

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΧΩΡΟΤΑΞΙΑΣ ΠΟΛΕΟΔΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ  
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ  
ΜΠΣ: ΧΩΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΤΟΞΙΚΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ  
ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΓΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ  
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΒΙΟΔΟΚΙΜΩΝ

*ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ*

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ Η. ΚΡΑΒΒΑΡΙΤΗ

*ΓΕΩΠΟΝΟΣ*

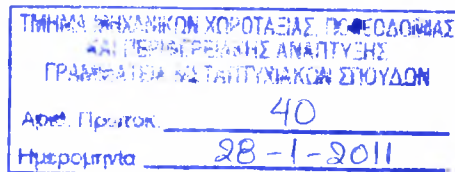
ΒΟΛΟΣ, 2011



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 9272/1  
Ημερ. Εισ.: 21-02-2011  
Δωρεά: Συγγραφέα  
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ  
632.95  
ΚΡΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΧΩΡΟΤΑΞΙΑΣ ΠΟΛΕΟΔΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ  
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ  
ΜΠΣ: ΧΩΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΤΟΞΙΚΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ  
ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΓΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ  
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΒΙΟΔΟΚΙΜΩΝ

*ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ*

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ Η. ΚΡΑΒΒΑΡΙΤΗ

*ΓΕΩΠΟΝΟΣ*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΚΟΥΓΚΟΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Π.Θ. (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΤΣΙΡΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Π.Θ.

ΟΛΓΑ ΧΡΙΣΤΟΠΟΥΛΟΥ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Π.Θ.

ΒΟΛΟΣ, 2011

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι τοξικές επιδράσεις δυο αγροχημικών, του Propiconazole και του Chlorpyrifos, εκτιμήθηκαν με βιοδοκιμές σε δύο οργανισμούς που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά τροφικά επίπεδα, το καρκινοειδές *Daphnia magna* και τα μικροφύκη *Pseudokirchneriella subcapitata*. Η έκθεση κάθε οργανισμού στις ουσίες πραγματοποιήθηκε σε πέντε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης για την κάθε ουσία, για τον υπολογισμό της τιμής IC<sub>50</sub> (συγκέντρωση του κάθε αγροχημικού που προκαλεί 50% ακινητοποίηση και αναστολή της ανάπτυξης των οργανισμών *D. magna* και *P. Subcapitata*, αντίστοιχα) και σε έξι διαφορετικούς συνδυασμούς συγκεντρώσεων των δύο ουσιών για τη μελέτη της συνδυασμένης τοξικότητας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η *D. magna* ήταν πιο ευαίσθητη στο Chlorpyrifos (IC<sub>50</sub> = 0,11 mg/L), συγκριτικά με το *P. subcapitata* (IC<sub>50</sub> = 8,47 mg/L). Αντίθετα, το *P. subcapitata* ήταν πιο ευαίσθητο στο Propiconazole (IC<sub>50</sub> = 4,12 mg/L) από ότι η *D. magna* (IC<sub>50</sub> = 8,47 mg/L). Η συνδυασμένη επίδραση για τη *D. magna* ήταν φαινόμενο κυρίως ανταγωνιστικό, εκτός δύο περιπτώσεων που ήταν προσθετικό, ενώ για το *P. subcapitata*, ήταν κυρίως προσθετικό ή συνεργιστικό και σε μια μόνο περίπτωση ανταγωνιστικό. Η συνεργιστική δράση των δύο αγροχημικών μπορεί να θέσει σε κίνδυνο τα υδατικά οικοσυστήματα.

*Λέξεις κλειδιά:* Propiconazole, Chlorpyrifos, βιοδοκιμές, *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, συνδυασμένη τοξικότητα.

## ABSTRACT

The toxic effects of two pesticides, Propiconazole and Chlorpyrifos, were evaluated using bioassays with two organisms, representing different trofic levels, the crustacean *Daphnia magna* and the microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. Each organism was exposed at five different levels of magnitude for each chemical in order to calculate the IC<sub>50</sub> value (concentration of each agrochemical which induce 50% immobilization and growth inhibition of the organisms *D. magna* and *P. Subcapitata*, respectively) and at six different concentration combinations of the two substances in order to assess their toxic interactive effects. According to the results, *D. magna* was more sensitive to Chlorpyrifos (IC<sub>50</sub> = 0,11 mg/L), compared to *P. subcapitata* (IC<sub>50</sub> = 8,47 mg/L). On the contrary, *P. subcapitata* showed higher sensitivity to Propiconazole (IC<sub>50</sub> = 4,12 mg/L) than *D. magna* (IC<sub>50</sub> = 8,47 mg/L). The interactive effects for *D. magna* were mostly antagonistic and just in two cases additive, while for *P. subcapitata* were mostly additive or synergistic and just in one case antagonistic. Synergism of the two agrochemicals may pose at risk the aquatic environments.

*Key words:* Propiconazole, Chlorpyrifos, bioassays, *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, toxic interactive effects.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Αθανάσιο Κούγκολο, Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Χωροταξίας και Περιφερειακής Ανάπτυξης του Π.Θ., για την ανάθεση του θέματος, καθώς και για τις πολύτιμες υποδείξεις και συμβουλές του, ως επιβλέπων της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Νικόλαο Τσιρόπουλο, Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Π.Θ. και την κ. Όλγα Χριστοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Μηχανικών Χωροταξίας και Περιφερειακής Ανάπτυξης του Π.Θ., για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή. Ακόμη, ευχαριστώ τον κ. Βασίλειο Τσιρίδη, Χημικό Μηχανικό και υποψήφιο διδάκτορα, για την πολύτιμη καθοδήγηση, βοήθεια και ενεργό συμμετοχή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης του πειραματικού και συγγραφικού μέρους της παρούσας διατριβής. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κοντινούς μου ανθρώπους, για τη συμβολή, συμπαράσταση και κατανόησή τους σε κάθε μου προσπάθεια.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	7
1. ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ .....	10
<u>1.1 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ</u> .....	10
1.1.1 ΣΥΝΤΟΜΗ ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ .....	11
1.1.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ .....	12
<u>1.2 ΤΥΧΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ</u> .....	14
1.2.1 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΣΤΟ ΕΛΑΦΟΣ .....	15
1.2.2 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΣΤΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΝΕΡΑ.....	18
1.2.3 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΣΤΑ ΥΠΟΓΕΙΑ ΝΕΡΑ .....	21
<u>1.3 ΟΡΘΗ ΧΡΗΣΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ-ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΝΕΡΩΝ</u> .....	21
<u>1.4 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ</u> .....	23
<u>1.5 ΤΡΙΑΖΟΛΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ</u> .....	24
1.5.1 PROPICONAZOLE .....	25
<u>1.6 ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ</u> .....	27
1.6.1 CHLORPYRIFOS .....	28
2. ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ-ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ-ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ ..	32
<u>2.1 ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ</u> .....	32
2.1.1 ΤΡΟΠΟΙ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΟΞΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ.....	33
2.1.2 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ-ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	34
<u>2.2 ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ-ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ</u> .....	37
<u>2.3 ΥΔΑΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ</u> .....	38
2.3.1 ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ .....	39
2.3.2 DAPHNIA MAGNA ΚΑΙ PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA.....	41
2.3.3 ΔΟΚΙΜΕΣ ΤΟΧΚΙΤΣ .....	43
2.3.4 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΜΙΓΜΑΤΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.....	44
2.3.5 ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ .....	45
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47
<u>3.1 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ</u> .....	47
<u>3.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ</u> .....	47

