχαίτισης, σε συνάρτηση τη συγκέντρωσης του χαλκού, παρουσιάζοντας την αναλογία που υπάρχει και επαληθεύοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων.



Σχήμα 6.5. Μεταβολή του κυτταρικού αριθμού (cells/ml) της *Dunallia tertiolecta* παρουσία του Cu.



Σχήμα 6.6. Μεταβολή της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης (µg/l) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του Cu την τέταρτη μέρα.



Σχήμα 6.7. Μεταβολή του ρυθμού ανάπτυξης της *Dunallia tertiolecta* παρουσία του Cu.

Για το συγκεκριμένο παράδειγμα η αύξηση του κυτταρικού αριθμού που παρατηρήθηκε στη ορισμένα σημεία της καμπύλης πιθανότατα να οφείλεται σε επιμόλυνση.

Τέλος πρέπει να επισημανθεί ότι οι πειραματικές μετρήσεις αφορούν ζωντανούς οργανισμούς, οι οποίοι πάντα έχουν απρόβλεπτη συμπεριφορά και επομένως είναι αδύνατο να υπάρχουν πανομοιότυπα αποτελέσματα.

Και για τα υπόλοιπα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, τα αντίστοιχα διαγράμματα έχουν παρόμοιες μορφές μεταξύ τους.

6.5 Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν για την εκτίμηση της οξείας τοξικότητας της DCPMU και του Cu, στο χλωροφύκος *Dunaliella tertiolecta*, καθώς και της συνδυασμένης τοξικής δράσης της DCPMU με το diuron, του Cu με το diuron και του Cu με τη DCPMU συμπεραίνεται ότι:

1. Η DCPMU είναι πολύ πιο τοξική για τη *Dunaliella tertiolecta* από ότι ο Cu, με EC_{50} των δύο ουσιών ίσες με 340 $\mu\text{g/l}$ και 9400 $\mu\text{g/l}$ αντίστοιχα.
2. Επίσης η DCPMU αποδείχτηκε ότι είναι λιγότερο τοξική από την αρχική ένωση, το diuron, του οποίου η EC_{50} για τη *Dunaliella tertiolecta* είναι ίση με 5,9 $\mu\text{g/l}$.
3. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι τα μίγματα διαφόρων συγκεντρώσεων της DCPMU, του Cu και του diuron ήταν στις περισσότερες περιπτώσεις πιο τοξικά από τις αντίστοιχες ουσίες μεμονωμένες, χωρίς όμως να υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για το αν η δράση τους είναι προσθετική ή συνεργιστική.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Albanis T.A., Lambropoulou D.A., Sakkas V.A. and Konstantinou I.K. (2002) Antifouling paint booster biocide contamination in Greek marine sediments. *Chemosphere* **48**, 475–485
- ASTM (1993) *ASTM standards on aquatic toxicology and hazard evaluation*. ASTM Philadelphia.
- S.M. Bengtson Nash, P.A. Quayle, U. Schreiber, and J.F. Müller (2005) The selection of a model microalgal species as biomaterial for a novel aquatic phytotoxicity assay. *Aquatic Toxicology*, **72**, 315–326
- Boxall A.B.A., Comber S.D., Conrad A.U., Howcroft J. and Zaman N. (2000) Inputs, monitoring and fate modelling of antifouling biocides in UK Estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* **40**, 898–905.
- Burns L.A. and Baughman G.L. (1985) *Fate modeling*. In Rand, G.M., Petrocelli, S.R., (eds) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, pp. 558-584, Hemisphere Publishing Corporation.
- Callow M.E. and Finlay J.A. (1995) A simple method to evaluate the potential for degradation of antifouling biocides. *Biofouling* **9** (2), 153-165
- Castro P. and Huber M. 1999, «Θαλάσσια Βιολογία», University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
- Ciba Specialty Chemicals (1999) Irgarol 1051: General information Part I. Tech. rpt. Ciba-Geigy.
- Comber S.D.W., Franklin G., Gardner M.J., Watts C.D., Boxall A.B.A. and Howcroft J. (2002) Partitioning of marine antifoulants in the marine environment. *Sci. Total Environ.* **286**, 61–71
- Cullington J.E. and Walker A., (1999) Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biol. Biochem.* **31**, 677–686.
- Dahl B. and Blanck H. (1996) Toxic effects of the antifouling agent Irgarol 1051 on periphyton communities in coastal water microcosms. *Mar. Pollut. Bull.* **32**, 342–350.
- De Almeida Azevedo D., Lacorte S., Vinhas T., Viana P. and Barceló D. (2000) Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas-chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **879**, 13–26.

