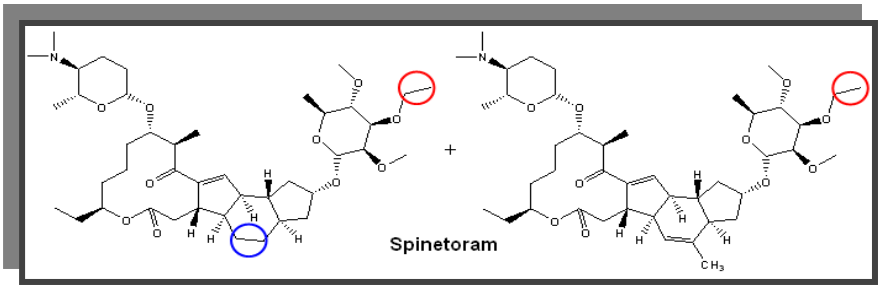
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΣΥΓΧΡΟΝΗΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

‘Υπολειμματική δράση μεταβολιτών του *Saccharopolyspora spinosa* (Bacteria: Actinomycetables) κατά εντόμων αποθηκευμένων δημητριακών’

Μεταπτυχιακή Διατριβή



Τριανταφυλλιά Μ. Ξούρα
Γεωπόνος

Βόλος, 2011

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΣΥΓΧΡΟΝΗΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

‘Υπολειμματική δράση μεταβολιτών του *Saccharopolyspora spinosa* (Bacteria: Actinomycetables) κατά εντόμων αποθηκευμένων δημητριακών’

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Τριανταφυλλιά Μ. Ξούρα

Γεωπόνος

Εξεταστική επιτροπή

Τσιρόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής (Επιβλέπων)
Αθανασίου Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής (Μέλος)
Λιαπής Κωνσταντίνος, Ερευνητής Β’ (Μέλος)

Βόλος, 2011

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα του spinetoram σε σιτάρι και καλαμπόκι, κατά δύο εντόμων αποθηκών, των *Sitophilius oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) και *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). Για το σκοπό αυτό, έγιναν βιοδοκιμές σε σιτάρι και καλαμπόκι, στα οποία εφαρμόσθηκε spinetoram σε τρία επίπεδα (δόσεις) δηλαδή σε 0,1, 1,0 και 10 mg/Kg ή ppm w/w. Επίσης, τα δημητριακά αυτά παρέμειναν στο Εργαστήριο για διάστημα 6 μηνών και οι βιοδοκιμές επαναλαμβάνονταν κάθε μήνα για την επισήμανση της υπολειμματικής δράσης του εντομοκτόνου. Χρησιμοποιήθηκαν ακμαία, για τα οποία γινόταν καταγραφή της θνησιμότητας μετά από 7 και 14 ημέρες έκθεσης, ενώ τα δείγματα στα οποία τοποθετούνταν τα έντομα παρέμεναν στο Εργαστήριο για 60 ακόμα ημέρες για καταμέτρηση τυχόν απογόνων. Το *R. dominica* ήταν πιο ευαίσθητο σε σχέση με το *S. oryzae*, με τη θνησιμότητα για το πρώτο είδος να φθάνει το 100 % από τις 7 ημέρες και στο 0,1 ppm, σε μεγάλο αριθμό περιπτώσεων. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι και η παραγωγή απογόνων ήταν χαμηλή. Αντιθέτως, για το *S. oryzae* η θνησιμότητα δεν ήταν υψηλή στο 0,1 ppm, με αντίστοιχα υψηλούς αριθμούς απογόνων. Γενικά η αποτελεσματικότητα του spinetoram παρέμεινε σε παρόμοια επίπεδα και για όλη τη διάρκεια του πειράματος (έξι μήνες), ενώ στο καλαμπόκι το spinetoram δεν ήταν τόσο αποτελεσματικό όσο στο σιτάρι. Τα υπολείμματα του spinetoram στα δείγματα και των δύο δημητριακών παρακολουθήθηκαν σε τακτά χρονικά διαστήματα (ανά μήνα) και προέκυψε ότι η μείωση του spinetoram μετά από 6 μήνες ήταν περίπου 20%, γεγονός που υποδηλώνει ότι το spinetoram είναι ιδιαίτερα σταθερό στους χώρους αποθήκευσης. Η ανάλυση των υπολειμμάτων πραγματοποιήθηκε με συζευγμένο σύστημα υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών (LC-MS) μετά από εκχύλιση των σπόρων με μίγμα διαλυτών με ανακίνηση. Συμπερασματικά, τα δεδομένα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι το spinetoram είναι αποτελεσματικό κατά εντόμων αποθηκών ακόμη και για τη χρήση αυτή απαιτείται εκτενέστερος πειραματισμός.

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε με τη συνεργασία των Εργαστηρίων Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας και του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και του Εργαστηρίου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενακείου Φυτοπαθοπλογικού Ινστιτούτου.

Abstract

In the present study, we investigated the insecticidal efficacy of spinetoram on wheat and maize, against two major stored-grain species, the rice weevil, *Sitophilius oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). For this purpose, bioassays were carried out with spinetoram at the doses 0.1, 1 and 10 ppm. Moreover, the treated grains were left in the laboratory for a period of six months, in order to examine the residual effect of spinetoram, by conducting bioassays at monthly intervals. For both species, adults were tested, which were exposed in the treated grains for 7 and 14 days, in order to estimate the mortality level. After the termination of this interval, the treated samples were left for an additional period of 60 days, on which progeny production was recorded. *R. dominica* was by far more susceptible than *S. oryzae*, given that mortality, in many cases, reached 100 % even after 7 days of exposure, and even at the lowest dose rate of 0.1 ppm. At the same time, for this species, progeny production was extremely low. In contrast, for *S. oryzae* mortality was low at 0.1 ppm, with high levels of progeny production. Generally, during the experimental period, the efficacy of spinetoram remained stable; however, it was less effective on maize than on wheat. The analysis of the residues of spinetoram indicated that the decrease of spinetoram after 6 months was merely 20 %, which clearly suggests that spinetroam is stable at the conditions tested. Residues analysis of spinetoram on maize and wheat was performed in a LC-MS system after grain extraction with a solvent mixture by shaking. Based on the results of the present work, spinetoram is an effective grain protectant, and additional experimentation is required for its wider assessment for this purpose.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.1 Εισαγωγή…….8
1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος της προσβολής των αποθηκευμένων προϊόντων……...9
1.2.1 Υγειονομική κατάσταση του προϊόντος πριν από την επεξεργασία ή αποθήκευση του.....9
1.2.2 Συνθήκες περιβάλλοντος που επικρατούν μέσα στους αποθηκευτικούς χώρους. 9
1.2.3 Ικανότητα πτήσης των εντόμων. 9
1.2.4 Συμπεριφορά των εντόμων.....9
1.2.5 Καταλληλότητα και προστασία των αποθηκευτικών χώρων. 10
1.3 Παρουσία εντόμων - Αντιμετώπιση του προβλήματος……10
1.3.1 Ακριβής προσδιορισμός του είδους ή των ειδών των αρθροπόδων που υπάρχουν.....10
1.4 Μέσα αντιμετώπισης εντόμων εχθρών των αποθηκευμένων προϊόντων…….11
1.4.1 Χημικές μέθοδοι αντιμετώπισης 11
1.4.2 Βιοτεχνικές και Βιοτεχνολογικές μέθοδοι αντιμετώπισης. 14
1.4.3 Βιολογικές μέθοδοι.....16
1.4.4 Φυσικές μέθοδοι αντιμετώπισης.....16
2.1 Έντομα αποθηκευμένων γεωργικών προϊόντων και τροφίμων και η σημασία τους……...21
2.2 Τα σπουδαιότερα έντομα αποθηκών…….....23
2.2.1 ΚΟΛΕΟΠΤΕΡΑ 25
2.2.2 ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΑ 30
3.1 Υπολείμματα στα φυτικά προϊόντα ……34
3.2 Προσδιορισμός υπολειμμάτων……..35
3.3 Στάδια μεθόδου ανάλυσης……..36
3.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων.....36
3.3.2 Εκχύλιση του δείγματος 36
3.3.3 Τεχνικές εκχύλισης.....38
3.3.4 Διήθηση 44
3.3.5 Καθαρισμός εκχυλίσματος (cleanup) 44
3.3.6 Συμπύκνωση του εκχυλίσματος 45

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

3.3.7 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός……...45
3.3.8 Ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων……46
3.4 Αέρια χρωματογραφία……46
3.4.1 Όργανα από τα οποία απαρτίζεται ένα σύστημα αέριας χρωματογραφίας...47
3.5 Υγρή χρωματογραφία……48
3.5.1 Όργανα από τα οποία απαρτίζεται ένα σύστημα HPLC……49
4.1 Γενικά……52
4.2 Εντομοκτόνα προστατευτικά σπόρων τα οποία έχουν έγκριση στην Ελλάδα και χρησιμοποιούνται σήμερα……52
4.2.1 Bacillus thuringiensis……53
4.2.2 Deltamethrin……...53
4.2.3 Pirimiphos methyl……..54
4.3 Το spinosad και η χρήση του ως μέσο αντιμετώπισης εντόμων εχθρών των αποθηκευμένων γεωργικών προϊόντων και τροφίμων……56
4.3.1 Η ιστορία του spinosad……...56
4.3.2 Spinosad……57
4.3.3 Spinetoram……..60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 - Σκοποί της παρούσας μελέτης ……64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Υλικά και μέθοδοι……..65
6.1 Εντομοκτόνο……..65
6.2 Δημητριακά……...65
6.3 Έντομα……...65
6.4 Εφαρμογή εντομοκτόνου……...66
6.5 Βιοδοκιμές……67
6.6 Πρότυπα διαλύματα και διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν……...69
6.7 Πειράματα ανάκτησης……...70
6.7.1 Εμβολιασμός (φορτίση) του σιταριού……...70
6.7.2 Εμβολιασμός (φορτίση) καλαμποκιού……70
6.8 Διαδικασία εκχύλισης δειγμάτων……..70
6.9 Προσδιορισμός υπολειμμάτων με την χρήση υγρής χρωματογραφίας…….71
6.10. Στατιστική επεξεργασία……72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 - Αποτελέσματα……..74
7.1 Θνησιμότητα για το R. dominica……..74

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

7.2 Απόγονοι του R. dominica στις 60 ημέρες…….....80
7.3 Θνησιμότητα για το S. Oryzae……..82
7.4 Απόγονοι του S. oryzae στις 60 ημέρες……88
7.5 Προσδιορισμός υπολειμμάτων spinetoram…….....91
7.5.1 Χρωματογραφήματα – Χρόνοι κατακράτησης…….....91
7.5.2 Καμπύλη αναφοράς – Ποσοτικός προσδιορισμός……94
7.5.3 Πειράματα ανάκτησης……...95
7.5.4 Αποτελέσματα υπολειμματικότητας σε καλαμπόκι και σιτάρι……97
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 - Συζήτηση – Συμπεράσματα……100
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ……103

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Κεφάλαιο 1

1.1 Εισαγωγή

Με τον όρο αποθήκευση εννοούμε τους χειρισμούς μετά την συγκομιδή, κατά την επεξεργασία, τη συσκευασία και μεταφορά των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων. Τα αποθηκευμένα προϊόντα υφίστανται προσβολές από μικροοργανισμούς, αρθρόποδα και τρωκτικά είτε συνεργιστικά είτε μεμονωμένα, με αποτέλεσμα την ποιοτική αλλά και ποσοτική υποβάθμιση τους.

Τα αρθρόποδα προκαλούν τις σημαντικότερες ζημίες στα αποθηκευμένα προϊόντα Μέσα στους αποθηκευτικούς χώρους συναντώνται κυρίως έντομα των τάξεων Κολεόπτερα, Λεπιδόπτερα και σε μικρότερο βαθμό Υμενόπτερα, Ημίπτερα, Δίπτερα και Δικτυόπτερα. Από τις τάξεις που αναφέρθηκαν, τα Λεπιδόπτερα και Κολεόπτερα περιλαμβάνουν έντομα που ζημιώνουν τα αποθηκευμένα προϊόντα, ενώ έντομα που ανήκουν στις τάξεις Υμενόπτερα και Ημίπτερα περιλαμβάνουν ωφέλιμα έντομα (φυσικούς εχθρούς) των εντόμων εχθρών των αποθηκών (Μπουχέλος, 1993). Η ύπαρξη εντόμων από άλλες τάξεις όπως Δίπτερα και Δικτυόπτερα, αν και κρίνεται μάλλον συμπτωματική, υποβαθμίζει ποιοτικά τα προϊόντα. Καθώς τα έντομα αυτά γενικότερα διαβιούν σε κατοικημένους (αστικούς ή μη) χώρους, χαρακτηρίζονται ευρύτερα ως «έντομα υγειονομικής σημασίας».

Το κλειστό σύστημα των αποθηκών δεν είναι ικανό να προστατεύσει τα αποθηκευμένα προϊόντα από τους εχθρούς τους, όπως το οικοσύστημα μιας καλλιέργειας του αγρού. Στα αποθηκευμένα προϊόντα μόνο ο άνθρωπος μπορεί να επέμβει και να τα προστατέψει, γι αυτό τον λόγο είχε καταφύγει από παλιά σε διάφορες μεθόδους για την αντιμετώπιση των εχθρών των αποθηκευμένων προϊόντων. Αυτές οι μέθοδοι έχουν εξελιχτεί με την πάροδο του χρόνου και παρέχουν υψηλότερη προστασία με λιγότερους κινδύνους για το περιβάλλον αλλά και για τον άνθρωπο. Βέβαια η κατάχρηση των μεθόδων αντιμετώπισης και ιδιαίτερα των χημικών, είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας από πολλά είδη εντόμων, γι αυτό τον λόγο δημιουργήθηκε η ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης των εχθρών των αποθηκευμένων προϊόντων με λιγότερες συνέπειες στο περιβάλλον, τον άνθρωπο και το οικοσύστημα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος της προσβολής των αποθηκευμένων προϊόντων

Το μέγεθος της προσβολής ενός προϊόντος που βρίσκεται στη φάση της επεξεργασίας ή της αποθήκευσης, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες οι κυριότεροι των οποίων είναι οι εξής

1.2.1 Υγειονομική κατάσταση του προϊόντος πριν από την επεξεργασία ή αποθήκευση του.

Προσβεβλημένα προϊόντα από τον αγρό αποτελούν πηγή μόλυνσης για τα άλλα απρόσβλητα προϊόντα, καθώς και αύξηση της μόλυνσης της αρχικής προσβολής.

1.2.2 Συνθήκες περιβάλλοντος που επικρατούν μέσα στους αποθηκευτικούς χώρους.

Η θερμοκρασία που επικρατεί στον αποθηκευτικό χώρο και η υγρασία τόσο του περιβάλλοντος χώρου, όσο και του αποθηκευμένου προϊόντος, παίζουν σημαντικό ρόλο στο μέγεθος της εντομολογικής προσβολής. Οι δύο αυτοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό: Τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου του εντόμου με αντίστοιχη αύξηση ή μείωση του αριθμού των γενεών, τη διάπαυση του εντόμου, τη γονιμότητα του, καθώς και την εν γένει δραστηριότητά του.

1.2.3 Ικανότητα πτήσης των εντόμων.

Όταν ένα έντομο πετάει σε μακρινές αποστάσεις έχει την ικανότητα να προσβάλει αποθηκευμένα προϊόντα που απέχουν μεταξύ τους ικανή απόσταση, καθώς επίσης και να μολύνει προϊόντα που έχουν απεντομοθεί.

1.2.4 Συμπεριφορά των εντόμων.

Η συμπεριφορά ενός εντόμου είναι καθοριστική του μεγέθους της προσβολής ενός αποθηκευμένου προϊόντος. Έντομα που προσβάλλουν αποκλειστικά σπασμένους σπόρους ή ήδη προσβεβλημένους από άλλα έντομα, προκαλούν ζημία μόνο όταν πληρούνται οι παραπάνω προϋποθέσεις. Υπάρχουν έντομα που κατά την διάρκεια του βιολογικού τους κύκλου προσβάλουν πολλούς καρπούς ενώ άλλα τρέφονται μόνο από ένα καρπό. Στην πρώτη περίπτωση η ζημιές είναι μεγαλύτερες αν και σημαντικό ρόλο παίζει ο αριθμός των γενεών του εντόμου, η γονιμότητα του, καθώς και η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

ύπαρξή διάπαυσης.

1.2.5 Καταλληλότητα και προστασία των αποθηκευτικών χώρων.

Οι αποθηκευτικοί χώροι πρέπει να είναι καλά προστατευμένοι ώστε να αποφεύγεται η εύκολη προσπέλαση των εντόμων. Μερικά μέτρα προστασίας είναι: πόρτες κλεισμένες πολύ καλά, μη ύπαρξη ρωγμών ή ανοιγμάτων στους τοίχους, ψιλή σίτα στα παράθυρα, δάπεδα που καθαρίζονται εύκολα και δεν αποτελούν καταφύγιο των εντόμων, χρήση εντομοτοξικών ουσιών στους τοίχους και τα δάπεδα.

1.3 Παρουσία εντόμων - Αντιμετώπιση του προβλήματος

Εάν παρόλα τα μέτρα που έχουμε πάρει για την αποφυγή εγκατάστασης επιβλαβών αρθροπόδων παρουσιαστεί κάποιο πρόβλημα, τότε θα πρέπει απαραιτήτως να γίνουν οι παρακάτω ενέργειες

1.3.1 Ακριβής προσδιορισμός του είδους ή των ειδών των αρθροπόδων που υπάρχουν.

Ο ακριβής προσδιορισμός του είδους του αρθροπόδου που υπάρχει θα μας βοηθήσει ώστε να επιλέξουμε την κατάλληλη μέθοδο αντιμετώπισης. Συγγενικά είδη που μοιάζουν μεταξύ τους απαιτούν διαφορετικό τρόπο αντιμετώπισης. Επίσης ένα είδος εντόμου μπορεί να είναι ανθεκτικό σε ένα εντομοκτόνο σε σχέση με κάποιο άλλο είδος εντόμου, καθώς και τα ευαίσθητα στάδια για την καταπολέμηση του να είναι διαφορετικά. Για παράδειγμα Εάν στο ένα άκρο μιας μεγάλης αποθήκης παρουσιαστεί προσβολή από το ***Tribolíum castaneum*** **(Coleoptera: Tenebrionidae),** θα πρέπει τα μέτρα που θα πάρουμε να είναι άμεσα γιατί το έντομο αυτό μπορεί να πετάει σε μακρινές αποστάσεις οπότε σε μικρό χρονικό διάστημα μπορεί να μολύνει ολόκληρη την αποθήκη ενώ αν πρόκειται για το έντομο ***T. confusum*** που δεν πετάει, η ταχύτητα εξάπλωσης του θα είναι μικρότερη, πράγμα που θα μας επιτρέψει να έχουμε στη διάθεση μας περισσότερο χρόνο για μια επέμβαση. Επίσης εάν σε μια αποθήκη όπου είναι αποθηκευμένα διάφορα προϊόντα, οι παγίδες που έχουμε τοποθετήσει δείξουν παρουσία του εντόμου ***Acanthoscelídes obtectus*** **(Coleoptera: Bruchidae),** θα πρέπει να κοιτάξουμε και να φροντίσουμε μόνο για αποθηκευμένα φασόλια η ρεβύθια μια που το έντομο αυτό δεν έχει άλλους ξενιστές.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

1.4 Μέσα αντιμετώπισης εντόμων εχθρών των αποθηκευμένων προϊόντων

Οι μέθοδοι που εφαρμόζοντα είτε μεμονωμένα (όπου είναι εφικτό) είτε σε συνδυασμό για την αντιμετώπιση των εντόμων εχθρών των αποθηκευμένων προϊόντων, διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

1.Χημικές μέθοδοι

2.Βιοτεχνικές και Βιοτεχνολογικές μέθοδοι

3.Βιολογικές μέθοδοι

4. Φυσικές μέθοδοι

1.4.1 Χημικές μέθοδοι αντιμετώπισης

Η χημική καταπολέμηση, υπό ορισμένες συνθήκες, είναι η πιο εύκολη, γρήγορη και οικονομική μέθοδος αντιμετώπισης των ακάρεων και των εντόμων. Τα σκευάσματα που χρησιμοποιούνται είναι είτε κοινά εντομοκτόνα (κυρίως οργανοφωσφορικά και πυρεθρινοείδή εντομοκτόνα). είτε υπό μορφή καπνογόνων. Το ιδανικό εντομοκτόνο θα πρέπει να θανατώνει γρήγορα όλα τα επιβλαβή έντομα αλλά να μην βλάπτει τον άνθρωπο ή το περιβάλλον, να έχει την απαιτούμενη υπολειμματική διάρκεια με αποδεκτά υπολείμματα στα προϊόντα, να είναι φθηνό, εύκολο στο χειρισμό και στην προετοιμασία του (Bennet et al. 1988).

Τα κοινά εντομοκτόνα, αν και δεν χαρακτηρίζονται από τον μεγάλο βαθμό διεισδυτικότητας των καπνογόνων, εξασφαλίζουν μακράς διάρκειας προστασία. Από τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα έχουν χρησιμοποιηθεί τα malathion, dichlorvos, (τα οποία δεν έχουν πια έγκριση) pyrimiphos methyl, fenthion, ενώ από τα πυρεθρινοειδή κυρίως το deltamethrin. Τόσο τα οργανοφωσφορικά όσο και τα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα επιδρούν στο νευρικό σύστημα των εντόμων. Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα δεσμεύουν το ένζυμο ακετυλχολινεστεράση (λόγω χημικής συγγένειας του μορίου το φωσφόρου με το ένζυμο) που ελέγχει την παραγωγή ακετυλοχολίνης, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της τελευταίας στον οργανισμό των εντόμων να ανέρχεται σε τοξικά επίπεδα. Τα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα παρεμποδίζουν την αξονική μεταβίβαση του νευρικού παλμού, καθώς τον αποσυντονίζουν. Το θανατηφόρο αποτέλεσμα επί των εντόμων επέρχεται

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

συντομότερα στα πυρεθρινοειδή σε σχέση με τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, ενώ επίσης τα πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα εφαρμόζονται συνήθως σε δόσεις χαμηλότερες των οργανοφωσφορικών (Papadopoulou et al. 1991).

Έντομα αποθηκών όπως τα *T. castaneum, T. confusum, Ephestia cautella* (Lepidoptera: Pyralidae) και *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrychidae) έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο malathion και σε διάφορα άλλα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, ενώ άλλα είδη όπως π.χ. τα *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae), και *Sitophilus* spp. (Coleoptera: Curculionidae) φαίνεται να έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στα πυρεθρινοείδή εντομοκτόνα (Arthur 1996).

Τα κοινά εντομοκτόνα εφαρμόζονται είτε πριν είτε κατά την εισαγωγή των προϊόντων στην αποθήκη. Στην πρώτη περίπτωση, γίνεται ψεκασμός των εσωτερικών επιφανειών της αποθήκης (τοίχοι, οροφή, δάπεδο) με εντομοκτόνα μεγάλης υπολειμματικής διάρκειας δράσης. Ο καθολικός ψεκασμός των εσωτερικών επιφανειών της αποθήκης γίνεται αφού έχει προηγηθεί σχολαστικός καθαρισμός της σκόνης και των υπολειμμάτων που προϋπήρχαν. Αν η αποθήκευση γίνεται σε μεταλλικές αποθήκες (σιλό) τότε ψεκάζονται οι εσωτερικές κενές μεταλλικές επιφάνειες, όπως και ο χώρος υποδοχής του προϊόντος (τάφρος), καθώς και το σύστημα αλυσιδωτών ταινιών που μεταφέρουν το προϊόν. Στην δεύτερη περίπτωση, αναμιγνύονται τα σιτηρά, κατά την εισαγωγή τους στον αποθηκευτικό χώρο, με κατάλληλα εντομοκτόνα στις σωστές δοσολογίες. Αυτή η μέθοδος εφαρμόζεται σε οριζόντιες αποθήκες μηχανικής εισαγωγής ή σε σιλό μεταλλικά ή τσιμεντένια με τη χρήση μιας απλής ηλεκτρικής δοσομετρικής αντλίας. Αυτός ο τρόπος απεντόμωσης είναι αποτελεσματικός, ακίνδυνος, οικονομικός και ασφαλής. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η πλήρης και ομοιόμορφη διαβροχή του εισερχόμενου σιτηρού, κάτι που δυστυχώς δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε απλές, κλασικές αποθήκες οριζοντίου τύπου, οι οποίες στερούνται μέσων μηχανικής εισαγωγής (Θωμαΐδης 1992).

Τα καπνογόνα είναι εντομοκτόνα που δρουν μέσω των ατμών οι οποίοι εισέρχονται στο εσωτερικό των εντόμων μέσω της αναπνευστικής τους δραστηριότητας. Τέτοιες ουσίες είναι το βρωμιούχο μεθύλιο (CH_3Br) και η φωσφίνη (PH_3). Οι ουσίες αυτές χαρακτηρίζονται από μεγάλη πτητικότητα, και έχουν την δυνατότητα να εισδύουν σε μέρη όπου τα κοινά εντομοκτόνα δεν θα μπορούσαν να εισχωρήσουν (π.χ. μέσα σε ρωγμές). Ωστόσο, οι ουσίες αυτές είναι πολύ τοξικές για τα θερμόαιμα και βέβαια η χρήση τους πρέπει να γίνεται μόνο από εξειδικευμένο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

προσωπικό. Η εφαρμογή τους γίνεται είτε με την ταυτόχρονη ύπαρξη του προϊόντος, είτε σε άδειες αποθήκες. Σε ότι αφορά στο CH_3Br, η χρήση του στην Ευρώπη έχει απαγορευτεί σταδιακά ξεκινώντας από το έτος 2005 και εκτιμάται ότι θα έχει απαγορευτεί παγκοσμίως μέχρι το 2020 (United Nations Environment Programme, 1998). Ο λόγος της απαγόρευσης του CH_3Br, έγκειται στο γεγονός ότι η ουσία αυτή ενέχει σοβαρούς περιβαλλοντολογικούς κινδύνους, καθώς προκαλεί ανεπανόρθωτη βλάβη στο όζον της ατμόσφαιρας. (Arthur, 1996).

Η φωσφίνη είναι άχρωμο και άγευστο αέριο το οποίο έχει οσμή σκόρδου ή αποσυντεθειμένου ψαριού όταν εκλύεται από τις στερεές μορφές φωσφορούχου αργιλίου ή φωσφορούχου μμαγνησίου. Έχει μικρό μοριακό βάρος και χαμηλό σημείο βρασμού. Είναι μόλις 1,2 φορές βαρύτερο από τον αέρα και έτσι αναμειγνύεται χωρίς να στρωματώνει ή να απαιτεί την χρήση ανεμιστήρων για να αναμιχθεί με τον αέρα. Μπορεί να διεισδύσει πολύ καλά στα προϊόντα και στις ταινίες συσκευασίας. Το σημαντικότερο μειονέκτημα του είναι ότι απαιτεί, για να θανατώσει τον πληθυσμό του εντόμου - στόχου, 3 έως 7 ημέρες. Επίσης, η φωσφίνη είναι διαβρωτική στο χαλκό, τον μπρούντζο, το ασήμι και τον χρυσό (Bond et al. 1984). Η φωσφίνη δρα τόσο στα έντομα όσο και στα τρωκτικά, με τη διακοπή της αναπνοής. Συγκεκριμένα, παρεμποδίζει τη λήψη ή τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το οξυγόνο στο σώμα (Price and Walter 1987). Τα πλεονεκτήματα που έχει η φωσφίνη ως υποκαπνιστικό είναι ότι εφαρμόζεται εύκολα επειδή είναι σε στερεά μορφή, αναμιγνύεται εύκολα με τον αέρα, διαχέεται και εισέρχεται στα προϊόντα πολύ γρήγορα από κάθε άλλο γνωστό υποκαπνιστικό. Επειδή έχει μικρό μοριακό βάρος διασκορπίζεται γρήγορα και στη συνέχεια απομακρύνεται εύκολα με αερισμό (Leesch et al. 1982). Η φωσφίνη αφήνει τα χαμηλότερα επίπεδα υπολειμμάτων από κάθε άλλο καπνογόνο μετά τον υποκαπνισμό και τον αερισμό, ενώ δεν επιδρά στην βλαστικότητα και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε σπόρο που αποθηκεύεται ως πολλαπλασιαστικό υλικό (Sittisuang and Nakakita 1985). Τα έντομα των αποθηκευομένων προϊόντων έχουν ήδη αναπτύξει ανθεκτικότητα στα καπνογόνα και ειδικότερα στη PH_3, με αποτέλεσμα να απαιτούνται αυξημένες δόσεις για την αντιμετώπιση τους (Arthur, 1996).

Ο τρόπος δράσης του βρωμιούχου μεθυλίου σε οργανισμούς-στόχους ή στον άνθρωπο δεν είναι ακόμη κατανοητός. Έχει παρατηρηθεί ότι δρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα και ότι τα συμπτώματα συχνά καθυστερούν για περισσότερο από 2 μέρες στην περίπτωση των ανθρώπων (Bond 1984). Ακόμα και στα έντομα έχει

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

παρατηρηθεί καθυστέρηση στη θνησιμότητα τους και γι' αυτό είναι σωστό να υπάρχει ένα περιθώριο τουλάχιστον 24 ωρών πριν καθοριστεί η επιτυχία του υποκαπνισμού με βρωμιούχο μεθύλιο (Bond 1984). Εξαιτίας της αντίδρασης του βρωμιούχου μεθυλίου με τους δισουλφιδικούς δεσμούς δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε ορισμένα υλικά. Το βρωμιούχο μεθύλιο αντιδρά με το θείο και με τα μόρια που περιέχουν θείο. Υλικά όπως οι γούνες, το φυσικό λάστιχο, τα φτερά και το αλεύρι σόγιας δεν μπορούν να απεντομωθούν με βρωμιούχο μεθύλιο εξαιτίας της μυρωδιάς η οποία παραμένει μετά τον υποκαπνισμό. Επειδή είναι ισχυρό διαλυτικό, δεν θα πρέπει να έρχεται σε επαφή με ασφαλτούχα υλικά και ορισμένα πλαστικά όπως το PVC. Τα βασικά του πλεονεκτήματα είναι η υψηλή τοξικότητά του στα έντομα, η ικανότητά του να διεισδύει στα προϊόντα σε θερμοκρασίες και πιέσεις περιβάλλοντος και ότι δεν αναφλέγεται. Εξαιτίας αυτών των ιδιοτήτων, απαιτούνται σχετικά μικρές περίοδοι έκθεσης για την επιτυχία ενός αποτελεσματικού υποκαπνισμού. Τέλος, μπορεί, υπό προϋποθέσεις, να χρησιμοποιηθεί και για την αντιμετώπιση μικροοργανισμών, σπόρων ζιζανίων στο έδαφος, νηματωδών κτλ.

Το βρωμιούχο μεθύλιο είναι υγρό, και θα πρέπει να μετατραπεί σε αέριο για την εφαρμογή, το οποίο δεν είναι εφικτό σε χαμηλές θερμοκρασίες. Επίσης, είναι αρκετά βαρύτερο από τον αέρα και για αυτό το λόγο βρίσκεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε μικρά ύψη ενός χώρου (π.χ. κοντά στο πάτωμα) . Ακόμα, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την βλαστικότητα των σπόρων (Powell 1975). Παρόλα αυτά, το σημαντικότερο μειονέκτημα του είναι ότι αντιδρά με το στρατοσφαιρικό όζον, για έχει αρχίσει η βαθμιαία μείωση της χρήσης του, ενώ η παγκόσμια ανάκλησή του ως υποκαπνιστικό έχει σχεδιαστεί για το έτος 2015 (Bell 2000).

1.4.2 Βιοτεχνικές και Βιοτεχνολογικές μέθοδοι αντιμετώπισης.

Στις Βιοτεχνικές μεθόδους αυτές συγκαταλέγονται η χρήση παγίδων και φερομονών και ή χρήση των ρυθμιστών ανάπτυξης των εντόμων. Στις βιοτεχνολογικές μεθόδους ανήκει η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών οι οποίες έχουν προέλθει μέσω γενετικής μηχανικής. Η χρήση παγίδων και φερομονών χρησιμοποιείται κυρίως για την διαπίστωση της παρουσίας (monitoring) των εντόμων εχθρών των αποθηκευμένων προϊόντων (Philips et al. 2000), αν και σε ορισμένες περιπτώσεις η χρήση τους έχει μελετηθεί και για αντιμετώπιση (μέθοδος

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

παρεμπόδισης της συνεύρεσης των δύο φύλων, μαζική παγίδευση, μέθοδος attracticide) με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Pierce 1994, Trematerra 1994). Σε γενικές γραμμές, οι παγίδες ανιχνεύουν τους πληθυσμούς των εντόμων σε χρονικό διάστημα πολύ πιο σύντομο από το αντίστοιχο που χρειάζεται μια απλή δειγματοληψία, ευνοώντας με τον τρόπο αυτό μια πρωϊμότερη κατάστρωση του σχεδίου αντιμετωπίσεως των εντομολογικών προσβολών (Nordlund 1981). Ένα σημαντικό μειονέκτημα αυτών των παγίδων είναι ότι μπορεί να χρειάζονται συχνή αντικατάσταση εάν η επιφάνειά τους έχει κορεστεί από τα συλληφθέντα έντομα, τη σκόνη ή άλλα τεμαχίδια (Phillips et al. 2000).

Στους ρυθμιστές ανάπτυξης που έχουν μελετηθεί για την αντιμετώπιση των εντόμων εχθρών των αποθηκευμένων προϊόντων, ανήκουν οι μιμητές ορμόνης νεότητας, οι ανταγωνιστές εκδυστεροειδών και οι παρεμποδιστές σύνθεσης χιτίνης. Οι ουσίες αυτές παρεμποδίζουν την μεταμόρφωση των ατελών σταδίων των εντόμων ή πολλές φορές ακόμη και την εκολλαψιμότητα των ωών (Oberlnader et al. 2000). Τα πλεονεκτήματα της χρήσης τους είναι: α) δρουν εκλεκτικά μόνο στα έντομα και συνεπώς έχουν μικρή τοξικότητα στα θηλαστικά (Oberlander et al. 1997) και β) η πιθανότητα αναπτύξεως ανθεκτικότητας είναι μικρή, αν και έχουν καταγραφεί περιπτώσεις αναπτύξεως ανθεκτικότητας των εντόμων έναντι των ρυθμιστών ανάπτυξης (Staal 1975, Daglish 2008). Πάντως, παρόλο που ουσίες συγγενούς χημικής σύνθεσης με ορμόνες νεότητας των εντόμων (π.χ methoprene) ή και μη συγγενούς σύνθεσης (fenoxycarb, pyriproxyfen tebufenozide και methoxyfenozide), έχουν μελετηθεί και έχουν βρεθεί να είναι αποτελεσματικές επί των εντόμων που προσβάλλουν τα αποθηκευμένα προϊόντα, η χρήση τους χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση, λόγω του μεγάλου βαθμού εξειδίκευσης που παρουσιάζουν σε σχέση με το είδος του εντόμου αλλά και το στάδιο ανάπτυξης του (Elek and Longstaff, 1994). Επιπροσθέτως, οι ρυθμιστές ανάπτυξης δεν φαίνεται να είναι αποτελεσματικές σε μεγάλες κατηγορίες εντόμων αποθηκών, όπως τα Psocoptera (Athanassiou et al. 2010).

Από τις ορμόνες νεότητας το methoprene είναι το πιο αποτελεσματικό επί εντόμων που τρέφονται εξωτερικά των σπόρων (Smet et al. 1989) και έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία κατά των *Oryzaephílus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) και *Rhyzopertha dominica*, τα οποία είναι ανθεκτικά στα οργανοφωσφορικά και τα πυρεθρινοειδή, αντίστοιχα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

1.4.3 Βιολογικές μέθοδοι

Με τις μεθόδους αυτές αποσκοπούμε στη χρήση ζωντανών οργανισμών, οι οποίοι μπορούν να παρασιτήσουν, ή να τραφούν, ή να προκαλέσουν ασθένεια στα έντομα εχθρούς που προσβάλουν τα αποθηκευμένα προϊόντα. Παράγοντες της βιολογικής καταπολέμησης είναι τα έντομα φυσικοί εχθροί (αρπακτικά ή παρασιτοειδή) και οι παθογόνοι μικροοργανισμοί (βακτήρια, ιοί, μύκητες, πρωτόζωα, νηματώδεις).

Το *Bacíllus thuringiensis* Berliner (γνωστό και ως *Bt*) και το *Bacíllus cereus* Frankland είναι τα πιο σημαντικά εμπορικά είδη που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των εντόμων, αλλά και άλλων αρθροπόδων (Moore et al. 2000). Το *Bt* είναι προαιρετικό παθογόνο που προκαλεί το θάνατο γιατί τα σπόρια του σχετίζονται με τοξίνες Μεγάλο ενδιαφέρον από τις τοξίνες παρουσιάζουν η δ-ενδοτοξίνη και η β-εξωτοξίνη ή thuringiensin. Η δ-ενδοτοξίνη είναι δηλητήριο του εντέρου. Τα έντομα που έχουν προσβληθεί κινούνται αργά και έπειτα θανατώνονται. Το *Bt* τυποποιείται και εφαρμόζεται όπως τα συμβατικά εντομοκτόνα.