<u>3.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ</u> .....	48
3.3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ <i>D. MAGNA</i> .....	48
3.3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ <i>P. SUBCAPITATA</i> .....	54
<u>3.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ</u> .....	60
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	61
4.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ IC <sub>50</sub> .....	61
4.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ.....	65
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	70
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	72
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	73

#### ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ ΚΑΙ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Πίνακας 1.1 Φυσικές ιδιότητες του Propiconazole.....	26
Πίνακας 1.2 Φυσικές ιδιότητες του Chlorpyrifos .....	29
Πίνακας 2.1 Κατηγορίες τοξικότητας γεωργικών φαρμάκων για τον άνθρωπο σύμφωνα με τον WHO.....	36
Πίνακας 3.1 Σύσταση προτύπου διαλύματος για μετρήσεις τοξικότητας με τα μικροφύκη <i>P. subcapitata</i> .....	57
Πίνακας 4.1 Ποσοστό ακινητοποίησης της <i>D. magna</i> λόγω επίδρασης των διαφόρων επιπέδων συγκεντρώσεων του Chlorpyrifos .....	61
Πίνακας 4.2 Ποσοστό ακινητοποίησης της <i>D. magna</i> λόγω επίδρασης των διαφόρων επιπέδων συγκεντρώσεων του Propiconazole.....	61
Γράφημα 4.1 Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της μεταβολής της συγκέντρωσης των δυο φυτοπροστατευτικών ουσιών στην ακινητοποίηση της <i>D. magna</i> .....	62
Πίνακας 4.3 Ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης του <i>P. subcapitata</i> λόγω επίδρασης των διαφόρων επιπέδων συγκεντρώσεων του Chlorpyrifos .....	62
Πίνακας 4.4 Ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης του <i>P. subcapitata</i> λόγω επίδρασης των διαφόρων επιπέδων συγκεντρώσεων του Propiconazole.....	62
Γράφημα 4.2 Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της μεταβολής της συγκέντρωσης των δυο φυτοπροστατευτικών ουσιών στην ανάπτυξη του <i>P. subcapitata</i> .....	63
Πίνακας 4.5 Τιμές IC <sub>50</sub> για τις δυο ουσίες στους οργανισμούς-δείκτες.....	64
Πίνακας 4.6 Μεμονωμένη επίδραση των δυο φυτοπροστατευτικών ουσιών στη <i>D. magna</i> .....	66

Πίνακας 4.7 Μεμονωμένη επίδραση των δυο φυτοπροστατευτικών ουσιών στο <i>P. subcapitata</i> .....	66
Γράφημα 4.3 Σύγκριση μεταξύ θεωρητικά αναμενόμενης (P(E)) και παρατηρούμενης (P(O)) επίδρασης διαφόρων συνδυασμών συγκεντρώσεων των δυο φυτοπροστατευτικών ουσιών στην ακινητοποίηση της <i>D. magna</i> .....	67
Πίνακας 4.8 Συνδυασμένη επίδραση των διαφόρων μιγμάτων Chlorpyrifos και Propiconazole στη <i>D. magna</i> .....	67
Γράφημα 4.4 Σύγκριση μεταξύ θεωρητικά αναμενόμενης (P(E)) και παρατηρούμενης (P(O)) επίδρασης διαφόρων συνδυασμών συγκεντρώσεων των δυο φυτοπροστατευτικών ουσιών στην αναστολή ανάπτυξης του <i>P. subcapitata</i> .....	68
Πίνακας 4.9 Συνδυασμένη επίδραση των διαφόρων μιγμάτων Chlorpyrifos και Propiconazole στο <i>P. subcapitata</i> .....	69



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες μετά τη βιομηχανική επανάσταση προκάλεσαν ευρύτατης κλίμακας ρύπανση, υποβάθμιση οικοσυστημάτων, μείωση της βιοποικιλότητας, ερημοποίηση εδαφών, υπερεκμετάλλευση φυσικών πόρων και υποβάθμιση της ποιότητας ζωής. Μία από τις σημαντικότερες αλλαγές που επήλθαν λόγω της ανάπτυξης των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων είναι η αλματώδης αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού από 1 δισεκατομμύριο το 1820, σε 2,5 δισεκατομμύρια το 1950 και σε 6.2 δισεκατομμύρια το 2000. Επιπλέον, η κατανάλωση γλυκού νερού για πόσιμο, ύδρευση, άρδευση και άλλες χρήσεις, αυξήθηκε κατά 9 φορές, ενώ συγχρόνως προκλήθηκε εκτεταμένη ρύπανση υδάτων και υδάτινων συστημάτων από υγρά και στερεά απόβλητα (αστικά, βιομηχανικά). Σε πολλές περιοχές οι πηγές και τα διαθέσιμα αποθέματα νερού έχουν εξαντληθεί ή έχουν μειωθεί δραματικά (Βαλαβανίδης και Βλαχογιάννη, 2008).