- Douglas-Helders G.M., Tan C., Carson J., Nowak B.F. (2003), Effects of copper-based antifouling treatment on the presence of *Neoparamoeba pemaquidensis* Page, 1987 on nets and gills of reared Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Aquaculture* 221 13–22.
- Ferrer I., Ballesteros B., Marco M.P. and Barceló D. (1997) Pilot survey for the determination of the antifouling agent irgarol 1051 in enclosed seawater samples by a direct enzyme-linked immunosorbent assay and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 3530–3535.
- Ferrer I. and Barceló D. (1999) Simultaneous determination of antifouling herbicides in marina water samples by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectroscopy. *J. Chromatogr. A* **854**, 197–206.
- Friberg L., Nordberg G.F. and Vouk V.B.(eds) (1990) *Handbook on the toxicology of metals*, 2nd edition, Elsevier, Amsterdam
- Giacomazzi S. and Cochet N. (2004) Environmental impact of diuron transformation: a review. *Review Chemosphere* **56**, 1021–1032.
- Granmo A, Ekelund R, Sneli J.-A., Berggren M and Svavarsson J (2002), Effects of antifouling paint components (TBTO, copper and triazine) on the early development of embryos in cod (*Gadus morhua* L.), *Marine Pollution Bulletin* 44 1142–1148.
- Health and safety Executive (HSE) Environmental modelling of antifoulants, Contract Research Report 342/2001.
- Hornsby A. G., Wauchope R. D. and Herner A. E. (1996) *Pesticide Properties in the Environment*. Springer-Verlag, New York
- Kenaga E.E. (1980) Correlation of bioconcentration factors of chemicals in aquatic and terrestrial organisms with their physical and chemical-properties, *Environ. Sci. Technol.*, **14**, 553-556.
- Kenneth Schiff, Dario Diehl and Aldis Valkirs (2004), Copper emissions from antifouling paint on recreational vessels, *Marine Pollution Bulletin* **48** 371–377.
- Khoshmanesh A., Lawson F. and Prince I.G. (1997) Cell surface area as a major parameter in the uptake of cadmium by unicellular green microalgae. *Chem. Eng. J.***1**, 13-19
- Klaasen C., 1986, Principles of toxicology, in: Klaasen C., Ambur M., Doull J., (eds), «Toxicology The basic Science of poisons», Mac Millan, New York, p.p 11-32.
- Lamoree M.H., Swart S.P., Van der Horst A. and Van Hattum B. (2002) Determination of diuron and the antifouling paint biocide Irgarol 1051 in Dutch marinas and coastal waters. *J. Chromatogr. A* **970**, 183–190.
- Levinton J. ,1995, “Marine Biology”, Oxford University Press, New York