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μορφές του, συμπεριλαμβανομένου της βρέξιμης σκόνης, της υγρής μορφής και της σκόνης. Όπως και με τα άλλα μικροβιολογικά εντομοκτόνα, πολλά σκευάσματα του *Bt* μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αποθηκευμένα προϊόντα (Moore et al. 2000). Καθώς δρα μέσω κατάποσης, η κάλυψη είναι εξαιρετικά σημαντική για την αποτελεσματικότητα του (Brower et al. 1996). Τα κύρια πλεονεκτήματα του *Bt* είναι ότι είναι εύκολο και οικονομικό στην παραγωγή, απλό στην εφαρμογή και έχει καλή σταθερότητα αποθήκευσης (Alves et al. 1997).

1.4.4 Φυσικές μέθοδοι αντιμετώπισης

Στις φυσικές μεθόδους αντιμετώπισης, συγκαταλέγονται η τροποποίηση της υγρασίας και της θερμοκρασίας του αποθηκευμένου προϊόντος ή του περιβάλλοντος, η χρήση ακτινοβολιών και η χρήση της σκόνης της γης διατόμων και άλλων συναφών ουσιών (π.χ. διοξείδιο του πυριτίου).

Η υγρασία αποτελεί κρίσιμο παράγοντα που ευνοεί την ανάπτυξη των εντόμων και των μυκήτων. Έτσι η ξήρανση των προϊόντων και η απαλλαγή τους από την περίσσεια υγρασίας, έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη συντήρηση τους. Ξήρανση των προϊόντων εντός των αποθηκευτικών χώρων, μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση ανεμιστήρων που τροφοδοτούν την αποθήκη με θερμό αέρα υψηλής ταχύτητας. Η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

εφαρμογή ακραίων θερμοκρασιών είναι σήμερα η πιο διαδεδομένη φυσική μέθοδος. Τα έντομα δεν μπορούν να συμπληρώσουν την ανάπτυξή τους και να αναπαραχθούν σε θερμοκρασίες κάτω από 13°C ή πάνω από 35 °C. Η διάρκεια εφαρμογής των ακραίων θερμοκρασιών για τον έλεγχο των εντόμων εξαρτάται από την θερμοκρασία, το είδος του εντόμου, το στάδιο ανάπτυξής του, την «θερμοαντοχή» του και την σχετική υγρασία (Fields 1992). Η μέθοδος της χρήσης υψηλών θερμοκρασιών είναι θανατηφόρα για τα έντομα ή ακάρεα - εχθρούς σε μικρότερης χρονικής διάρκειας έκθεση από την μέθοδο των χαμηλών θερμοκρασιών. Στα περισσότερα είδη εντόμων παρατηρείται 95% θνησιμότητα, αν εκτεθούν σε θερμοκρασίες 42-50 °C για μερικές ώρες (Fields 1992). Η μέθοδος αυτή χρειάζεται πολύ προσοχή κατά την εφαρμογή της καθώς είναι πιθανή η δημιουργία πολύ υψηλών θερμοκρασιών η οποίες μπορούν να αποβούν καταστρεπτικές για τα αποθηκευμένα προϊόντα ή τον μηχανολογικό εξοπλισμό (π.χ. σε χώρους επεξεργασίας τροφίμων).

Εκτός από την χρήση υψηλών θερμοκρασιών και οι χαμηλές θερμοκρασίες αποτελούν αποτελεσματική μέθοδο απεντόμωσης χωρίς μάλιστα να προκαλούν αλλοιώσεις στα προϊόντα ή καταστροφή ορισμένων από τα συστατικά τους, όπως συμβαίνει με την χρήση πολύ υψηλών θερμοκρασιών.

Υπάρχουν 2 βασικές επιδράσεις των χαμηλών θερμοκρασιών: α) η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, διατροφής και αναπαραγωγής και β) η μείωση του ποσοστού επιβίωσης. Η θερμοκρασία κατά την οποία η αύξηση του πληθυσμού είναι μηδέν είναι σημαντική για την καταπολέμηση των εντόμων δεδομένου ότι καθορίζει την θερμοκρασία στην οποία μια μάζα σιτηρού θα πρέπει να διατηρηθεί για να αποτραπεί η αύξηση μιας προσβολής (Banks and Fields 1995).

Πριν την εφαρμογή των χαμηλών θερμοκρασιών, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:

1. Υπάρχουν έντομα που θανατώνονται σε θερμοκρασίες ελάχιστα υψηλότερες από το σημείο πήξεως της αιμολέμφου τους. Επίσης, υπάρχουν έντομα που θανατώνονται μόλις οι ιστοί τους παγώσουν, ενώ υπάρχουν και άλλα που μπορούν να επιβιώσουν έστω κι αν εκτεθούν για πολλές ώρες σε χαμηλές θερμοκρασίες μέχρι και -15 ή -20°C.

2. Πολλά έντομα αν εγκλιματισθούν για ορισμένο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από αυτές όπου ζουν συνήθως, τότε είναι ικανά να αντέξουν σε πιο χαμηλές θερμοκρασίες, στις οποίες φυσιολογικά θα θανατώνονταν. Για παράδειγμα το *Cryptolestes ferrugineus* αν εκτεθεί στους -

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

12°C επί 72 ώρες θανατώνεται. Αν όμως επί 4 εβδομάδες υποστεί θερμοκρασίες 15°C, τότε το 61 % των τέλειων εντόμων κατορθώνει να επιβιώσει για 4 εβδομάδες στους -12°C.

3. Τα διάφορα στάδια ενός εντόμου παρουσιάζουν διαφορετική αντοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες. Έτσι π.χ. τα τέλεια του *Acanthoscelides obtectus* είναι πολύ πιο ευαίσθητα από τις προνύμφες του (Σταμόπουλος 1999).

Για την επίτευξη πολύ χαμηλών θερμοκρασιών απαιτούνται συσκευές ψύξεως. Οι ψυκτικές ουσίες είναι συνήθως το αλογόνο (πχ. freon) ή η αμμωνία. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι σε συνδυασμό με τις συσκευές ψύξεως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ρεύματα ψυχρού αέρα που βοηθούν στην ταχεία πτώση της θερμοκρασίας και στη γρήγορη ψύξη ολόκληρης της μάζας των προϊόντων.

- Χρήση ελεγχόμενων ατμοσφαιρών

Με τη μέθοδο αυτή προσπαθούμε να ελέγξουμε πληθυσμούς εντόμων που προσβάλλουν προϊόντα που βρίσκονται σε μεγάλους αλλά καλά κλεισμένους χώρους (σιλό, containers) μεταβάλλοντας την σύνθεση του ατμοσφαιρικού αέρα, είτε προσθέτοντας CO_2 ή N_2 ή αφαιρώντας O_2. Με αυτό τον τρόπο πετυχαίνουνε να δημιουργήσουμε συνθήκες δυσμενείς για την επιβίωση όχι μόνο αρθροπόδων αλλά και μυκήτων που προσβάλλουν τα αποθηκευμένα προϊόντα.

Εκτός από την επέμβαση στη σύνθεση του ατμοσφαιρικού αέρα που περιβάλλει το προϊόν, μπορούμε επίσης να επέμβουμε στη σχετική του υγρασία ή στην ατμοσφαιρική πίεση. Τις περισσότερες φορές, γίνεται συνδυασμένη χρήση των παραπάνω μεθόδων ώστε να έχουμε καλύτερα αποτελέσματα. Π.χ. σε πειράματα που έγιναν από τους Jay et al. (1971) με τέλεια των *T. confusum, T. casfaneum* και *O. surinamensis,* βρέθηκε ότι η ελάττωση της σχετικής υγρασίας της ατμόσφαιρας που περιέχει 99% N_2 από 68% σε 9%, αύξησε την θνησιμότητα των εντόμων αυτών από 3% στα 98% για τα δύο πρώτα και στο 40% για το τρίτο.

Γενικά η μέθοδος αυτή δεν έχει γενικευθεί γιατί απαιτεί ειδικές εγκαταστάσεις που ανεβάζουν το κόστος απεντόμωσης παρόλο που πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να ελέγξει τόσο εντομολογικές όσο και μυκητολογικές προσβολές, δεν αφήνει ανεπιθύμητα υπολείμματα, δεν επηρεάζει δυσμενώς το προϊόν ή τις εγκαταστάσεις όπου αυτό είναι αποθηκευμένο και δε φαίνεται να επηρεάζει την βλαστική ικανότητα των σπόρων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

-Χρήση ιονιζουσών ακτινοβολιών

Οι ιονίζουσες ακτινοβολίες, μπορεί να χρησιμοποιηθούν εναντίον εντόμων που προσβάλλουν αποθηκευμένα προϊόντα είτε εφαρμοζόμενες κατευθείαν στα προσβεβλημένα προϊόντα, είτε χρησιμοποιούμενες για στείρωση εντόμων, με σκοπό τη βαθμιαία μείωση των πληθυσμών τους, Η εφαρμογή τους για στείρωση εντόμων δε βρήκε έδαφος στην περίπτωση των εντόμων αποθήκης γιατί τα στείρα έντομα εξακολουθούν τρεφόμενα να προκαλούν ζημιές στα προϊόντα.

Δυο κυρίως τύποι ακτινοβολίας έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για απεντόμωση προϊόντων: η γ ακτινοβολία που παράγεται από ραδιενεργά ισότοπα (Co-60 ή Cs- 137) και τα ηλεκτρόνια υψηλής ταχύτητας (σωματίδια β μέγιστης ενέργειας 10 megavolts) που κατευθύνονται επάνω στο προϊόν που κινείται σε λεπτό στρώμα (max, 1,7 cm) μπροστά από μηχάνημα σάρωσης, Η ακτινοβολία γ είναι πιο αποτελεσματική γιατί έχει πολύ μεγαλύτερη ικανότητα διείσδυσης.

Η χρήση ακτινοβολιών εναντίον εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων είναι μία μέθοδος που δεν αφήνει κατάλοιπα στα προϊόντα και σε αρκετές περιπτώσεις, απεδείχθη κατάλληλη σαν μέθοδος προστασίας τους, Το κυριότερο μειονέκτημα της είναι το υψηλό κόστος των εγκαταστάσεων που απαιτεί η εφαρμογή της. Κυρίως εφαρμόζεται για απεντόμωση μεγάλων ποσοτήτων σπόρων η άλλων τροφίμων στο τελικό στάδιο της επεξεργασίας τους και για δημητριακά προϊόντα χύδην η συσκευασμένα, πριν από την εξαγωγή τους.

Αν και η επιτρεπόμενη δόση ακτινοβολίας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για απεντομώσεις τροφίμων είναι μέχρι 10,000 gray (1 Gy =100 rads), στην πράξη χρησιμοποιούνται δόσεις μέχρι 1 kGy (100 krad). Μάλιστα, τις περισσότερες φορές οι χρησιμοποιούμενες δόσεις κυμαίνονται μεταξύ 200 - 300 Gy (20-30 krad), ενώ η ενέργεια των παραγόμενων ηλεκτρονίων δεν ξεπερνά το 1,4 MeV. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, είναι πρακτικά αδύνατο να διεγερθούν οι πυρήνες ατόμων διαφόρων υλικών (περιλαμβανομένων και των τροφών), ώστε να εκδηλωθεί ραδιενεργός ακτινοβολία.

Ένα άλλο σοβαρό πρόβλημα που ανακύπτει επίσης είναι η αποδοχή από μέρους του καταναλωτικού κοινού του ακτινοβολημένου προϊόντος. Πράγματι, σε πολλές περιπτώσεις το κοινό αρνείται να καταναλώνει τέτοια προϊόντα και έτσι σε πολλές Χώρες (π.χ. Γερμανία) δεν επιτρέπεται η εισαγωγή ακτινοβολημένων προιόντων. (Σταμόπουλος 1999).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

-Γη διατόμων

Η σκόνη της γης διατόμων (diatomaceous earth ή συντομογραφικά DE) είναι προϊόν μηχανικής επεξεργασίας (λατόμηση, ξήρανση, άλεση) απολιθωμένων διατόμων. Τα διάτομα που είναι μονοκύτταρα φύκη (Bacillariophyta), πιθανότατα αποτελούν το πιο διαδεδομένο είδος φυτών στον πλανήτη (περισσότερα από 40000 είδη) και απαντώνται τόσο σε χερσαία όσο και σε υδάτινα οικοσυστήματα (Round et al., 1992). Το κύτταρο των διατόμων προστατεύεται εντός περιβλήματος που αποτελείται από διοξείδιο του πυριτίου. Η φυσική γη διατόμων περιέχει ποσοστό υγρασίας περίπου 50% ενώ το 86-94% της στερεάς μορφής της είναι το διοξείδιο του πυριτίου και το υπόλοιπο άργιλος, πηλός και οξείδια μετάλλων (Korunic 1998). Το εντομοκτόνο αποτέλεσμα, προέρχεται μέσω της επαφής των εντόμων με τα σωματίδια της σκόνης και λιγότερο έως καθόλου μέσω κατάποσης των σωματιδίων της (Korunic, 1998).

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία (Korunic 1998, Subramanyam and Roesli 2000) έχουν προταθεί οι παρακάτω τρόποι, ως οι πιθανότεροι, για τον τρόπο δράσης της σκόνης της γης διατόμων επί των εντόμων:

- Ο θάνατος επέρχεται μέσω κατάποσης των σωματιδίων της σκόνης γης διατόμων.
- Η γη διατόμων φράσσει τα αναπνευστικά τρίμματα μέσω της επαφής της με τα έντομα, ή τις τραχείες, με αποτέλεσμα ο θάνατος να επέρχεται μέσω ασφυξίας.
- Η σκόνη της γης διατόμων δημιουργεί αμυχές στον εξωσκελετό των εντόμων. Έτσι παρατηρείται συνεχής αποβολή νερού από το εσωτερικό του σώματος των εντόμων -διαμέσου των αμυχών-, με αποτέλεσμα την κατάληξη του εντόμου μέσω αφυδάτωσης.
- Η σκόνη της γης διατόμων, μέσω απορρόφησης, δεσμεύει τα λιπίδια που βρίσκονται στο κηρώδες στρώμα του εξωσκελετού των εντόμων. Ο ρόλος των λιπιδίων είναι η αδιαβροχοποίηση αλλά και η σταθεροποίηση της εσωτερικής υγρασίας των εντόμων. Τα λιπίδια, μετά την δέσμευση τους, καθίστανται ανενεργά με αποτέλεσμα να παρατηρείται συνεχής εκροή νερού από το εσωτερικό των εντόμων προς το εξωτερικό περιβάλλον και ο θάνατος του εντόμου να επέρχεται μέσω αφυδάτωσης.

Σήμερα, ως ο πλέον αποδεκτός και κυριότερος τρόπος δράσης της σκόνης της γης διατόμων θεωρείται η δράση μέσω αφυδάτωσης. Αναφέρεται επίσης ότι οι αδρανείς σκόνες δρουν απωθητικά επί των εντόμων, οπότε αυτή η απωθητική τους ικανότητα μπορεί να προσδώσει κάποια επιπλέον προστασία απέναντι σε αυτά (Korunic, 1998).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Κεφάλαιο 2

2.1 Έντομα αποθηκευμένων γεωργικών προϊόντων και τροφίμων και η σημασία τους

Με τον όρο έντομα αποθηκευμένων προϊόντων, χαρακτηρίζουμε τα αρθρόποδα εκείνα που προσβάλλουν εδώδιμα η μη προϊόντα που βρίσκονται στη φάση της επεξεργασίας η της αποθήκευσης τους (Μπουχέλος 1993). Η προσβολή αυτή μπορεί να γίνει αποκλειστικά στην αποθήκη, αλλά δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις όπου η πρωτογενής προσβολή γίνεται στον αγρό και κατόπιν το έντομο συνεχίζει το βιολογικό του κύκλο στο αποθηκευμένο προϊόν. Εδώ συμπεριλαμβάνονται επίσης και τα αρθρόποδα εκείνα που προσβάλλουν μέσα στα σπίτια τρόφιμα η ρούχα, όπως και εκείνα που προκαλούν ζημιές σε μουσειακές συλλογές (βαλσαμωμένα ζώα, εντομολογικές συλλογές, στολές, υφάσματα, ταπετσαρίες κλπ), καθώς και τα ξυλοφάφα έντομα.

Τα είδη των διαφόρων αρθροπόδων που προσβάλλουν αποθηκευμένα προϊόντα, ανέρχονται σε πολλές δεκάδες και σύμφωνα με τον FAO οι απώλειες που έχουν οι λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες σε κάθε είδους εδώδιμους σπόρους, ανέρχονται σε περίπου 81 εκ. τόνους. Υπολογίζεται γενικά ότι το 10% της παγκόσμιας παραγωγής δημητριακών χάνεται κάθε χρόνο εξ αιτίας των αρθροπόδων, κυρίως των εντόμων, που υπάρχουν στα μετασυγκομιστικά στάδια. Χώρες όπως πχ η Νιγηρία και η Αιθιοπία υπολογίζεται ότι χάνουν το 30% της παραγωγής τους σε αραβόσιτο από έντομα αποθηκών, ενώ η Ιταλία αναφέρεται ότι χάνει το 5% της παραγωγής της σε δημητριακά κατά την αποθήκευση.

Τα περισσότερα είδη εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων ανήκουν στις τάξεις των Κολεοπτέρων και Λεπιδόπτερων και λιγότερα στις τάξεις των Δίπτερων, Υμενοπτέρων, Ψωκοπτέρων κλπ. Έντομα όπως οι κατσαρίδες (Δικτυόπτερα) και μυρμήγκια (Υμενόπτερα) που θα μπορούσαμε να τα συμπεριλάβουμε στην κατηγορία αυτή, τα θεωρούμε και τα μελετούμε πολλές φορές ως έντομα οικιών παρά αποθηκών (Σταμόπουλος 1999).

Έχει υπολογισθεί ότι, τα τέλεια και οι προνύμφες των κολεοπτέρων και οι προνύμφες των λεπιδοπτέρων καταβροχθίζουν σε μια εβδομάδα προϊόν βάρους έως

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

πολλαπλάσιου του βάρους τους. Μόνο μια προνύμφη *Ephestia kuehniella* , κατατρώει το φύτρο 50 περίπου σπόρων μέχρι τη νύμφωσή της (Aitken 1975, Μπουχέλος 1993).

Εκτός από τις ποσοτικές ζημιές, οι προσβολές των αποθηκευμένων προϊόντων από έντομα και ακάρεα μπορεί να δημιουργήσουν προβλήματα υγείας στους καταναλωτές αυτών των προϊόντων. Η παρουσία εντόμων σε προϊόντα που είτε βρίσκονται στο στάδιο της επεξεργασίας είτε φτάνουν στην κατανάλωση, είναι πολλές φορές συνδεδεμένη με την εμφάνιση αλλεργικών αντιδράσεων (Mallis 2008). Έτσι:

- Η παρουσία διαφόρων τμημάτων των εντόμων (τριχών, ποδιών, φτερών) μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση σε προσωπικό επεξεργασίας φυτικών προϊόντων. Η παρουσία πολύ μεγάλου αριθμού εκδυμάτων ή τριχών π.χ. των προνυμφών εντόμων της οικ. Dermistidae μπορεί να προκαλέσει έντονο κνησμό στο λαιμό, συνοδευόμενο από ξηρό και συνεχή βήχα, δερματίτιδες, επιπεφυκίτιδα, ρινίτιδες, έκζεμα κα.
- Τα ακάρεα *Acarus siro* και *Tyrophagus putrescentiae* (Astigmata), που προσβάλουν τα άλευρα, είναι υπεύθυνα για αλλεργικές δερματίτιδες γνωστές ως "κνησμός των αρτοποιών". Επίσης, σχετίζονται με άσθμα και αλλεργίες.
- Αλλεργικά φαινόμενα μπορούν να εμφανιστούν επίσης όταν σωματικά τμήματα νεκρών εντόμων, που έχουν κονιορτοποιηθεί, εισέλθουν στον οργανισμό μέσω της αναπνευστικής οδού αλλά και μέσω της τροφής. Τέτοιες αλλεργίες έχουν αναφερθεί από διάφορα είδη Κολεοπτέρων αποθηκών.
- Η κατάποση τμημάτων ή ολόκληρων εντόμων, σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητα φαινόμενα που συνήθως εκδηλώνονται με δυσπεψία, εμετούς, ναυτίες, διάρροιες, μυιάσεις κλπ.
- Τρόφιμα που προσβλήθηκαν από έντομα της οικ. Tenebrionidae μπορεί να περιέχουν κινόνες που παράγουν τα έντομα αυτά σε εντυπωσιακές μάλιστα ποσότητες (380 μg / τέλειο) και οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν δερματίτιδες, ερυθήματα, φλύκταινες και ερεθισμούς στα μάτια, ενώ είναι ύποπτες και για καρκινογένεση.
- Μερικά από τα έντομα που βρίσκονται σε χώρους αποθήκευσης και επεξεργασίας τροφίμων, πολλές φορές μπορεί να γίνουν φορείς βακτηρίων (*Salmonella*, Enterobacteriaceae) και ιών (πολιομυελίτιδας, ηπατίτιδας, π.χ. κατσαρίδες). Η παρουσία τοξινών που παράγονται από έντομα ή μυκοτοξινών

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

που παράγονται από μύκητες μετά από εντομολογικές προσβολές, σε τρόφιμα, είναι από τα σοβαρότερα προβλήματα που μπορούν να παρουσιαστούν σε αποθηκευμένα προϊόντα, λόγω της άμεσης σχέσης των ουσιών αυτών με καρκινογενέσεις.

2.2 Τα σπουδαιότερα έντομα αποθηκών

Πίνακας 1. Τα σπουδαιότερα έντομα αποθηκών

ΚΟΛΕΟΠΤΕΡΑ		
Οικογένεια	**Είδος**	**Προσβολές**
Anodiidae	*Lasioderma serricorne*	Εχθρός του καπνού. Προσβάλει τσιγάρα, πούρα, κακάο, μπαχαρικά, ζυμαρικά, όσπρια
Curculionidae	*Sitophilus granarius*	Σπόρους δημητριακών (σιτάρι, ρύζι, βρώμη, κριθάρι, αραβόσιτο)
	Sitophilus oryzae	Ρύζι και σπόρους δημητριακών.
Bruchidae	*Acanthoscelides obtectus*	Σπόρους ψυχανθών
	Bruchus pisorum	
	Bruchus lentis	
Dermestidae	*Trogoderma granarium*	Τρέφεται αποκλειστικά με φυτικές ύλες και είναι καταστρεπτικό στα αποθηκευμένα σιτηρά
Trogostidae	*Tenebrioides mauritanicus*	Η προνύμφη προσβάλει σπόρους σιτηρών ήδη προσβεβλημένους από άλλα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

		είδη. Το τέλειο τρέφεται και από άλλα έντομα αποθηκών (σαρκοφάγο)
Bostrychidae	*Rhyzopertha dominica*	Είναι το πολυπληθέστερο έντομο αποθηκών σε αποθηκευμένο σιτάρι και ρύζι στην Ελλάδα. Προσβάλλει επίσης κριθάρι, καλαμπόκι, μπισκότα και άλλα προϊόντα αλεύρου.
Tenebrionidae	*Tribolium confusum*	Όλα τα είδη σπόρων, άλευρα, πίτυρα, μπαχαρικά, και μεγάλη ποικιλία ξηρών φυτικών υλών (ρίζες, φρούτα, καρπούς)
	Tribolium castaneum	
ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΑ		
Οικογένεια	Είδος	Προσβολές
Pyralididae	*Ephestia elutella*	Εκτός από τα καπνόφυλλα προσβάλλει κακάο, σοκολάτα, αλεύρι, ζυμαρικά, αφυδατωμένα λαχανικά
	Ephestia kuehniella	Άλευρα, σπόρους σιτηρών, όσπρια ξηρούς καρπούς
	Ephestia cautella	Ξηρά φρούτα ενώ προσβάλει λιγότερο το αλεύρι, τα μπισκότα, τη σοκολάτα και τις ζωοτροφές .
	Plodia interpunctella	Διάφορα είδη σπόρων, σκόνη γάλακτος ,σοκολάτα
Gelechiidae	*Sitotroga cerealella*	Σοβαρός εχθρός των σπόρων όλων των καλλιεργούμενων σιτηρών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

2.2.1 ΚΟΛΕΟΠΤΕΡΑ

Οικογένεια Anodiidae

α) *Lasioderma serricorne* (F*)*: κν. Σκαθάρι (ψείρα) του ξερού καπνού.

Τέλειο: Μήκος 2 – 3 mm, σχήμα ωοειδές, χρώμα υποκάστανο έως ερυθροκαστανό. Έλυτρα χωρίς γραμμώσεις καλυπτόμενα από λεπτό χνούδι (Εικ. 2.1)

Προνύμφη: Μήκος μέχρι 4mm, λευκή – υποκίτρινη, κοντόχοντρη με λευκές τρίχες.

Βιολογία – Προσβολές: Μπορεί να έχει ακόμα και πάνω από 4 γενεές ανά έτος. Διαχειμάζει ως προνύμφη μέσα σε καπνοδέματα. Η προνύμφη καθώς και το τέλειο κατατρώγουν τον καπνό στο βάθος των καπνοδεμάτων. Προσβάλλει κυρίως όλα τα προϊόντα του καπνού και του κακάο (Εικ. 2.2). Έχει ευρύτατο κύκλο τροφικών προτιμήσεων. Προσβολές συναντάμε σε όσπρια, ζυμαρικά, ελαιώδεις σπόρους, αυτοφυή φυτά κ.α.

Εικ. 2.1: **Το ακμαίο του *Lasioderma***

Lasioderma serricorne

Εικ. 2.2: **Προσβολή**

***serricorne*.**

Οικογένεια Curculionidae

α) ***Sitophilus granarius* (L) ή *Calandra granaria* (L) : κν. Σκαθάρι του σιταριού.**

Τέλειο: Μήκος 3 – 4 mm. Τα έλυτρα φέρουν αυλακώσεις. (Εικ. 2.3)

Προνύμφη: Μήκος 3 – 4 mm, κοντόχοντρη, κεκαμμένη, κιτρινωπή.

Βιολογία – Προσβολές: Έχει 4 – 5 γενεές κατ' έτος. Γεννά μέχρι 400 αυγά σε βοθρία που ανοίγουν σε κάθε σπόρο. Η προνύμφη αναπτύσσεται μέσα στο σπόρο. Προσβάλλει όλους τους σπόρους δημητριακών και σπανιότερα όσπρια και ξηρούς καρπούς.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Εικ. 2.3: Το ακμαίο του *Sitophilus granaries*

***Β) Sitophilus oryzae* (L) : Σκαθάρι του ρυζιού.**

Τέλειο: Μήκος 3 – 4 mm και 2,5 – 4,5 mm αντίστοιχα. Τα έλυτρα φέρουν αυλακώσεις και παρατηρούνται 4 ανοιχτόχρωμες κηλίδες. Το *S. granarius* δεν πετά διότι δεν έχει μεμβρανοειδείς πτέρυγες, όμως το *S. oryzae* πετά (Εικ.2.4).

Προνύμφη: Μήκος 3 – 4 mm, κοντόχοντρη, κεκαμένη, κιτρινωπή.

Βιολογία – Προσβολές: Έχει 4 – 5 γενεές κατ' έτος. Γεννά μέχρι 400 αυγά σε βοθρία που ανοίγουν σε κάθε σπόρο. Η προνύμφη αναπτύσσεται στο σπόρο. Επειδή πετά, προσβάλλει τα φυτά και στον αγρό. Προσβάλλει όλους τους σπόρους δημητριακών και σπανιότερα όσπρια και ξηρούς καρπούς. (Εικ. 2.5)

Εικ. 2.4: Το ακμαίο του *Sitophilus oryzae* (L).

Εικ.2.5: Προσβολή του *Sitophilus oryzae* (L).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Οικογένεια Bruchidae

α) *Acanthoscelides obtectus* (Say) : Βρούχος των φασολιών.

Τέλειο: Μήκος 3 – 4 mm, σχήμα ωοειδές, χρώμα καστανό – μαύρο καλυπτόμενο με λεπτό φαιό χνούδι (Εικ.2.6).

Προνύμφη: Μήκος 3 mm, σαρκώδης, κυρτή, λευκή με κίτρινη κεφαλή.

Βιολογία – Προσβολές: Έχει 3 – 4 γενεές το χρόνο. Η προσβολή αρχίζει πάνω στο φυτό και συνεχίζεται στην αποθήκη. Μεταναστεύει στον αγρό κατά τη θερμή περίοδο. Προσβάλλει τα φασόλια αλλά και τη σόγια (Εικ. 2.7).

Εικ.2.6: Το ακμαίο του *Acanthoscelides obtectus*.

Εικ.2.7: Προσβολή του *Acanthoscelides obtectus*.

Οικογένεια Dermestidae

α) ***Trogoderma granarium* (Everts) : Τρωγόδερμα των σπόρων.**

Τέλειο: Μήκος 3 mm, ωοειδές, καστανό (Εικ.2.8).

Προνύμφη: Μήκος 5 mm, χρώμα ανοιχτό καστανό, φέρει μακριές και λεπτές κοκκινωπές τρίχες.

Βιολογία – Προσβολές: Έντομο καραντίνας για πολλές χώρες. Το τέλειο δεν τρέφεται ενώ η προνύμφη μπορεί να έχει μακρά διάπαυση (έως 8 έτη) και να δραστηριοποιηθεί όταν οι συνθήκες γίνουν ευνοϊκές (ξηροθερμικές). Προσβάλει σιτηρά, ελαιώδεις σπόρους και πλακούντες (Εικ 2.9).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Εικ.2.8: Το ακμαίο του *Trogoderma granarium*.

Εικ.2.9: Προσβολή του *Trogoderma Granarium* σε καρπούς ελιάς

Οικογένεια Trogostidae

α) *Tenebrioides mauritanicus* (L) : Σκαθάρι των σπόρων.

Τέλειο: Μήκος 8 – 11 mm, καστανόμαυρο με πόδια και κεραίες καστανέρυθρα. Τα έλυτρα φέρουν ραβδώσεις (Εικ. 2.10).

Προνύμφη: Ανεπτυγμένη, έχει μήκος 15 – 20 mm. Χρώμα λευκό – κίτρινο. Φέρει τρίχες.

Βιολογία – Προσβολές : Έντομο μακρόβιο. Το τέλειο ζει 1 – 2 έτη και η προνύμφη 2 – 3. Από την άνοιξη έως και το φθινόπωρο γεννά 800 – 1000 αυγά πολύ ανθεκτικά στο ψύχος (έως -9 ^{0}C). Η προνύμφη τρέφεται από ήδη προσβεβλημένους σπόρους άλευρα, πίτουρα, βαμβακόσπορο. Το τέλειο τρέφεται από άλλα έντομα αποθηκών (αρπακτικό- νεκροφάγο).

Εικ. 2.10: Ακμαίο *Tenebrioides mauritanicus*.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Οικογένεια Bostrychidae

α) *Rhyzopertha dominica* (F) : Σκαθάρι του ρυζιού.

Τέλειο: Μήκος 3 mm, επίμηκες κυλινδρικό, καστανού χρώματος. Η κεφαλή δεν φαίνεται. Τα έλυτρα φέρουν ευκρινείς κατά μήκος γραμμές από μικρά κοιλώματα (2.11).

Προνύμφη: Μήκος 4 – 6 mm, με σώμα παχύ, κυρτό, διογκωμένο εμπρός, υπόλευκη.

Βιολογία – Προσβολές : Έχει 4 – 6 γενεές το χρόνο. Διαχειμάζει σ' όλα τα στάδια. Πολλές προνύμφες προσβάλλουν έναν σπόρο όπου και νυμφώνονται. Είναι το πολυπληθέστερο έντομο σε αποθήκες ρυζιού και σιτηρών στην Ελλάδα, καθώς και σε πολλές άλλες περιοχές του κόσμου. Προσβάλλει ακόμη καλαμπόκι, κριθάρι κ.α (Εικ 2.12).

Εικ. 2.11: Ακμαίο *Rhyzopertha dominica* (F)

Εικ. 2.12: Προσβολή *Rhyzopertha dominica* (F)

Οικογένεια Tenebrionidae

α) *Tribolium castaneum* (Herbst): Σκούρο σκαθάρι των αλεύρων.

Τέλειο: Μήκος 3,5 mm, πεπλατυσμένο ερυθρό καστανό, γυαλιστερό (Εικ.2.13).

Προνύμφη: Μήκος 5 mm, λευκοκίτρινη, φέρει πυλωρικά τριχίδια (Εικ.2.14).

Βιολογία – Προσβολές : Έχει μέχρι 5 γενεές το χρόνο, το θηλυκό γεννά 600 αυγά. Προτιμά ήδη προσβεβλημένους ή σπασμένους σπόρους. Προσβάλλει όλα τα είδη σπόρων (σιτηρά, όσπρια, ζωοτροφές, μπαχαρικά και λιγότερο το βαμβακόσπορο).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

***Εικ 2.13*:** Ακμαίο του *Tribolium castaneum*

Εικ.2.14: Στάδια ανάπτυξης του T.castaneum

2.2.2 ΛΕΠΙΔΟΠΤΕΡΑ

Οικογένεια Pyralidae

***α) Ephestia kuehniella* (Zeller) : Σκουλήκι των αλεύρων.**

Τέλειο: Άνοιγμα πτερύγων 18 – 25 mm. Το σώμα και οι πρόσθιες τεφρό χρώμα. Οι οπίσθιες πτέρυγες έχουν χρώμα υπόλευκο με καστανό (Εικ.2.15).

Προνύμφη: Μήκος 11 mm, χρώμα υποπόδινο, κεφαλή καστανή.

Βιολογία – Προσβολές : Έχει ως και 5 γενεές το χρόνο. Είναι νυκτόβιο και δραστηριοποιείται με το ημίφως ή τη νύχτα. Τα θηλυκά ωοτοκούν συνήθως πάνω στους σωρούς των αλεύρων (200 – 300 αυγά το καθένα). Οι προνύμφες κατασκευάζουν θήκες μέσα στις οποίες τρέφονται και αναπτύσσονται. Με αυτόν τρόπο ρυπαίνουν, προκαλούν ζυμώσεις και δυσάρεστες οσμές στα άλευρα και τα υποβαθμίζουν. Εκτός από τα άλευρα και σπόρους δημητριακών προσβάλλει ακόμη όσπρια, πίτουρα, γύρη σε κυψέλες μελισσών κ.α.

Εικ.2.15: Το ακμαίο του *Ephestia kuehniella*

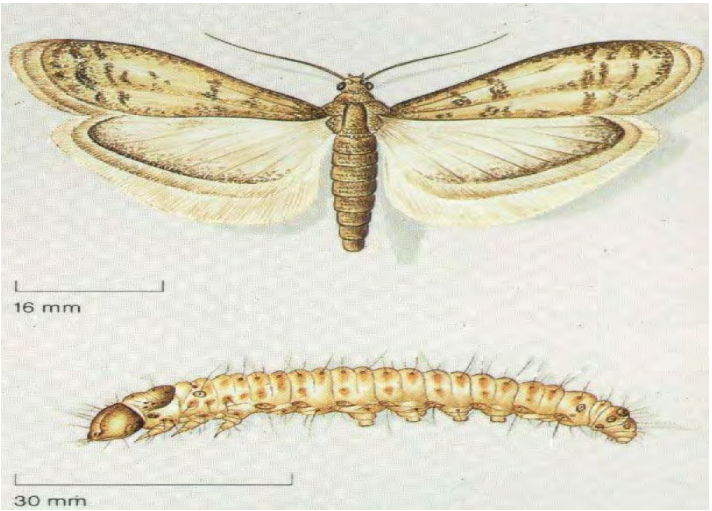
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

β) *Ephestia (Cadra) cautella* (Walker) : Σκουλήκι σύκων, σταφίδας.

Τέλειο: Άνοιγμα πτερύγων 15-20 mm.Ο χρωματισμός είναι λίγο σκουρότερος από το *E. Kuehniella* (Εικ.2.16).

Προνύμφη: Μήκος 8- 15 mm και έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με την προνύμφη του *E. kuehniella.*

Βιολογία – Προσβολές : Έχει 3 – 4 γενεές το χρόνο. Διαχειμάζει ως προνύμφη σε ξερά σύκα ή σε βομβύκιο. Τον Ιούνιο εμφανίζονται τα τέλεια και τοποθετούν τα αυγά τους (100 – 200) είτε σε ημίξερα σύκα (πάνω ή κάτω από τα δέντρα) είτε σε ήδη αποθηκευμένα σύκα. Τον Αύγουστο η καινούργια γενεά προσβάλλει σύκα απλωμένα για ξήρανση κι έτσι συνεχίζεται η προσβολή μέσα στις αποθήκες. Εκτός από τα σύκα προσβάλλει και πολλά ξερά φρούτα.



Εικ.2.16: Στάδια ανάπτυξης του *Ephestia cautella*

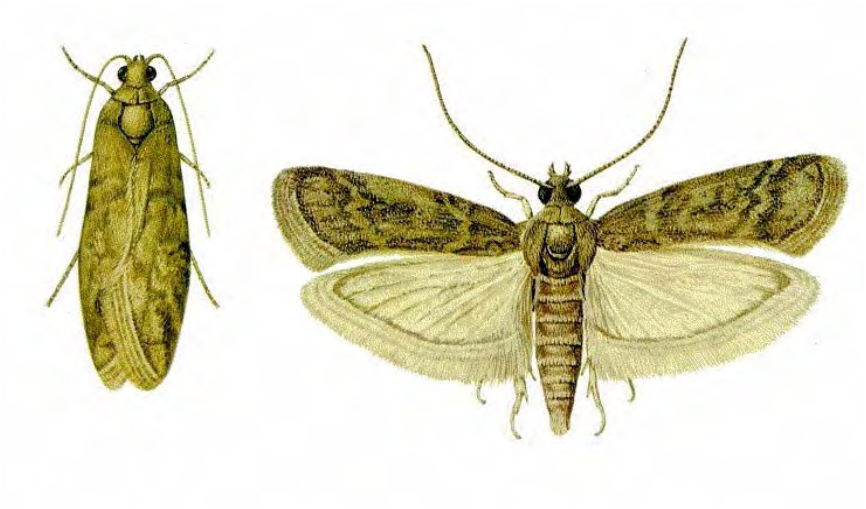
γ) Ephestia elutella (Hübner) **:** Σκουλήκι του καπνού ή του κακάο

Τέλειο: Άνοιγμα πτερύγων 14-20 mm. Παρόμοια χαρακτηριστικά με τα προηγούμενα δύο (Εικ.2.17).