Μία από τις κυριότερες ανθρωπογενείς δραστηριότητες, η οποία αποσκοπεί στην απόκτηση αγαθών και ενέργειας και η οποία εκ φύσεως επιδρά άμεσα στα οικοσυστήματα και στις συνιστώσες τους, μεταβάλλοντας τις ισορροπίες τους, είναι η γεωργία. Αναπόσπαστο κομμάτι της συμβατικής της μορφής είναι η χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων, όπως εντομοκτόνων, μυκητοκτόνων και ζιζανιοκτόνων ουσιών. Η παρουσία των φυτοπροστατευτικών ουσιών στη γεωργική πρακτική τις τελευταίες δεκαετίες διασφάλισε σημαντικά τόσο τη φυτική παραγωγή, όσο και τη δημόσια υγεία. Ωστόσο, η εκτεταμένη και κυρίως η αλόγιστη χρήση τους ενέχει σοβαρούς περιβαλλοντικούς κινδύνους, καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη εξεύρεσης της ιδανικής σχέσης μεταξύ των ωφελειών και των κινδύνων. Πιο συγκεκριμένα, απαιτείται γνώση της τύχης και της συμπεριφοράς των μορίων των φυτοπροστατευτικών ουσιών, των μεταβολιτών και των υπολειμμάτων τους στο έδαφος, στα νερά, στον αέρα, αλλά και στα φυτικά προϊόντα, ώστε να είναι δυνατή η ανάπτυξη και εφαρμογή μεθόδων που αποσκοπούν στη μείωση του περιβαλλοντικού κόστους και στην αύξηση της φυτικής παραγωγής.

Ένα σημαντικό ποσοστό των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων των γεωργικών φαρμάκων, καταλήγει εξαιτίας διαφόρων διεργασιών στους επιφανειακούς και υπόγειους υδροφορείς, υποβαθμίζοντας την ποιότητα των υδάτων, τόσο ως πόσιμα όσο και ως αρδευτικά. Κατά συνέπεια, τα φαινόμενα τοξικότητας

λόγω παρουσίας των φυτοπροστατευτικών ουσιών στα οικοσυστήματα, καθιστούν εύθραυστη την υγεία τους και φυσικά των οργανισμών που διαβιούν σε αυτά.

Δεδομένου ότι το νερό αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς φυσικούς πόρους και ότι η διαθεσιμότητά του είναι επισφαλής, λόγω της μη ορθής διαχείρισής του, το ζήτημα των φαινομένων τοξικότητας στα υδάτινα οικοσυστήματα απασχολεί τους επιστήμονες. Στην οικοτοξικολογία και υδατική τοξικολογία πραγματοποιούνται πειράματα όπου έμβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούνται ως δείκτες για τη μέτρηση τοξικών ουσιών ή μιγμάτων στα οικοσυστήματα. Τα πειράματα αυτά ονομάζονται βιοδοκιμές ή βιολογικές δοκιμασίες (bioassays). Με τις βιοδοκιμές διαπιστώνουμε ποιες συγκεντρώσεις των μελετώμενων χημικών ουσιών θανατώνουν τους έμβιους οργανισμούς ή προκαλούν βλάβη σε κάποια ζωτική τους λειτουργία (π.χ. ικανότητα αναπαραγωγής). Κατά το παρελθόν, τα πειράματα προσδιορισμού τοξικότητας των χημικών ουσιών-ρύπων, αφορούσαν σε μεμονωμένες ουσίες. Καθώς όμως στο περιβάλλον οι ξеноβιοτικές ουσίες εμφανίζονται ως μίγματα, είναι δόκιμο οι πειραματικές μελέτες να οργανώνονται και να πραγματοποιούνται για περισσότερες από μια χημικές ουσίες ταυτόχρονα. Υπάρχει μεγάλο θεωρητικό και πρακτικό ενδιαφέρον για την πρόβλεψη της συνδυασμένης τοξικότητας δύο ή και περισσότερων χημικών ουσιών που επιδρούν στον ίδιο οργανισμό (Κούγκολος, 2007).

Η επιλογή του θέματος της παρούσας διατριβής βασίστηκε στο γεγονός ότι η οικοτοξικολογία των φυτοπροστατευτικών προϊόντων αποτελεί μια νευραλγική πτυχή του ζητήματος της διαχείρισης και προστασίας του περιβάλλοντος. Σκοπός ήταν η μελέτη των τοξικών επιδράσεων (μεμονωμένων και συνδυασμένων) των δύο επιλεγμένων αγροχημικών, του μυκητοκτόνου Propiconazole και του εντομοκτόνου Chlorgyridifos, σε δύο οργανισμούς-δείκτες. Κατά τα πειράματα, έγινε χρήση των εμπορικών σκευασμάτων, αντί των καθαρών ουσιών, με σκοπό την όσο το δυνατό καλύτερη προσέγγιση των πραγματικών συνθηκών έκθεσης στο περιβάλλον των οργανισμών-δεικτών στις ουσίες. Η μελέτη των παραπάνω φυτοπροστατευτικών καθίσταται ενδιαφέρουσα σε θεωρητικό αλλά και σε πρακτικό επίπεδο, καθώς οι ουσίες αυτές εφαρμόζονται σε ευρεία κλίμακα στη γεωργική πρακτική στην Ελλάδα και συχνά στην ίδια καλλιέργεια. Κατά συνέπεια, είναι δυνατό να βρεθούν μαζί ως μίγμα σε ένα υδάτινο οικοσύστημα και να προκαλέσουν σε αυτό φαινόμενα τοξικότητας.

Η πλειοψηφία των εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται είναι οργανοφωσφορικές, καρβαμιδικές και πυρεθροειδείς ουσίες. Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, στα οποία ανήκει το Chlorgyrifos, αντικατέστησαν τα οργανοχλωριωμένα, καθώς παρουσιάζουν παρόμοιο φάσμα δράσης, έχοντας όμως μικρότερη υπολειμματική δράση στο περιβάλλον. Ωστόσο, παρά τη γρήγορη αποικοδόμησή τους, οι ουσίες αυτές είναι πολύ περισσότερο τοξικές στα οστρακοειδή (π.χ. στη *Daphnia magna*), στα έντομα και στα ψάρια, συγκριτικά με άλλες ομάδες εντομοκτόνων (Palma et al., 2009). Τα αζόλια, στα οποία ανήκει το Propiconazole, είναι φυτοπροστατευτικές ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργική πρακτική και δρουν αναστέλλοντας τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης, ουσίας απαραίτητης στο σχηματισμό των κυτταρικών τοιχωμάτων του μύκητα, σταματώντας έτσι την ανάπτυξή του (Soetaert et al., 2006).