- Maraldo K. and Dahllorf I. (2004), Seasonal variations in the effect of zinc pyrrithione and copper pyrrithione on pelagic phytoplankton communities, *Aquatic Toxicology* 69 189–198.
- Martinez K. and Barcelo D. (2001) Determination of antifouling pesticides and their degradation products in marine sediments by means of ultrasonic extraction and HPLC-APCI-MS. *Fresen. J. Anal. Chem.* **370**, 940-945.
- Okamura Y., Koyama J., Takaku H and Satoh H. (2001) Influence of organic solvents on the growth of marine microalgae. *Archives of Environ. Contam. Toxicol.* **41**, 123-128.
- Okamura H., Watanabe T., Aoyama I. and Hasobe M. (2002) Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. *Chemosphere* **46**, 945–951.
- Okamura H., Aoyama I., Ono Y. and Nishida T. (2003) Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. *Mar. Pollut. Bull.* **47**, 59–67.
- Omae I. (2003) General Aspects of Tin Free Antifouling Paints. *Chem. Rev.* 103, 3431-3448.
- Rand G.M. and Petrocelli S.R. (1985) Introduction. In Rand, G.M., Petrocelli, S.R., (eds) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation, pp.1-28.
- Salvestrini S., Di Cerbo P. and Capasso S. (2002) Kinetics of the chemical degradation of diuron. *Chemosphere* **48**, 69–73.
- Spencer E.Y. (1982) *Guide to chemicals used in crop protection*. (7th eds), Agriculture Canada, Ottawa
- SRC organization: <http://www.syrres.com/esc/physdemo.htm>. Ημερομηνία τελευταίας πρόσβασης: 30/9/2005
- Terlizzi A., Frascchetti S., Gianguzza P., Faimali M., and Boero F. (2001) Environmental impact of antifouling technologies: state of the art and perspectives. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 100, 311-317.
- Thomas K.V. (1998) Determination of selected antifouling booster biocides by high-performance liquid-chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **825**, 29–35.
- Thomas K.V., Waldock M.J., Readman J., Fileman T.W. (1999) Monitoring of antifouling paint booster biocides and tributyltin in UK marinas, estuaries and coastal waters. A final report for the Department of the Environment, Transport and the Regions and the Environment Agency (EPG, 1/5/90 and P2-118). This report also constitutes the environmental Agency's Technical Report No P313; 1999.
- Thomas K.V., Blake S.J. and Waldock M.J. (2000) Antifouling Paint Booster Biocide Contamination in UK Marine Sediments. *Mar. Pollut. Bull.* **40**, 739-745.

- Thomas K.V. (2001a) The environmental fate and behaviour of antifouling paint booster biocides: a review. *Biofouling* **17**, 73-86.
- Thomas K.V., Fileman T.W., Readman J. and Waldock M. (2001b) Antifouling paint booster biocides in the UK coastal environment and potential risks of biological effects. *Mar. Pollut. Bull.* **42**, 677–688.
- Thomas K.V., McHugh M. and Waldock M. (2002) Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. *Sci. Total. Environ.* **293**, 117-127.
- Thomas K.V., Mathew McHugh M., Hilton M. and Waldock M. (2003) Increased persistence of antifouling paint biocides when associated with paint particles. *Environ. Pollut.* **123**, 153–161.
- Tixier C., Sancelme M., Bonnemoy F., Cuer A. and Veschambre H. (2001) Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: synthesis, ecotoxicity, and biotransformation. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 1381–1389
- Voulvoulis N., Scrimshaw M.D. and Lester J.N. (2002) Partitioning of selected antifouling biocides in the aquatic environment. *Mar. Environ. Res.* **53**, 1–16.
- Wauchope R.D., Buttler T.M., Augustijn-Beckers P.W.M. and Burt J.P. (1992) SCS/ARS/CES pesticides properties database for environmental decision making. *Rev. Environ. Toxicol.* **123**, 1–157.
- Yan H. and Pan G. (2002) Toxicity and bioaccumulation of copper in three microalgal species. *Chemosphere* **49**, 471-476
- Yebra D.M and Kiil S., Johansen J.D, (2003), Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings, *Progress in Organic Coatings*, **50** 75–104.
- Ακριώτης Τ., 2001, Σημειώσεις Οικοτοξικολογίας, Μυτιλήνη.
- Γατίδου Γ. (2005) *Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων, μελέτη της τοξικότητάς τους και ανίχνευσή τους στο περιβάλλον*, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Τμήμα Περιβάλλοντος.
- Ελευθεροχωρινός Η. Γ. (1996) *Ζιζανιολογία*, Εκδόσεις Αγροτύπος, Αθήνα.
- Κουτσούμπας Δ., 2003, Σημειώσεις «Οικολογία παράκτιων υδατικών οικοσυστημάτων», Μυτιλήνη.
- Μανουσάκης Γ. (1999) *Γενική και Ανόργανη Χημεία*, Εκδόσεις Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη

Παππάς Κ. και Χανδρινού Σ. (2003), *Προσδιορισμός των οργανοκασσιτερικών ενώσεων στη θαλάσσια τροφή και εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης των ελλήνων σε αυτές τις ενώσεις*, Πτυχιακή Εργασία, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Τμήμα Περιβάλλοντος.