Προνύμφη: Παρόμοια χαρακτηριστικά με τα προηγούμενα δύο.

Βιολογία – Προσβολές : Συμπληρώνει 3 – 4 γενεές κατ' έτος. Διαχειμάζει σε βομβύκιο. Τον Απρίλιο εμφανίζονται τα τέλεια και γεννούν πάνω σε δέματα καπνού. Οι προνύμφες τρώνε το φύλλο, από το μίσχο προς την κορυφή. Η προσβολή περιορίζεται στα επιφανειακά φύλλα. Προτιμούν καπνά με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και χαμηλή σε νικοτίνη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87



Εικ.2.17: Το ακμαίο *Ephestia elutella*

δ)Plodia interpunctella (Hübner) **:** Κοινό σκουλήκι αποθηκών.

Τέλειο: Άνοιγμα πτερύγων 15 – 20 mm. Οι πρόσθιες πτέρυγες κατά το ήμισυ έχουν χρώμα καστανέρυθρο με δύο εγκάρσιες μαύρες γραμμώσεις. Το υπόλοιπο ήμισυ είναι αργυρόλευκο. Οι οπίσθιες πτέρυγες έχουν αργυρόλευκο χρώμα και φέρουν κρόσσια (Εικ.2.18).

Προνύμφη: Μήκος 8 – 12 mm με χρώμα υπόλευκο- υποπόδινο ανάλογα με την τροφή. Κεφαλή καστανή.

Βιολογία – Προσβολές : Μπορεί να συμπληρώσει έως 8 γενεές κατ' έτος. Είναι νυκτόβια και γεννά περίπου 150 αυγά, πάνω σε σπόρους ή άλλα προϊόντα. Η προνύμφη τρέφεται από αυτά υφαίνοντας μετάξινα νήματα. Νυμφώνεται σε βομβύκιο. Είναι έντομο πολυφάγο και μπορεί να προσβάλει σπόρους ,ξερά σύκα, προϊόντα αμύλου κα.

Εικ.2.18: Το ακμαίο του *Plodia interpunctella.*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

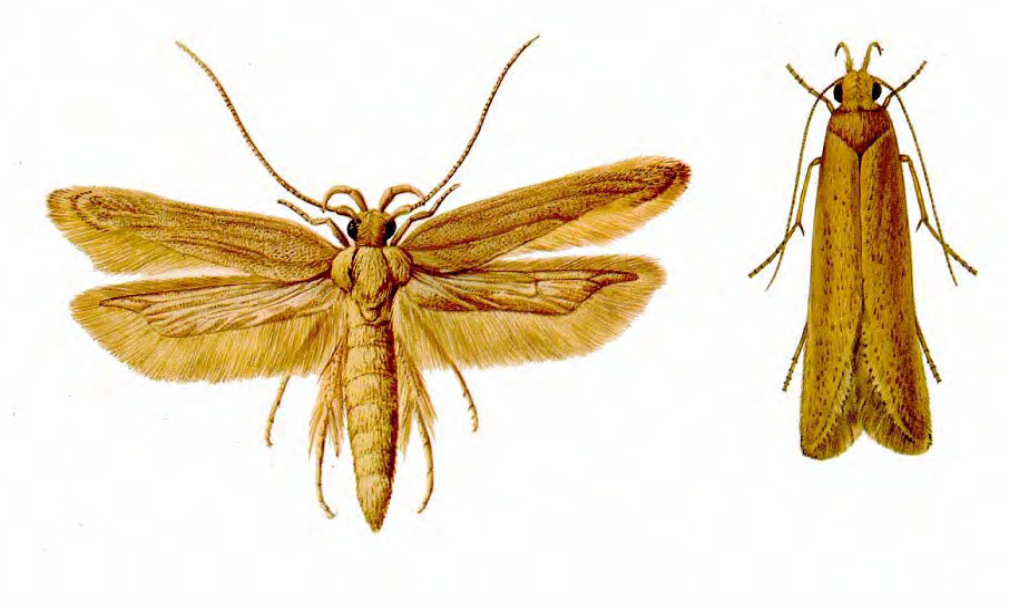
Οικογένεια Gelechiidae

α) *Sitotroga cerealella* (Oliver) : Σιτότρωγα.

Τέλειο: Πτέρυγες κροσσωτές μυτερές, με χρώμα κίτρινο τεφρό οι πρόσθιες και τεφρό οι οπίσθιες. Άνοιγμα πτερύγων 12 – 16 mm (Εικ.2.19)

Προνύμφη: Μήκος έως 9 mm, χρώμα ανοιχτό καστανό ή υπόλευκο.

Βιολογία – Προσβολές : Μπορεί να έχει 3 – 5 γενεές το χρόνο. Γεννά πάνω στους σπόρους σιτηρών. Οι προνύμφες ζουν και αναπτύσσονται αποκλειστικά μέσα στους σπόρους. Δεν δημιουργούν νήματα. Προσβάλλουν όλους τους σπόρους των σιτηρών αλλά και καλλιεργούμενα αγρωστώδη. Προσβεβλημένο κριθάρι είναι ακατάλληλο για ζυθοποιία.



Εικ.2.19: **Το ακμαίο του *Sitotroga cerealella***

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Κεφάλαιο 3. Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

3.1 Υπολείμματα στα φυτικά προϊόντα .

Σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία ως *υπόλειμμα* γεωργικού φαρμάκου ορίζεται «η μετά την εφαρμογή ενός γεωργικού φαρμάκου παραμένουσα επί ή εντός του φυτού φερομένου προς κατανάλωση ποσότητα δρώντος συστατικού ή και των επιβλαβών προϊόντων αποικοδομήσεως του και γενικώς χημικής μετατροπής» (Ν. 721/1977, άρθρο 1 παρ. ιγ).

Ο έλεγχος των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στα γεωργικά προϊόντα που διατίθενται στην αγορά είναι επιβεβλημένος για τη διασφάλιση της υγείας του καταναλωτή και η συγκέντρωση των γεωργικών φαρμάκων σε αυτά δεν πρέπει να υπερβαίνει τα *ανώτερα όρια υπολειμμάτων* (Maximum Residue Limits, MRLs). Τα MRLs είναι οι ανώτερες νόμιμες συγκεντρώσεις που μπορεί να περιέχονται στα γεωργικά προϊόντα που διατίθενται στην αγορά και καθορίζονται έτσι ώστε να αντανακλούν την σωστή εφαρμογή της *ορθής γεωργικής πρακτικής* από τον παραγωγό (γεωργό). Δείχνουν δηλαδή ότι ο γεωργός ακολούθησε πιστά της οδηγίες σήμανσης των γεωργικών φαρμάκων, χρησιμοποίησε το ενδεδειγμένο και εγκεκριμένο φάρμακο για τη συγκεκριμένη καλλιέργεια, στην κατάλληλη δόση και στον κατάλληλο χρόνο για την αποτελεσματική καταπολέμηση των ενδεικνυόμενων εχθρών ή ασθενειών, καθώς και ότι το προϊόν συλλέχθηκε στον προκαθορισμένο χρόνο μετά τον τελευταίο ψεκασμό (PHI, Pre-Harvest Interval).

Τα MRLs καθορίζονται έτσι ώστε να υπάρχει έλεγχος στη χρήση των γεωργικών φαρμάκων να διευκολύνεται το εμπόριο αγροτικών προϊόντων, να προστατεύεται ο γεωργός που ακολουθεί πιστά τις οδηγίες σήμανσης από ενδεχόμενη απόρριψη των προϊόντων του από την αγορά και να προστατεύεται η υγεία του καταναλωτή. Τα όρια αυτά, αν και δεν βασίζονται σε τοξικολογικά δεδομένα, πρέπει να είναι τοξικολογικά αποδεκτά, ώστε να καθορίζουν την καταλληλότητα των τροφίμων για εμπορία και την καταλληλότητά τους για βρώση. Επειδή τα MRLs αντανακλούν την ορθή γεωργική πρακτική, κάθε χώρα ορίζει συνήθως τα δικά της MRLs για κάθε φάρμακο και σε κάθε καλλιέργεια που χρησιμοποιείται. Επειδή κάτι τέτοιο δημιουργεί προβλήματα στο διεθνές

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

εμπόριο καταβάλλεται προσπάθεια εναρμόνισης των MRLs από χώρα σε χώρα. Τα τελευταία έτη για τα περισσότερα από τα γεωργικά φάρμακα που κυκλοφορούν στην αγορά των χωρών της Ενωμένης Ευρώπης υπάρχουν Κοινοτικά MRLs (Μουρκίδου Ε. και Πατσιάς Ι. 2009).

3.2 Προσδιορισμός υπολειμμάτων

Η ολοένα αυξανόμενη σημασία της μέτρησης των υπολειμμάτων στις τροφές έχει επιφέρει εντυπωσιακή εξέλιξη στις τεχνικές και τη μεθοδολογία της ενόργανης χημικής ανάλυσης. Οι αναλυτικές δυνατότητες αυξήθηκαν σημαντικά και τα όρια αναλυτικού προσδιορισμού μειώθηκαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Ο μεγάλος αριθμός φ.ο., τα οποία χρησιμοποιούνται στις διάφορες φάσεις της παραγωγικής διαδικασίας, και το πλήθος των γεωργικών προϊόντων κάνουν σύνθετο το πρόβλημα και δύσκολο τον προσδιορισμό. Η ικανότητα ανάλυσης μεγάλου αριθμού φ.ο. σε ένα ευρύ φάσμα προϊόντων μπορεί να εγγυηθεί την τήρηση των μέγιστων ορίων υπολειμμάτων τα οποία θέτει η νομοθεσία. Οι χρησιμοποιούμενοι μέθοδοι ανάλυσης πρέπει να είναι απλές και γρήγορες και να εφαρμόζονται μετά από επικύρωση που διασφαλίζει τα κριτήρια αξιοπιστίας σε εργαστήρια αναλύσεων ρουτίνας.

Οι μέθοδοι προσδιορισμού των υπολειμμάτων φ.ο. διακρίνονται σε εξειδικευμένες ή μεμονωμένου υπολείμματος (specific or single residue methods) και σε πολυδύναμες (multi-residue methods). **Εξειδικευμένες ή μεμονωμένου υπολείμματος μέθοδοι** (specific or single residue methods) είναι αυτές με τις οποίες προσδιορίζεται ένα μόνον φ.ο. ή ορισμένες μόνο συγγενείς ουσίες. Πριν το 1960 χρησιμοποιούνταν μέθοδοι μεμονωμένου υπολείμματος ανάλυσης για κάθε φ.ο., καθώς όμως η χρήση των φ.ο. αυξανόταν, η εφαρμογή των μεμονωμένου υπολείμματος μεθόδων ανάλυσης για όλες τις φ.ο. γινόταν αντιοικονομική. Ο Mills (1959) αναφέρει ότι απαιτείται ένας μήνας για την ανάλυση όλων των φ.ο., έκτοτε ήταν μεγάλη η ανάγκη ανάπτυξης μεθόδων που να προσδιορίζουν περισσότερες από μία φ.ο. (Sherman 1989). Εξειδικευμένες μέθοδοι μεμονωμένου υπολείμματος εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται και σήμερα, σε περιπτώσεις ουσιών οι οποίες δεν είναι δυνατόν να ενταχθούν στην αρχή μιας πολυδύναμης μεθόδου.

Οι **Πολυδύναμες ή πολύ-υπολειμματικές μέθοδοι** (multi-residue methods) αναπτύχθηκαν για να διευκολύνουν τον έλεγχο ρουτίνας (monitoring) των γεωργικών

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

προϊόντων επιτρέποντας τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών φ.ο. Με τις πολυδύναμες μεθόδους προσδιορίζονται κυρίως ουσίες της ίδιας ομάδας, όπως οργανοφωσφορικά, οργανοχλωριωμένα, πυρεθρίνες κλπ. και είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για ένα γενικό έλεγχο των γεωργικών προϊόντων. Είναι χρήσιμες για προκαταρκτικό έλεγχο των φ.ο. *(Screening)* αλλά, από μόνες τους δεν επαρκούν για την επισήμανση και τον προσδιορισμό του συνολικού φορτίου σε υπολείμματα ενός δείγματος. Τα τελευταία 10-20 χρόνια με την ανάπτυξη της συζευγμένης χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (GC-MS ή LC-MS) έχουν αυξηθεί εντυπωσιακά οι δυνατότητες των πολυδύναμων μεθόδων τόσο στον αριθμό των μορίων όσο και στην ταυτοποίηση τους, ώστε να αναφέρονται στη βιβλιογραφία μέθοδοι για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό έως και 500 μορίων παρασιτοκτόνων ουσιών (Alder et α/, 2006).

3.3 Στάδια μεθόδου ανάλυσης.

3.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων.

Σε ειδική οδηγία της Ε.Ε. ορίζεται το μέρος του γεωργικού προϊόντος για το οποίο ορίζονται MRLs, και επομένως το μέρος στο οποίο πρέπει να γίνει η ανάλυση (178/2006EC). Το δείγμα πρέπει να έχει ληφθεί από το αρχικό φορτίο κατά τρόπο που να είναι όσο το δυνατό περισσότερο αντιπροσωπευτικό και υποδιαιρείται στη συνέχεια σε μικρότερα υποδείγματα, ένα εκ των οποίων αποτελεί το εργαστηριακό δείγμα. Το εργαστηριακό δείγμα ομογενοποιείται και ένα μέρος αυτού αποτελεί το αναλυτικό δείγμα που προορίζεται για την ανάλυση.

3.3.2 Εκχύλιση του δείγματος

Εκχύλιση είναι το στάδιο κατά το οποίο οι φ.ο. παραλαμβάνονται από τους φυτικούς ιστούς με κατάλληλα εκχυλιστικά μέσα οποία θα πρέπει να διαθέτουν ικανότητα εκχύλισης μόνο των φ.ο. και όχι ανεπιθύμητων ουσιών του υπό ανάλυση υποστρώματος. Ιδιαίτερη σημασία έχει η επιλογή του κατάλληλου εκχυλιστικού μέσου στις πολύ- υπολειμματικές μεθόδους, λόγω της ύπαρξης φ.ο. με διαφορετικές ιδιότητες τα οποία είναι δυνατόν να περιέχονται στο δείγμα και επομένως, το εκχυλιστικό μέσο πρέπει να έχει την κατάλληλη σύνθεση ώστε να μπορεί να εκχυλίσει ουσίες με διαφορετική πολικότητα. Οι φυτικές ουσίες είναι γενικά πολικές, με εξαίρεση τους κηρούς και τα έλαια. Οι παλαιότερες πολυδύναμες μέθοδοι χρησιμοποιούσαν μίγματα διαλυτών διαφορετικής πολικότητας, ώστε πολικές και μη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

πολικές ουσίες να εκχυλίζονται ταυτόχρονα. Συνέπεια της μεγάλης εκχυλιστικής ικανότητας αυτών των μιγμάτων ήταν η ταυτόχρονη συνεκχύλιση φυτικών ουσιών και η δημιουργία γαλακτωμάτων.

Στις αναλύσεις υπολειμμάτων φ.ο. χρησιμοποιούνται ευρύτατα οι οργανικοί διαλύτες σαν εκχυλιστικά μέσα. Βασική έννοια στον προσδιορισμό των υπολειμμάτων φ.ο. είναι η έννοια της πολικότητας (polarity) των ουσιών. Πολικότητα είναι η ασυμμετρία του ηλεκτρικού φορτίου του μορίου, η οποία μετριέται με τη διπολική ροπή και επηρεάζει ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως το σημείο τήξεως, το σημείο ζέσεως και τη διαλυτότητα. Για τις μεθόδους προσδιορισμού υπολειμμάτων, η τελευταία ιδιότητα, είναι καθοριστική. Όταν μία ομοιοπολική ένωση διακρίνεται από μεγάλη διπολική ροπή είναι πολική και χαρακτηρίζεται από υψηλή υδατοδιαλυτότητα. Αντίθετα, όταν η διπολική ροπή είναι μικρή, η ουσία είναι μη πολική και χαρακτηρίζεται από μικρή υδατοδιαλυτότητα και υψηλή λιποδιαλυτότητα (Barwick 1997). Παρακάτω, δίνονται οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι διαλύτες, κατά σειρά αυξανόμενης πολικότητας, θεωρώντας το νερό σαν τον πιο πολικό διαλύτη: εξάνιο < πετρελαϊκός *αιθέρας* < κυκλοεξάνιο < τολουόλιο < βενζόλιο < διχλωρομεθάνιο < χλωροφόρμιο < οξικός αιθυλεστέρας < ακετόνη < μεθανόλη < ακετονιτρίλιο.

Δύο γειτονικοί στη λίστα διαλύτες είναι μεταξύ τους πολύ διαλυτοί, ενώ όσο απομακρύνονται γίνονται μη αναμίξιμοι. Ο κατάλληλος διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί στην εκχύλιση είναι εκείνος που θα έχει παραπλήσιες ιδιότητες και κυρίως παρόμοια πολικότητα με τις υπό εκχύλιση ουσίες, ισχύει δηλαδή η γνωστή γενίκευση "όμοια-όμοιοι διαλύονται". Τα κριτήρια που λαμβάνονται υπόψη για την επιλογή του διαλύτη εκχύλιση ς είναι:

- Έλλειψη αντίδρασης μεταξύ του διαλύτη και των φ.ο.
- Η πολικότητα των προς προσδιορισμό φ.ο.
- Η διαλυτότητα των φ.ο. στους διάφορους διαλύτες.
- Ο τύπος του προς ανάλυση δείγματος.
- Η τοξικότητα του διαλύτη.
- Η πτητικότητα του διαλύτη.
- Η καθαρότητα του διαλύτη
- Ο τύπος της μεθόδου (ειδική ή πολυδύναμη).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Σήμερα υπάρχει η τάση απλούστευσης της διαδικασίας χρησιμοποιώντας μικρότερο αριθμό διαλυτών ή και εάν είναι δυνατόν ενός μόνο διαλύτη, μικρότερες ποσότητες και αποφεύγοντας την χρήση χλωριωμένων διαλυτών. Το 1980 αναπτύχθηκαν αρκετές νέες μέθοδοι οι οποίες απέφευγαν την χρήση χλωριωμένων διαλυτών για λόγους υγείας και προστασίας του περιβάλλοντος, χρησιμοποιώντας μίγμα κυκλοεξάνιου με οξικό αιθυλεστέρα σε αντικατάσταση του διχλωρομεθάνιου και του πετρελαϊκού αιθέρα. Οι περισσότερο χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι το ακετονιτρίλιο, η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας. Το ακετονιτρίλιο ως πιο εκλεκτικός διαλύτης δίνει καθαρότερα εκχυλίσματα, είναι αναμίξιμο με το νερό και απαιτεί συνδιαλύτη μη πολικό για το διαχωρισμό των δύο φάσεων, ενώ με την προσθήκη αλάτων δεν απαιτείται συνδιαλύτης. Το ακετονιτρίλιο είναι όμως περισσότερο τοξικό, σχετικά ακριβό και εξατμίζεται δυσκολότερα από την ακετόνη και δε συνεκχυλίζει λιπόφιλες ουσίες. Η ακετόνη εξατμίζεται ευκολότερα, είναι αναμίξιμη με το νερό και απαιτεί συνδιαλύτη μη πολικό για τον διαχωρισμό των δύο φάσεων (με την προσθήκη αλάτων δεν απαιτείται συνδιαλύτης), λιγότερο τοξική και σχετικά φθηνή, έχει όμως μεγάλη εκχυλιστική ικανότητα. (Analytical Methods 1996). Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι ο πιο εκλεκτικός και δίνει καθαρότερα εκχυλίσματα από την ακετόνη, έχει το πλεονέκτημα της μερικής μείξης με το νερό και δεν είναι αναγκαία η προσθήκη μη πολικών διαλυτών για τον διαχωρισμό του νερού από το εκχύλισμα. Εν τούτοις τα μειονεκτήματα του οξικού αιθυλεστέρα είναι ότι οι πολικές φ.ο. δεν κατανέμονται εύκολα στην φάση του και η εκχύλιση μεγάλων ποσοτήτων μη πολικών συνεκχυλισμάτων όπως λιπίδια και υλικά επιθηλιακών κυττάρων (Analytical Methods 1996).

3.3.3 Τεχνικές εκχύλισης

1. Εκχύλιση υγρού/ υγρού *(Liquid/ Liquid Extraction -LLE)*

Η εκχύλιση αυτού του τύπου είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους παραλαβής των υπολειμμάτων από τα διάφορα περιβαλλοντικά και διατροφικά υποστρώματα. Αποτελεί την επίσημη μέθοδο εκχύλισης σε πολλά πρωτόκολλα αναλυτικών εργαστηρίων. Στηρίζεται στην κατανομή των χημικών ουσιών με βάση τη διαφορετική διαλυτότητά τους σε ένα σύστημα δύο πρακτικά μη αναμιγνυόμενων υγρών. Διακρίνεται σε συνεχή εκχύλιση, όπου το δείγμα εκχυλίζεται

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

με τη συσκευή *Soxhlet*, και σε ασυνεχή εκχύλιση, όπου το δείγμα εκχυλίζεται με επαναληπτικές δόσεις διαλύτη με μηχανική ανάδευση ή συσκευή υπερήχων. Η υψηλή εκλεκτικότητά της και η ευρεία χρήση της στην απομόνωση διαφορετικών φ.ο. με μεγάλο εύρος φυσικοχημικών ιδιοτήτων, την κάνουν να βρίσκει ευρεία εφαρμογή παρά τα μειονεκτήματα της, τα οποία είναι το σχετικά υψηλό της κόστος και το ότι είναι χρονοβόρα. Το μειονέκτημα όμως του υψηλού κόστους της χρήσης μεγάλων όγκων δείγματος και διαλυτών και του επακόλουθου κινδύνου επιμολύνσεων οδήγησε σε βελτιωμένη έκδοση της τεχνικής, την υγρού/υγρού μικροεκχύλιση *(Liquid/Liquid Microextraction - LLME)*, η οποία είναι και πιο φιλική στο περιβάλλον, αφού χρησιμοποιούνται μικρότερες ποσότητες οργανικών διαλυτών (μL ή mL) και δείγματος (1,5 - 10 mL) (Αμβράζη, 2007)

2. Εκχύλιση στερεού/υγρού *(Solid/Liquid Extraction - SLE)*

Η εκχύλιση αυτού του τύπου περιλαμβάνει την εκχύλιση του ομογενοποιημένου στερεού δείγματος με τον οργανικό διαλύτη και όπως η LLE διακρίνεται και αυτή σε συνεχή και ασυνεχή. Στην περίπτωση της συνεχούς εκχύλισης το δείγμα εκχυλίζεται με τη συσκευή *Soxhlet*, όπου το προς εκχύλιση δείγμα (5,0 - 50 g) τοποθετείται στον εκχυλιστήρα της συσκευής και εκχυλίζεται με οργανικό διαλύτη (100 - 200 mL) για 4 έως 18 ώρες. Στην ασυνεχή εκχύλιση το εξεταζόμενο δείγμα εκχυλίζεται διαδοχικά έως την ποσοτική λήψη των φ.ο. Παρά το ότι είναι μια χρονοβόρα διαδικασία εκχύλισης, βρίσκει ευρεία εφαρμογή διότι επιτυγχάνονται υψηλές ανακτήσεις (Pensado et al., 2005).

Η πιο εξελιγμένη τεχνική της εκχύλισης στερεού/υγρού είναι η εκχύλιση με μηχανική ανάμιξη σε υψηλές ταχύτητες *(Blending)* ή με τη χρήση υπερήχων *(Sonication)*, που βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ανάλυση υπολειμμάτων στα στερεά τρόφιμα και τα εδαφικά δείγματα. Η εκχύλιση περιλαμβάνει ομογενοποίησα του δείγματος με οργανικό διαλύτη (συνήθως ακετόνη ή ακετονιτρίλιο) και μηχανική ανάδευση σε αναμικτήρα *(Mixer)* υψηλών ταχυτήτων ή χρήση υπερήχων. Για να πετύχουμε ικανοποιητική εκχύλιση χρησιμοποιούμε ομογενοποιητή μεγάλων ταχυτήτων (4000 - 5000 στροφές/ λεπτό), ενώ το δοχείο εκχύλισης (που είναι συνήθως μεταλλικό) βρίσκεται μέσα σε υδατόμετρο ψύξης για την αποφυγή υψηλών θερμοκρασιών. Η εκχύλιση των φυτικών ιστών πραγματοποιείται είτε σε κλειστά δοχεία τύπου *«Omni mixer»* είτε σε ανοικτά, τύπου *«Ultra turax»*. Σε αυτή την

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

τεχνική χρησιμοποιούνται 100 g ομογενοποιημένου δείγματος και 200 mL ακετονιτρίλιο ή ακετόνη. Σήμερα, η τεχνική εφαρμόζεται με μικρότερες ποσότητες δείγματος και οργανικών διαλυτών, επιβαρύνοντας έτσι λιγότερο και το περιβάλλον. Επειδή η ακετόνη, όπως και το ακετονιτρίλιο είναι διαλύτες οι οποίοι αναμιγνύονται με το νερό, στην πράξη ο πραγματικός διαλύτης εκχύλιση ς είναι το μίγμα ακετόνης-νερού ή ακετονιτριλίου-νερού. Στη συνέχεια, οι προς ανάλυση ενώσεις κατανέμονται σε άπολο διαλύτη με υγρού/ υγρού εκχύλιση.

Οι υψηλές ταχύτητες που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της ομογενοποίησης συμβάλλουν στην απελευθέρωση των αναλυτών που βρίσκονται παγιδευμένοι στα σωματίδια του στερεού υποστρώματος, με αποτέλεσμα η μέθοδος αυτή να παρουσιάζει υψηλές ανακτήσεις. Έτσι, βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ανάλυση υπολειμμάτων φ.ο. σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, αλλά και σε ζωικά δείγματα.

3. Εκχύλιση με μικροκύματα *(Microwave Assisted Extraction - MAE)*

Η πρώτη εφαρμογή της τεχνικής εκχύλισης με τη χρήση μικροκυμάτων, δημοσιεύτηκε το 1986, ενώ το 1993 αξιολογήθηκε η δυνατότητα εκχύλισης διαφόρων φ.ο. σε δείγματα ιζημάτων. Έκτοτε και μέχρι σήμερα αναφέρονται αρκετές ερευνητικές εργασίες όσον αφορά τη χρήση της στην εκχύλιση διαφόρων οργανικών ενώσεων όπως οργανοχλωριωμένα παράγωγα, πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες και πολυχλωριωμένα διφαινύλια, κ.α. σε διάφορα δείγματα εδάφους, ιζημάτων, νερών και τροφίμων (Ganzler 2009,- Eskilsson 2000), στην ανάλυση των ουσιών *chlorpyrifos, chlorothalonil, diazinon, permetrin, methoxychlor, και azinphos-methyl* σε αγγούρι, λάχανο, πιπεριά και τομάτα (Pylypiw 1997).

Σε αυτή τη μέθοδο εκχύλισης το προς ανάλυση δείγμα αναμιγνύεται με τον οργανικό διαλύτη και ακτινοβολείται σε συμβατικό φούρνο μικροκυμάτων, χωρίς όμως το αιώρημα να φτάσει στο σημείο βρασμού του. Η ακτινοβόληση συνήθως γίνεται για 30 sec σε συχνότητα 2450 HZ και επαναλαμβάνεται μερικές φορές για να επιτευχθούν οι μέγιστες ανακτήσεις της εκχυλιζόμενης ουσίας. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ο μικρός χρόνος εκχύλισης με αποδόσεις ανάλογες των κλασικών μεθόδων εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες. Χρησιμοποιείται περισσότερο στην ανάλυση φ.ο. σε εδάφη (Camel, 2000)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

4. Επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη *(Accelerated Solvent Extraction - ASE)*

Η επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη ή εκχύλιση με διαλύτη υπό πίεση *(pressurized Solvent Extraction - PSE)* εφαρμόζεται από το 1995. Το κύριο χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι οι συνθήκες υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας που επικρατούν κατά την εκχύλιση. Οι υψηλές πιέσεις εξασφαλίζουν την αποτελεσματική διείσδυση του διαλύτη στους πόρους του δείγματος, ενώ οι υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν το ρυθμό διάχυσης, τη μεταφορά μάζας και τη διαλυτότητα των υπό εξέταση ενώσεων και μειώνουν το ιξώδες και την επιφανειακή τάση των διαλυτών, μειώνοντας έτσι κατά πολύ τους όγκους εκχύλισης των διαλυτών (Ahmed, 2001).

Χρησιμοποιούνται διαλύτες μεγάλου εύρους πολικότητας, καθώς και μίγματα αυτών, και παρέχεται η δυνατότητα χρήσης μεγάλου εύρους πιέσεων (5,0 - 200 Atm) και θερμοκρασιών (από θερμοκρασίες δωματίου έως 200 °C). Η ASE έχει χρησιμοποιηθεί για ταυτόχρονη εκχύλιση και καθαρισμό *(Clean-up)* του δείγματος, χρησιμοποιώντας ως υλικό καθαρισμού τον γραφίτη *(Graphitized carbon)*, στον προσδιορισμό φ.ο. σε φυλλώδη λαχανικά με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (Tanaka et αI, 2007).

5. Εκχύλιση υπερκρίσιμου σημείου *(Supercritical Fluid Extraction - SFE)*

Η τεχνική SFE χρησιμοποιεί τις ιδιότητες των υγρών σε υπερκρίσιμη κατάσταση, όπως η διαλυτική ικανότητα, η υψηλή διάχυση, η χαμηλή ρευστότητα και η μικρή επιφανειακή τους τάση. Η εκχύλιση του δείγματος πραγματοποιείται σε δοχείο υψηλής πίεσης με υγρό σε υπερκρίσιμη κατάσταση (το περισσότερο χρησιμοποιούμενο είναι το διοξείδιο του άνθρακα σε πίεση 150-450 bar και θερμοκρασία 40-150°C). Οι αναλύτες συλλέγονται σε μικρή ποσότητα διαλύτη ή σε παγίδα στερεής φάσης, η οποία ξεπλένεται με κατάλληλο διαλύτη.

Η τεχνική της SFE έχει αρκετά πλεονεκτήματα όπως η ταχύτητα εκχύλισης, μικρές ποσότητες διαλυτών, σχετική εκλεκτικότητα, δεν απαιτείται επιπλέον στάδιο καθαρισμού και συμπύκνωση του εκχυλίσματος. Απαιτεί όμως βελτιστοποίηση αρκετών παραμέτρων, ακριβό εξοπλισμό με σύστημα παραγωγής υψηλής πίεσης και δοχείο υψηλής καθαρότητας αερίου (Rissato 2005). Τα εκχυλίσματα τα οποία

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

λαμβάνονται είναι σχετικά καθαρά και το πλεονέκτημα του μικρού εκχυλιστικού όγκου μπορεί να θεωρηθεί και μειονέκτημα στην περίπτωση που απαιτείται να αναλυθούν μεγαλύτερες ποσότητες δείγματος (Camel, 1998).

6. Εκχύλιση δια της στερεάς φάσης *(Solid Phase Extraction - SPE)*

Η εκχύλιση δια της στερεάς φάσης βασίζεται στη θεωρία της χρωματογραφίας και χρησιμοποιείται για την άμεση εκχύλιση των οργανικών ενώσεων από υγρά/υδατικά δείγματα, αλλά και ως βασική τεχνική καθαρισμού *(Clean-up)* των εκχυλισμάτων οργανικού διαλύτη πριν από τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών.

Το χρωματογραφικό σύστημα αποτελείται από μια στατική φάση, η οποία είναι ένα στερεό υλικό επιφανειακά ενεργό, και μια κινητή φάση (διαλύτης έκλουσης), που αποτελείται από οργανικό διαλύτη ή μίγμα αυτών. Ο διαχωρισμός των ενώσεων στηρίζεται στη διαφορετική ικανότητα κατακράτησης των ουσιών πάνω στην επιφάνεια της στατικής φάσης. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται στη SPE είναι είτε μικροστήλες, οι οποίες περιέχουν κατάλληλο χρωματογραφικό υλικό *(C-18, Diol, Sílica, Florisil),* είτε δίσκοι εκχύλισης στους οποίους το χρωματογραφικό υλικό είναι με μορφή μεμβράνης ενσωματωμένης πάνω σε ένα δίκτυο μικροϊνιδίων πολυτετραφθοροαιθυλενίου *(PTFE).*

Για τη σωστή επιλογή του προσροφητικού υλικού θα πρέπει να γίνεται μελέτη της φυσικοχημείας του συστήματος και να λαμβάνονται υπόψη διάφοροι παράμετροι, όπως οι χαρακτηριστικές ομάδες των αναλυτών, η φύση του προσροφητικού υλικού, οι ενέργειες των σχηματιζόμενων δεσμών, οι δευτερεύουσες επιδράσεις και η αλληλεπίδραση του προσροφητικού και των προς ανάλυση ενώσεων με τα υπόλοιπα συστατικά του υποστρώματος (Masque et al., 1998).

7. Μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction - SPME)

Η τεχνική SPME είναι απλή, γρήγορη, ευαίσθητη, απαλλαγμένη οργανικών διαλυτών και βρήκε μεγάλη εφαρμογή στην ανάλυση υπολειμμάτων με την ανάπτυξη πολυϋπολειμματικών μεθόδων για την απομόνωση των ουσιών κυρίως σε υγρά υποστρώματα όπως χυμούς φρούτων, κρασί, σε δείγματα νερών, στον

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

καθαρισμό και την προσυγκέντρωση των δειγμάτων πριν την ανάλυση (Otero 2002), σε φράουλα και χυμό κεράσι (Lambropoulou 2002), σε λάδι (Tsoutsi 2004), σε δείγματα νερών, εδάφους, χυμών κρασιού και άλλων υποστρωμάτων (Kataoka 2000). Η τεχνική έχει δύο στάδια, στο πρώτο στάδιο η επικαλυμμένη ίνα εκτίθεται στο δείγμα ή στην επιφάνεια του δείγματος με αποτέλεσμα οι αναλύτες να κατανέμονται μεταξύ του δείγματος και της προσροφητικής επιφάνειας της ίνας και στο δεύτερο στάδιο η ίνα με τους προσροφημένους αναλύτες μεταφέρεται στην αναλυτική συσκευή με τη βοήθεια της σύριγγας. Η ίνα εισάγεται στον εισαγωγέα, ο οποίος βρίσκεται σε υψηλή θερμοκρασία, ώστε να επιτευχθεί η εκρόφηση των αναλυτών από το προσροφητικό υλικό της ίνας και η εισαγωγή τους για ανάλυση στο χρωματογραφικό σύστημα.

Η τεχνική SPME μπορεί να εφαρμοστεί με

- Απευθείας εκχύλιση με εισαγωγή της ίνας στο δείγμα (προσθήκη νερού. ανάδευση ή χρησιμοποίηση υπέρηχων βοηθά ικανοποιητικά την εκχύλιση)
- Εκχύλιση υπερκείμενης φάσης όπου η ίνα δεν έρχεται σε επαφή με το δείγμα και οι αναλύτες μεταφέρονται στο προσροφητικό μέσω του περιβάλλοντα αέρα.
- Χρήση προστατευτικής μεμβράνης του προσροφητικού υλικού της ίνας για την εκχύλιση πολύ βρόμικων δειγμάτων.

Το υλικό (πάχος, πολικότητα) της ίνας, ο χρόνος εκχύλισης, η φύση του προς εκχύλιση δείγματος (pH, περιεχόμενες παρεμποδίζουσες πτητικές ενώσεις, ιοντική ισχύς του δείγματος), ο ρυθμός ανάδευσης και η θερμοκρασία του δείγματος, είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εν λόγω τεχνικής (Dean,1998).

8. Υγρή εκχύλιση υπό πίεση - Pressurized liquid extraction (PLE)

Η τεχνική (PLE) χρησιμοποιεί για την εκχύλιση οργανικούς διαλύτες σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση. Η υψηλή θερμοκρασία αυξάνει την εκχυλιστική ικανότητα των διαλυτών, προκαλεί ταχύτερους ρυθμούς διάχυσης του διαλύτη, βελτιώνεται η μμεταφορά της μάζας και αυξάνεται ο ρυθμός εκχύλισης εισάγοντας συνεχώς νέα ποσότητα διαλύτη. Επίσης η χρησιμοποίηση υψηλών πιέσεων επιτρέπει τον διαλύτη να παραμένει υγροποιημένος πάνω από το σημείο βρασμού και να εισχωρήσει στο εσωτερικό του υποστρώματος βελτιώνοντας την απόδοση της εκχύλισης. Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι η ταχύτητα εκχύλισης, η χρησιμοποίηση μικρών

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

ποσοτήτων διαλυτών, απαιτείται όμως στάδιο καθαρισμού του εκχυλίσματος. Εφαρμόσθηκε στον προσδιορισμό φ.ο. σε ψάρια και ζωοτροφές (Blasco 2005) και σε έδαφος (Hussen 2007).