Οι οργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις βιοδοκιμές ήταν το καρκινοειδές *Daphnia magna* και τα μικροφύκη *Pseudokirchneriella subcapitata*. Η *D. magna* είναι ένας πολύ ευαίσθητος οργανισμός στις οργανοφωσφορικές ουσίες και συχνά διαβιεί σε μικρούς υδάτινους όγκους εντός και γύρω από αγροτικές εκτάσεις, οι οποίοι είναι αποδέκτες συγκεντρώσεων οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών που χρησιμοποιούνται στη γεωργική πρακτική (Barata et al., 2004). Παρουσιάζει πειραματικό ενδιαφέρον ως οργανισμός-μοντέλο, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί, αντί ειδών θηλαστικών, σε πειράματα οικοτοξικολογικής ανάλυσης επικινδυνότητας για ουσίες-ρυπαντές, με σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας του πόσιμου νερού (Palma et al., 2009). Επιπλέον, είναι ένας οργανισμός με τον οποίο μπορεί να σχετιστούν πειραματικά μοντέλα επίδρασης της αναστολής της Β-εστεράσης σε ατομικό επίπεδο (Barata et al., 2004). Η *D. magna* επιλέχθηκε γιατί θεωρείται ένας οργανισμός ευαίσθητος στις περισσότερες τοξικές ουσίες. Επιπλέον, πλεονεκτεί από πρακτικής άποψης γιατί οι παρατηρήσεις στα συγκεκριμένα πειράματα τοξικότητας γίνονται με γυμνό οφθαλμό (Κούγκολος, 2007). Τα μικροφύκη *P. subcapitata* επιλέχθηκαν γιατί αντιπροσωπεύουν ένα διαφορετικό τροφικό επίπεδο σε σχέση με τη *D. magna* και γιατί παρουσιάζουν ευαισθησία, απλή δομή και εύκολη τυποποίηση. Πρόκειται για δύο είδη οργανισμών-δεικτών, ευρέως χρησιμοποιούμενων σε βιοδοκιμές.

## 1. ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

### 1.1 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Σύμφωνα με στοιχεία που προκύπτουν από αρχαιολογικά απολιθώματα, οι παράγοντες που προκαλούν ασθένειες στα φυτά υπήρχαν και δρούσαν πριν την εμφάνιση του ανθρώπου στη γη. Η Βίβλος αναφέρει καταστροφές οι οποίες αποδίδονταν στην οργή του Θεού, ενώ μέχρι ακόμα και πολύ αργότερα, παρόμοιες καταστάσεις αποδίδονταν στη δράση της μαγείας και των πνευμάτων (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991).

Η απαρχή της χρήσης χημικών ουσιών για την αντιμετώπιση των εχθρών και των ασθενειών των καλλιεργειών μπορεί να τοποθετηθεί στα χρόνια της αρχαιότητας, από την εποχή της κλασικής αρχαιότητας στην Ελλάδα και στη Ρώμη. Ωστόσο, η συστηματική εφαρμογή των χημικών ουσιών στη γεωργία άρχισε στο τέλος του 19<sup>ου</sup> αιώνα με τη χρησιμοποίηση διαφόρων ανόργανων αλάτων και καθιερώθηκε στη δεκαετία του 1950, με την είσοδο στην αγορά των συνθετικών οργανικών ενώσεων. Η χρήση των φυτοπροστατευτικών ουσιών αυξήθηκε ραγδαία από το 1945, παρόλα αυτά, ο ρυθμός της παρουσιάζει μείωση τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς νέα δεδομένα για τις μεθόδους φυτοπροστασίας οδηγούν στη μείωση των ποσοτήτων των χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στη γεωργία, ενώ ταυτόχρονα υποδεικνύουν τη δημιουργία και χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων με ιδιότητες που επιβαρύνουν το περιβάλλον το ελάχιστο δυνατό. Η εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων είναι μια σύνθετη υπόθεση και πριν ο παραγωγός παραλάβει το τελικό προϊόν, απαιτείται η εμπλοκή και συνεργασία διαφόρων επιστημονικών κλάδων, όπως της χημείας, της γεωπονίας, της τοξικολογίας, της βιολογίας, της οικονομολογίας και της μηχανολογίας. Αλλά και εν συνεχεία, ομαδική συμβολή των παραπάνω κλάδων κρίνεται απαραίτητη, ώστε να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά τα προβλήματα που ενδεχομένως να προκύψουν (Μενκίσογλου-Σπυρούδη, 1998).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), ορίζει ως *φυτοπροστατευτικά προϊόντα* τις χημικές ουσίες, τα φυτικά εκχυλίσματα ή τις συνθετικές ουσίες, που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των ασθενειών και των εχθρών των φυτών, όπως είναι τα επιβλαβή ζώα και έντομα και τα ζιζάνια (WHO, 1990).

### *1.1.1 ΣΥΝΤΟΜΗ ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ*

Όπως προαναφέρθηκε, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα αναπτύχθηκαν τα τελευταία εξήντα περίπου χρόνια. Κατά τη διάρκεια του Β' Παγκόσμιου πόλεμου, το 1942 ο Ελβετός Muller εφευρίσκει το DDT, ενώ το 1946 τα εργαστήρια της εταιρίας φαρμάκων Bayer κατασκευάζουν το παραθείο. Ακολούθησε η παρασκευή εντομοκτόνων οργανοφωσφορικών μίγμάτων στην Γερμανία. Το 1945 το πρώτο καρβαμιδικό ζιζανιοκτόνο που δρα στο έδαφος παράχθηκε από Άγγλους εργάτες, ενώ το οργανοχλωριωμένο chlordane κυκλοφόρησε στην Αμερική και την Γερμανία. Στην περίοδο μεταξύ 1950 και 1955 παράγωγα ουρίας χρησιμοποιήθηκαν ως ζιζανιοκτόνα στην Αμερική, τα μυκητοκτόνα captan και clyodin εμφανίστηκαν, ενώ παρασκευάστηκε και το μαλάθειο. Μεταξύ 1955 και 1960 παρασκευάστηκαν νέα προϊόντα που περιελάμβαναν τις ζιζανιοκτόνες τριαζίνες και τα τεταρτοταγή αμμωνιακά ζιζανιοκτόνα. Τα dichlobenil, trifluralin, bromoxynil και το μυκητοκτόνο benomil άρχισαν να εφαρμόζονται στη γεωργία τη δεκαετία του 1960. Η συμβολή όλων των παραπάνω ουσιών στην προστασία της αγροτικής παραγωγής, γέννησε πολλές ελπίδες για τη λύση του προβλήματος της έλλειψης τροφής που αντιμετώπιζε η ανθρωπότητα λόγω της απότομης αύξησης του πληθυσμού της γης που είχε προηγηθεί (Γατρού, 2009).