9. Διασπορά στερεής φάσης με υπόστρωμα – Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)

Μια νέα τεχνική για την προπαρασκευή του δείγματος εφαρμόστηκε στην ανάλυση με τη χρήση προσροφητικών υλικών στερεής φάσης για την εκχύλιση των αναλυτών από στερεά και παχύρευστα υποστρώματα. Κατά την εφαρμογή της τεχνικής MSPD το δείγμα ομογενοποιείται με ένα προσροφητικό υλικό το οποίο δεσμεύει τους αναλύτες, στη συνέχεια το μίγμα τοποθετείται σε φυσίγγιο και εκλούονται οι αναλύτες με τη χρησιμοποίηση μικρής ποσότητας κατάλληλου διαλύτη (Sanchez-Brunete 2003). Χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση διαφόρων ουσιών σε υποστρώματα πορτοκαλιού, σταφυλιού, τομάτας και κρεμμυδιού (Fernandez 2000) και σε πουρέ καρύδας (Geovonia 2008).

Η τεχνική MSPD χρησιμοποιεί 95% λιγότερους διαλύτες και 90% λιγότερο χρόνο απ' ότι η τεχνική SPE. Οι εφαρμογές τα τελευταία χρόνια της τεχνικής MSPD είναι συνεχώς αυξανόμενες και σε μερικές περιπτώσεις η εκχύλιση MSPD έχει αποτελέσματα ισοδύναμα με πρότυπες συμβατικές μεθόδους εκχύλισης (Lehotay 2005b).

3.3.4 Διήθηση

Το προϊόν της εκχύλισης αποτελείται από αιωρούμενους φυτικούς ιστούς και την υγρή φάση. Για να απομακρυνθούν τα στερεά σωματίδια ακολουθεί διήθηση του εκχυλίσματος, η οποία πραγματοποιείται μέσω χάρτινου ηθμού είτε με φυσική ροή πάνω από ύαλο χαλάζια ή υαλοβάμβακα ειδικής καθαρότητας, είτε υπό κενό σε χωνιά Buchner εφοδιασμένα με χάρτινο ηθμό.

3.3.5 Καθαρισμός εκχυλίσματος (cleanup)

Το εκχύλισμα που λαμβάνεται από το στάδιο της εκχύλισης είναι μίγμα του διαλύτη ή των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση, και ενδεχομένως

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

του νερού του φυτικού ιστού και πολλών από τις φυτικές ουσίες που έχουν συνεκχυλισθεί (χρωστικές, κηροί, αιθέρια έλαια, σάκχαρα, οξέα και άλλων). Για να επιτευχθεί ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων των φ.ο., θα πρέπει να απομακρυνθεί το νερό και όσον το δυνατό μεγαλύτερος αριθμός ανεπιθύμητων ουσιών με την προσθήκη στην αναλυτική διαδικασία του σταδίου του καθαρισμού (Berna1 1997).

3.3.6 Συμπύκνωση του εκχυλίσματος

Ο τελικός όγκος του διαλύματος που παραλαμβάνουμε από το προηγούμενο στάδιο απαιτείται συνήθως να ελαττωθεί σε 1,0 - 10 mL με σκοπό την αύξηση της συγκέντρωσης του υπολείμματος. Αυτό επιτυγχάνεται με περιστροφικό εξατμιστήρα *(Rotary evaporator),* όπου η εξάτμιση γίνεται υπό κενό σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, συνήθως μέχρι 40°C, για να μη διασπάται η ουσία. Επίσης, μικροί όγκοι πτητικών διαλυτών μπορούν να εξατμιστούν με ρεύμα καθαρού αζώτου.

Πολλές φορές μετά τη συμπύκνωση ακολουθεί «αλλαγή διαλύτη» για λόγους χρωματογραφικής συμβατότητας. Στην περίπτωση αυτή η συμπύκνωση γίνεται «μέχρι ξηρού» και έπειτα προστίθεται ο νέος διαλύτης. Οι όγκοι πρέπει να μετρώνται με μεγάλη ακρίβεια γιατί επηρεάζουν σημαντικά τον τελικό προσδιορισμό.

3.3.7 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός

Μέχρι το 1960 χρησιμοποιήθηκαν κυρίως βιολογικές μέθοδοι (βιοδοκιμές) ή μέθοδοι της κλασικής χημείας, όπως η χρωματομετρία, η χρωματογραφία σε χαρτί, η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, η φασματοφωτομετρία, κλπ. Από τη δεκαετία του 1970 όμως και μετά, η μεθοδολογία προσδιορισμού υπολειμμάτων φ.ο. γνώρισε αλματώδη πρόοδο και βασίζεται κυρίως στη χρήση εξειδικευμένων ενόργανων συστημάτων ανάλυσης. Τα όργανα αυτά είναι κυρίως ο αέριος χρωματογράφος, ο υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης εφοδιασμένοι με τους κατάλληλους εκλεκτικούς και ευαίσθητους ανιχνευτές, καθώς και τα συζευγμένα συστήματα αέριας ή υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας. Για ορισμένες εξειδικευμένες μεθόδους, χρησιμοποιείται ακόμη το φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους. Επίσης έχουν αναπτυχθεί και οι βιοτεχνολογικές μέθοδοι (ανοσοδοκιμασίες - *Immunoassays),* οι οποίες όμως δεν εφαρμόζονται σε πολυδύναμες μεθόδους ανάλυσης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

3.3.8 Ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων

Ένα στάδιο θεμελιώδους σημασίας στον προσδιορισμό υπολειμμάτων φ.ο. αποτελεί η ταυτοποίηση των θετικών ανιχνεύσεων, όταν το κριτήριο ανίχνευσης είναι ο χρόνος κατακράτησης της ένωσης στα διάφορα συστήματα αέριας ή υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται. Η ταυτοποίηση των ενώσεων μπορεί να γίνει με τους ακόλουθους τρόπους :

- ✓ Χρησιμοποίηση διαφορετικών χρωματογραφικών συνθηκών προσδιορισμού, κυρίως με τη χρήση στήλης με χρωματογραφικό υλικό διαφορετικής πολικότητας.
- ✓ Χρησιμοποίηση άλλης αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού .
- ✓ Λήψη φάσματος υπεριώδους της ένωσης, όταν ο προσδιορισμός γίνεται με HPLC-DAD
- ✓ Χρησιμοποίηση φασματομετρίας μάζας. (Παπαδή- Ψύλλου 2009)

3.4 Αέρια χρωματογραφία

Η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) στηρίζεται στον διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος καθώς αυτά κατανέμονται διαφορετικά μεταξύ μιας στερεής ή υγρής ακίνητης φάσης που περιέχεται σε μια κατάλληλη στήλη και μιας αέριας κινητής φάσης (φέρον αέριο) η οποία ρέει υπό πίεση διαμέσου της στήλης.

Η θερμοκρασία λειτουργίας της στήλης είναι μεγαλύτερη από τα σημεία ζέσεως των συστατικών του δείγματος και η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί για σχετικά πτητικά δείγματα τα συστατικά των οποίων μπορούν να είναι στην αέρια μορφή τους στις συνήθεις θερμοκρασίες λειτουργίας της στήλης. Επιπλέον τα προς ανάλυση συστατικά του δείγματος πρέπει να είναι και θερμικώς σταθερά στις θερμοκρασίες αυτές.

Ένα μικρό τμήμα του δείγματος εισάγεται με κατάλληλη τεχνική στην αναλυτική στήλη όπου τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται καθώς κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες λόγω της διαφορετικής κατανομής τους μεταξύ της ακίνητης φάσης και του φέροντος αερίου και εξέρχονται σε διαφορετικούς χρόνους από την στήλη όπου και ανιχνεύονται με τη χρήση κατάλληλης συσκευής ανίχνευσης το σήμα της οποίας καταγράφεται συνεχώς.

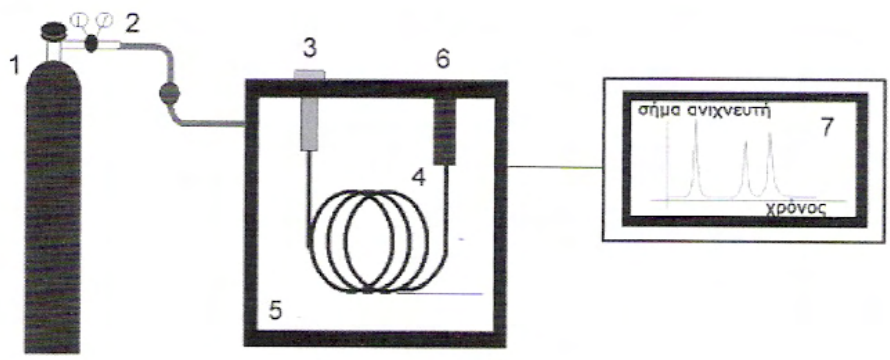
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Η απόκριση του ανιχνευτή στην παρουσία των εξερχόμενων από την στήλη συστατικών του μίγματος, καθώς το σήμα του καταγράφεται ως συνάρτηση του χρόνου, παράγει μια σειρά από κορυφές έκλουσης, η οποία είναι γνωστή ως χρωματογράφημα**.** Η θέση μιας κορυφής στο χρωματογράφημα σε σχέση με τον χρόνο από την αρχή της ανάλυσης (εισαγωγή του δείγματος) χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό προσδιορισμό ενός συστατικού, ενώ το ύψος ή το εμβαδό της κορυφής χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του.

3.4.1 Όργανα από τα οποία απαρτίζεται ένα σύστημα αέριας χρωματογραφίας.

Ένα σύστημα αέριας χρωματογραφίας απαρτίζεται από τα ακόλουθα όργανα (Σχήμα 3.1) (Μουρκίδου Ε. και Πατσιάς Ι. 2009):

- Φιάλη αερίου
- Εγχυτής δείγματος
- Αναλυτική στήλη τοποθετημένη μέσα σε κατάλληλα θερμοστατούμενο φούρνο
- Ανιχνευτής (-ες)
- Καταγραφικό σήματος



Σχήμα 3.1: Συνδεσμολογία ενός συστήματος αέριας χρωματογραφίας. 1. φιάλη αερίου, 2. μανόμετρο, 3. εγχυτής δείγματος, 4. αναλυτική στήλη 5. θερμοστατούμενος φούρνος, 6. ανιχνευτής, 7. χρωματογράφημα.

Ο *ανιχνευτής* είναι το εξάρτημα που ανιχνεύει τις ουσίες στην έξοδο της στήλης. Οι ανιχνευτές είναι είτε εξειδικευμένοι για ορισμένα άτομα των μορίων ή μη εξειδικευμένοι. Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές στην αέρια χρωματογραφία

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

για αναλύσεις υπολειμμάτων, είναι:

- ✓ Ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου *(Nitrogen Phosphorus Detector - NPD)* που είναι εξειδικευμένος για ουσίες που περιέχουν άζωτο ή φώσφορο στο μόριό τους, π.χ. οργανοφωσφορικά, τριαζίνες .
- ✓ Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων *(Electron Capture Detector - ECD)* για οργανοαλογονούχες ενώσεις, που περιέχουν φθόριο ή χλώριο στο μόριό τους, π. Χ. οργανοχλωριωμένα .
- ✓ Ανιχνευτής φωτομετρίας φλόγας *(Flame Photometric Detector - FPD)* που με το κατάλληλο φίλτρο προσδιορίζει ουσίες που στο μόριό τους περιέχεται θείο ή φώσφορος, π. Χ. οργανοφωσφορικά .
- ✓ Ανιχνευτής φασματομετρίας μάζας.

Το *καταγραφικό* καταγράφει υπό μορφή κορυφής το σήμα. Στα σύγχρονα όργανα όλες οι παράμετροι ρυθμίζονται με σύστημα ηλεκτρονικού υπολογιστή όπου καταγράφονται και οι κορυφές. Με κατάλληλο λογισμικό *(Software)* γίνεται η επεξεργασία των χρωματογραφικών σημάτων και προκύπτουν τα τελικά αποτελέσματα για την κάθε κορυφή-ουσία του χρωματογραφήματος (Παπαδή-Ψύλλου 2009).

3.5 Υγρή χρωματογραφία

Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται σε στήλη η οποία είναι πληρωμένη με τα σωματίδια της στατικής (ακίνητης) φάσης (πληρωτικό υλικό), διαμέσου της οποίας διέρχεται η κινητή φάση (εκλουστικό) με υψηλή πίεση, με την βοήθεια αντλίας, ώστε να υπερκεράσει την αντίσταση των σωματιδίων της στήλης στην ροή. Το δείγμα διαλύεται στο εκλουστικό και ένα τμήμα αυτού εισάγεται στην είσοδο της στήλης και εισέρχεται σε αυτή με τη ροή του εκλουστικού, όπου και κατανέμεται μεταξύ των δύο φάσεων. Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος είναι αποτέλεσμα της διαφορετικής κατανομής τους μεταξύ των δύο φάσεων, λόγω της διαφορετικής τους συγγένειας προς την κινητή και τη στατική φάση.

Η μέση ταχύτητα με την οποία μία ουσία μετακινείται κατά μήκος της στήλης εξαρτάται από το χρόνο που αυτό βρίσκεται στην κινητή φάση, από την στιγμή που

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

μόνο αυτή κινείται. Μία ουσία η οποία κατακρατείται ισχυρά από τη στατική φάση μετακινείται κατά μήκος της στήλης με μικρότερη ταχύτητα σε σχέση με μία άλλη που κατακρατείται λιγότερο ισχυρά. Η διαφορά αυτή στην ταχύτητα μετακίνησης των ουσιών οδηγεί τα συστατικά ενός δείγματος (μίγματος ουσιών) να διαχωριστούν σε ξεχωριστές *ζώνες* (bands) καθώς κινούνται κατά μήκος της στήλης. Η συνεχής παροχή εκλουστικού (κινητής φάσης) εκλούει τις ξεχωριστές αυτές ζώνες από τη στήλη και ακολουθεί η ανίχνευση τους με ειδική συσκευή ανίχνευσης. Η καταγραφή του σήματος του ανιχνευτή σε σχέση με το χρόνο παρέχει ένα διάγραμμα με συνεχόμενες κορυφές έκλουσης γνωστό ως *χρωματογράφημα*. Η θέση της κάθε κορυφής έκλουσης στο χρωματογράφημα σε σχέση με το χρόνο (χρόνος κατακράτισης) χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό προσδιορισμό του συστατικού που αντιστοιχεί σε αυτή, ενώ το ύψος ή το εμβαδό της κορυφής για τον ποσοτικό προσδιορισμό του.

3.5.1 Όργανα από τα οποία απαρτίζεται ένα σύστημα HPLC

Ένα σύστημα HPLC αποτελείται συνήθως από τα εξής τμήματα με τη σειρά που αναφέρονται:

- Φιάλη (-ες) κινητής φάσης (εκλουστικού)
- Αντλία (-ες) προώθησης εκλουστικού
- Εγχυτής δείγματος
- Χρωματογραφική στήλη
- Ανιχνευτής (-ες)
- Καταγραφικό (-α) του σήματος του ανιχνευτή (-ων)

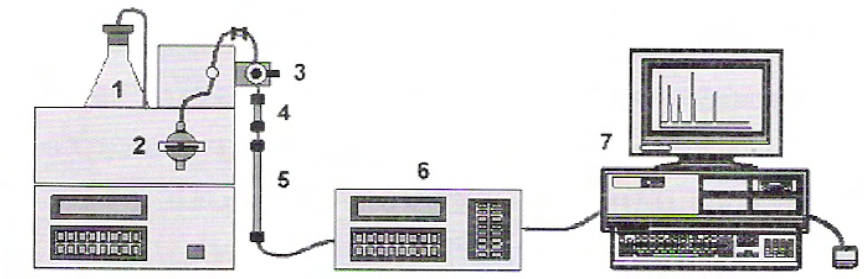
Στο Σχήμα 3.2 παρουσιάζεται σχηματικά η συνδεσμολογία ενός συστήματος HPLC. Τα διάφορα επιμέρους τμήματα που απαρτίζουν ένα HPLC, με εξαίρεση το τελευταίο που είναι το καταγραφικό του σήματος, συνδέονται μεταξύ τους υδραυλικά με σωληνώσεις από ατσάλι.

Το προς ανάλυση δείγμα (το οποίο είναι συνήθως μίγμα διαφόρων συστατικών), εισάγεται μέσω ενός κατάλληλα σχεδιασμένου εγχυτή δείγματος στην είσοδο της χρωματογραφικής στήλης, η οποία είναι πληρωμένη με τη στατική φάση. Η συνεχής ροή του εκλουστικού, που προωθείται με ειδική αντλία, μεταφέρει τα συστατικά του μίγματος διαμέσου της στήλης, τα οποία κινούνται με διαφορετική ταχύτητα το

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

καθένα. Στην έξοδο της χρωματογραφικής στήλης τα συστατικά του μίγματος ανιχνεύονται με τη μέτρηση διαφόρων φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων. Η καταγραφή του σήματος του ανιχνευτή σε συνάρτηση με τον χρόνο δίνει το χρωματογράφημα, με περαιτέρω επεξεργασία του οποίου γίνεται ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών του δείγματος.

Η επιλογή των οργάνων που απαρτίζουν ένα σύστημα HPLC (π.χ. του είδους της χρωματογραφικής στήλης, του τύπου του ανιχνευτή κτλ), καθώς και της μορφής που αυτό τελικά θα πάρει εξαρτάται από το είδος της εφαρμογής που επιχειρείται κάθε φορά. Η δυνατότητα αυτή της προσαρμογής του συστήματος της χρωματογραφικής ανάλυσης ανάλογα με την εφαρμογή και η ευελιξία που αυτό συνεπάγεται για το αναλυτικό εργαστήριο είναι ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της HPLC (Μουρκίδου Ε. και Πατσιάς Ι. 2009)



Σχήμα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση ενός συστήματος HPLC. 1: φιάλη εκλουστικού (κινητή φάση), 2: αντλία, 3: εγχυτής δείγματος, 4: προστήλη, 5: αναλυτική στήλη, 6: ανιχνευτής, 7: καταγραφικό και επεξεργαστής σήματος.

Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές στην υγρή χρωματογραφία για αναλύσεις υπολειμμάτων, είναι:

- *Απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-VS).* Είναι ο κατ' εξοχήν ανιχνευτής στην υγρή χρωματογραφία. Η λειτουργία τους στηρίζεται στη διέλευση της κινητής φάσης μέσα από κυψελίδα, η οποία δέχεται δέσμη ακτίνων περιοχής UV- VIS. Ανιχνεύει ενώσεις που απορροφούν UV ή ορατό φως (200 - 350 nm), όπως οι αρωματικές και οι ενώσεις με πολλαπλού ς δεσμούς μεταξύ C και O, N ή S. Η κινητή φάση συνήθως απορροφά καθόλου ή ελάχιστη ακτινοβολία. Παρουσιάζει γραμμικότητα και γενικά δεν επηρεάζεται το σήμα από αλλαγές ροής ή πίεσης. Οι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

ανιχνευτές UV είναι τριών τύπων: α) σταθερού μήκους κύματος (λ), π.χ. 254 nm, **β)** μεταβαλλόμενου μήκους κύματος και γ) συστοιχίας διόδων λυχνιών *(Diode Array Detector - UV-DAD),* ο οποίος είναι περισσότερο εκλεκτικός, μικρής όμως ευαισθησίας. Οι ανιχνευτές μεταβαλλόμενου μήκους κύματος πλεονεκτούν έναντι του σταθερού, γιατί έχουν αυξημένη ευαισθησία (επιλέγεται για την κάθε ουσία το βέλτιστο μήκος κύματος).

- *Φθορισμού (Fluorescent - FLD).* Οι ανιχνευτές φθορισμού είναι πολύ ευαίσθητοι (10-12 g/ mL) και πολύ εκλεκτικοί.
- *Φασματομετρίας μάζας (MS).* Η φασματομετρία μάζας λειτουργεί υπό κενό, γι' αυτό αναζητήθηκαν τρόποι εισαγωγής της κινητής φάσης που εξέρχεται από τη στήλη της υγρής χρωματογραφίας στο MS. Υπάρχουν διάφορες τεχνικές ιονισμού και αντίστοιχοι διασυνδέτες *(Interfaces).* Ο διασυνδέτης περιλαμβάνει την εισαγωγή του εκλούσματος της υγρής χρωματογραφίας στο MS σύστημα και τον ιονισμό του δείγματος (Μηλιάδης, 2004).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Κεφάλαιο 4. Εντομοκτόνα προστατευτικά σπόρων

4.1 Γενικά

Τα εντομοκτόνα-προστατευτικά σπόρων (γνωστά παγκοσμίως και ως grain protectants) αποτελούν εντομοκτόνα τα οποία έχουν δημιουργηθεί για να εφαρμόζονται σε δημητριακά απευθείας με την είσοδό τους στο χώρο αποθήκευσης. Τα εντομοκτόνα προστατευτικά σπόρων χρησιμοποιούν κατάλληλες βοηθητικές ουσίες ώστε να διατηρούν τις εντομοκτόνες ιδιότητές τους για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Δεν είναι ιδιαίτερα πτητικά και η διεισδυτικότητα τους εντός των προσβεβλημένων σπόρων είναι περιορισμένη. Κατά αυτό τον τρόπο είναι δύσκολο να καταπολεμήσουν όλα τα στάδια ανάπτυξης των εντόμων, όταν πρόκειται για είδη τα οποία αναπτύσσονται στο εσωτερικό του σπόρου (π.χ. *R. dominica* και *S. oryzae*). Γενικά ένα εντομοκτόνο προστατευτικό σπόρων, πιθανόν να μην είναι απαραίτητο για βραχυπρόθεσμες αποθηκεύσεις προϊόντων, τα οποία πρόκειται να πωληθούν πριν οι θερμοκρασίες ανέλθουν αρκετά ώστε να υπάρχει πιθανότητα προσβολής. Το χειμώνα μια τεχνική η οποία μπορεί να εφαρμοστεί για την καλύτερη συντήρηση του αποθηκευμένου σπόρου, είναι αυτή του αερισμού, προκειμένου η θερμοκρασία να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα. Από την άλλη μεριά, όταν ένα δημητριακό εισέρχεται στο χώρο αποθήκευσης κατά τους θερινούς μήνες ή αν πρόκειται για μια μακροχρόνια αποθήκευση (περισσότερο από 3 μήνες), τότε είναι σημαντικό να χρησιμοποιηθεί κάποιο εντομοκτόνο προστατευτικό σπόρων (Subramanyam et al, 2005).

4.2 Εντομοκτόνα προστατευτικά σπόρων τα οποία έχουν έγκριση στην Ελλάδα και χρησιμοποιούνται σήμερα.

Τα εντομοκτόνα προστατευτικά σπόρων (δραστικές ουσίες) τα οποία κυκλοφορούν στην Ελληνική αγορά και για τα οποία η έγκριση κυκλοφορίας βρίσκεται σε ισχύ ή έχει πραγματοποιηθεί αίτηση ανανέωσης έγκρισης κυκλοφορίας, είναι τα ακόλουθα:

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

4.2.1 Bacillus thuringiensis

Σκευάσματα με δραστική ουσία *Bacillus thuringiensis* έχουν έγκριση για εφαρμογή σε επιφάνειες αποθηκών καθώς και για επιφανειακές εφαρμογές σε σιτηρά (π.χ. σωρούς δημητριακών).

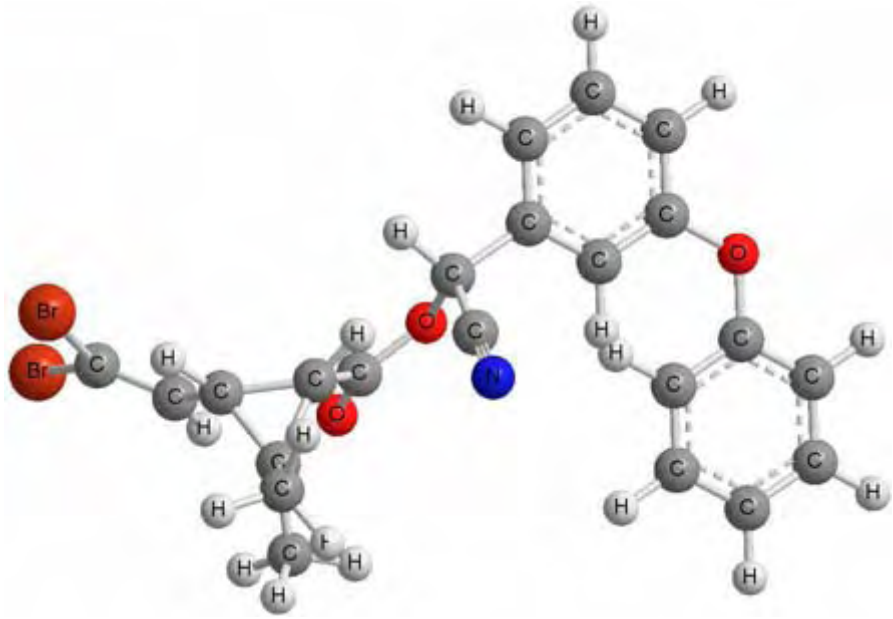
Το *B. thuringiensis* παράγεται στα κύτταρα του *Pseudomonas fluorescens* τα οποία είναι γενετικά τροποποιημένα για να παράγουν τοξίνη του *B. thuringiensis*. Αποτελεί εντομοκτόνο στομάχου. Ανήκει στα κρυσταλλοφόρα βακτήρια, κατά την σπορίωση παράγει ένα παρασποριακό κρυσταλλικό έγκλειστο σωμάτιο. Όταν το σποριωμένο βακτήριο καταποθεί από το έντομο, το κρυσταλλικό αυτό σωμάτιο διαλυτοποιείται στο μέσο έντερο του και ελευθερώνει πρωτεΐνες που ονομάζονται δ-ενδοτοξίνες οι οποίες αποδομούνται σε τοξίνες. Οι τοξίνες διαπερνούν την περιτροφική μεμβράνη, φτάνουν στο επιθήλιο του μέσου εντέρου και προκαλούν λύση των κυτταρικών μεμβρανών. Ο πεπτικός σωλήνας παραλύει και το έντομο σταματάει να τρώει. Τα βακτήρια βλαστάνουν και το έντομο πεθαίνει από σηψαιμία (Starnes et al,1993).

Είναι ένα εντομοπαθογόνο προσθετικό το οποίο χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των προνυμφών του *Plodia interpunctella* και άλλων λεπιδοπτέρων αποθηκών, με βάση εφαρμογές στα ανώτερα 10-12cm. Οι δοσολογίες είναι δυνατόν να διαφοροποιούνται ανάλογα με την περιεκτικότητα στο βάκιλο. Οι καρποί στους οποίους μπορεί να γίνει εφαρμογή είναι δυνατόν να διαφέρουν ανάλογα με το σκεύασμα αλλά γενικά περιλαμβάνουν τα περισσότερα δημητριακά αλλά επιπλέον περιλαμβάνουν σπόρους σόγιας και ηλίανθου. Το *B. thuringiensis* δεν είναι αποτελεσματικό απέναντι σε ακμαία λεπιδοπτέρων, βρούχους και άλλα κολεόπτερα που προσβάλλουν σπόρους δημητριακών.

4.2.2 Deltamethrin

Υπάρχουν διάφορα εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα με δραστική ουσία deltamethrin, τα οποία εφαρμόζονται κατά την είσοδο του δημητριακού σε σιλό και συναφείς χώρους, με χρήση ειδικού μηχανισμού ψεκασμού υπέρμικρου όγκου (Ultra Low Volume, ULV) (Εικ. 4.1)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87



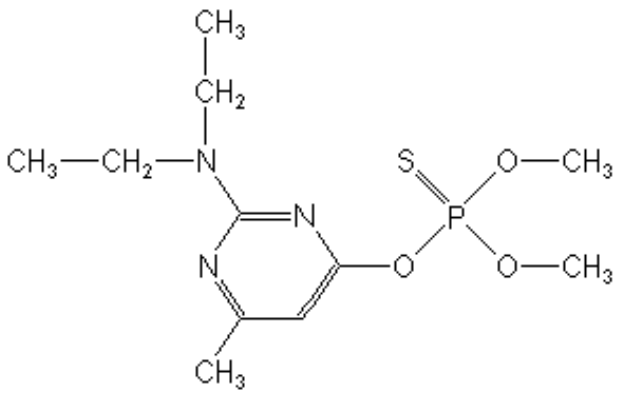
Εικ.4.1: Χημικός τύπος του deltamethrin

Το deltamethrin είναι πυρεθροειδές με δράση στο νευρικό σύστημα και λειτουργεί ως παρεμποδιστής του διαύλου νατρίου, έτσι ώστε να μην μπορούν να λάβουν χώρα οι νευρικές συσπάσεις. Δεν παρουσιάζει διασυστηματική δράση. Δρα διά στομάχου και με επαφή. Έχει ταχεία δράση. Ανήκει στην κατηγορία ΙΙ των τοξικών ουσιών. Παρέχει προστασία απέναντι σε ένα μεγάλο φάσμα εντόμων. Έχει έγκριση σε περισσότερες από 100 χώρες σε όλο τον κόσμο, όπως Αργεντινή, Βραζιλία, Καναδάς, Κίνα, Γαλλία, Γερμανία, Ινδία, Ινδονησία, Ιταλία, Πακιστάν, Ισπανία και ΗΠΑ.

4.2.3 Pirimiphos methyl

Υπάρχει μεγάλος αριθμός σκευασμάτων στην ελληνική αγορά, τα οποία χρησιμοποιούνται για απ’ ευθείας εφαρμογή στο προϊόν, ή για ψεκασμό σε επιφάνειες αποθηκευτικών χώρων (π.χ. τοίχους) (Εικ.4.2)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87



Εικ.4.2: Χημικός τύπος του pirimiphos - methyl

Το pirimiphos - methyl είναι οργανοφωφορικό εντομοκτόνο (και ακαρεοκτόνο) ευρέως φάσματος. Δρα σαν δηλητήριο επαφής και αναπνοής. Παρεμποδίζει τη χοληνεστεράση, με ταχεία ταυτόχρονη δράση μέσω των ατμών. Δρα δια επαφής και δια στομάχου. Έχει μικρή υπολειμματική δράση στους φυτικούς ιστούς (ημιπερίοδος ζωής γύρω στις 16 ώρες) και μεγάλη σε αδρανείς επιφάνειες, σε μερικές περιπτώσεις, για αρκετούς μήνες. Για αυτό μπορεί να χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση εντόμων αποθηκών, σπιτιών και μονάδων με ζώα (π.χ. βουστασίων). Διασπάται εύκολα με υδρόλυση. Τα υπολείμματά του μειώνονται ταχύτατα από το φυτό αμέσως μετά τον ψεκασμό, με εξάτμιση. Υδρολύεται σε πολύ όξινο και αλκαλικό περιβάλλον και είναι ελαφρώς διαβρωτικό στον ψευδάργυρο και το μαλακό ατσάλι. Έχει μικρή τοξικότητα στα θηλαστικά. Είναι αποτελεσματικό στον έλεγχο πολλών εντόμων αποθηκών, συμπεριλαμβανομένων και κάποιων εντόμων ή πληθυσμών εντόμων ανθεκτικών στο malathion. Σπόρος στον οποίο έχει πραγματοποιηθεί εφαρμογή με pirimiphos methyl στην αναγραφόμενη δοσολογία, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί άμεσα ως ανθρώπινη τροφή ή για σιτηρέσιο ζώων. Δεν πρέπει να γίνονται περισσότερες από μία εφαρμογές στις ίδιες αποθηκευμένες ποσότητες σπόρων. Είναι κατάλληλο για αποθήκες αλλά και για βιομηχανίες, χώρους επεξεργασίας προϊόντων δημητριακών κλπ. για την καταπολέμηση εντόμων. Για παράδειγμα, η δραστική αυτή χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των *Sitotroga cerealella*, *Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais* (Culculionidae), *Sitophilus oryzae* (Curculionidae), *Oryzaephilus surinamensis* (Sylvanidae), μυγών κ.α. Σε ότι αφορά στις περιπτώσεις όπου έχουμε αποθηκευμένα σιτηρά, καλό θεωρείται και το να προηγηθεί ψεκασμός με pirimiphos methyl σε επιφάνειες προκειμένου να έχουμε μια ικανοποιητική

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

κάλυψη, αφού γίνει ένας σχολαστικός καθαρισμός του χώρου και κατόπιν τούτου μπορεί, αφού τοποθετηθεί το προϊόν, να γίνει επίπαση με σκόνη pirimiphos methyl.

4.3 Το spinosad και η χρήση του ως μέσο αντιμετώπισης εντόμων εχθρών των αποθηκευμένων γεωργικών προϊόντων και τροφίμων.

4.3.1 Η ιστορία του spinosad

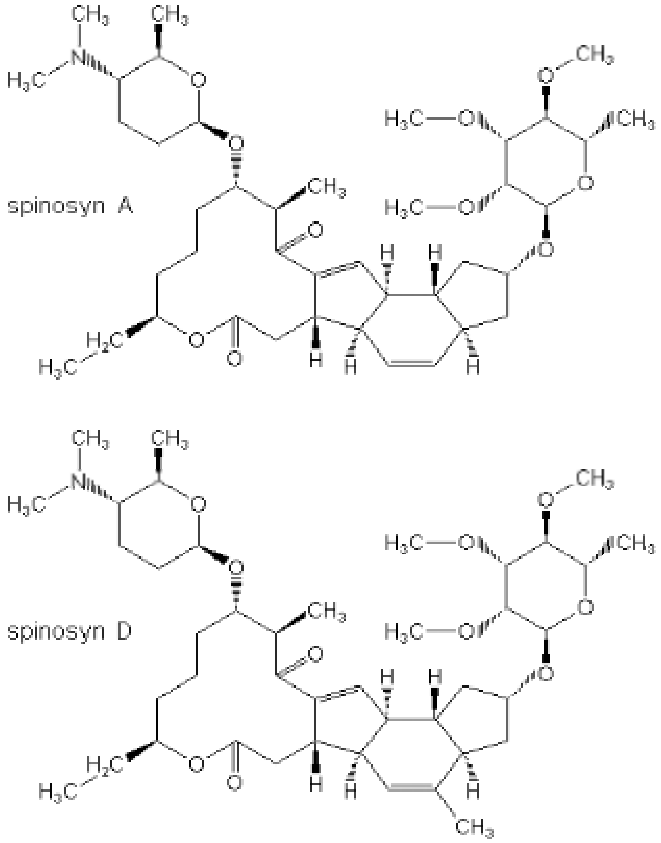
Στα τέλη της δεκαετίας του ΄50, εταιρείες μεταξύ των οποίων η Dow Chemical Company (New York, USA) και η Eli Lilly and Company (Indianapolis, USA) άρχισαν να προσανατολίζονται σε βιολογικής φύσεως φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Το 1982 και ενώ επιστήμονας της Eli Lilly βρίσκονταν σε διακοπές σε νησί της Καραϊβικής επισκέφθηκε ένα εγκαταλελειμμένο εργοστάσιο παρασκευής ρουμιού από όπου πήρε μερικά εδαφικά δείγματα. Τα δείγματα αυτά οδηγήθηκαν στα εργαστήρια της Eli Lilly προς διερεύνηση υπάρξεως βιολογικής δράσεως. Τρία χρόνια αργότερα, τα προϊόντα που προήλθαν από τη ζύμωση αυτών των δειγμάτων έδειξαν ότι έχουν εντομοκτόνο δράση. Το 1986 οι επιστήμονες της Eli Lilly πιστοποίησαν τον οργανισμό που παρήγαγε τις βιολογικά ενεργές ουσίες. Προσδιόρισαν ότι πρόκειται για ένα νέο είδος βακτηρίου, το *Saccharopolyspora spinosa*. Το *S. spinosa* ανήκει στην κλάση Thallobacteria (διακλαδούμενα βακτήρια) και στην τάξη Actinomycetales. Είναι αερόβιο και αναπτύσσεται αργά (Hertlein et al., 2010). Ακολούθησε ο προσδιορισμός των δραστικότερων μεταβολιτών του βακτηρίου. Μερικά χρόνια αργότερα, και μετά από εκτεταμένες δοκιμές που έγιναν σε πολλά μέρη του κόσμου, αναπτύχθηκε ένα λίαν αποτελεσματικό σκεύασμα. Το σκεύασμα αυτό περιείχε ένα μίγμα των μεταβολιτών spinosyn A και spinosyn D. Το όνομα spinosad προέρχεται από το συνδυασμό του ονόματος του είδους spinosa, με τους δύο μεταβολίτες A και D (spinos-A-D). Το 1995 και λόγω του ιδανικού της οικολογικής και τοξικολογικής εικόνας του το spinosad χαρακτηρίστηκε από τη United States Environmental Protection Agency (USEPA) ως “προϊόν χαμηλού κινδύνου”. Το 1997 έλαβε την πρώτη έγκριση στις Η.Π.Α. Το spinosad παρουσιάζει χαρακτηριστικά φιλικά για τα θηλαστικά και το περιβάλλον και για αυτό το 1999 κέρδισε το Presidential Green Chemistry Award από την USEPA.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Οι αποικίες του *S.spinosa* αναπτύσσονται τρεφόμενες με φυτικά προϊόντα όπως σόγια και βαμβακόπιτα. Για τον έλεγχο της θερμοκρασίας, του οξυγόνου και των επιπέδων των θρεπτικών στοιχείων προκειμένου να εξασφαλίζεται η μέγιστη παραγωγή των μεταβολιτών spinosyn A και D, χρησιμοποιούνται προγράμματα υπολογιστών.