Κατά τη διάρκεια των δεκαετιών 1970 - 1980 εμφανίστηκαν πολλές νέες ομάδες φυτοπροστατευτικών ουσιών. Η παρασκευή τους βασίστηκε σε μια πιο λεπτομερή κατανόηση των βιολογικών και βιοχημικών μηχανισμών και συχνά τα προϊόντα που ανήκουν σε αυτές είναι πιο δραστικά σε μικρότερες δόσεις σε σύγκριση με τα παλαιότερα φυτοφάρμακα. Έως το 1970 η χρήση των οργανοχλωριωμένων ήταν ιδιαίτερα διαδεδομένη, ενώ την ίδια περίοδο τέθηκαν σε κυκλοφορία τα πρώτα συνθετικά πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα. Μετά από παρατεταμένες έρευνες και πειράματα που αφορούσαν σε ένα μεγάλο εύρος χημικών ενώσεων με εντομοκτόνο δράση, οι οργανοφωσφορικοί εστέρες αποτέλεσαν την ομάδα η οποία εμφάνισε ικανοποιητική δραστικότητα, διάρκεια δράσης, τοξικότητα, μεγάλο εύρος δραστικότητας και ομαλής συμπεριφοράς στα φυτά. Αναμφίβολα, η σύγχρονη φυτοπροστασία θα ήταν αδιανόητη στις μέρες μας χωρίς την χρήση αυτών των ενώσεων. Ωστόσο, από τη δεκαετία του 1960 άρχισαν να προσδιορίζονται οι ανεπιθύμητες και επιζήμιες ιδιότητες των φυτοφαρμάκων της ομάδας των

*Κραββαρίτη Κ.- Φυτοπρ. Πρ. & Περιβ.*

οργανοχλωριωμένων υδρογονανθράκων (βιοσυσώρευση στο περιβάλλον, ανίχνευση στους ανθρώπινους ιστούς, κ.ά.). Τα μειονεκτήματα αυτά ανάγκασαν τους επιστήμονες να στραφούν σε άλλη κατεύθυνση και να δημιουργήσουν φυτοπροστατευτικές ουσίες με ηπιότερα τοξικολογικά χαρακτηριστικά. Έτσι, ως εναλλακτικές λύσεις προέκυψαν τα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα (Κοτρίκλα, 2002).

Ο περιορισμός και σε ορισμένες περιπτώσεις η εξαφάνιση ομάδων φυτικών και ζωικών οργανισμών, εξαιτίας της αλλόγοιστης χρήσης φυτοπροστατευτικών ουσιών, απασχολούν τους ειδικούς τις τελευταίες δεκαετίες, ενώ από ένα πλήθος επιστημονικών δημοσιευμάτων προκύπτει ότι ορισμένα γεωργικά φάρμακα μπορεί να προκαλέσουν βλάβες στην υγεία του ανθρώπου. Έτσι μερικά από τα πρώτα φυτοφάρμακα αποσύρονται από την κυκλοφορία στις σύγχρονες χώρες (εξακολουθούν όμως να κυκλοφορούν στις τριτοκοσμικές χώρες) (Ελευθεροχωρινός, 1996).

### *1.1.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ*

Ο αρκετά μεγάλος αριθμός των φυτοπροστατευτικών ουσιών, κατέστησε επιτακτική την ανάγκη κατάταξης τους σε διάφορες κατηγορίες. Η κατάταξή τους βασίζεται σε διάφορα κριτήρια, τα οποία παρατίθενται στη συνέχεια μαζί με τις αντίστοιχες κατηγορίες ταξινόμησης:

*Τρόπος εφαρμογής.* Ανάλογα με το πότε εφαρμόζονται διακρίνονται στις κατηγορίες :

- Προφυτευτικά,
- Προφυτρωτικά,
- Μεταφυτρωτικά.

*Τρόπος δράσης.* Ανάλογα με τη συμπεριφορά τους ως προς τα φυτά στα οποία εφαρμόζονται όπου διακρίνονται στις εξής κατηγορίες :

- Επιφανειακής ή προστατευτικής δράσης,
- Διεσδυτικής (τοπικής) δράσης,
- Διασυστημικής δράσης.

*Εκλεκτικότητα.* Αναφέρεται στο αν το φυτοπροστατευτικό προϊόν μπορεί να δράσει επιλεκτικά και να παρεμποδίσει ή να μειώσει την ανάπτυξη συγκεκριμένης καλλιέργειας χωρίς να βλάψει άλλα φυτά ή μικροοργανισμούς. Σε αυτή την περίπτωση χαρακτηρίζεται ως εκλεκτικό. Όταν συμβαίνει το αντίθετο και υπάρχουν δυσμενείς επιδράσεις και σε άλλους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς τότε χαρακτηρίζεται ως μη εκλεκτικό.

*Τοξική δράση.* Ανάλογα με το σύστημα το οποίο επηρεάζει το φυτοπροστατευτικό προϊόντος. Κατηγοριοποιούνται σε αναστολείς της φωτοσύνθεσης, της αναπνοής, της κυτταρικής διαίρεσης, της πρωτεινοσύνθεσης, κ.ά.

*Οργανισμός στόχος,* ανάλογα με τον οργανισμό τον οποίο στοχεύουν, χωρίζονται στις εξής κατηγορίες :

- Εντομοκτόνα (Insecticides),
- Ζιζανιοκτόνα (Herbicides),
- Μυκητοκτόνα (Fungicides),
- Ακαρεοκτόνα (Acaricides),
- Νηματωδοκτόνα (Nemadocides),
- Τρωκτικοκτόνα (Rodenticides).

*Χημική ομάδα.* Ανάλογα με την χημική ομάδα την οποία ανήκει το φυτοπροστατευτικό προϊόν, χωρίζονται στις εξής βασικές κατηγορίες (Corbet, 1974; Matolesy, 1988; Κοτρίκλα, 2002):

- Χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες,
- Οργανοφωσφορικοί εστέρες,
- Καρβαμιδικές και θειοκαρβαδιμικές ενώσεις,
- Τριαζίνες,
- Ουρίες,
- Ανιλίδια,
- Πυρεθρίνες,
- Διάφορες ανόργανες ενώσεις.

## 1.2 Η ΤΥΧΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Κατά την διάρκεια των τελευταίων 30 χρόνων ένας αυξανόμενος αριθμός ερευνητών έχει τεκμηριώσει την ύπαρξη υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στον αέρα και τα ατμοσφαιρικά κατακρημνίσματα, ως αποτέλεσμα της διαφυγής κατά την εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων (spray drift), εξάτμισης από τις επιφάνειες εφαρμογής και διάβρωσης του εδάφους από τον αέρα. Όταν τα γεωργικά φάρμακα εισέλθουν στην ατμόσφαιρα, μπορούν να μεταφερθούν με τη βοήθεια ρευμάτων αέρα συχνά σε μεγάλες αποστάσεις μακριά από τα σημεία εφαρμογής τους. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τα πολύ σταθερά οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα, τα οποία έχουν ανιχνευθεί ακόμα και σε απομονωμένες περιοχές όπως ο Βόρειος και ο Νότιος Πόλος. Επιπλέον μελέτες ιδιαίτερα κατά την τελευταία δεκαετία έχουν δείξει ότι το φαινόμενο της μεταφοράς γεωργικών φαρμάκων μέσω της ατμόσφαιρας, ισχύει τουλάχιστον σε τοπικό επίπεδο και για φάρμακα από άλλες χημικές ομάδες. Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα ανιχνεύθηκαν στην ατμόσφαιρα σε υψόμετρο 1930 m σε βουνά τη Sierra Nevada (ΗΠΑ), σε απόσταση 150 Km περίπου μακρύτερα από γεωργικές περιοχές (3), ενώ τριαζίνες βρέθηκαν στη βροχή στο νησί Heligoland (Βόρειος Θάλασσα), το οποίο βρίσκεται 50Km μακριά από την κοντινότερη ακτή. Μέχρι σήμερα περισσότερες από 40 δραστικές ουσίες γεωργικών φαρμάκων έχουν ανιχνευθεί στη βροχή στις ΗΠΑ, στην Ευρώπη και την Αφρική. Στις έρευνες αυτές τα ζιζανιοκτόνα (τριαζίνες και ακετανιλίδια) ήταν τα πιο συχνά ανιχνευόμενα φάρμακα. Μέγιστες συγκεντρώσεις που έχουν αναφερθεί στη βροχή είναι 40  $\mu\text{g/L}$  για την atrazine (ΗΠΑ) και 430  $\mu\text{g/L}$  για το 2,4-D (Νότιος Αφρική) ([www.minagric.gr](http://www.minagric.gr)).

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των φυτοπροστατευτικών ουσιών καθορίζουν την συμπεριφορά τους στο περιβάλλον. Βασικές τέτοιες ιδιότητες είναι :

- η υδατοδιαλυτότητα,
- η τάση ατμών.
- η σταθερά του Henry,
- ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης – νερού,
- ο συντελεστής προσρόφησης στην οργανική ύλη του εδάφους,
- η σταθερά διάστασης στο νερό,
- ο ρυθμός διάστασης.



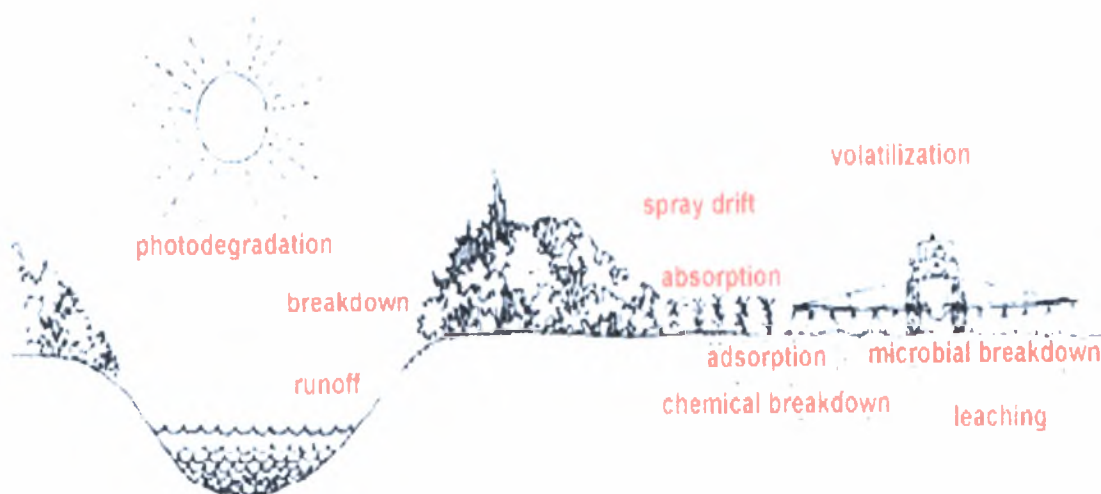
Για κάθε φυσικοχημική ιδιότητα, παρατηρείται συχνά η αναφορά διαφορετικών τιμών, που μπορεί να εκτείνονται σε αρκετές τάξεις μεγέθους (Hornsbony et al., 1998, Mackay et al., 2000). Η υδατοδιαλυτότητα μιας ένωσης είναι ίσως η σημαντικότερη ιδιότητα για την εκτίμηση της τύχης της στο περιβάλλον. Ουσίες με υψηλή υδατοδιαλυτότητα παραμένουν στο νερό και δεν προσροφώνται στο έδαφος, το ίζημα ή τους οργανισμούς έχουν μικρότερη πιθανότητα εξάτμισης (ανάλογα με την σταθερά του νόμου του Henry), μεγαλύτερη πιθανότητα διάσπασης αλλά και ρυθμούς έκπλυσης από το χώμα (Howard, 1990).

### *1.2.1 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ*

Η τύχη των φυτοπροστατευτικών προϊόντων (ΦΠ) στο έδαφος, επηρεάζεται επίσης από έναν αριθμό διεργασιών, συχνά σύνθετων και δυναμικών, οι οποίες είναι φυσικές, χημικές και βιολογικές (Εικόνα 1.1). Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται (Walker, 1994):

- η χημική και βιολογική αποδόμηση (chemical and microbial degradation),
- η προσρόφηση/εκρόφηση (adsorption/desorption),
- η εξάτμιση/εξάχνωση (volatilization),
- η έκπλυση (leaching),
- η επιφανειακή απορροή (surface run-off),
- η οριζόντια ενδορροή (lateral drainage),
- η πρόσληψη από τα φυτά (absorption) και
- η φωτοδιάσπαση (photodegradation).

Η προσρόφηση, η αποδόμηση και η έκπλυση είναι ίσως οι σημαντικότερες από τις παραπάνω διεργασίες, καθώς σε συνδυασμό με τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των μορίων (βαθμός ιονισμού, υδατοδιαλυτότητα, πτητικότητα και είδος φορτίου), τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους, το είδος της γεωργικής πρακτικής και το μικροκλίμα της εκάστοτε περιοχής, καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την τύχη των φυτοπροστατευτικών ουσιών στο περιβάλλον (Carter, 2000).



Εικόνα 1.1 Η τύχη των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο έδαφος (www.agf.gov.bc.ca).

Ο χρόνος ζωής των φυτοπροστατευτικών ουσιών στο έδαφος, επηρεάζεται από μια σειρά παραγόντων, οι οποίοι εμπίπτουν σε τρεις κατηγορίες.