4.3.2 Spinosad

Το spinosad (spinosyn A και spinosyn D) αποτελεί μια νέα χημική κλάση εντομοκτόνου το οποίο είναι εγκεκριμένο, όπως προαναφέρθηκε, από τη USEPA, για τον έλεγχο μεγάλου αριθμού εντόμων. Οι spinosyns A και D περιέχονται σε ποσοστό 85:15% στο τελικό προϊόν, αντίστοιχα (Εικ.4.3)



Εικ.4.3: Χημικός τύπος: $C_{41}H_{65}NO_{10}$ (spinosyn A) + $C_{42}H_{67}NO_{10}$ (spinosyn D)

Σε δοκιμές υπαίθρου η υπολειμματική διάρκεια κυμαίνεται από 7 έως 14 ημέρες. Σε θερμοκήπια με λεπτή σήτα για προστασία από έντομα, η υπολειμματική διάρκεια φθάνει τις 21 ημέρες Τα υπολείμματα του spinosad είναι εξαιρετικά σταθερά στους σπόρους που αποθηκεύονται σε δοχεία (λόγω απουσίας φωτός) και κυμαίνεται από 6

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

μήνες έως 2 χρόνια. Πολλοί παράγοντες έχουν αποδειχθεί να έχουν αντίκτυπο στην συνολική απόδοση του spinosad, όπως το είδος των εντόμων, στάδιο ζωής των εντόμων, το είδος σιτηρών, η ποικιλία σπόρων, καθώς και τον τύπο του σκευάσματος. Το spinosad διαθέτει ένα μοναδικό τρόπο δράσης στα έντομα και στον έλεγχο εντομών με ανθεκτικά στελέχη σε άλλα προστατευτικά σπόρων. Ο συνδυασμός της υψηλής αποτελεσματικότητας, το ευρύ φάσμα εντόμων, της χαμηλής τοξικότητας, και φιλικό στο περιβάλλον είναι μοναδικός μεταξύ των υφιστάμενων προϊόντων που χρησιμοποιούνται σήμερα για την προστασία των αποθηκευμένων προϊόντων (Hertlein et al., 2010). Το spinosad είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό για τα έντομα που ανήκουν στις Τάξεις: Λεπιδόπτερα, Δίπτερα, Θυσανόπτερα, Κολεόπτερα, Ορθόπτερα, Υμενόπτερα και άλλα (Sparks et al., 1995).

Η δράση του spinosad είναι διαφορετική και μοναδική και μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί διασταυρούμενη ανθεκτικότητα σε οποιαδήποτε άλλο γνωστό εντομοκτόνο (Salgado and Sparks, 2005). Το spinosad αντί να αποτρέψει τη δράση της ακετυλοχολίνης, την παρατείνει. Η ικανότητα του spinosad να παρατείνει τη δράση της ακετυλοχολίνης, δείχνει ότι αυτό και η ακετυλοχολίνη δρουν παραλλήλως και για το λόγο αυτό πρέπει να βρίσκονται και να δρουν σε σημεία τα οποία απέχουν μεταξύ τους. Το spinosad δεσμεύει μία ή περισσότερες πρωτεΐνες και ενεργοποιεί τον υποδοχέα νικοτινικής ακετυλοχολίνης. Κατόπιν τούτου αρχίζει η εισροή ιόντων νατρίου προς τους νευρώνες και αυτοί γίνονται υπερδραστήριοι. Η υπερδραστηριότητα του νευρικού συστήματος έχει ως συνέπεια την συνεχή δραστηριότητα των μυών οδηγώντας τους σε σύσπαση. Το ίδιο και στην περίπτωση κατά την οποία το spinosad δράσει στους διαφοροποιημένους GABA υποδοχείς. Πρόκειται για διαφορετικούς από τους προηγούμενους υποδοχείς οι οποίοι ίσως δεν εξουδετερώνονται από την ακετυλοχολινεστεράση, με αποτέλεσμα να μην εξουδετερώνεται η νευρική διέγερση. Κατόπιν τούτου εμφανίζονται συμπτώματα νευρομυϊκής κοπώσεως και παραλύσεως, όπως έχουν προαναφερθεί. Ο νέος τρόπος δράσεως, σε σχέση με άλλα εντομοκτόνα, διαπιστώθηκε εξ αρχής από τα συμπτώματα που εμφανίζονταν στα περισσότερα έντομα στα οποία είχε πραγματοποιηθεί εφαρμογή με spinosad. Τα συμπτώματα είχαν να κάνουν με ένα “ανασήκωμα” του σώματος του εντόμου, το οποίο προκαλούνταν από την έκταση των ποδών του. Στην πραγματικότητα, η έκταση των ποδών ήταν τόσο έντονη ώστε στη συνέχεια ακολουθούσε πτώση του εντόμου, λόγω της ανικανότητάς του να στηριχτεί σε αυτά. Παραλλήλως, προκαλούνταν ασθενές τρεμούλιασμα, ασθενείς

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

σπασμοί, ενώ τα στοματικά μόρια παρουσίαζαν συνεχή κίνηση. Έντομα τα οποία έρχονται σε επαφή με spinosad, δείχνουν κι άλλα συμπτώματα υπερδιεγέρσεως, όπως χτύπημα πτερύγων και τυμπανιαία κοιλία, προερχόμενη από την είσοδο μεγάλης ποσότητας αέρα εντός αυτής. Τα συμπτώματα εμφανίζονται εντός 20 περίπου λεπτών από τη στιγμή που το spinosad θα έρθει σε επαφή με το σώμα του εντόμου. Ο θάνατος επέρχεται εντός ωρών, οι οποίες όμως μπορεί να ξεπερνούν τις 24, μετά την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων.

Η καταλληλότητα του spinosad ως προστατευτικό αποθηκευμένων προϊόντων άρχισε σταδιακά να παρουσιάζεται με επιστημονικές δημοσιεύσεις που χρονολογούνται από το 1999 (Subramanyam et al., 1999). Από τότε το spinosad έχει αποδειχθεί ότι παρέχει αποτελεσματικό και μακροχρόνιο έλεγχο εναντίων των πολυάριθμων εχθρών των διάφορων αποθηκευμένων προϊόντων (Chintzoglou et al., 2008). Αρχικά το spinosad εγκρίθηκε για χρήση ως προστατευτικό σπόρων στην Κένυα το 2003, κυρίως λόγω της μεγάλης αποτελεσματικότητάς του κατά του *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrychidae), που προκαλεί σημαντικές ζημιές σε αποθηκευμένο αραβόσιτο στην υποσαχάρια Αφρική. Στις Ηνωμένες Πολιτείες εγκρίθηκε στις αρχές του 2005, με την επισήμανση της χρήσης spinosad στη δόση του 1 ppm (1 mg / kg σπόρου) και με ανώτερα όρια υπολειμμάτων (Maximum Residue Limit, MRL) 1,5 ppm (Hertlein et al., 2010).

Το spinosad έχει έγκριση στην Ελλάδα, με δύο εμπορικά σκευάσματα, το SUCCESS 0,24 CB και το LASER 480 SC. Το Success 0,024 CB, σε μορφή συμπυκνωμένου δολώματος (Concentrated Bait), είναι διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου με προληπτική και κατασταλτική δράση, για την καταπολέμηση του Δάκου της ελιάς, με δολωματικούς ψεκασμούς από εδάφους. Περιέχει δραστική ουσία spinosad 0,024 % β/ο. Το Laser 480 SC το οποίο περιέχει 48% β/ο spinosad, βρίσκεται σε μορφή εναιωρήματος (SC). Το Laser 480 SC δεν κατατάσσεται τοξικολογικά και δε φέρει σήμανση τοξικότητας για τον άνθρωπο. Εφαρμόζεται με ψεκασμό καλύψεως φυλλώματος. Έχει έγκριση για την καταπολέμηση της ευδεμίδας (*Lobesia botrana*), στο αμπέλι, του θρίπα της Καλιφόρνιας (*Frankliniella occidentalis*) στο αμπέλι, την τομάτα, την πιπεριά, τη μελιτζάνα, την αγγουριά, και τη φράουλα θερμοκηπίου. Τέλος έχει έγκριση για την καταπολέμηση της λιριόμυζας (*Liriomyza* sp.) στην τομάτα και την πιπεριά.

Η ευαισθησία των εντόμων στο spinosad έχει αποδειχθεί ότι ποικίλλει ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τις εργαστηριακές δοκιμές . Η τοξικότητα του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

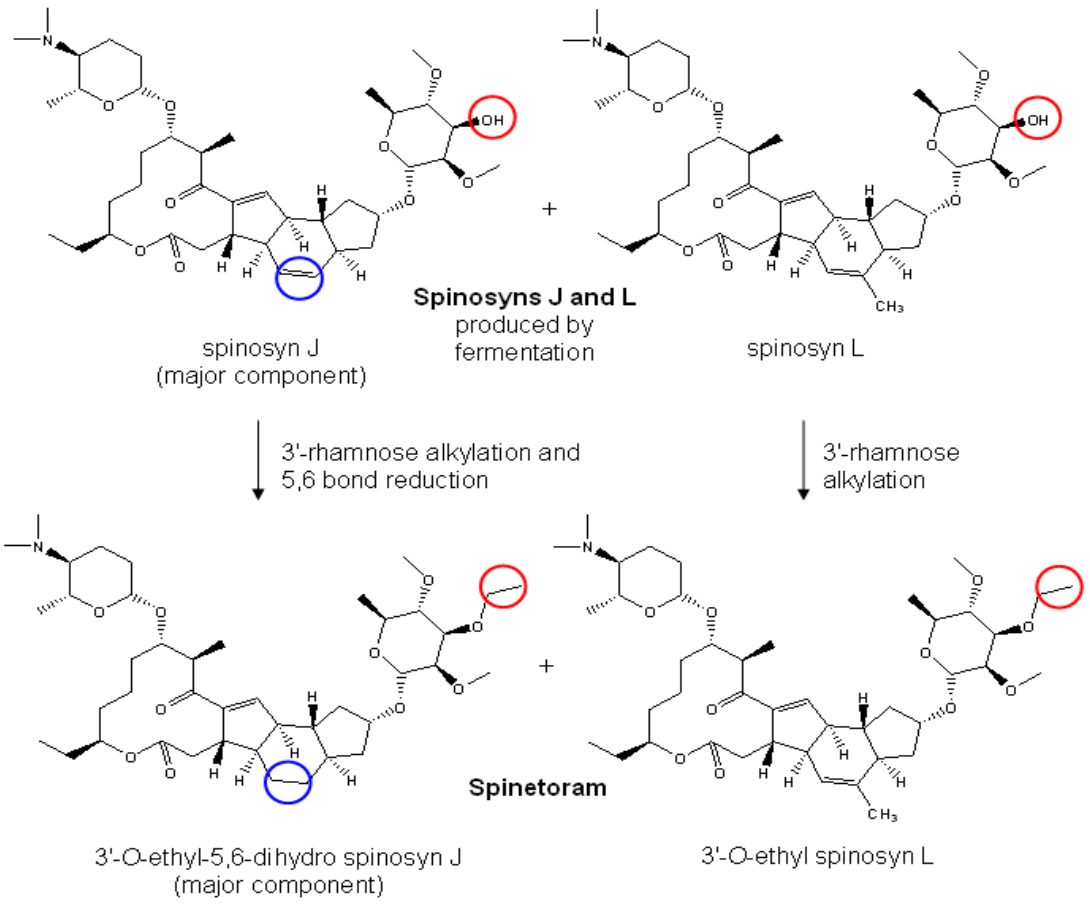
spinosad στα έντομα των αποθηκευμένων προϊόντων γενικά συσχετίζεται θετικά με τη θερμοκρασία αν και το αποτέλεσμα είναι πιο έντονο για τα λιγότερο ευαίσθητα είδη, όπως *S. oryzae* και *T. confusum* σε σχέση με τα εξαιρετικά ευαίσθητα είδη, όπως *R. dominica* (Fang and Subramanyam, 2003). Καμία διαφορά δεν βρέθηκε στην τοξικότητα του spinosad στο *R. Dominica* σε εργαστηριακές δοκιμές όταν η σχετική υγρασία αυξήθηκε από 55 έως 70% (Daglish and Nayak, 2006). Το spinosad παρέχει κατάλληλη προστασία για 6 μήνες εναντίων του *S. oryzae* και *R. dominica* αλλά δεν είναι κατάλληλο για μακροχρόνια προστασία κατά του *T. confusum* κ*αι C. ferrugineus.*

Το spinosad αποδείχθηκε πιο αποτελεσματικό κατά του *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) στην τομάτα σε σχέση με το quinalphos, lambda cyhalothrin και cypermethrin. Το spinosad δεν προκάλεσε θνησιμότητα σε τρία σημαντικά παράσιτα που καταγράφηκαν στην καλλιέργειας της τομάτας (*Menochilus sexmaculaus*, *Syrphus corollae* και*Chrysoperla carnea*). Γενικά, είναι ασφαλές στα ατελή στάδια και τα ενήλικα πολλών φυσικών εχθρών (Ghosh et al 2010).

4.3.3 Spinetoram

Το spinetoram είναι ένα νέο μέλος της κατηγορίας των spinosyns που αναπτύχθηκε από την εταιρεία Dow AgroSciences και προέρχονται από ζύμωση του *Saccharopolyspora spinosa* όπως και οι άλλες spinosyns, αλλά η ζύμωση του ακολουθείται από χημικές αλλαγές για να δημιουργηθεί η δραστική ουσία spinetoram. Το spinetoram είναι ένα μείγμα από spinosyn J (κύριο συστατικό) και spinosyn L (δευτερεύον συστατικό), οι οποίες έχουν μια ομάδα υδροξυλίου στη θέση 3’. Οι spinosyns J και L έχουν και οι δύο τροποποιηθεί με την υποκατάσταση της ομάδας – OH από την 3'-O-ethyl και την αναγωγή του διπλού δεσμού σε 5,6 spinosyn J (Εικ.4.4) Το spinetoram φαίνεται ότι αποτελεί συνδυασμό της δραστικότητας της ουσίας και του βελτιωμένου έλεγχου (residual control), διατηρώντας παράλληλα τη χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά καθώς και το χαρακτηριστικό να είναι φιλικό προς το περιβάλλον, όπως όλες οι spinosyns (Dow AgroSciences 2006).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87



Εικ.4.4: Spinetoram: αποτέλεσμα των συνθετικών τροποποιήσεων στις spinosyns J και L.

Το spinetoram προκαλεί διέγερση του νευρικού συστήματος του εντόμου με την αλλαγή της λειτουργίας των νικοτινικών και GABA υποδοχέων. Ωστόσο δεν αλληλεπιδρούν με τις γνωστές θέσεις δέσμευσης των άλλων τάξεων εντομοκτόνων, όπως neonicitinoids, fiproles, ή αβερμεκτίνες. Το spinetoram έχει ίδιο τρόπο δράσης με το spinosad. Αν και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο spinosad είναι σπάνιο φαινόμενο στα αγροοικοσυστήματα, είναι πιθανό η ανθεκτικότητα του spinosad να επηρεάσει αρνητικά και το spinetoram (Dripps et al., 2008)

Το spinetoram έχει ευρύ φάσμα δράσης και έχει αξιολογηθεί ως τώρα με επιτυχία κατά ειδών των τάξεων Λεπιδόπτερα, Θυσανόπτερα, και Δίπτερα. (Williams et al. (2003). Το spinetoram είναι αποτελεσματικό σε διάφορες καλλιέργειες για τα είδη *Cydia pomonella, Grapholita molesta, Spodoptera* spp., *Frankliniella occidentalis, Thrips tabaci, Liriomyza* spp. και πολλά άλλα. Λειτουργεί ως εντομοκτόνο στομάχου και επαφής και διασπάται ραγδαία στο περιβάλλον. Είναι μετρίως τοξικό για τα πουλιά και τα θηλαστικά (Bret et al., 2002). Τυπικά ποσοστά

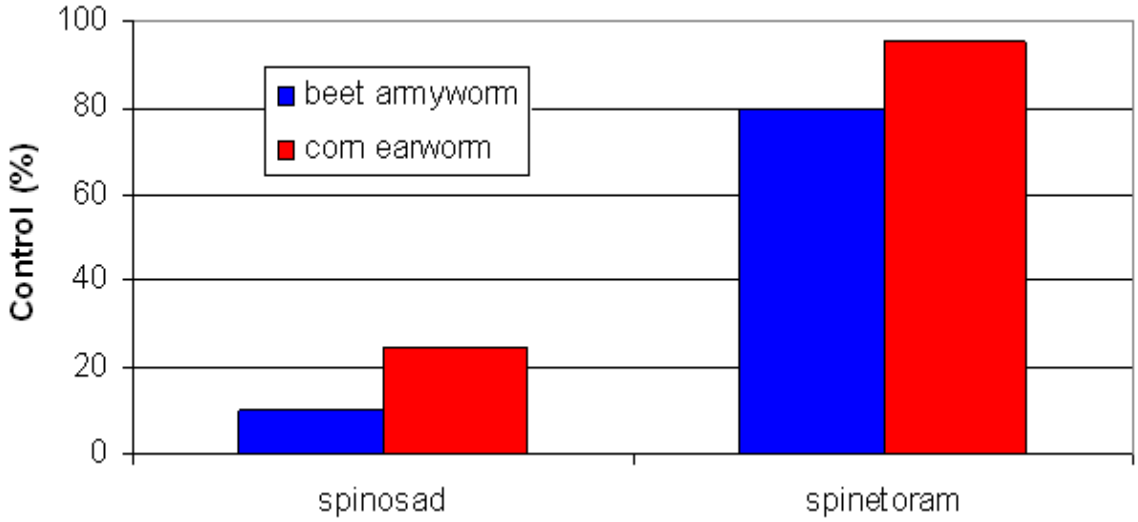
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

εφαρμογής στην καλλιέργεια κυμαίνονται από 30 -120 περίπου g δραστικής ουσίας / εκτάριο (0,4 - 1,7 ai oz / στρέμμα), ανάλογα με την καλλιέργεια και την προσβολή. Το spinetoram παρουσιάζει επίσης και διασυστηματική δράση.

Κατάλογος των επιβλαβών εντόμων για τα οποία το spinetoram έχει αξιολογηθεί με επιτυχία	
Καλλιέργεια	Κυριότεροι εχθροί
Μήλα και Αχλάδια	*Cydia pomonella, Rhagoletis pomonella, Cacopsylla* spp.
Σταυρανθή	*Plutella xylostella, Pieris* spp. *Spodoptera* spp.
Φυλλώδη λαχανικά	*Trichoplusia ni., Frankliniella* spp., *Liriomyza* spp.
Καρποφόρα λαχανικά	*Helicoverpa zea.*
Εσπεριδοειδή	Θρίπες
Σταφύλια	*Lobesia botrana*
Κολοκυνθοειδή	*Diaphania* spp.
Καλαμπόκι	*Helicoverpa zea., Ostrinia nubilalis., Agrotis* spp.
Βαμβάκι	*Helicoverpa* spp.
Σόγια	*Pseudoplusia includens.*

Οι Dripps et al. (2008) αναφέρουν ότι σε καλλιέργεια λάχανου το spinetoram ήταν πιο αποτελεσματικό εναντίων του *Spodoptera exigua* και του *Helicoverpa armigera* σε σύγκριση με το spinosad έξι ημέρες μετά την εφαρμογή (Εικ.4.5). Γενικά, με βάση τα ως τώρα στοιχεία, το spinetoram είναι πιο αποτελεσματικό από το spinosad και αντιμετωπίζει μεγαλύτερο φάσμα εντόμων, καθώς διατηρεί το περιβαλλοντικό και τοξικολογικό προφίλ που έχουν τα προϊόντα πρώτης γενιάς (spinosad) (Huang et al., 2009). Επίσης βρέθηκε ότι είναι αποτελεσματικό στους θρίπες του κρεμμυδιού (*Thrips tabaci*) και στις αφίδες των ροδάκινων (*Myzus persicae*) σε συνθήκες εργαστήριου και σε συνθήκες αγρού (Mahmoud et al., 2009). Επίσης, το spinetoram σε συνθήκες αγρού, προκαλεί αξιοσημείωτη θνησιμότητατα διαφορετικών σταδίων του *Tetranychus urticae* (Kady et al., 2007).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87



Εικ. 4.5: Σύγκριση του ελέγχου του spinosad και spinetoram (6 ημέρες μετά την εφαρμογή, 100 g ai / εκτάριο λάχανου) στο *Spodoptera exigua και στο Helicoverpa armigera*

Το spinetoram εγκρίθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες το Σεπτέμβριο του 2007. Η έγκριση και η ανάπτυξη του spinetoram σε πολλές άλλες χώρες σε όλο τον κόσμο αναμένεται να ξεκινήσει κατά το τρέχον έτος (2011). Υπάρχουν επί του παρόντος δύο προϊόντα spinetoram στις Ηνωμένες Πολιτείες: το Delegate™ WG το οποίο είναι εντομοκτόνο με έγκριση για τα φρούτα, τα καρύδια, τα εσπεριδοειδή, το ζαχαροκάλαμο και τα σταφύλια και το Radiant ™ SC το οποίο είναι εντομοκτόνο για τα λαχανικά τις φράουλες, και ορισμένα βότανα. Οι ιδιότητες του spinetoram και η καινοτόμος προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε για την να ανακάλυψη του αναγνωρίστηκαν από την USEPA όταν ο οργανισμός απένειμε στη δραστική αυτή το 2008 το Βραβείο Πράσινης Χημείας στην κατηγορία Designing Greener Chemicals (Dripps et al., 2008).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 - Σκοποί της παρούσας μελέτης.

Παρόλο που υπάρχουν πολλά δεδομένα διαθέσιμα για την χρήση του spinosad για την αντιμετώπιση των εντόμων των αποθηκευμένων αγροτικών προϊόντων και τροφίμων, δεν υπάρχουν δεδομένα για την αποτελεσματικότητα του spinetoram για τον ίδιο σκοπό. Η παρούσα εργασία αποτελεί μια πρώτη προσέγγιση σχετικά με την εξέταση της αποτελεσματικότητας του spinetoram κατά εντόμων αποθηκών. Για την υλοποίηση αυτής της προσέγγισης απαιτήθηκε η ανάπτυξη μιας μεθόδου προσδιορισμού του spinetoram σε σπόρους δημητριακών, αφού από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση δε βρέθηκε μέθοδος ανάλυσης του σε δημητριακά. Έτσι, για τον προσδιορισμό του spinetoram στα αποθηκευμένα δημητριακά ακολουθήθηκαν βήματα μεθόδων προσδιορισμού του spinosad με μικρές παραλλαγές στην τεχνική της εκχύλισης και με τις αναγκαίες ρυθμίσεις στη χρωματογραφική ανάλυση.

Συνοπτικά, οι σκοποί της παρούσας μελέτης είναι:

1. Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του spinetoram κατά δυο εκ των σημαντικότερων εντόμων αποθηκών παγκοσμίως, των *Rhyzopertha dominica* και *Sitophilus oryzae*.
2. Η επίδραση του είδους του δημητριακού και της δόσης στην αποτελεσματικότητα του spinetoram.
3. Η υπολειμματική δράση του spinetoram σε σιτάρι και καλαμπόκι τόσο όσο προς την αποτελεσματικότητά του κατά των εντόμων, όσο και ως προς την παραμονή του στους καρπούς με βάση τον ποσοτικό προσδιορισμό του με χρωματογραφικές μεθόδους.
4. Η ανάπτυξη μιας μεθόδου για τον προσδιορισμό του spinetoram σε δημητριακά.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Υλικά και μέθοδοι

6.1 Εντομοκτόνο

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε σκεύασμα spinetoram, το οποίο μας παρείχε η εταιρεία DAS (DOW Agrosciences, Indianaponis, IN, USA). Το σκεύασμα σε μορφή βρέξιμων κόκκων (WG), περιείχε spineroram σε περιεκτικότητα 25 % (β/β/) ,

6.2 Δημητριακά

Για τις βιοδοκιμές, χρησιμοποιήθηκαν σπόροι σκληρού σιταριού (ποικιλία Simeto) και καλαμποκιού (υβρίδιο Constantsa), οι οποίοι δεν είχαν δεχτεί προηγουμένως καμία χημική επέμβαση. Και στις δύο περιπτώσεις οι σπόροι προέρχονται από τη συγκομιδή του 2009 και η υγρασία τους κυμάνθηκε από 11,4-11,8 %, με βάση τις μετρήσεις υγρασιόμετρου Dickey-John CAC II (Dickey-John Co, KS, USA). Οι σπόροι, πριν τη χρησιμοποίηση τους, τοποθετήθηκαν στο ψυγείο για τουλάχιστον 2 μήνες. Στη συνέχεια, πριν την εφαρμογή των εντομοκτόνων, τα προϊόντα μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου όπου παρέμειναν για μια ημέρα.

6.3 Έντομα

Τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή. τα *S. oryzae* και *R. dominica*, ελήφθησαν από εκτροφές στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι ως άνω εκτροφές έλαβαν χώρα σε θερμοκρασία 25 ± 1 ^{o}C και σχετική υγρασία (ΣΥ) 65 ± 5 %, με συνεχές σκότος, σε αραβόσιτο και σιτάρι για τα *S. oryzae* και *R. dominica*, αντιστοίχως. Μόνο ακμαία χρησιμοποιήθηκαν στις εκτροφές, δοθέντος του ότι τα ατελή στάδια βρίσκονται μέσα στο σπόρο του δημητριακού (Μπουχέλος 1995).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

6.4 Εφαρμογή εντομοκτόνου

Για τον πειραματισμό, χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες σπόρων των 4 kg από το κάθε δημητριακό. Η κάθε ποσότητα ψεκάστηκε σε επίπεδα 0 (μάρτυρας), 0.1, 1 και 10 ppm, Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν 4 ποσότητες από κάθε δημητριακό (μια για κάθε επίπεδο). Ο ψεκασμός έγινε με αερογράφο. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν 3 διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων, ένα για το κάθε επίπεδο του spinetoram. Για το κάθε επίπεδο και το κάθε δημητριακό εφαρμόσθηκε 1 ml διαλύματος/kg δημητριακού, ενώ για τους μάρτυρες εφαρμόσθηκε αντιστοίχως 1 ml νερό. Τα διαλύματα που παρασκευάσθηκαν ήσαν όγκου 25 ml, εκ των οποίων 4 ml χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές. Αυτό έγινε για να επιτευχθεί καλύτερη ακρίβεια, και καλύτερη ανάμιξη του εντομοκτόνου με το νερό. Οι ποσότητες σπόρων, πριν τον ψεκασμό, τοποθετήθηκαν σε πλαστική βάση και απλώθηκαν έτσι ώστε να έχουν πάχος <0.5 cm. Μετά την εφαρμογή των διαλυμάτων, οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε κυλινδρικά γυάλινα δοχεία (ύψος 27cm και διάμετρο 16,5cm) με πλαστικό καπάκι, όπου ανακατεύθηκαν για 1 λεπτό με το χέρι, για την καλύτερη ανάμιξη του υγρού με όλη τη μάζα του προϊόντος (Φωτ.1**).** Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές (επαναλήψεις). Έτσι συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 24 ποσότητες σπόρων των 4 κιλών (12 για κάθε δημητριακό) οι οποίες τοποθετήθηκαν σε ισόποσα δοχεία. Μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας, όλα τα δοχεία τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία 25 ± 1 ^{o}C, ΣΥ 65 ± 5 % και συνεχές σκότος,

Φωτ.1*:* Ο ψεκασμός του σιταριού.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

6.5 Βιοδοκιμές

Από κάθε γυάλινο δοχείο (φωτ.2), αφαιρέθηκαν 4 δείγματα των 20 gr το καθένα. Το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε πλαστικό κυλινδρικό φιαλίδιο, διαστάσεων (Φωτ.3). Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε κάθε φιαλίδιο 20 ακμαία του *S. oryzae*. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και στην περίπτωση του *R. dominica*, με τη λήψη νέων δειγμάτων. Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν στις συνθήκες που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Μετά από 7 ημέρες τα φιαλίδια ανοίγονταν και γινόταν καταγραφή της θνησιμότητας των ακμαίων για το κάθε είδος, ενώ στη συνέχεια τα νεκρά ακμαία αφαιρούνταν (Φωτ.4). Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνονταν 7 ημέρες αργότερα (καταμέτρηση θνησιμότητας 14 ημερών). Στη συνέχεια, απομακρύνονταν όλα τα ακμαία (νεκρά και ζώντα) και τα φιαλίδια παρέμεναν για 65 ημέρες ακόμα στις ως άνω συνθήκες. Μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας, τα φιαλίδια εξετάζονταν για τυχόν παρουσία ακμαίων (παραγωγή απογόνων).(Φωτ 5,6,7). Η ίδια διαδικασία επαναλαμβανόταν ανά 30 ημέρες, με σκοπό να συμπληρωθούν 6 μήνες (6 σειρές βιοδοκιμών). Επιπροσθέτως, κατά τις ημέρες λήψης των δειγμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν για τις βιοδοκιμές με τα έντομα, λαμβάνονταν τέσσερα ακόμα δείγματα (σε κάθε συνδυασμό δημητριακού, δόσης και μήνα), τα οποία μεταφέρονταν στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων του spinetoram. Έτσι, συνολικά ελήφθησαν 1728 φιαλίδια, και χρησιμοποιήθηκαν 25620 έντομα, ενώ καταμετρήθηκαν και 1254 ακμαία ως απόγονοι και αναλύθηκαν 160 δείγματα για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων.

Φωτ.2: Γυάλινα δοχεία με σιτάρι και καλαμπόκι ψεκασμένα σε 3 επίπεδα συγκέντρωσης και 1 μάρτυρα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Φωτ.3: Πλαστικά φιαλίδια με σιτάρι και καλαμπόκι

Φωτ .4: Μέτρηση της θνησιμότητας

Φωτ.5: Φιαλίδιο με απογόνους *S. oryzae*

Φωτ.6: Μέτρηση απογόνων *S. oryzae*

Φωτ Φωτ.6: Απόγονοι *S. oryzae*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

6.6 Πρότυπα διαλύματα και διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν.

Για την ανάλυση των δημητριακών χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες εξάνιο (Hx), ακετόνη (Ac) και μεθανόλη (MeOH).

Καθόσον δεν είχαμε στη διάθεσή μας καθαρή πρότυπη δραστική ουσία απομονώσαμε αυτή από το διαθέσιμο σκεύασμα με εκχύλιση υγρού-υγρού ενός υδατικού διαλύματος του σκευάσματος συγκέντρωσης 1 mg/L (σύμφωνα με την αναγραφόμενη περιεκτικότητα του σκευάσματος σε δραστική ουσία).

Συγκεκριμένα παρασκευάσαμε ένα πρότυπο μητρικό διάλυμα spinetoram συγκέντρωσης 200μg/ml σε μεθανόλη και αυτό χρησιμοποιήθηκε ως αναλυτικό πρότυπο. Η διαδικασία που εφαρμόστηκε για την Παρασκευή του μητρικού πρότυπου διαλύματος σε μεθανόλη ήταν η εξής;

- Εκχύλιση υδατικού διαλύματος σκευάσματος spinetoram με διχλωρομεθάνιο και παράλληλη προσθήκη άλατος (NaCl).
- Παραλαβή της οργανικής φάσης με διήθηση δια μέσου ηθμού σε σφαιρική φιάλη.
- Συμπύκνωση του εκχυλίσματος μέχρι ξηρού σε περιστροφικό εξατμιστήρα και επαναδιάλυση του υπολείμματος με μεθανόλη.

Για τις ανάγκες της ποσοτικοποίησης του χρωματογραφικού συστήματος και των πειραμάτων ανάκτησης παρασκευάστηκαν έξι πρότυπα διαλύματα spinetoram διαφόρων συγκεντρώσεων (0,02 -20 mg/L) σε μεθανόλη ή/και σε ακετονοτρίλιο με αραίωση ή με διαδοχικές αραιώσεις του μητρικού προτύπου διαλύματος των 200 mg/L.

Τα διαλύματα συγκεντρώσεων 0,02 – 0,06 – 0,10 – 0,20 – 0,60 – 1,0 – 2,0 mg/L σε ακετονιτρίλιο χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς στο σύστημα LC-MS, ενώ για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκαν και πρότυπα διαλύματα σε εκχυλίσματα υποστρωμάτων καλαμποκιού και σιταριού. Τα πρότυπα διαλύματα μεγαλύτερης συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μεθόδου ανάλυσης σε σύστημα HPLC-UV για τον έλεγχο της καθαρότητας του παρασκευασθέντος προτύπου μητρικού διαλύματος αλλά και τον πρώτο έλεγχο της καθαρότητας των εκχυλισμάτων στο υψηλότερο επίπεδο ψεκασμού , αυτό των 10 ppm (mg/kg) σε σιτάρι και καλαμπόκι.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

6.7 Πειράματα ανάκτησης

6.7.1 Εμβολιασμός (φόρτιση) του σιταριού.

Η φόρτιση του σιταριού (5g) έγινε σε 3 επίπεδα (0,02 mg/Kg, 0,10 mg/Kg, και 1,0 mg/Kg) με 5 επαναλήψεις σε κάθε επίπεδο. Η φόρτιση στο επίπεδο 0,02 mg/Kg έγινε με 5μl από το πρότυπο διάλυμα spinetoram 20 mg/L σε MeOH. Η φόρτιση στο επίπεδο 0,10 mg/Kg έγινε με 25μl από το πρότυπο διάλυμα spinetoram 20 mg/L σε MeOH. Τέλος η φόρτιση στο επίπεδο 1,0 mg/Kg έγινε με 25μl από το μητρικό διάλυμα. Περιμέναμε 30-60 λεπτά για την ενσωμάτωση της δραστικής στο υπόστρωμα και ακολούθησε η διαδικασία της εκχύλισης.

6.7.2 Φορτίσεις καλαμποκιού.

Η φόρτιση του καλαμποκιού (10g) έγινε σε 3 επίπεδα (0,02 mg/Kg, 0,10 mg/Kg, 1,0 mg/Kg) με 5 επαναλήψεις. Η φόρτιση στο επίπεδο 0,02 mg/Kg έγινε με 10μl από διάλυμα spinetoram 20 mg/Kg σε MeoH. Η φόρτιση στο επίπεδο 0,10 mg/Kg έγινε με 50μl από το διάλυμα spinetoram 20 mg/Kg σε MeoH. Τέλος η φόρτιση 1,0 mg/Kg έγινε με 50μl από το μητρικό διάλυμα. Περιμέναμε 30-60 λεπτά για την ενσωμάτωση της δραστικής στο υπόστρωμα και ακολούθησε η διαδικασία της εκχύλισης.

6.8 Διαδικασία εκχύλισης δειγμάτων.

Για την ανάλυση των δειγμάτων καλαμποκιού και σιταριού για τον προσδιορισμό του spinetoram ακολουθήθηκε η παρακάτω πορεία προετοιμασίας των δειγμάτων στα πλαίσια της αναλυτικής μεθοδολογίας προσδιορισμού υπολειμμάτων.

- Ζύγιση 5g σιταριού.
- Προσθήκη 10ml ακετόνης και 20ml εξανίου.
- Ανακίνηση για 3 ώρες. (Φωτ.7)
- Παραλαβή 25ml από το εκχύχισμα και εξάτμιση μέχρι ξηρού σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα υπό κενό και σε θερμοκρασία 35°C (Φωτ.8)
- Επαναδιάλυση με 2ml MeOH και μεταφορά του τελικού εκχυλίσματος με σύριγγα με προσαρμοσμένο φίλτρο σε φιαλίδια χρωματογραφίας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

- Χρωματογραφική ανάλυση.

Για το καλαμπόκι χρησιμοποιήθηκε διπλάσια ποσότητα δείγματος (10g) και διπλάσια ποσότητα διαλυτών.

Φωτ.7: Ανακίνηση για 3 ώρες.

Φωτ.8: Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας

6.9 Προσδιορισμός υπολειμμάτων με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας.

Ο διαχωρισμός των ουσιών γίνεται με τη χρήση συζευγμένου συστήματος υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών. Η χρωματογραφική στήλη ήταν τύπου Polaris C-18, μήκους 5cm, εσωτερικής διαμέτρου 2 mm και μεγέθους σωματιδίων 5μm (VARIAN Inc). Η θερμοκρασία της στήλης ήταν αυτή του περιβάλλοντος (25 ± 4°C).

Ο διαλύτης έκλουσης Α ήταν μίγμα μεθανόλης – νερού 10:90 που περιείχε 1mM $HCOONH_4$ και ο διαλύτης έκλουσης Β ήταν μίγμα μεθανόλης – νερού 90:10 που περιέχει 1mM $HCOONH_4$. Η ροή του διαλύτη έκλουσης ήταν σταθερή 0,25 mL/min.

Η πηγή ηλεκτροδιάχυσης επιλέχτηκε σε ESI^+ .Η θερμοκρασία της πηγής ρυθμίστηκε στους 60°C. Το αέριο εκνέφωσης και ξήρανσης ήταν N_2 με ροές 47,5 και 19,3psi αντίστοιχα. Η θερμοκρασία του αερίου ξήρανσης ρυθμίστηκε στους 250 ^{o}C. Το αέριο για την πλήρωση του κελιού θρασματοποίηση (Q2) ήταν Αργό καθαρότητας 99.999% με πίεση 1.5 mTorr.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Το πρόγραμμα έκλουσης ήταν:

Χρόνος (min)	**% Διάλυμα Α**	**% Διάλυμα Β**
0,00	70,0	30,0
5,00	0,0	100,0
8,00	0,0	100,0
8,12	70,0	30,0
12,00	70,0	30,0

Ο ανιχνευτής MS ρυθμίστηκε στα 1500V. Εγχύονταν 10 μL του τελικού εκχυλίσματος.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι χρόνοι κατακράτησης, οι μεταπτώσεις και οι ρυθμίσεις του MS για κάθε αναλύτη. Ο χρόνος σάρωσης ανά μετάπτωση είναι 50 μsec.