*α. Εδαφικοί παράγοντες*

Στους εδαφικούς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται η σύνθεση του εδάφους, οι χημικές ιδιότητες του εδάφους και η μικροβιακή δραστηριότητα του εδάφους. Όσον αφορά στη σύνθεση του εδάφους αυτό που έχει σημασία είναι τόσο η δομή του όσο και η περιεκτικότητα σε οργανική ουσία. Από τις χημικές ιδιότητες ενδιαφέρον παρουσιάζει το pH ενώ από μικροβιακή άποψη εξετάζεται το πλήθος και τα είδη των μικροοργανισμών.

Η σύνθεση του εδάφους επηρεάζει την υπολειμματικότητα των φυτοπροστατευτικών ουσιών μέσω της προσρόφησης, της έκπλυσης και της εξάτμισης. Γενικά, εδάφη με υψηλά ποσοστά αργίλου ή οργανικής ουσίας, ή και των δύο, εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα προσρόφησης των μορίων των ζιζανιοκτόνων στα εδαφικά κolloειδή και κατά συνέπεια μειωμένη έκπλυση και εξάτμιση. Επιπλέον, η αυξημένη προσρόφηση ελαττώνει την αρχική πρόσληψη των ουσιών από τα φυτά, ενώ ευαίσθητες καλλιέργειες της επόμενης περιόδου πιθανόν να δεχτούν επιδράσεις από τα προσροφημένα μόρια.

Το εδαφικό pH επηρεάζει την υπολειμματικότητα των ΦΠ, κυρίως των ασθενών βάσεων και των ασθενών οξέων, καθώς ο ρυθμός της χημικής τους αποδόμησης ελαττώνεται σημαντικά σε  $pH > 7$ , ενώ αυξάνεται η προσρόφησή τους. Σε  $pH < 6$  η

χημική αποδόμηση των δύο παραπάνω ομάδων είναι ταχεία. Αντίθετα, σε σχετικά χαμηλά pH αυξάνεται η υπολειμματική δράση ορισμένων ιμιδαζολινών.

*Η μικροβιακή δραστηριότητα* αποτελεί την πιο σημαντική διεργασία αποικοδόμησης των φυτοπροστατευτικών ουσιών. Τα είδη, καθώς και οι σχετικοί πληθυσμοί των μικροοργανισμών καθορίζουν το ρυθμό αποικοδόμησης. Ωστόσο, οι μικροοργανισμοί απαιτούν την ύπαρξη ορισμένων συνθηκών, έτσι ώστε να αναπτυχθούν και να παρουσιάσουν δραστηριότητα ως προς τα ΦΠ. Η υγρασία, η θερμοκρασία, το pH, το οξυγόνο και τα θρεπτικά στοιχεία αποτελούν τους παράγοντες που επηρεάζουν μικροβιακή δραστηριότητα (Curran, 1998).

### *β. Κλιματικοί παράγοντες*

Οι κλιματικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη διάρκεια ζωής των φυτοπροστατευτικών ουσιών είναι η βροχόπτωση, η υγρασία, η θερμοκρασία και το φως.

*Η βροχόπτωση* εκτός από την υγρασία του εδάφους, επηρεάζει και την κατακόρυφη μετακίνηση των ουσιών, η οποία είναι καθοριστικής σημασίας για την υπολειμματική τους διάρκεια. Η υπερβολική βροχόπτωση αυξάνει το χρόνο παραμονής αυτών που εκπλύνονται εύκολα επειδή τις μεταφέρει στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα όπου ο ρυθμός διάσπασης είναι βραδύτερος (Harris et al., 1969).

Όπως προαναφέρθηκε αύξηση της υγρασίας και της θερμοκρασίας επιταχύνει τη διάσπαση των ουσιών, καθώς αυξάνεται ο ρυθμός της χημικής και μικροβιακής αποικοδόμησης, ενώ ξηρές και ψυχρές συνθήκες την επιβραδύνουν (Torp et al., 1997).

Το φως αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα αποικοδόμησης. Η φωτοδιάσπαση έχει αναφερθεί για αρκετά φυτοπροστατευτικά προϊόντα, παρόλο που για ορισμένα με μεγάλη υπολειμματική διάρκεια οι απώλειες λόγω φωτοαποσύνθεσης είναι αμελητέες. Εξαιρέση αποτελούν οι δινιτροανιλίνες οι οποίες αποικοδομούνται από το φως αν παραμείνουν στην επιφάνεια του εδάφους για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς βροχόπτωση. Για αυτό το λόγο απαιτείται η ενσωμάτωσή τους κατά την εφαρμογή (Curran, 1998).

### *γ. Ιδιότητες φυτοπροστατευτικού προϊόντος*

Οι χημικές ιδιότητες των φυτοπροστατευτικών ουσιών επηρεάζουν την υπολειμματικότητα τους. Οι ιδιότητες αυτές είναι η υδατοδιαλυτότητα, η πτητικότητα και η χημική δομή της ουσίας.

*Η υδατοδιαλυτότητα* σχετίζεται με την έκπλυση, η οποία συμβαίνει όταν μια ουσία διαλύεται στο νερό και μετακινείται προς τα κάτω στο έδαφος. Έτσι, όσο πιο υδατοδιαλυτή είναι μια ουσία, τόσο πιο εύκολα εκπλύνεται.

*Η πτητικότητα* μιας ουσίας καθορίζει την ικανότητά της να εξατμίζεται, δηλαδή την ικανότητά της να μετατρέπεται από υγρό ή στερεό σε αέριο. Οι περισσότερες πτητικές ουσίες αποδομούνται πιο εύκολα σε σχέση με τις λιγότερο πτητικές. Η εξατμωση αυξάνεται όταν αυξάνεται η θερμοκρασία και η υγρασία.

*Η χημική δομή* μιας ουσίας υποδεικνύει το πώς αυτή θα αποικοδομηθεί στο έδαφος. Πιο συγκεκριμένα, η χημική δομή καθορίζει την ευαισθησία της ουσίας στη χημική αλλά και στη μικροβιακή αποικοδόμηση.

Άλλες ιδιότητες που επηρεάζουν την αποικοδόμηση είναι η δόση και η μέθοδος εφαρμογής καθώς και η παρουσία άλλου φυτοπροστατευτικού προϊόντος, η οποία μπορεί να ευνοεί ή όχι την παρουσία μικροοργανισμών στο έδαφος (Curtan, 1998).