Αναλύτης	***Ψευδομοριακό Ιόν***	***Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης***		***Τάση .τριχοειδούς***	***Ενέργεια θραυσματοποίησης***	***Μετάπτωση Ταυτοποίησης***		***Τάση .τριχοειδούς***	***Ενέργεια θραυσματοποίησης***	***Χρόνος κατακράτησης***
Spinetoram J	[M+H]+	*748*	*142*	85	25	*748*	*98*	95	40	6,8
Spinetoram L	[M+H]+	*760*	*142*	85	25	*760*	*98*	95	40	7,4

6.10. Στατιστική επεξεργασία

Η θνησιμότητα στους μάρτυρες διορθώθηκε σύμφωνα με τον τύπο του Abbott (1925). Σύμφωνα με τον τύπο αυτό, η θνησιμότητα είναι:

$$\text{Διόρθωση Abbott} = \frac{\text{Θνησιμότητα}_{\text{φαρμάκου}} - \text{Θνησιμότητα}_{\text{μάρτυρα}}}{100 - \text{Θνησιμότητα}_{\text{μάρτυρα}}} \times 100\%$$

Πριν την ανάλυση, τα δεδομένα υπεβλήθησαν σε δοκιμασία κανονικότητας με βάση το Levene test, σε α=0,05. Για τη θνησιμότητα, οι μετρήσεις αναλύθηκαν με βάση την Ανάλυση της Διασποράς Επαναλαμβανομένων Μετρήσεων (Repeated Measures ANOVA), με παράγοντες το επίπεδο φόρτισης (δόση), το προϊόν και το μήνα της βιοδοκιμής, καθώς και το χρόνο έκθεσης ως την επαναλαμβανόμενη μεταβλητή. Στην περίπτωση της παραγωγής απογόνων, τα δεδομένα υπεβλήθησαν σε Ανάλυση της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Διασποράς με τρεις παράγοντες (three-way ANOVA), με τους ίδιους παράγοντες όπως παραπάνω, ενώ στην ανάλυση αυτή συμπεριελήφθησαν και οι μετρήσεις στους μάρτυρες. Παρόμοια ήταν και η ανάλυση στην περίπτωση των μετρήσεων που ελήφθησαν από τη χρωματογραφική ανάλυση. Οι συγκρίσεις των μέσων έγιναν με τη δοκιμασία HSD (Honestly Significant Difference) των Tukey-Kramer σε επίπεδο α=0,05. Το στατιστικό λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το JMP 7 (Sall et al. 2001).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 - Αποτελέσματα

7.1 Θνησιμότητα για το *R. dominica*

Στην ανάλυση της διασποράς των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων οι κύριες επιδράσεις ήταν σημαντικές, καθώς και οι περισσότερες αλληλεπιδράσεις, (Πίνακας 7.1.) Η ανάλυση έδειξε ότι τόσο οι κύριες επιδράσεις, όσο και οι αλληλεπιδράσεις ήταν σημαντικές, και για τις δύο περιόδους έκθεσης, (Πίνακας 7.3 και Πίνακας 7.4). Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι η θνησιμότητα του *R. dominica* στο σιτάρι ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με το καλαμπόκι με εξαίρεση τον πρώτο μήνα, όπου και στα δυο δημητριακά καταγράφηκε θνησιμότητα σχεδόν 100%. Στο καλαμπόκι η θνησιμότητα μειώθηκε σταδιακά με την πάροδο του χρόνου, ενώ στο σιτάρι η θνησιμότητα παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα (97-100%) καθ όλη την διάρκεια της πειραματικής περιόδου (Διάγραμμα 7.1α) Στο επίπεδο (δόση) του 1 ppm και του 10 ppm η θνησιμότητα του *R. dominica* στο σιτάρι και στο καλαμπόκι ήταν 100% καθ όλη την διάρκεια του πειράματος (Διάγραμμα 7.1β,7.1γ.)

Η θνησιμότητα του *R. dominica* στο επίπεδο (δόση) του 0,1 ppm στις 14 ημέρες στο καλαμπόκι κυμάνθηκε από 87% (το οποίο παρατηρήθηκε τον δεύτερο μήνα) έως 95% (κατά τον έκτο μήνα), ενώ στο σιτάρι η θνησιμότητα ήταν ήδη στο 100% από τις 7 ημέρες, σε όλες τις περιπτώσεις (Διάγραμμα 7.1δ). Στο επίπεδο (δόση) του 1 ppm και 10 ppm η θνησιμότητα ήταν 100% (Διάγραμμα 7.1 ε, 7.1στ)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Πίνακας 7.1. Ανάλυση διασποράς επαναλαμβανομένων μετρήσεων για το είδος *R. dominica* (β.ε. συνόλου =396)

	R. dominica		
Πηγή μεταξύ των μεταβλητών	***Β.ε.***	***F***	***P***
Όλες μεταξύ τους	35	9,8	**<0,0001**
Τιμή αποκοπής	1	48384,8	**0,0000**
Επίπεδο (δόση)	2	54,0	**<0,0001**
Είδος δημητριακού	1	51,7	**<0,0001**
Είδος δημητριακού Χ Δόση	2	50,5	**<0,0001**
Μήνας	5	3,1	**0,0089**
Δόση Χ Μήνα	10	2,8	**0,0022**
Είδος δημητριακού Χ Μήνα	5	2,8	**0,0169**
Δόση Χ Είδος δημητριακού Χ Μήνα	10	2,7	**0,0037**
Πηγή μεταξύ των μεταβλητών	***Β.ε.***	***F***	***P***
Εντός των μεταβλητών	35	2,5	**<0,0001**
Χρόνος	1	7,9	**0,0051**
Χρόνος Χ Δόση	2	6,7	**0,0013**
Χρόνος Χ Είδος δημητριακού	1	5,6	**0,0187**
Χρόνος Χ Δόση Χ Είδος δημητριακού	2	5,0	**0,0068**
Χρόνος Χ Μήνα	5	2,1	**0,0618**
Χρόνος Χ Δόση Χ Μήνα	10	2,0	**0,0320**
Χρόνος Χ Είδος δημητριακού Χ Μήνα	5	1,9	**0,0917**
Χρόνος Χ Δόση Είδος δημητριακού Χ Μήνα	10	1,9	**0,0444**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

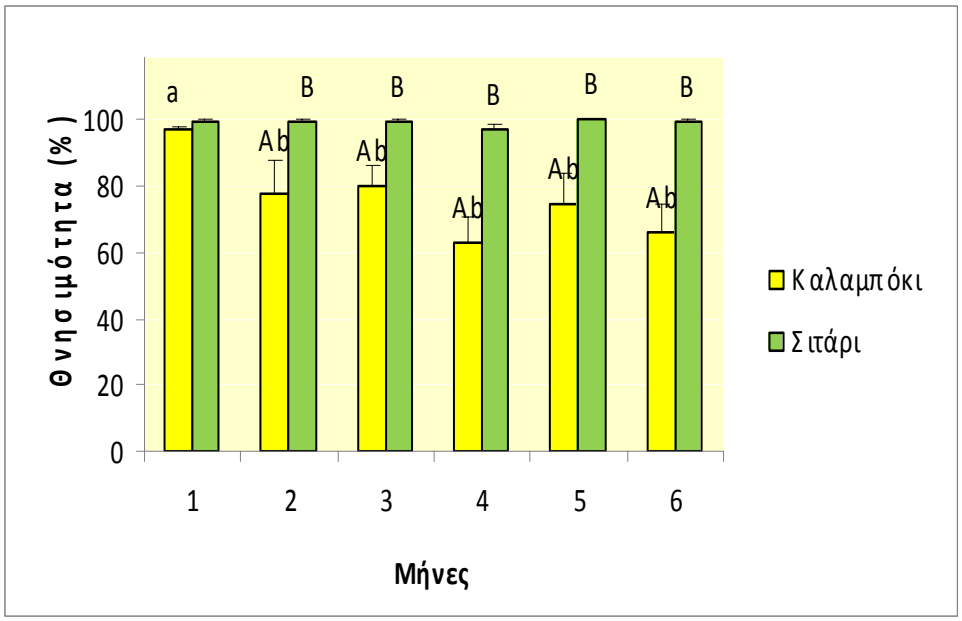
Πίνακας 7.3. Ανάλυση της διασποράς για 7 ημέρες για την θνησιμότητα του *R. dominica* (β.ε. συνόλου =431)

Πηγή παραλλακτικότητας	**Βαθμοί ελευθερίας (DF)**	**F**	**P**
Δόση	2	53,2	**<0,0001**
Είδος δημητριακού	1	49,6	**<0,0001**
Δόση Χ Είδος δημητριακού	2	47,8	**<0,0001**
Μήνας	5	2,8	**0,0178**
Δόση Χ Μήνα	10	2,3	**0,0121**
Είδος δημητριακού Χ Μήνα	5	2,2	**0,0509**
Δόση Χ Είδος δημητριακού Χ Μήνα	10	2,0	**0,0275**

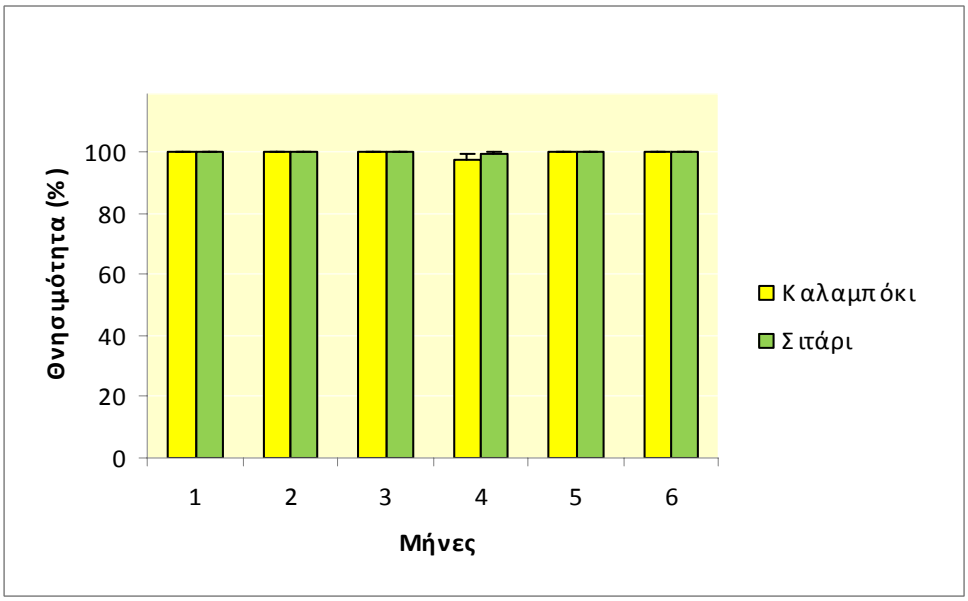
Πίνακας 7.4. Ανάλυση της διασποράς για 14 ημέρες για την θνησιμότητα του *R. dominica* (β.ε. συνόλου =431)

Πηγή παραλλακτικότητας	**Βαθμοί ελευθερίας (DF)**	**F**	**P**
Δόση	2	22,2	**<0,0001**
Είδος δημητριακού	1	22,2	**<0,0001**
Δόση Χ Είδος δημητριακού	2	22,2	**<0,0001**
Μήνας	5	2,8	**0,0159**
Δόση Χ Μήνα	10	2,8	**0,0021**
Είδος δημητριακού Χ Μήνα	5	2,8	**0,0159**
Δόση Χ Είδος δημητριακού Χ Μήνα	10	2,8	**0,0021**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

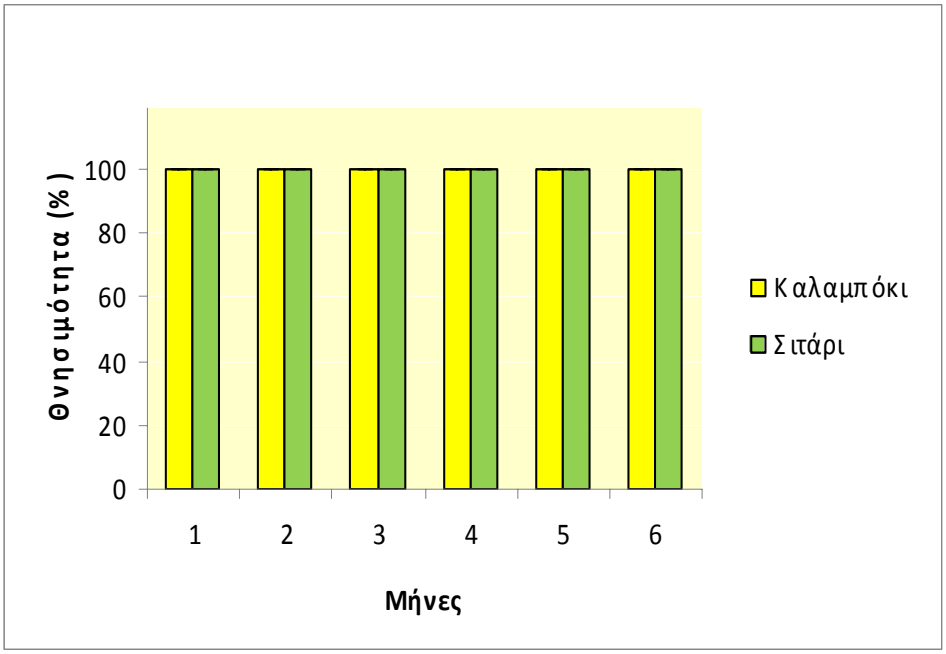


Διάγραμμα 7.1α . Θνησιμότητα του *R. dominica* στις 7 ημέρες στο επίπεδο (δόση) του 0,1 ppm για το σιτάρι και το καλαμπόκι.

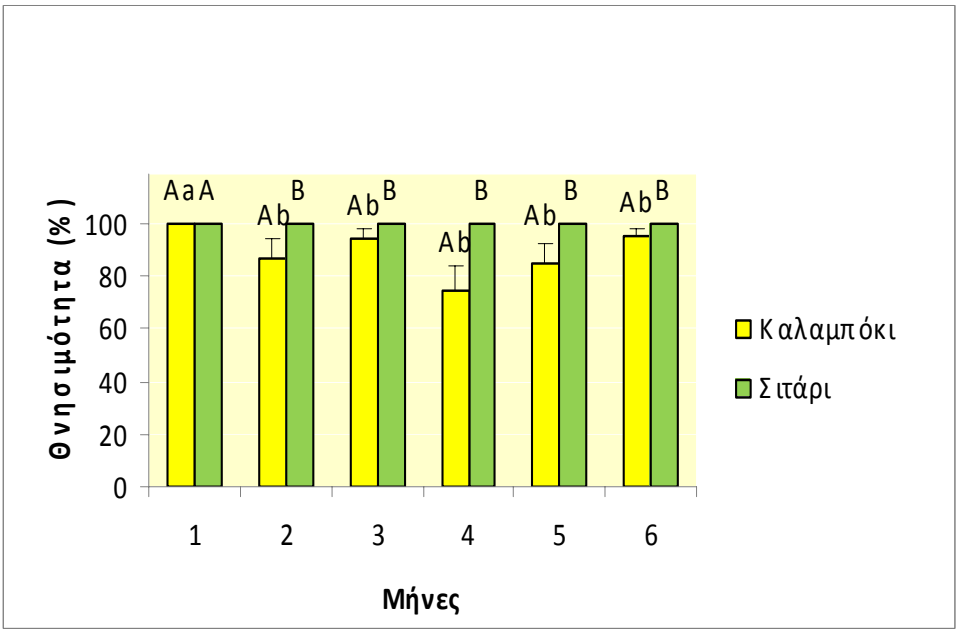


Διάγραμμα 7.1β . Θνησιμότητα του *R. dominica* στις 7 ημέρες στο επίπεδο (δόση) του 1 ppm για το σιτάρι και το καλαμπόκι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

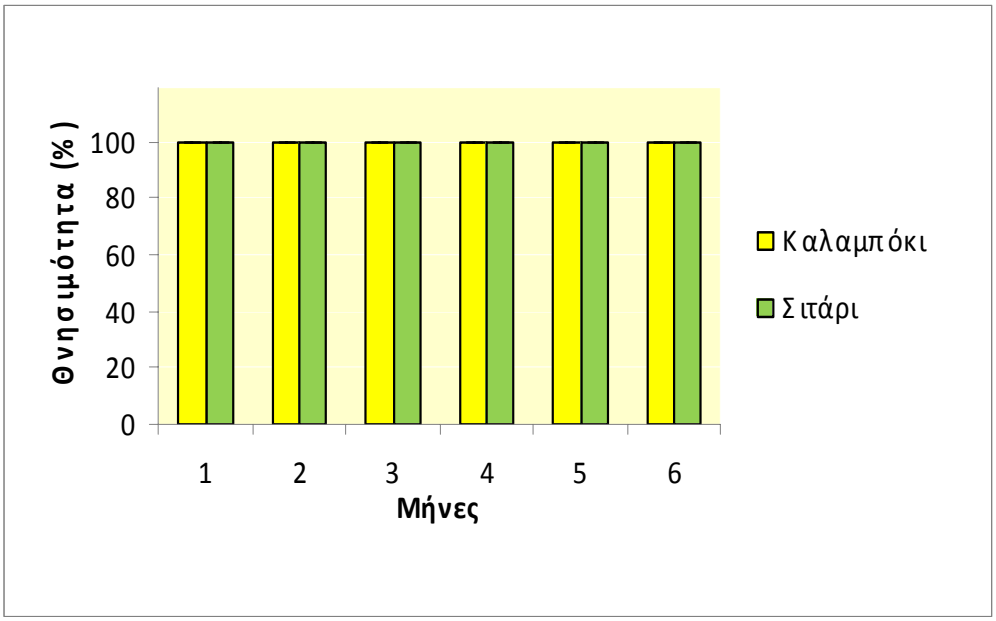


Διάγραμμα 7.1γ. Θνησιμότητα του *R. dominica* στις 7 ημέρες στο επίπεδο (δόση) 10 ppm για το σιτάρι και το καλαμπόκι

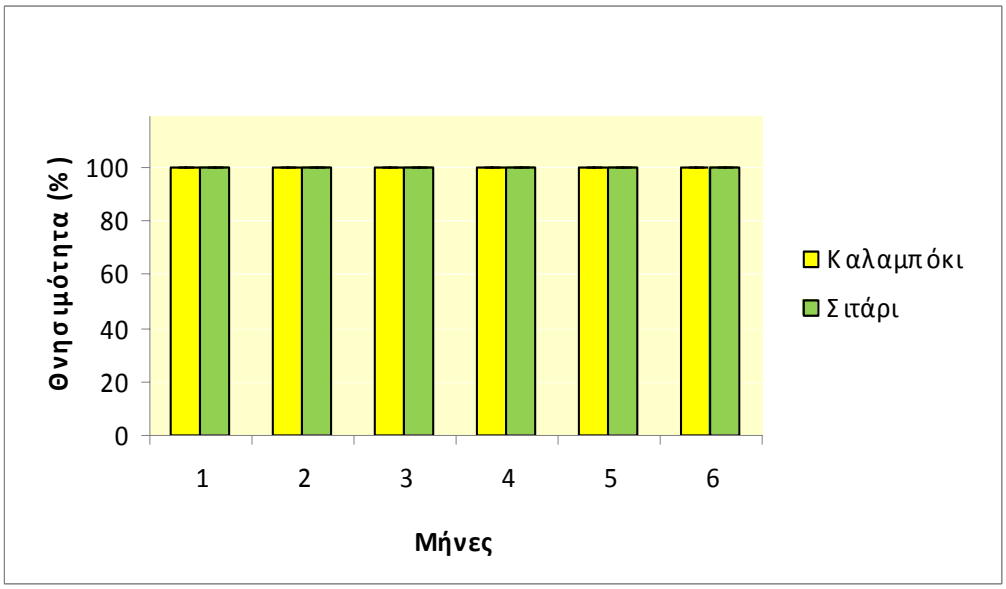


Διάγραμμα 7.1δ. Θνησιμότητα του *R. dominica* στις 14 ημέρες στο επίπεδο (δόση) του 0,1 ppm για το σιτάρι και το καλαμπόκι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87



Διάγραμμα 7.1ε. Θνησιμότητα του *R. dominica* στις 14 ημέρες στο επίπεδο (δόση) του 1 ppm για το σιτάρι και το καλαμπόκι



Διάγραμμα 7.1στ. Θνησιμότητα του *R. dominica* στις 14 ημέρες στο επίπεδο (δόση) 10 ppm για το σιτάρι και το καλαμπόκι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

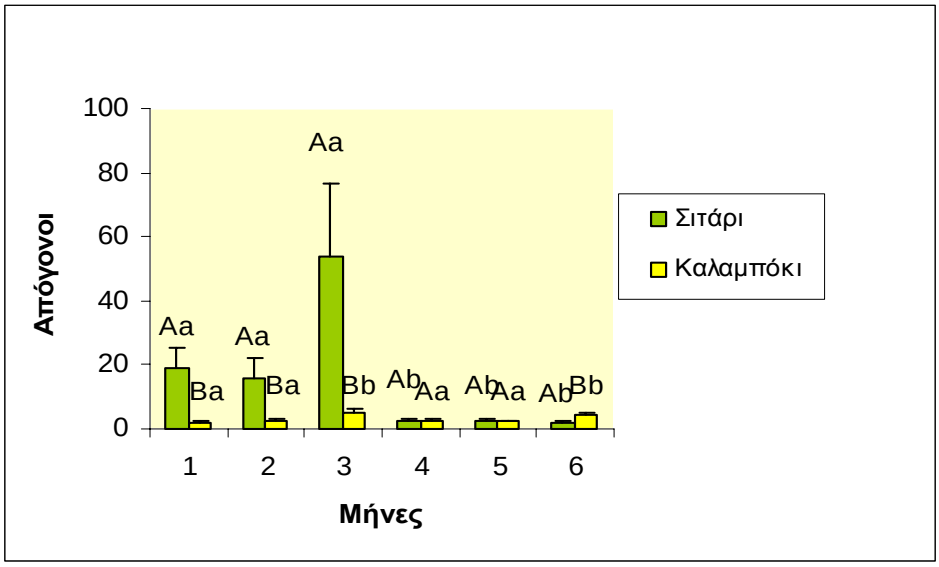
7.2 Απόγονοι του *R. dominica* στις 60 ημέρες.

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι τόσο οι κύριες επιδράσεις, όσο και οι αλληλεπιδράσεις ήταν σημαντικές, στους απογόνους (Πίνακας 7.7). Στους μάρτυρες του σιταριού οι απόγονοι ήταν γενικά περισσότεροι τους τρείς πρώτους μήνες σε σχέση με τους απογόνους που μετρήθηκαν στο καλαμπόκι. Η υψηλότερη τιμή απογόνων στο σιτάρι παρατηρήθηκε τον τρίτο μήνα (με μέσο όρο τα 54 ακμαία /φιαλίδιο). Επιπροσθέτως, τον τέταρτο μήνα παρατηρήθηκε μείωση τον απογόνων στο σιτάρι ενώ στο καλαμπόκι η παραγωγή απογόνων ήταν σταθερή, με τιμές <10 ακμαία/φιαλίδιο σε όλη την διάρκεια του πειράματος (Διάγραμμα 7.1ζ). Στο επίπεδο (δόση) του 0,1 ppm οι απόγονοι στο σιτάρι και στο καλαμπόκι είναι <5 ακμαία /φιαλίδιο κάθε μήνα, με εξαίρεση στο σιτάρι που από τον τέταρτο μήνα και μετά δεν παρατηρήθηκαν απόγονοι (Διάγραμμα 7.1η). Γενικά, δεν καταγράφηκαν απόγονοι στα επίπεδα (δόσεις) των 1 και 10 ppm.

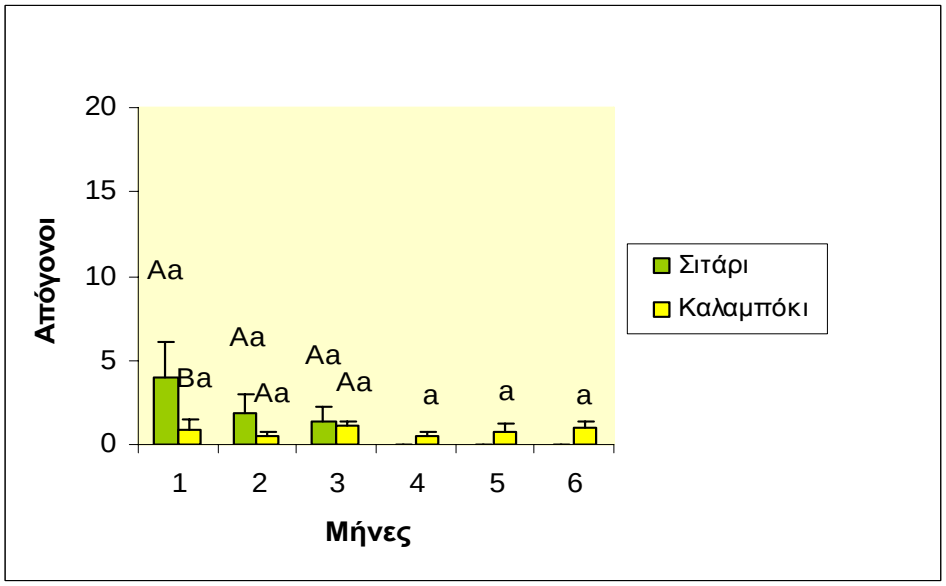
Πίνακας 7.7. Ανάλυση της διασποράς των απογόνων του *R. dominica* (β.ε. συνόλου =575)

Πηγή παραλλακτικότητας	**Βαθμοί ελευθερίας (DF)**	**F**	**P**
Δόση	2	699,8	**<0,0001**
Είδος δημητριακού	1	168,0	**<0,0001**
Δόση Χ Είδος δημητριακού	2	40,7	**<0,0001**
Μήνας	5	4,2	**0,0009**
Δόση Χ Μήνα	10	2,9	**0,0019**
Είδος δημητριακού Χ Μήνα	5	3,5	**0,0040**
Δόση Χ Είδος δημητριακού Χ Μήνα	10	3,5	**0,0002**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87



Διάγραμμα 7.1ζ. Απόγονοι του *R. dominica* στους μάρτυρες



Διάγραμμα 7.1η. Απόγονοι του *R. dominica* στο επίπεδο 0,1 ppm.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

7.3 Θνησιμότητα για το *S. Oryzae*

Στην ανάλυση της διασποράς των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων οι κύριες επιδράσεις ήταν σημαντικές, καθώς και οι περισσότερες αλληλεπιδράσεις .(Πίνακας 7.2) Η ανάλυση έδειξε ότι τόσο οι κύριες επιδράσεις, όσο και οι αλληλεπιδράσεις ήταν σημαντικές και για τις δύο περιόδους έκθεσης (Πίνακας 7.5 και Πίνακας 7.6), με εξαίρεση τις αλληλεπιδράσεις Δόση Χ Μήνα και Είδος δημητριακού Χ Μήνα στις 7 ημέρες (Πίνακας 7.5).

Η θνησιμότητα του *S. oryzae* τον πρώτο μήνα, στο επίπεδο (δόση) 0,1 ppm, στο σιτάρι και στο καλαμπόκι ήταν χαμηλή, με μέσο όρο θνησιμότητας για το σιτάρι και το καλαμπόκι το 10 και 5 %, αντιστοίχως. Τον δεύτερο μήνα όμως παρατηρήθηκε αύξηση στη θνησιμότητα- για παράδειγμα στο σιτάρι ο μέσος όρος της θνησιμότητας ήταν 45%. Παρόλα αυτά, για το καλαμπόκι, τους επόμενους μήνες η θνησιμότητα κυμάνθηκε στα επίπεδα του πρώτου μήνα. Αντιθέτως, στο σιτάρι παρατηρήθηκε μια αύξηση σε σχέση με τον πρώτο μήνα με μέσο όρο θνησιμότητας από 18%-27%. Τον έκτο μήνα καταγράφηκε εκ νέου πτώση της θνησιμότητας στο σιτάρι, ενώ στο καλαμπόκι η θνησιμότητα κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα με τους προηγούμενους μήνες (Διάγραμμα 7.2α). Στο επίπεδο (δόση) του 1 ppm η θνησιμότητα στο σιτάρι καθ όλη την διάρκεια του πειράματος κυμάνθηκε από 62% έως 80% σε αντίθεση με το καλαμπόκι που τον δεύτερο μήνα μόνο παρατηρήθηκε θνησιμότητα 51% (Διάγραμμα 7.2β). Στο επίπεδο (δόση) του 10 ppm η θνησιμότητα στο σιτάρι είναι 100% καθ όλη την διάρκεια του πειράματος. Αντίθετα, στο καλαμπόκι τον πρώτο μήνα η θνησιμότητα είναι 98% και με την πάροδο του χρόνου σταδιακά μειώνεται και τον έκτο μήνα έφτασε στο 84% (Διάγραμμα 7.2γ).

Η θνησιμότητα στο επίπεδο (δόση) του 0,1 ppm στο σιτάρι δεν ξεπέρασε το 60% ενώ στο καλαμπόκι δεν ξεπέρασε το 20%. Παρατηρήθηκε αύξηση της θνησιμότητας στο σιτάρι σε σύγκριση με τις 7 ημέρες (Διάγραμμα 7.2α) αλλά στο καλαμπόκι η όποια αύξηση ήταν μικρή (Διάγραμμα 7.2δ). Στο επίπεδο (δόση) του 1 ppm η θνησιμότητα στο σιτάρι κυμάνθηκε από 78% έως 95%, ενώ στο καλαμπόκι κυμάνθηκε από 38% έως 70% (Διάγραμμα 7.2ε). Στα 10 ppm η θνησιμότητα στο καλαμπόκι έφτασε 100% στις 14 ημέρες (Διάγραμμα 2στ), ενώ στο σιτάρι ήταν ήδη 100% από τις 7 ημέρες (Διάγραμμα 7.2γ).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Πίνακας 7.2. Ανάλυση διασποράς επαναλαμβανομένων μετρήσεων για το είδος *S. oryzae* (β.ε. συνόλου =393)

		S. oryzae	
Πηγή μεταξύ των μεταβλητών	***Β.ε.***	***F***	***P***
Όλες μεταξύ τους	35	54,2	**<,0001**
Τιμή αποκοπής	1	5667,4	**<,0001**
Δόση (επίπεδο)	2	789,0	**<,0001**
Είδος δημητριακού	1	162,0	**<,0001**
Είδος δημητριακού Χ Δόση	2	29,3	**<,0001**
Μήνας	5	5,6	**<,0001**
Δόση Χ Μήνα	10	2,4	**0,0089**
Είδος δημητριακού Χ Μήνα	5	2,7	**0,0222**
Δόση Χ Είδος δημητριακού Χ Μήνα	10	2,7	**0,0028**
Πηγή μεταξύ των μεταβλητών	***Β.ε.***	***F***	***P***
Εντός των μεταβλητών	35	5,4	**<0,0001**
Χρόνος	1	322,8	**<0,0001**
Χρόνος Χ Δόση	2	40,1	**<0,0001**
Χρόνος Χ Είδος δημητριακού	1	1,9	**0,1714**
Χρόνος Χ Δόση Χ Είδος δημητριακού	2	30,2	**<0,0001**
Χρόνος Χ Μήνας	5	1,6	**0,1715**
Χρόνος Χ Δόση Χ Μήνας	10	0,7	**0,6989**
Χρόνος Χ Είδος δημητριακού Χ Μήνας	5	1,4	**0,2300**
Χρόνος Χ Δόση Είδος δημητριακού Χ Μήνας	10	2,3	**0,0120**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

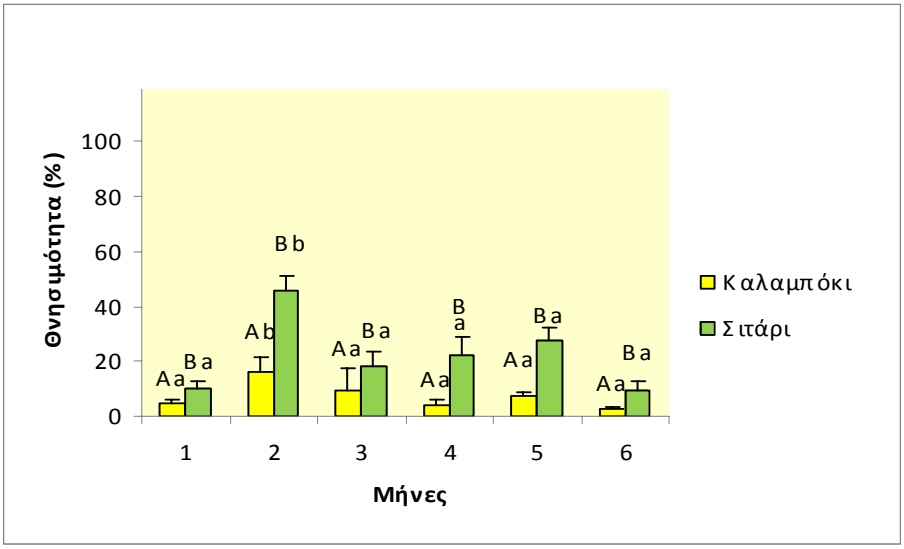
Πίνακας 7.5. Ανάλυση της διασποράς για 7 ημέρες για την θνησιμότητα του *S. oryzae* (β.ε. συνόλου=428)

Πηγή παραλλακτικότητας	**Βαθμοί ελευθερίας (DF)**	**F**	**P**
Δόση	2	688,3	**<0,0001**
Είδος δημητριακού	1	119,5	**<0,0001**
Δόση Χ Είδος δημητριακού	2	19,9	**<0,0001**
Μήνας	5	5,7	**<0,0001**
Δόση Χ Μήνα	10	1,6	**0,0985**
Είδος δημητριακού Χ Μήνα	5	1,6	**0,1493**
Δόση Χ Είδος δημητριακού Χ Μήνα	10	2,0	**0,0298**

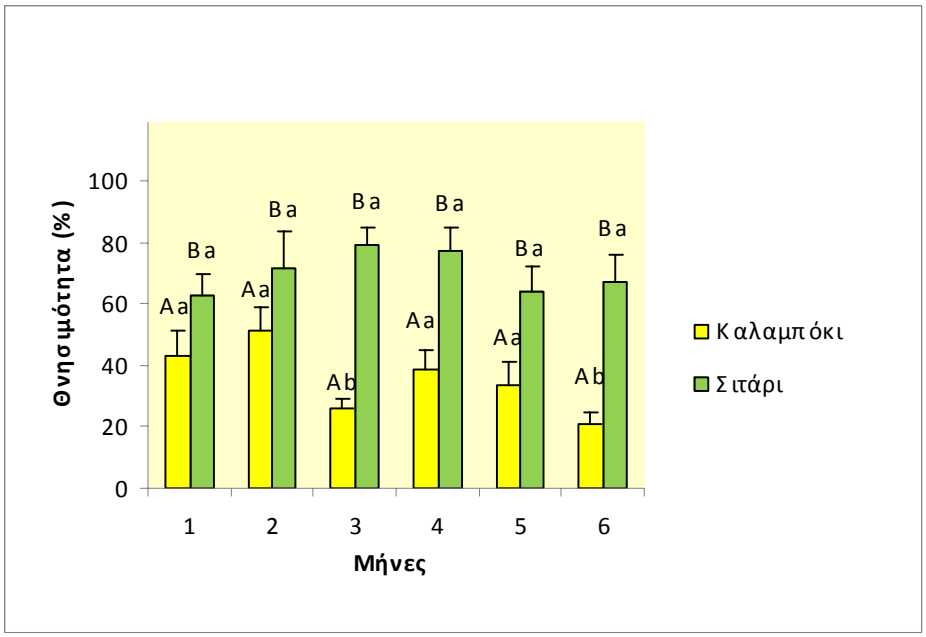
Πίνακας 7.6. Ανάλυση της διασποράς για 14 ημέρες για την θνησιμότητα του *S. oryzae* (β.ε. συνόλου =428)

Πηγή παραλλακτικότητας	**Βαθμοί ελευθερίας (DF)**	**F**	**P**
Δόση	2	699,8	**<0,0001**
Είδος δημητριακού	1	168,0	**<0,0001**
Δόση Χ Είδος δημητριακού	2	40,7	**<0,0001**
Μήνας	5	4,2	**0,0009**
Δόση Χ Μήνα	10	2,9	**0,0019**
Είδος δημητριακού Χ Μήνα	5	3,5	**0,0040**
Δόση Χ Είδος δημητριακού Χ Μήνα	10	3,5	**0,0002**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

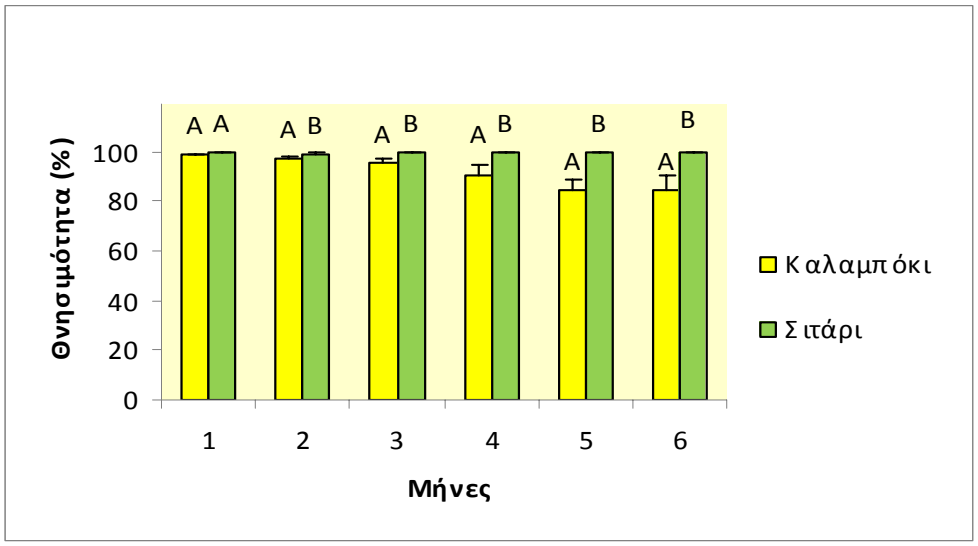


Διάγραμμα 7.2α . Θνησιμότητα του *S. oryzae* στις 7 ημέρες στο επίπεδο (δόση) του 0,1 ppm για το σιτάρι και το καλαμπόκι.

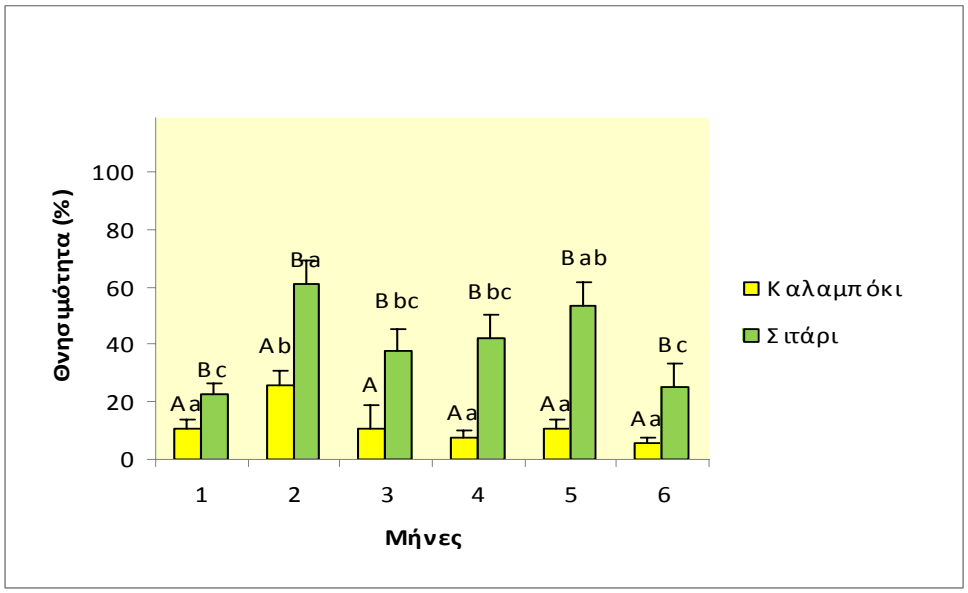


Διάγραμμα 7.2β . Θνησιμότητα του *S. oryzae* στις 7 ημέρες στο επίπεδο (δόση) του 1 ppm για το σιτάρι και το καλαμπόκι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

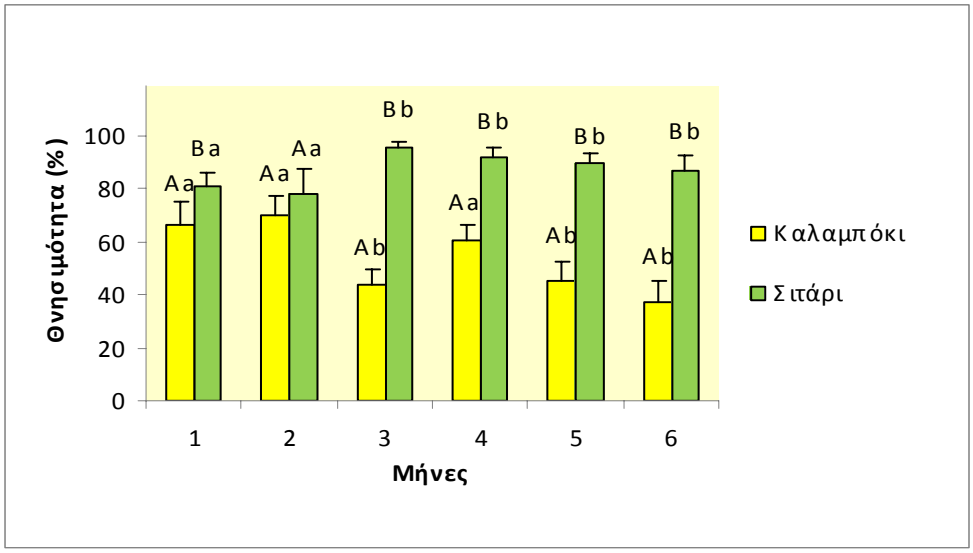


Διάγραμμα 7.2γ . Θνησιμότητα του *S. oryzae* στις 7 ημέρες στα 10 ppm για το σιτάρι και το καλαμπόκι

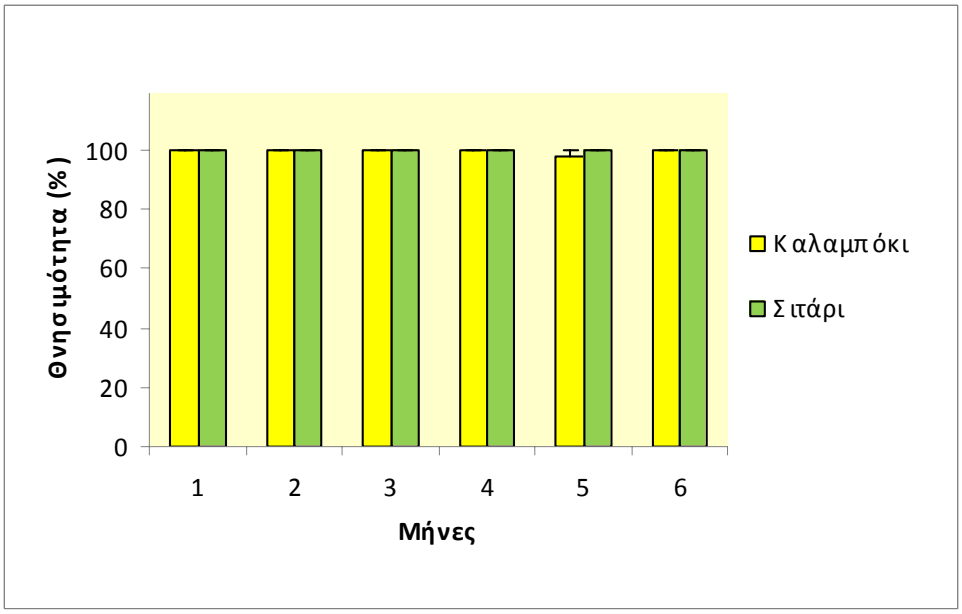


Διάγραμμα 7.2δ . Θνησιμότητα του *S. oryzae* στις 14 ημέρες στο επίπεδο (δόση) του 0,1 ppm για το σιτάρι και το καλαμπόκι.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87



Διάγραμμα 7.2ε. Θνησιμότητα του *S. oryzae* στις 14 ημέρες στο επίπεδο (δόση) του 1 ppm για το σιτάρι και το καλαμπόκι



Διάγραμμα 7.2στ . Θνησιμότητα του *S. oryzae* στις 14 ημέρες στα 10 ppm για το σιτάρι και το καλαμπόκι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

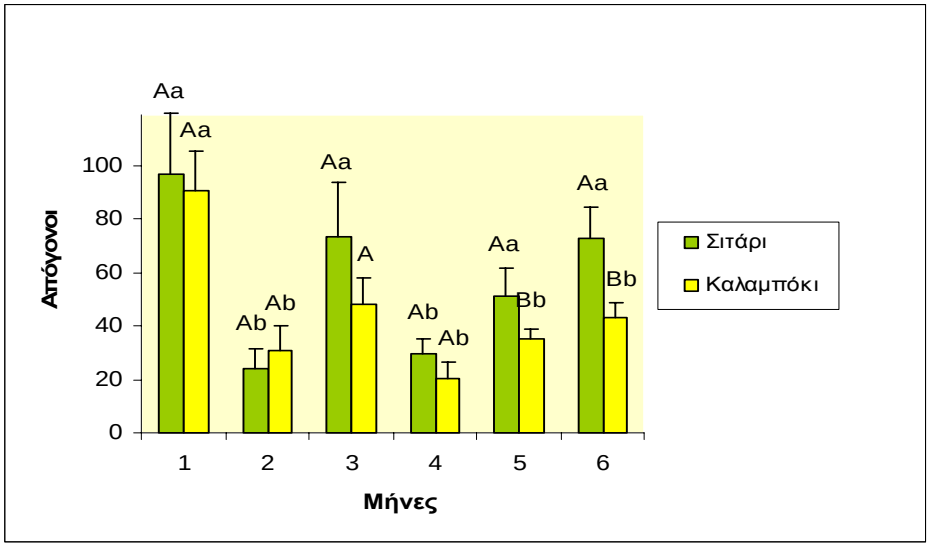
7.4 Απόγονοι του *S. oryzae* στις 60 ημέρες.

Η ανάλυση έδειξε ότι οι κύριες επιδράσεις και οι περισσότερες αλληλεπιδράσεις ήταν σημαντικές, στους απογόνους (Πίνακας 7.8). Στο σιτάρι και στο καλαμπόκι, παρατηρήθηκαν υψηλοί αριθμοί απογόνων του *S. oryzae* στους μάρτυρες τον πρώτο μήνα, με μέσο όρο 97 και 90 ακμαία /φιαλίδιο αντίστοιχα. Ο αριθμός των απογόνων στο σιτάρι ήταν γενικά μεγαλύτερος σε σχέση με το καλαμπόκι με εξαίρεση τον δεύτερο μήνα που ο αριθμός των απογόνων στο καλαμπόκι ήταν μεγαλύτερος. Τον τρίτο μήνα παρατηρήθηκε αύξηση των απογόνων, αλλά, στις περισσότερες περιπτώσεις, οι απόγονοι ήσαν περισσότεροι νωρίς την περίοδο (Διάγραμμα 7.2ζ). Στη δόση του 0,1 ppm οι απόγονοι στο καλαμπόκι ήταν περισσότεροι σε σχέση με το σιτάρι και αυτό οφείλεται στο ότι στο σιτάρι η θνησιμότητα ήταν μεγαλύτερη σε σύγκριση με το καλαμπόκι (Διάγραμμα 7.2δ). Τον πρώτο μήνα σημειώθηκε υψηλός αριθμός απογόνων σε σχέση με τους υπόλοιπους μήνες (Διάγραμμα 7.2η). Στη δόση του 1 ppm ο αριθμός των απογόνων κυμάνθηκε σε χαμηλές τιμές και στα δύο δημητριακά. Ειδικότερα, στο σιτάρι, δεν σημειώθηκαν τιμές > 20 ακμαία /φιαλίδιο με εξαίρεση τον πρώτο μήνα (μέσος όρος 45 ακμαία /φιαλίδιο). Στο καλαμπόκι τους 2 πρώτους μήνες σημειώθηκε υψηλός αριθμός απογόνων (μέσος όρος 45 ακμαία /φιαλίδιο) ενώ τους επόμενους μήνες παρατηρήθηκαν χαμηλές τιμές (μέσος όρος 20 ακμαία /φιαλίδιο) (Διάγραμμα 7.2θ). Στα 10 ppm δεν καταγράφηκαν απόγονοι, πιθανότατα λόγω της υψηλής θνησιμότητας

Πίνακας 7.8. Ανάλυση της διασποράς των απογόνων του *S. oryzae* (β.ε. συνόλου =575)

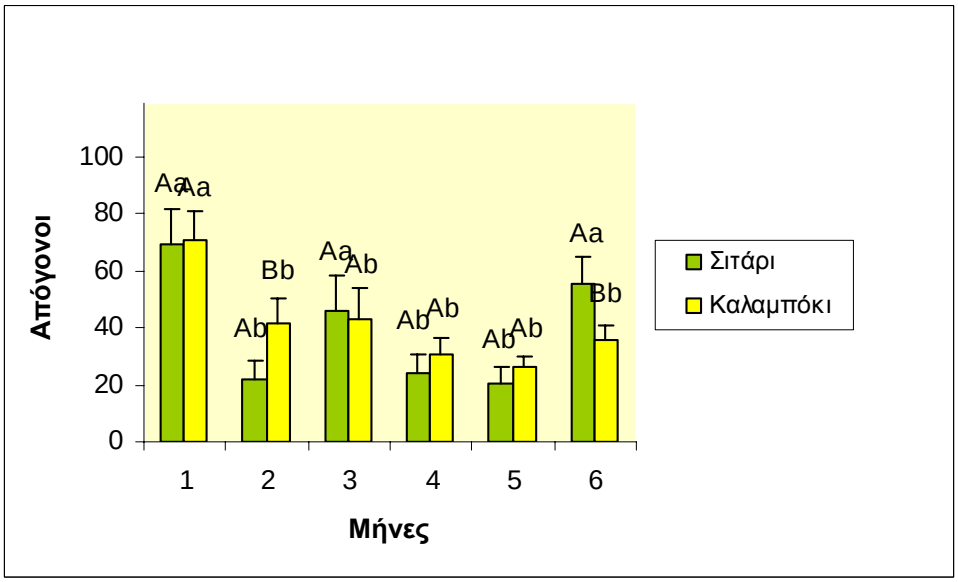
Πηγή παραλλακτικότητας	**Βαθμοί ελευθερίας (DF)**	**F**	**P**
Δόση (επίπεδο)	3	85,0	**<0,0001**
Είδος δημητριακού	1	0,2	**0,6822**
Δόση Χ Είδος δημητριακού	3	4,2	**0,0057**
Μήνας	5	21,1	**<0,0001**
Δόση Χ Μήνα	15	4,6	**<0,0001**
Είδος δημητριακού Χ Μήνα	5	1,8	**0,1182**
Δόση Χ Είδος δημητριακού Χ Μήνα	15	0,4	**0,9892**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87



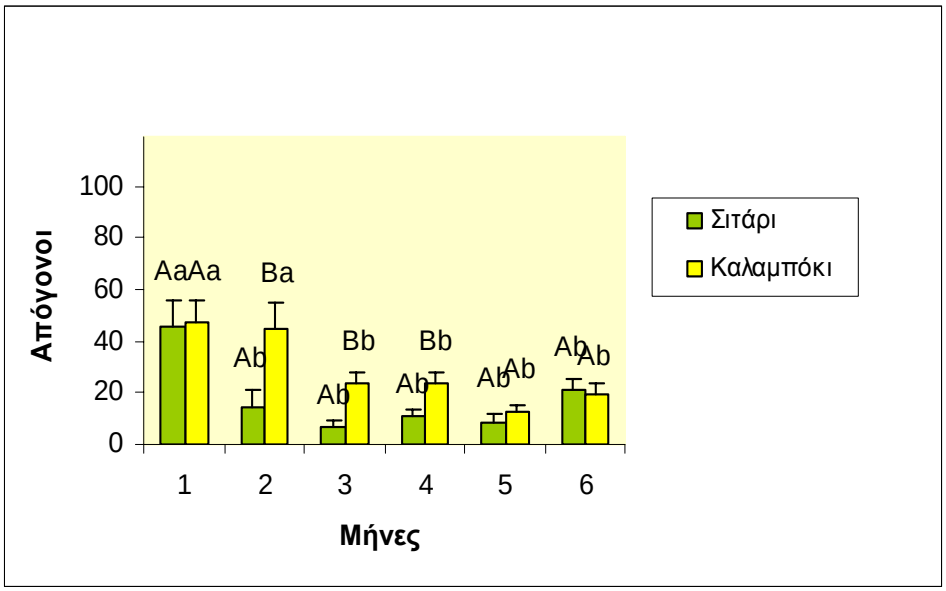
Διάγραμμα 7.2ζ. Απόγονοι του *S. oryzae* στους μάρτυρες

.



Διάγραμμα 7.2η. Απόγονοι του *S. oryzae* στο επίπεδο (δόση) του 0,1 ppm

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87



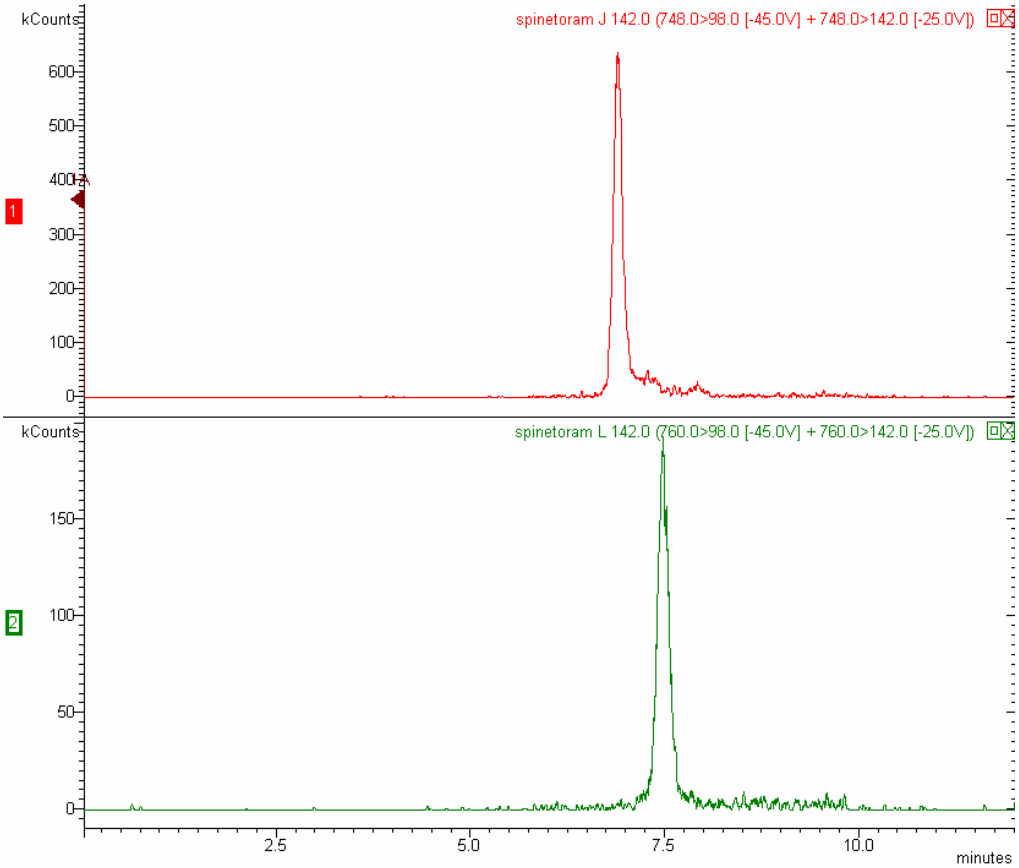
Διάγραμμα 7.2θ. Απόγονοι του *S. oryzae* στο επίπεδο (δόση) του 1 ppm

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

7.5 Προσδιορισμός υπολειμμάτων spinetoram

7.5.1 Χρωματογραφήματα – Χρόνοι κατακράτησης.

Η ανάλυση των δύο ισομερών του spinetoram , του J και του L επιτυγχάνεται με υγρή χρωματογραφία σε αντίστροφη φάση. Η ανίχνευση της κορυφής είναι πολύ πιο ευαίσθητη σε σύστημα LC-MS σε σχέση με την ανίχνευση σε σύστημα HPLC-UV. Έτσι , τα παρακάτω χρωματογραφήματα παρουσιάζουν τον καλό διαχωρισμό των δύο ισομερών του spinetoram σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας και την υψηλή ευαισθησία της ανίχνευσης με φασματομετρία μαζών χρησιμοποιώντας τις μεταπτώσεις 748 > 42 για την ποστικοποίηση και 748>98 για την ταυτοποίηση.

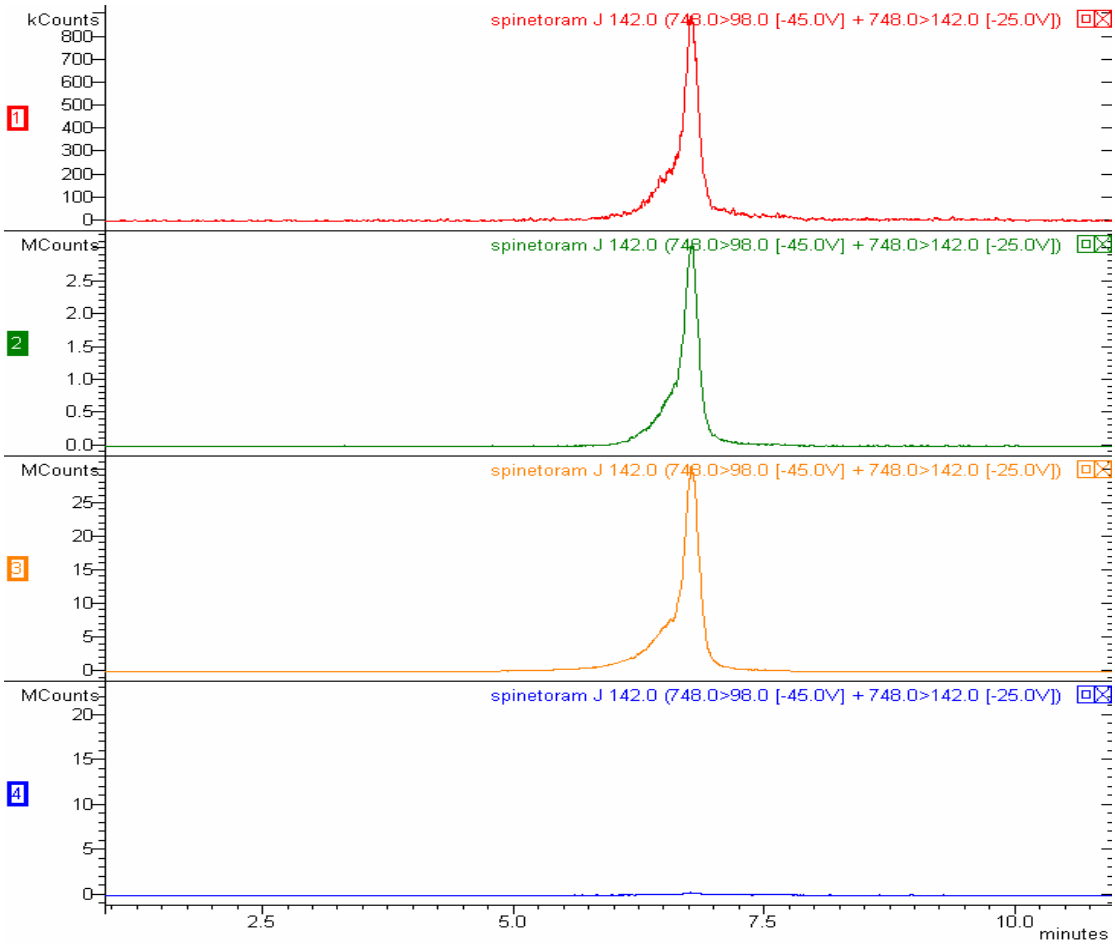


Χρωματογράφημα προτύπου δ/τος spinetoram που αντιστοιχεί σε συγκέντρωσης 0,02 mg/kg σε υπόστρωμα καλαμποκιού σε σύστημα LC-MS

Αναλύτης	Ψευδομο-ριακό Ιόν	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης		Μετάπτωση Ταυτοποίησης		Χρόνος κατακρά-τησης
Spinetoram J	[M+H]+	*748*	*142*	*748*	*98*	6.8
Spinetoram L	[M+H]+	*760*	*142*	*760*	*98*	7.4

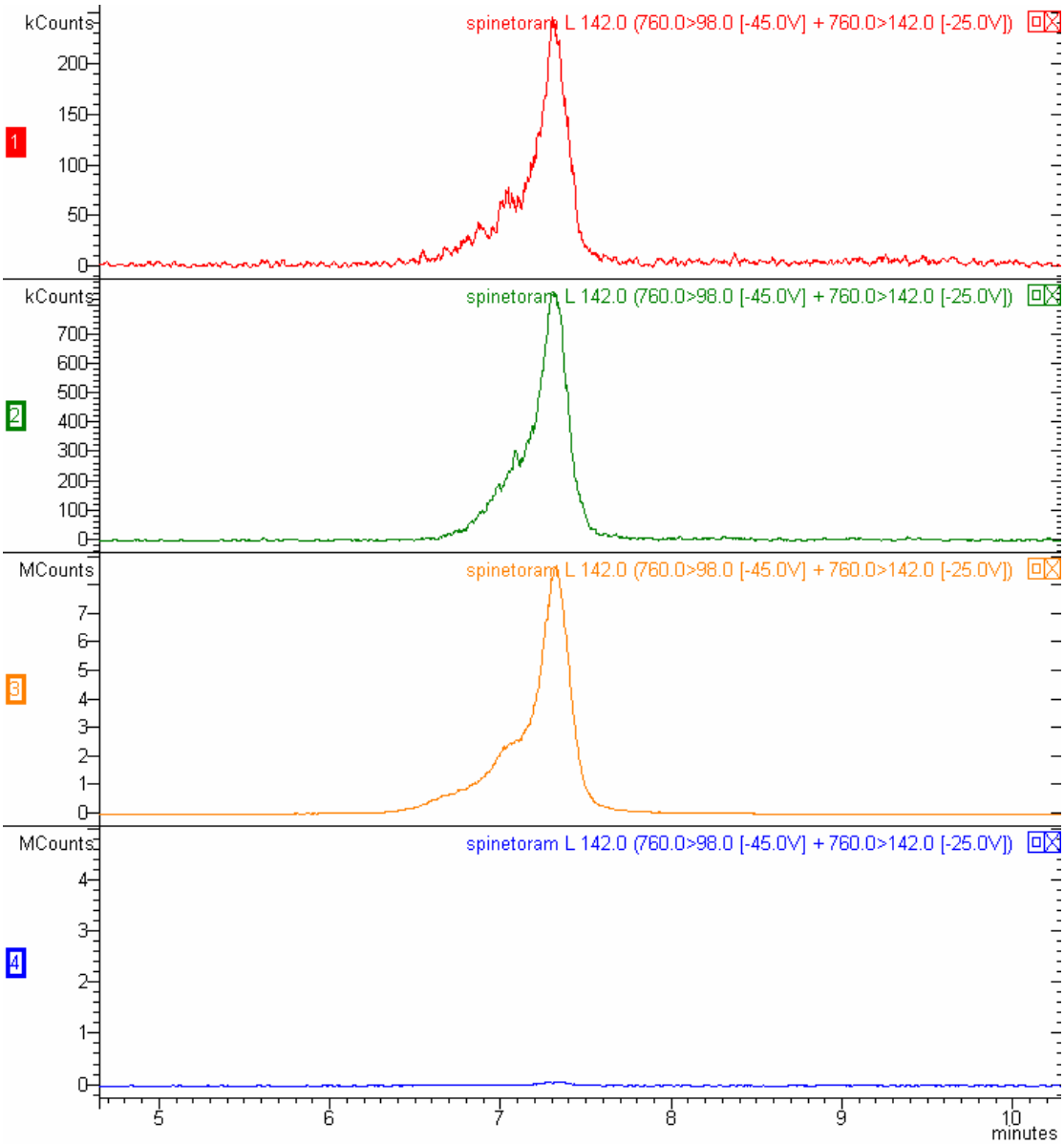
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Στα επόμενα δύο χρωματογραφήματα παρουσιάζονται οι κορυφές των ισομερών J και L σε πρότυπα διαλύματα spinetoram που αντιστοιχούν σε διάφορα επίπεδα συγκεντρώσεων του εμβολιασμένου ιστού (καλαμπόκι) τόσο στο χαμηλότερο όσο και σε υψηλότερα επίπεδα. Παρατηρούμε τη δυνατότητα προ0σδιορισμού των ισομερών στο χαμηλότερο επίπεδο των 0,02 mg/Kg καθώς και την απουσία οποιουδήποτε σήματος στον αντίστοιχο χρόνο κατακράτησης των δύο ισομερών κορυφών του spinetoram.



Χρωματογραφήματα προτύπων δ/των spinetoram J που αντιστοιχούν σε συγκέντρωση 0,02 (1) - 0,1 (2) και 0,2 mg/kg (3) σε υπόστρωμα καλαμπόκι και χρωματογράφημα εκχυλίσματος μάρτυρα καλαμπόκι (4).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87



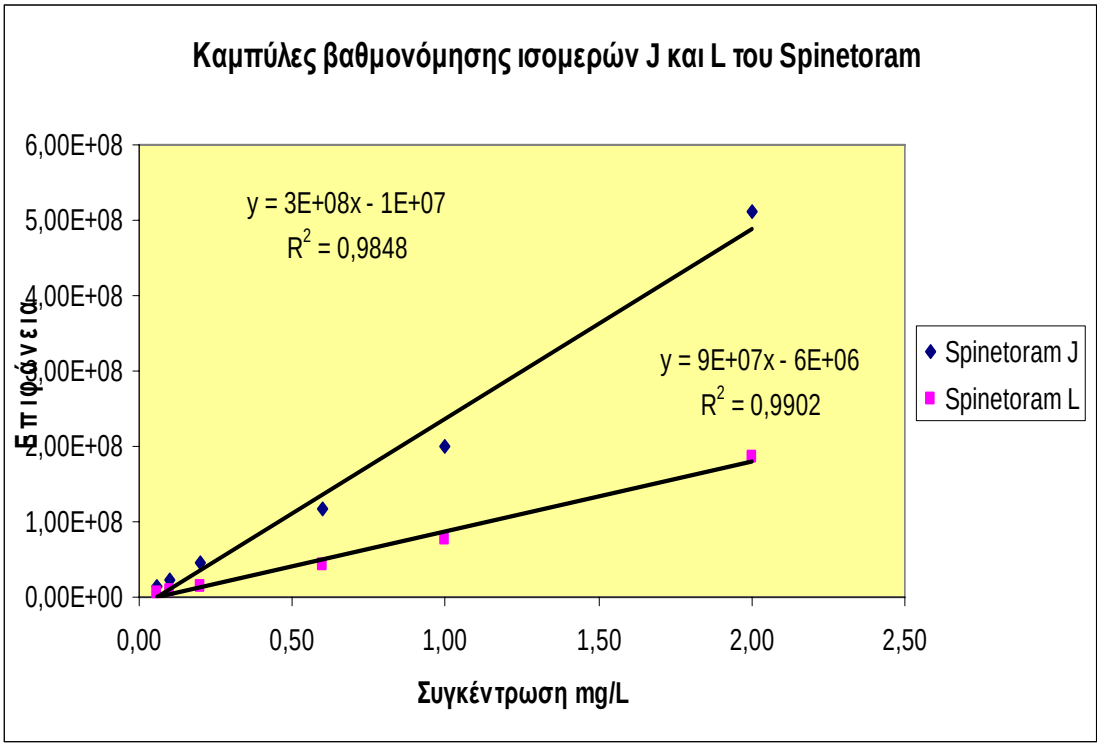
Χρωματογραφήματα προτύπων δ/των spinetoram L που αντιστοιχούν σε συγκέντρωση 0,02 (1) - 0,1 (2) και 0,2 mg/kg (3) σε υπόστρωμα καλαμπόκι και χρωματογράφημα εκχυλίσματος μάρτυρα καλαμπόκι (4).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

7.5.2 Καμπύλη αναφοράς – Ποσοτικός προσδιορισμός

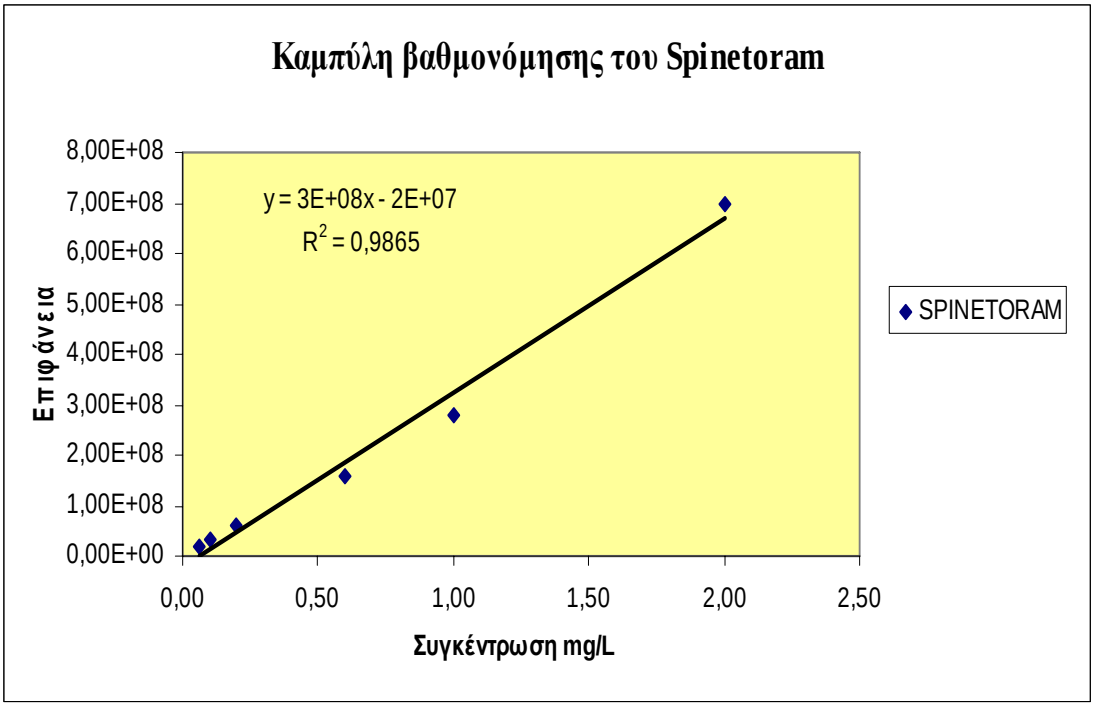
Η ποσοτικοποίηση του χρωματογραφικού σήματος έγινε με την τεχνική του εξωτερικού προτύπου με βάση την καμπύλη αναφοράς που παράχθηκε από τις εγχύσεις πρότυπων διαλυμάτων αναφοράς spinetoram. Ως απόκριση της δραστικής ουσίας θεωρήθηκε το άθροισμα των επιφανειών των κορυφών των δύο ισομερών J και L και έτσι προέκυψε η καμπύλη αναφοράς για το spinetoram με βάση την οποία έγινε η ποσοτική εκτίμηση των υπολειμμάτων του spinetoram στα δείγματα δημητριακών των πειραμάτων μας.

Στο Διάγραμμα 7.5α παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς για το κάθ ισομερές ξεχωριστά, ενώ στο Διάγραμμα 7.5β παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς καθώς και τα χαρακτηριστικά της (εξίσωση ευθείας και συντελεστής προσδιορισμού R^2) συνολικά για το spinetoram ως άθροισμα των δύο ισομερών.



Διάγραμμα 7.5α Καμύλες βαθμονόμησης ισομερών J και L του spinetoram.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87



Διάγραμμα 7.5β Καμπύλη βαθμονόμησης του spinetoram ως άθροισμα των δύο ισομερών.

7.5.3 Πειράματα ανάκτησης

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης που πραγματοποιήθηκαν με εμβολιασμούς των δύο υποστρωμάτων της μελέτης (καλαμπόκι και σιτάρι) σε τρία επίπεδα και με πέντε επαναλήψεις ανά επίπεδο εμβολιασμού προέκυψαν τιμές ανάκτησης που κυμαίνονται από 40 έως 60% για το καλαμπόκι και από 53 έως 111% για το σιτάρι, ενώ οι τιμές της Σχετικής Τυπικής Απόκλισης βρέθηκαν μικρότερες από 11,5 και 10,5 για το καλαμπόκι και το σιτάρι, αντίστοιχα (Πίνακας 7.9). Για το σιτάρι οι τιμές ανάκτησης συνοδευόμενες από τις πολύ καλές τιμές επαναληψιμότητας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος που ακολουθήσαμε μπορεί να προσδιορίσει με ορθότητα και ακρίβεια τα υπολείμματα του spinetoram στο υπόστρωμα αυτό. Για το καλαμπόκι θεωρούνται ικανοποιητικές μόνο οι τιμές της επαναληψιμότητας , ενώ οι τιμές της ανάκτησης είναι πολύ χαμηλές κάτι που υποδηλώνει ότι χρειάζεται μια ενίσχυση της διαδικασίας της εκχύλισης των υπολειμμάτων από το υπόστρωμα αυτό. Όμως , λαμβάνωντας υπόψη αφενός το είδος της μελέτης μας (σχετική σύγκριση των υπολειμμάτων του spinetoram σε διαφορετικούς χρόνους) καθώς και την πολύ καλή επεναληψιμότητα μπορούμε στο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

σημείο αυτό να αποδεχθούμε και να χρησιμοποιήσουμε την ίδια μεθοδολογίακαι στο καλαμπόκι για την εκτίμηση της πορείας των υπολειμμάτων του spinetoram.

Πίνακας 7.9 : Ανακτήσεις του spinetoram ως άθροισμα των δύο ισομερών καθώς και του spinetoram J και του spinetoram L σε τρία επίπεδα εμβολιασμού των υποστρωμάτων της μελέτης . Παρουσιάζονται η μέση τιμή των ανακτήσεων και η Σχετική Τυπική Απόκλιση για πέντε επαναλήψεις σε κάθε επίπεδο.

Ουσία	**Επίπεδο Φόρτισης mg / kg**	**n**	**Καλαμπόκι**		**Σιτάρι**	
			Ανάκτηση (%)	**ΣΤΑ**	**Ανάκτηση (%)**	**ΣΤΑ**
Spinetoram	**0.02**	**5**	60,9	13,0	69,4	6,6
	0.1	**5**	52,7	5,7	52,9	6,6
	1.0	**5**	39,9	7,4	86,1	0,6
Spinetoram J	**0.02**	**5**	62,4	11,5	58,4	3,8
	0.1	**5**	55,8	12,9	55,8	10,5
	1.0	**5**	42,4	12,9	77,9	0,7
Spinetoram L	**0.02**	**5**	56,8	10,4	104,7	6,7
	0.1	**5**	52,3	6,5	73,7	2,9
	1.0	5	39,3	9,9	110,6	2,2

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

7.5.4 Αποτελέσματα υπολειμματικότητας σε καλαμπόκι και σε σιτάρι

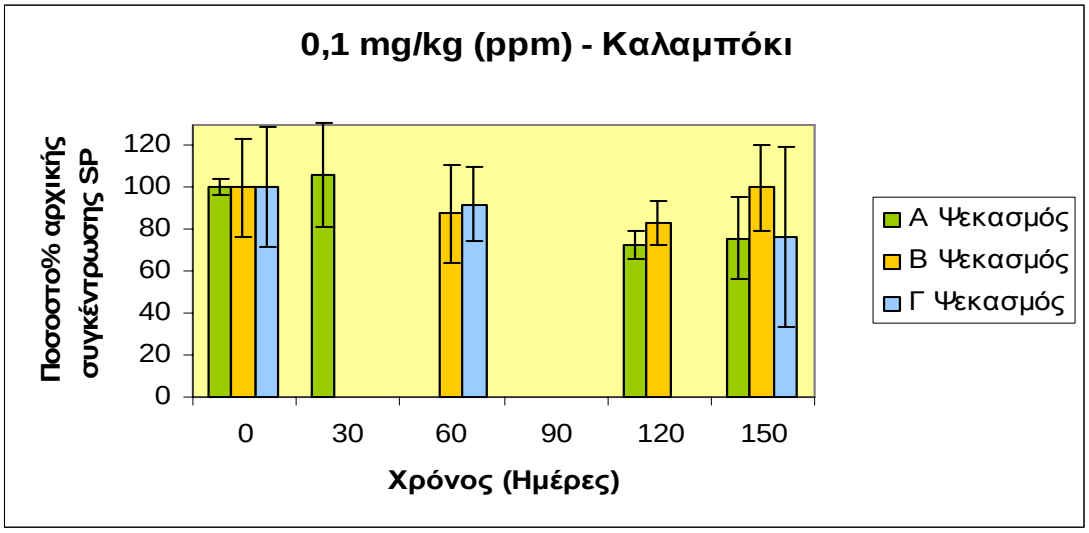
Στα Διαγράμματα 7.5 γ-στ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σχετικά με την πορεία των υπολειμμάτων του spinetoram αμέσως μετά το ψεκασμό (0 ημέρες) και σε τακτά χρονικά διαστήματα μετά το ψεκασμό των ποσοτήτων σπόρων της μελέτης μας με το σκεύασμα του spinetoram σε δύο διαφορετικά επίπεδα , αυτό του 0,1 mg/kg και σε αυτό του 1,0 mg/Kg. τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως % μεταβολή επί της αρχικής συγκέντρωσης που θεωρήθηκε η χρωματογραφική απόκριση κατά την ημέρα του ψεκασμού (ημέρα).

Στον Πίνακα 7.10 παρουσιάζονται οι τιμές των υπολειμμάτων του spinetoram σε mg/Kg που μετρήθηκαν σε ψεκασμένο και σιτάρι αμέσως μετά το ψεκασμό με το σκεύασμα (ημέρα μηδέν) και χαρακτηρίζονται ως αρχικές συγκεντρώσεις.

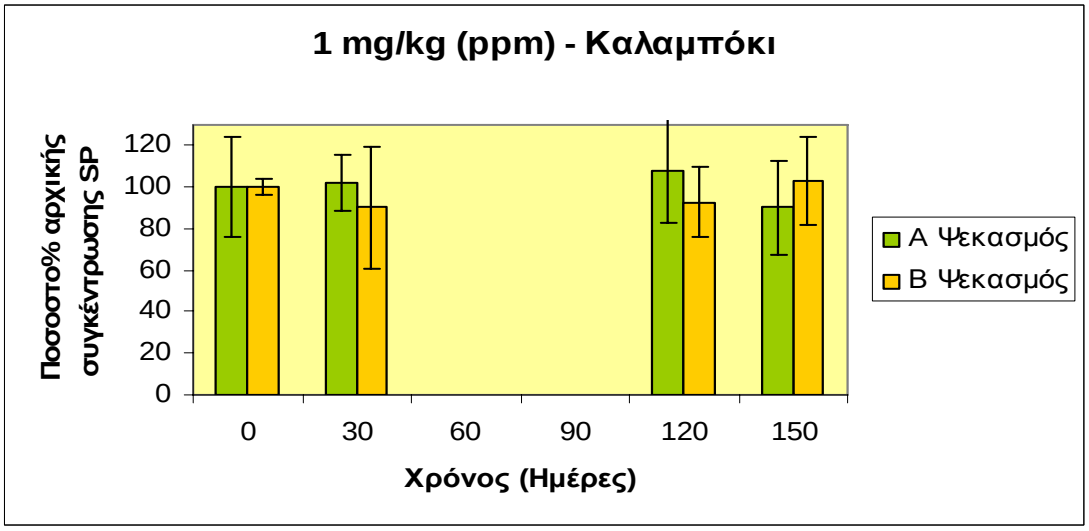
Πίνακας 7.10 : Αρχικές συγκεντρώσεις (μ.ο ± SD) υπολειμμάτων spinetoram στο καλαμπόκι και στο σιτάρι μετά από τους ψεκασμούς σε διάφορα επίπεδα-δόσεις (0,1 και 1 mg/kg)

	Ημέρες	**Επίπεδο Ψεκασμού 0,1 mg/kg (ppm)**		**Επίπεδο Ψεκασμού1 mg/kg (ppm)**	
		Σιτάρι	Καλαμπόκι	Σιτάρι	Καλαμπόκι
Α	0	0,061 ± 0,005	0,033 ± 0,0044	0,744 ±0,151	0,265 ± 0,064
Β	0	0,088 ± 0,017	0,024 ± 0,006	0,549 ± 0,116	0,237 ± 0,009
Γ	0	0,085 ± 0,014	0,038 ± 0,015	0,624 ± 0,014	

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

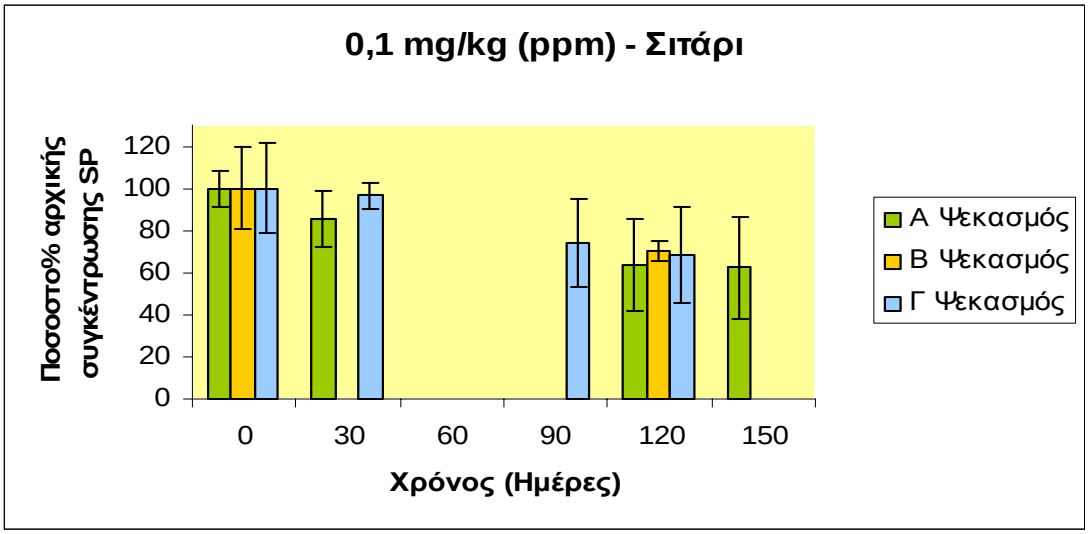


Διάγραμμα 7.5γ Εξέλιξη των συγκεντρώσεων του spinetoram στο καλαμπόκι που ψεκάστηκε σε επίπεδο 0,1 mg/kg. Τα αποτελέσματα αφορούν τις επαναλήψεις ψεκασμού Α, Β, Γ. Κάθε σημείο απεικονίζει το μέσο όρο τριών μετρήσεων-επαναλήψεων και τη σχετική τυπική απόκλιση

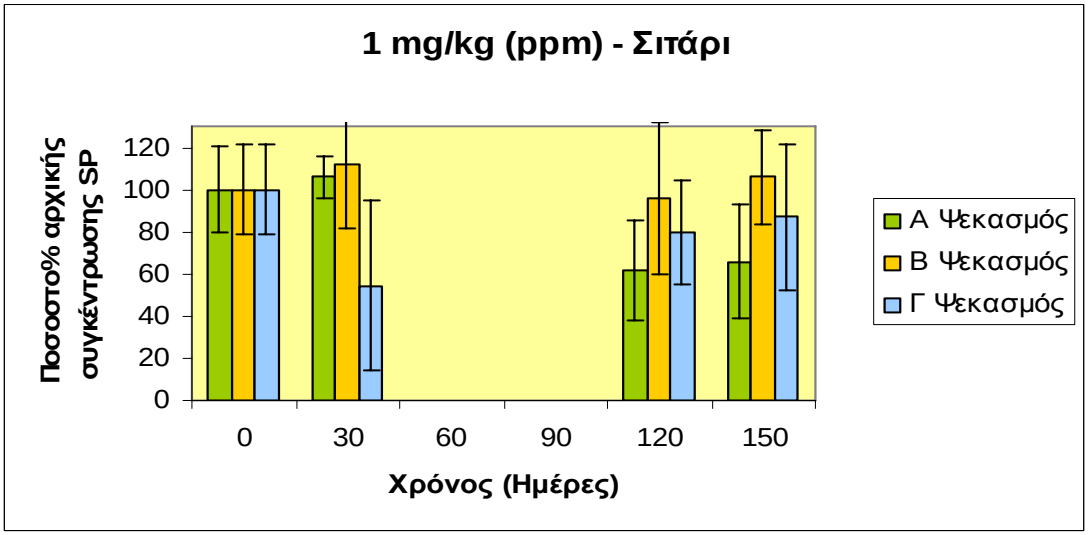


Διάγραμμα 7.5δ Εξέλιξη των συγκεντρώσεων του spinetoram στο καλαμπόκι που ψεκάστηκε σε επίπεδο 1 mg/kg. Τα αποτελέσματα αφορούν τις επαναλήψεις ψεκασμού Α και Γ. Κάθε σημείο απεικονίζει το μέσο όρο τριών μετρήσεων-επαναλήψεων και τη σχετική τυπική απόκλιση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87



Διάγραμμα 7.5ε Εξέλιξη των συγκεντρώσεων του spinetoram στο σιτάρι που ψεκάστηκε σε επίπεδο 0,1 mg/kg. Τα αποτελέσματα αφορούν τις επαναλήψεις ψεκασμού Α, Β, Γ. Κάθε σημείο απεικονίζει το μέσο όρο τριών μετρήσεων-επαναλήψεων και τη σχετική τυπική απόκλιση



Διάγραμμα 7.5στ Εξέλιξη των συγκεντρώσεων του spinetoram στο σιτάρι που ψεκάστηκε σε επίπεδο 1 mg/kg. Τα αποτελέσματα αφορούν τις επαναλήψεις ψεκασμού Α, Β, Γ. Κάθε σημείο απεικονίζει το μέσο όρο τριών μετρήσεων-επαναλήψεων και τη σχετική τυπική απόκλιση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 - Συζήτηση – Συμπεράσματα.

Με βάση την κριτική επισκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας, η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη πειραματική εργασία για την αποτελεσματικότητα του spinetoram κατά εντόμων αποθηκευμένων δημητριακών. Επιπροσθέτως, δεν έχει αναφερθεί έως σήμερα μια μέθοδος ανίχνευσης και προσδιορισμού στα ενδιαιτήματα αυτά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το spinetoram θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την αντιμετώπιση κολεοπτέρων που προσβάλλουν τα αποθηκευμένα δημητριακά, όπως το *S. oryzae* και το *R. dominica.* Ακόμα, το spinetoram παραμένει σχετικά σταθερό για μεγάλο χρονικό διάστημα, τόσο στο σιτάρι όσο και στο καλαμπόκι, γεγονός που το καθιστά ένα ελπιδοφόρο εντομοκτόνο για την προστασία των σπόρων.

Οι Hertein et al. (2011) αναφέρουν ότι έχουν κατά καιρούς παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα διάφορα διαθέσιμα σκευάσματα του spinosad, ακόμα και κάτω από παρόμοιες συνθήκες. Για παράδειγμα, η σκόνη spinosad ήταν λιγότερο αποτελεσματική κατά του *S. oryzae* σε σιτάρι και ρύζι, σε σχέση με το υγρό spinosad, παρόλο που οι διαφορές ήσαν μικρές για το *R. dominica* (Athanassiou et al. 2008, Subramanyam et al. 2008). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα σκεύασμα βρέξιμης σκόνης spinetoram το οποίο μπορεί να διαφέρει σε αποτελεσματικότητα από το υγρό (π.χ. σε μορφή EC). Η διαφορά αυτή, όπως άλλωστε και στην περίπτωση του spinosad, είναι εμφανής στην περίπτωση του *S. oryzae* (Fang et al. 2002, Hertein et al. 2011). Αντιθέτως, για το *R. dominica* το spinetoram ήταν λίαν αποτελεσματικό, ακόμα και στη χαμηλότερη δόση. Γενικά, οι σπινοσύνες θεωρούνται πολύ αποτελεσματικές για τα Bostrychidae αποθηκών, όπως το *R. dominica* και το *Prostephanus truncatus* (Horn), σε δόσεις ιδιαίτερα χαμηλές, που συνήθως δεν αρκούν για να ελέγξουν άλλα είδη. Ως προς τη σύγκριση του spinetoram με το spinosad, με βάση τα δεδομένα της παρούσας μελέτης και πρότερες δημοσιευμένες μελέτες για το spinosad, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι παρέχουν παρόμοια επίπεδα προστασίας και για τα δύο είδη, τουλάχιστον στη μορφή σκευάσματος WG. Όμως, θα πρέπει να τονιστεί ότι στην περίπτωση του *R. dominica*, το spinetoram φαίνεται να είναι ελαφρώς πιο αποτελεσματικό από το spinosad, δοθέντος του ότι η θνησιμότητα ήταν υψηλή ακόμα και στο επίπεδο (δόση) 0,1 ppm (mg/kg). Πάντως, από πρακτικής απόψεως, θα πρέπει να τονιστεί ότι οι δόσεις που

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

είναι αποτελεσματικές για το spinetoram θα πρέπει να κυμαίνονται περί το 1 ppm (mg/kg), όπως και στην περίπτωση του spinosad.

Παρατηρήθηκαν σαφείς διαφορές στη δράση του spinetoram ανάμεσα στα δύο δημητριακά που αξιολογήθηκαν. Έτσι, στο καλαμπόκι, το spinetoram ήταν λιγότερο αποτελεσματικό από ότι στο σιτάρι, ακόμα και στην περίπτωση του *R. dominica,* καθ΄ όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου. Εκτός από τη θνησιμότητα, η παραγωγή απογόνων ήταν μεγαλύτερη στο καλαμπόκι. Αυτό μπορεί, τουλάχιστον μερικώς, να αποδοθεί στο μεγαλύτερο βαθμό επιβίωσης των εκτεθέντων ακμαίων στο καλαμπόκι, τόσο στις 7 όσο και στις 14 ημέρες, γεγονός που συνδέεται με μεγαλύτερο ωοπαραγωγικό δυναμικό. Μειωμένη αποτελεσματικότητα στο καλαμπόκι, σε σύγκριση με άλλα δημητριακά, έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση άλλων προστατευτικών εντομοκτόνων. Για παράδειγμα, οι Athanassiou et al. (2003) αναφέρουν ότι η γη διατόμων ήταν λιγότερο αποτελεσματική στο καλαμπόκι από ότι στο κριθάρι, και αποδίδουν το γεγονός αυτό σε πιθανή «αδρανοποίηση» της γης διατόμων από τα λιπίδια του σπόρου. Οι Hertein et al. (2011) αναφέρουν το ίδιο και στην περίπτωση του spinosad, δίνοντας αντίστοιχα και παρόμοια εξήγηση. Παρόλα αυτά, εκτός από τις αλληλεπιδράσεις του spinosad ή του spinetoram με το εξωτερικό μέρος του σπόρου, είναι πιθανόν στο καλαμπόκι, λόγω της διαφοράς στο ειδικό βάρος (μεγάλα διαστήματα ανάμεσα στους σπόρους) τα ακμαία να έρχονται λιγότερο σε επαφή με την επίδραση του τοξικού παράγοντα (Hertein et al. 2011). Οι λόγοι της σχετικά μειωμένης θνησιμότητας στο καλαμπόκι θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω, με έμφαση στην κατανομή των ουσιών στο εξωτερικό μέρος του σπόρου.

Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά ενός εντομοκτόνου-προστατευτικού σπόρων δημητριακών, είναι η υπολειμματική του δράση. Με βάση πρότερες μελέτες (Fang and Subramanyam 2003, Vayias et al. 2009) το spinosad παραμένει στο προϊόν σε αρκετά υψηλά επίπεδα, τουλάχιστον για διάστημα 6 μηνών. Το γεγονός αυτό καθιστά το spinosad ένα ιδανικό εντομοκτόνο για το σκοπό αυτό, λόγω του τοξικολογικού του προφίλ. Για παράδειγμα, οι Fang and Subramanyam (2003) κατέγραψαν ότι η θνησιμότητα του *R. dominica* ήταν υψηλή για διάστημα 6-8 μηνών, σε δόσεις που δεν ξεπέρασαν το 1 ppm σε σιτάρι. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για το spinetoram, όπου έμεινε σε υψηλά επίπεδα στο προϊόν για όλο το διάστημα των μετρήσεων, με μόνο μια μικρή τάση μείωσης, που συνήθως δεν ξεπερνούσε το 20 % μετά από 6 μήνες, ανεξάρτητα από τη δόση. Έτσι, συμπεραίνεται ότι το spinetoram θα μπορούσε να αξιολογηθεί περαιτέρω

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

για το σκοπό αυτό, ως ένα εντομοκτόνο που παρέχει προστασία για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Εκτός από την άμεση θνησιμότητα, η αποφυγή παραγωγής απογόνων αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά ενός προστατευτικού σπόρων. Στην περίπτωση της παρούσας μελέτης η παραγωγής απογόνων δεν απεφεύχθη, αλλά μειώθηκε αισθητά με την αύξηση της δόσης. Πάντως, πρέπει να αναφερθεί ότι, σε ορισμένες περιπτώσεις, υψηλός αριθμός απογόνων βρέθηκε μόνο για το *S. oryzae*, ενώ για το *R. dominica* ήταν αμελητέος. Συμπερασματικά για το *S. oryzae* η αποτελεσματική δόση θα πρέπει να αναζητηθεί μεταξύ των δόσεων 1 και 10 ppm, π.χ. τα 2 ppm. Περαιτέρω πειραματισμός απαιτείται για την αξιολόγηση και άλλων δόσεων στο εύρος αυτό. Εκτός από τη μικρότερη θνησιμότητα των «μητρικών» ακμαίων, η αυξημένη παραγωγή απογόνων για το *S. oryzae* θα πρέπει να αναζητηθεί και στο γεγονός ότι, για το είδος αυτό, το θήλυ τοποθετεί τα ωά στο εσωτερικό του σπόρου, όπου λαμβάνει χώρα και η ανάπτυξη των ατελών σταδίων. Κατά συνέπεια, για το είδος αυτό, τα ατελή στάδια δεν επηρεάζονται με τον τοξικό παράγοντα που πιθανόν να υπάρχει στο εξωτερικό μέρος του σπόρου (Vayias et al. 2009). Αντιθέτως, για το *R. dominica* το θήλυ τοποθετεί τα ωά στο εξωτερικό του σπόρου, και μετά την εκκόλαψή της η προνύμφη τρέφεται αρχικά εξωτερικά, και στη συνέχεια εισέρχεται στο εσωτερικό. Έτσι, είναι πιθανόν να υπάρχει μεγαλύτερη επαφή με το εντομοκτόνο, από ότι στην περίπτωση του *S. oryzae*.

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη δείχνει ότι το spinetoram είναι ένα λίαν αποτελεσματικό εντομοκτόνο για χρήση σε δημητριακά. Παρόλο που το spinosad ήδη χρησιμοποιείται για τον σκοπό αυτό σε διάφορα μέρη του κόσμου, ενδέχεται το spinetoram να χρησιμοποιηθεί και αυτό στο μέλλον, λόγω της μεγαλύτερης αποτελεσματικότητας σε χαμηλότερες δόσεις. Για το σκοπό αυτό, προτείνεται η επέκταση του σχετικού πειραματισμού με το spinetoram σε ευρύτερο κύκλο περιπτώσεων, π.χ. άλλα είδη, βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Athanassiou, G.G., Kavallieratos, N.G., Tsaganou, F., Vayias, B., Dimizas, K., Buchelos Th, C., (2003.) Effect of grain type on the insecticidal efficacy of SilicoSec against Sitophilus oryzae (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Crop Protection* 22, 1141e1147

Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G., Chintzoglou, G.J.,(2008a) Effectiveness of spinosad dust against different European populations of the confused flour beetle, Tribolium confusum Jacquelin du Val. *Journal of Stored Products Research* 44, 47e51.

Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G., Chintzoglou, G.J., Peteinatos, G.G., Boukouvala, M.C., Petrou, S.S., Panoussakis, E.C., (2008b) Effect of temperature and grain on insecticidal efficacy of spinosad dust against Sitophilus oryzae (Coleoptera: Curculionidae) and Rhyzopertha dominica (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Economic Entomology* 101, 976e981.

Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G., Yiatilis, A.E., Vayias, B.J., Mavrotas, C.S., Tomanovic, Z., (2008c) Influence of temperature and humidity on the efficacy of spinosad against four stored-grain beetle species. *Journal of Insect Science* 8, 1e9

Ahmed, F. E., (2001). Analysis of pesticides and their metabolites in food and drinks. Trends in Analytical Chemistry, 20(11):649-661.

Alder L., Greulich K., Kempe G., Vieth B., (2006) Residue analysis of 500 high priority pesticides Better by GC-MS or LC-MS/MS?. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(6):838-865.

Analytical Methods for Pesticides Residues, (1996) Ministry of Public Health Welfare, Health and Sport, The Netherlands.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Arthur F.H., (1996) Grain protectans : Current status and prospects for the future. *J. Stored Prod. Res.*, 32:293-302.

Banks, H. J., and P.G Fields (1995). Physical Methods for Insects Controls in Stored Grain Ecosystems. pp. 353-409. In D. S. Jayas, N.D.G. White, and W. E. Muir, Stored grain ecosystems, Marcel Dekker Inc., New York.

Bell, C. H. (2000) Fumigation in the 21st Century. Crop. Prot., 19:563-569

Bennett, G. W., Owens, J.M., and R. M. Corrigan (1988). Truman's Scientific Guide to Pest Control Operations, 4th ed. Purdue University Press, Indiana.

Bernal, J., Lopez, F. J., Hernandez, F., (1997). Matrix effects in the determinationof acaricides and fungicides in must by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. *J.Chromatogr,* 111-117.

Blasco, C., Font, G., Pico, Y., (2005). Analysis of pesticides in fruits by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-ion-trap-triple stage mass spectometry. *J. Chromatogr. A* 37-43.

Bond, E. D. (1984). Manual of Fumigation for Insects Control. FAO Plant Prod. And Prot. Paper No.54, F.A.O of the U.N., Rome.

Bond, E. J., Dumas, T., and S. Hobbs (1984). Corrosion of metals by the fumigants phosphine, *J. Stored Prod.Res.*, 20:57-63

Bret, B. L., Larson, L. L., Schoonover, J. R., Sparks, T. C. and Thompson, G. D. 1997. Biological properties of Spinosad. *Down to Earth*, 52: 6 - 13.

Brower, J. H., L., Smith, P. V., Vail, and P. W. Flim (1996). Biological Control. Pp. 223-286. In: Bh. Subramanyam, and D. W. Hagstrum, Intergraded Management of Insects in Stored Products, Marcel Dekker Inc., New York.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Camel, V., (1998). Supercritical fluid extraction as a useful method for pesticides determination. *J. Chromatogr. A*, 26:99-111

Camel, V., (2000). Microwave assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 19(4):229-248.

Chintzoglou, G.J., Athanassiou, C.G., Markoglou, A.N., Kavallieratos, N.G., 2008. Influence of commodity on the effect of spinosad dust against *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) and *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Pest Management* 54, 277-285.

Daglish, G.J., Nayak, M.K., 2006. Long-term persistence and efficacy of spinosad against *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrychidae) in wheat. *Pest Management Science* 62, 148-152

Dean, J. R., (1998). Extraction methods for environmental analysis. Edited by John Wiley and Sons, New York.

Dripps, J., Olson, B., Sparks, T., and Crouse, G. 2008. Spinetoram: How artificial intelligence combined natural fermentation with synthetic chemistry to produce a new spinosyn insecticide. Plant Management Network

Dow AgroSciences 2006. Spinetoram Technical Bulletin, 2 - 4.
Dow AgroSciences 2008. Spinetoram Technical Bulletin, 1 - 6

Eskilsson, S.C., Bjorklund, E., (2000). Analytical scale microwave assisted extraction. *J. Chromatogr. A.* 227-250

El Kady, G., El Sharabasy, H. M., Mahmoud, M.F., Bahgat, I.M., (2007) Toxicity of Two Potential Bio-insecticides Against Moveable Stages of Tetranychus urticae Koch. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(11): 1315-1319,

Elek, J. A. and Longstaff., (1994). Effects of chitin synthesis inhibitors on stored products beetles. *Pesticide Sci.* 40:225-230.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Fang, L., Subramanyam, Bh, Arthur, F.H., 2002a. Effectiveness of spinosad on four classes of wheat against five stored-product insects. *Journal of Economic Entomology* 95, 640e650.

Fang, L., Subramanyam, Bh, Dolder, S., 2002b. Persistence and efficacy of spinosad residues in farm stored wheat. *Journal of Economic Entomology* 95, 1102e1109

Fang, L., Subramanyam, Bh., 2003. Activity of spinosad against adults of *Rhyzopertha dominica* (F) (Coleoptera: Bostrychidae) is not affected by wheat temperature and moisture. *Journal of the Kansas Entomological Society* 76, 529-532.

Fernandez, N., Pico, Y., Manes, J., (2000). Determination of carbamates residues in fruits and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectometry. *J. Chromatogr. A*. 263-274.

Fields, P.G. (1992). The control of stored products insects and mites with extreme temperatures, *J. Stored Prod. Res*., 28:89-118

Ghosh, A., Chatterjee, M., Roy, A., (2010) Bio-efficacy of spinosad against tomato fruit borer (*Helicoverpa armigera* Hub.) (Lepidoptera: Noctuidae) and its natural enemies *Journal of Horticulture and Forestry* Vol. 2(5), pp. 108-111

Hertlein, M., Thompson, G. , Subramanyam, Bh., Athanassiou Ch., (2011) Spinosad: A new natural product for stored grain protection. *Journal of Stored Products Research* 1e16

Huang, K., Xia, L., Zhang, Y., Ding, D., Zahn, j., (2009).Recent advances in the biochemistry of spinosyns. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:13–23

Hussen, A., Westborn, R., Megersa, N., Mathiasson, L., Bjorklund, E., (2007). Selective pressurized liquid extraction for multi residue analysis of organochlorine pesticides in soil. *J. Chromatogr.* A. 247-253.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Jay, E. G., R. T. Arbocast and G.C. Pearman, (1971). Relative humidity: its importance in the control of stored products insects with modified atmospheric gas concentrations. *J. Stored Prod.* Res. 7:325-329

Kataoka, H., Lord, H. L., Pawliszyn, J., (2002). Application of solid phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr A*. 36-62

Korunic, Z., and P. G. Fields (1995). Diatomaceous Earths, a group of Natural Insecticides. *J. Stored Prod.* Res., 34:87-97.

Lambropoulou, D. A., Albanis, T. A (2002). Headspace solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in strawberry and cherry juices. *J. Agric. Food. Chem*. 3359-3365.

Leesch, J. G., Redlinger, L. M., Gillenwater, H. B., and J.M. Zehner (1982). Fumigation of dates with phosphine, *J. Econ. Entomol.*, 73:829-831.

Lehotay, I. s., Mstovka, K., Lihgtfield, R., (2005). Use o buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Acta Horticulture*, 409-515.

Masque, N., Marce, M., Borrul, F., (1998). New polymeric and other type of sorbents for solid phase extraction of polar organic micropollutants from enviromental water.TrAC *Trends in Analytical Chemistry*, 17:384.

Mahmoud, M. F., Osman, M. A. M., Bahgat, I. M., El-Kady, G. A.(2009). Efficiency of Spinetoram as a biopesticide to Onion Thrips (Thrips tabaci Lindeman) and Green Peach Aphid (Myzus persicae Sulzer) under laboratory and field conditions *Journal of Biopesticides*, 2(2): 223- 227

Moore, D., J. C., Lord and S.M. Smith (2000). Pathogens. pp. 193-227. In: Bh. Subramanyam, and D. W. Hagstrum, Alternatives to Pesticides in Stored Products IPM, Kluwer Academic Publishers, Dordreecht.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Nordlund, D. A. (1981). Semiochemicals: a review of terminology. Pp. 13-28. In: D. A. Nordlund, R. L. Jones, and W. J. Lewis (eds.) Semiochemicals: Their Role in Pest Control. John Wiley & Sons, New York.

Otero, R. R., Ruiz C. Y., Grande, B., Candara, J. S (2002). Solid phase microextraction gas chromatography mass spectometry method for the determination of fungicides cypronil and fludioxonil in white wines. *J. Chomatogr. A.* 41-52

Papadopoulou - Moulkidou E. and T. Tomazou., (1991). Persistance and activity of permethrin in stored wheat and its residues in wheat milling fraction. *J. Stored Prod Res.*, 27:249-254.

Pensando, L., Casais, M. C., Mejuto, M. C., Cela, R., (2005). Application of matrix solid phase dispresion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. *J. Chromatogr A*, 1077:103.

Phillips, T. W., Cogan, P. M., and H.Y. Fadamino (2000) Pheremones. pp. 273-302 In: Bh. Subramanyam, and D. W. Hagstrum, Alternatives to Pesticides in Stored Products IPM, Kluwer Academic Publishers, Dordreecht.

Pierce L. H., (1994). Using pheremones for the location and suppression of the phycitid moths and cigarette beetles in Hawaii, a five year summary, pp 439-433 in Phillips W. T., Paul M.C. and H. Y. Fadamiro, 2000. Pheromones, in Alternatives to Pesticides in Stored Products IPM, ed by Subramanyam Bh and Hagstrum DW, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 273-295.

Powell, D. F. (1975) The fumigation of seeds with methyl bromide, *Ann. Appl. Biol.*, 81:425-431.

Price, N. R., and C. M. Walter (1987) A comparison of some effects of phosphine, hydrogen cyanide and anoxia in the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (F) (Coleoptera: Bostrychidae) *Comp. Biochem. Physiol*., 86C: 33-36

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Pylypiw, H. M., Arsenault, T. L., Thetford, D.M., Mattina, M. J., (1997). Suitability of microwave assisted extraction for multiresidue pesticide analysis of produce. *J. Agric. Food Chem.* 45(9): 3522-3528.

Rissato, S. R., Galhiane M. S., Apon B. M., Arruda M. S., (2005). Multiresidue analysis of pesticides in soil by supercritical fluid extraction/ gas chromatography with electron capture detection and confirmation by gas chromatography mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 62-69

Round, F.E., R.M., Crawford, and D.G. Mann (1992). The Diatoms. Biology & Morphology of genera. Cambrigde University Press, New York, USA.

Salgado, V.L., Sparks, T.C., 2005. The Spinosyns: Chemistry, biochemistry, mode of action and resistance. In: Gilbert L.I., Iatrou, K., Gill S., (Eds), Comprehensive Insect Molecular Science, Elsevier B.V., Vol. 6, pp. 137-173.

Sanchez-Brunete, C., Albero, B., Miguel, E., Tadeo, J. L., (2003). Determination of insecticides in honey by matrix solid phase dispersion and gas chromatography with nitrogen phosphorus datection and mass spectometric confirmation. *J.AOAC* Int 128-133.

Sherma, J., (1989). Analytical methods for pesticides and plant growth regulatiors. Advanced analytical techniques, Volume XVII, Academic Press Inc.

Sittisuang, P., and H. Nakakita (1985). The effect of phosphine and methyl bromide on germination of rice and corn, *J. Pestic. Sci.*, 10:461-468.

Smet, H. J., M., Rans and A. De Loof (1989). Activity of new juvenile hormone analogues on a stored food insects, Tribolium confusum. *J. Stored Prod. Res.*, 25:165-169.

Sparks, T.C., Thompson, G.D., Larson, L.L., Kirst, H.A., Jantz, O.K., Worden, T.V., Hertlein, M.B., Busacca, J.D., 1995. Biological characteristics of the spinosyns: New naturally derived insect control agents. In: Proceedings of the Beltwide Cotton

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Conference,San Antonio, Texas, 4-7 January, 1995, National Cotton Council of America, Memphis, TN., pp. 903-907.

Subramanyam, Bh., Nelson, J.J., Meronuck, R.A., Flora, E.A., 1999. Evaluation of spinosad on stored-product insects. In: Jin, Z.X., Liang Q., Liang, Y.S., Tan, X.C., Guan, L.H. (Eds), Stored Product Protection. Proceedings of the 7th International Working Conference on Stored-Product Protection, Beijing, China, October 14-19, 1998, Chengdu, China, Sichuan Publishing House of Science and Technology, Chengdu, PR China, Vol. 1, pp. 940-949.

Subramanyam, B., and R. Roesli (2000). Inert dusts. pp. 321-380. In: In: Bh. Subramanyam, and D. W. Hagstrum, Alternatives to Pesticides in Stored Products IPM, Kluwer Academic Publishers, Dordreecht.

Subramanyam, Bh., M. D. Toews and L. Fang 2003. Spinosad: an effective replacement for organophosphate grain protectants. pp. 916-920. *In* P. F. Credland, D.

Subramanyam, Bh., Toews, M.D., Ileleji, K.E., Maier, D.E., Thompson, G.D., Pitts, T.J., 2007. Evaluation of spinosad as a grain protectant on three Kansas farms. *Crop Protection* 26, 1021e1030.

Tanaka, T., Hori, T., Asada, T., Oikawa, K., Kawata, k., 2007. Simple one step extraction and clean up by pressurized liquid extraction for gas chromatographic mass spectometric determination of pesticides in green leafy vegetables. *J.Chromatogr A*, 1175:181-186.

Tsoutsi, S. C., Albanis, T. A., Optimization of headspace solid phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. Intern. *J. Environ. Anal. Chem* 84:1-13

Vayias, B.J., Athanassiou, C.G., Buchelos, C.Th, 2009a. Effectiveness of spinosad combined with diatomaceous earth against different European strains of Tribolium confusum Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae): influence of commodity and temperature. *Journal of Stored Products Research* 45, 165e176.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Vayias, B.J., Athannassiou, C.G., Milonas, D.N., Mavrotas, C., 2009b. Activity of spinosad against three stored-product beetle species on four grain commodities.*Crop Protection* 28, 561e566.

Vayias, B.J., Athannassiou, C.G., Milonas, D.N., Mavrotas, C., 2010a. Persistence and efficacy of spinosad on wheat, maize, and barley grains against four major stored product pests. *Crop Protection* 29, 496-505.

Williams, T., Valle, J. and Viñuela E. 2003. Is the naturally derived insecticide Spinosad® compatible with insect natural enemies? *Biocontrol Science and Technology,* 13: 459 - 475.

Αμβράζη, Γ. Ε., (2007) Ανάπτυξη μεθοδολογίας και εφαρμογή της στον προσδιορισμό επιλεγμένων φυτοφαρμάκων στην ελιά και το ελαιόλαδο κατά τη διαδικασία παραγωγής του. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Θωμαϊδης, Σ. (1992). Καταπολέμηση εντόμων σε αποθηκευμένα σιτηρά. *Γεωργική Τεχνολογία*, 10:80-88.

Μηλιάδης, Ε. Γ., (2004) Διδακτικές σημειώσεις από το Χημικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Μπουχέλος, Κ. (1996). Έντομα αποθηκευμένων γεωργικών προϊόντων και τροφίμων (Πανεπιστημιακές παραδόσεις ΓΠΑ), σελ. 34-59

Παπαδοπούλου – Μουρκίδου, Ε. και Πατσιάς, Ι., (2009). Χρωματογραφία και Εργαστηριακές Τεχνικές. Θεσσαλονίκη.

Παπαδή-Ψύλλου Α. (2009). Επικύρωση και αξιολόγηση αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών νέας γενιάς σε γεωργικά προϊόντα με χρήση αέριας χρωματογραφίας. Μεταπτυχιακή διατριβή, Παν.Θεσσαλίας, Βόλος.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87

Σταμόπουλος, Δ. Κ. (1995). Έντομα αποθηκών μεγάλων καλλιεργειών και λαχανικών. Ζήτη Εκδ., Θεσσαλονίκη, σελ. 7-115.

Τζανακάκης, Μ. Ε., (1995). Εντομολογία. Θεσσαλονίκη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 23:11:18 EEST - 3.133.131.87