### *1.2.2 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΣΤΑ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΝΕΡΑ*

Η επιφανειακή απορροή, τα απόβλητα βιομηχανιών, οικισμών, κτηνοτροφικών εγκαταστάσεων, οι διάφορες τυχαιές εισροές εξαιτίας ατυχημάτων, η προγραμματισμένη απευθείας εφαρμογή σε αυτή καθεαυτή την υδατοσυλλογή, η μεταφορά με τον άνεμο, την τροφική αλυσίδα, κ.ά. είναι ορισμένες από τις διεργασίες στις οποίες μπορεί να οφείλεται η παρουσία φυτοπροστατευτικών ουσιών στη θάλασσα, ποταμούς, λίμνες και άλλες υδατοσυλλογές. Η επιφανειακή απορροή θεωρείται ίσως η σημαντικότερη διεργασία μέσω της οποίας ρυπαίνονται τα επιφανειακά νερά. Σημαντική θεωρείται επίσης και η άμεση εισροή στις υδατοσυλλογές ανεπεξέργαστων αποβλήτων βιομηχανιών παρασκευής ή και τυποποίησης φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Η απευθείας εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων σε υδάτινους όγκους πραγματοποιείται με σκοπό την αντιμετώπιση υδρόβιων ζιζανίων και εντόμων για γεωργικούς σκοπούς (για παράδειγμα σε ορυζώνες, αρδευτικά και στραγγιστικά δίκτυα), για ναυσιπλοϊκούς σκοπούς (για παράδειγμα απομάκρυνση υδρόβιων ζιζανίων από πλωτούς ποταμούς) και για υγειονομικούς σκοπούς (για παράδειγμα αντιμετώπιση κουνουπιών). Τα οικιστικά απόβλητα, αν και περιέχουν χαμηλές συγκεντρώσεις φυτοπροστατευτικών ουσιών από οικιακή χρήση, μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να αποτελούν αιτία ανησυχίας λόγω του μεγάλου συνολικού

τους όγκου. Οι υπόλοιπες πηγές ρυπάνσεως που προαναφέρθηκαν είναι συνήθως μικρής σημασίας.

Μία φυτοπροστατευτική ουσία ενδέχεται να ακολουθήσει μια από τις εξής πορείες πριν καταλήξει τελικά στα επιφανειακά νερά:

- να εισέλθει στη ατμόσφαιρα λόγω εξατμίσεως,
- να παραμείνει στο νερό σε διάλυση ή αιώρηση,
- να εισέλθει στην τροφική αλυσίδα,
- να κατακρημνιστεί αποτελώντας έτσι μέρος του ιζήματος του πυθμένα (η φυτοπροστατευτική ουσία που υπάρχει στα ιζήματα του πυθμένα, από νεκρούς φυτικούς και άλλους οργανισμούς που έχουν προσλάβει την ουσία από το νερό).

Συχνά παρατηρείται ότι η συγκέντρωση μιας φυτοπροστατευτικής ουσίας στα αιωρούμενα σωματίδια και στα ιζήματα των πυθμένων των υδατοσυλλογών είναι υψηλότερη από την παρατηρούμενη συγκέντρωση στο νερό. Επιπλέον, η συσσώρευση μιας φυτοπροστατευτικής ουσίας στα ιζήματα του πυθμένα επηρεάζει καίρια τη συγκέντρωσή της στο υπερκείμενο νερό. Αναμενόμενο είναι έπειτα από την πάροδο αρκετού χρόνου από την είσοδο ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος σε έναν υδάτινο όγκο, να επέλθει μια ισορροπία ανάμεσα στη συγκέντρωση που υπάρχει στο ιζήμα (προσροφημένη συγκέντρωση) και αυτής που υπάρχει στο υπερκείμενο νερό.

Οι επιδράσεις των διαφόρων γεωργικών φαρμάκων και κυρίως των οργανοχλωριωμένων ουσιών (όπως το DDT) στους υδρόβιους οργανισμούς, είναι πολυάριθμες. Η βιομεγέθυνση, καθώς και η μεγάλη μείωση ζωικών πληθυσμών λόγω άμεσης τοξικότητας αλλά και λόγω έλλειψης ή και μείωσης της τροφής τους, είναι φαινόμενα που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον (Τσιούρης, 2001).

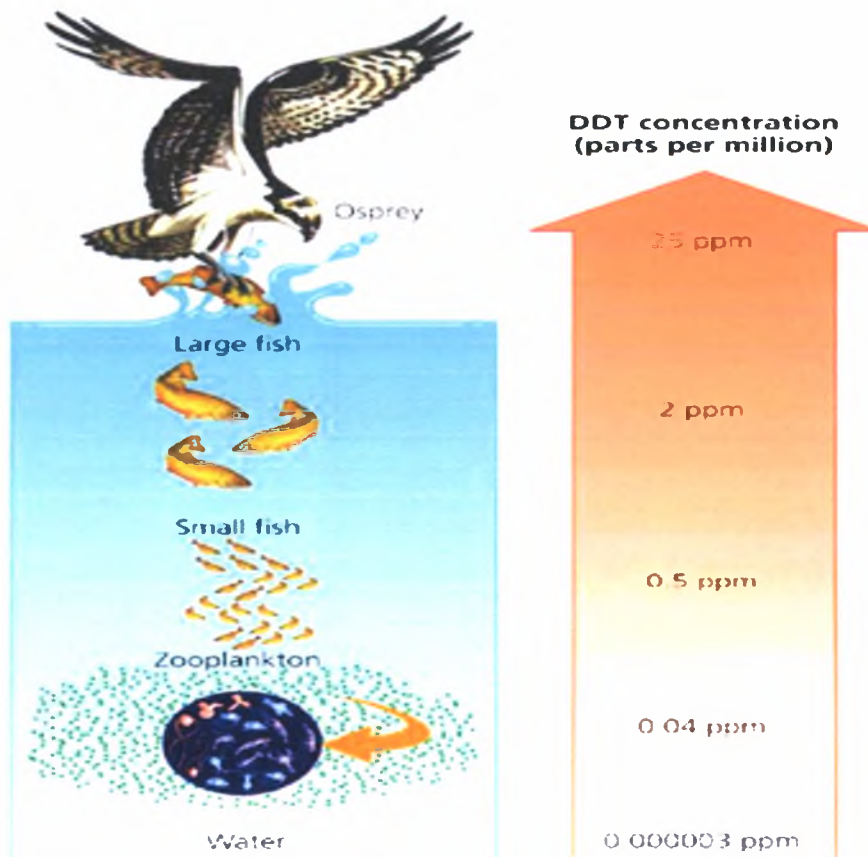
Η ρύπανση του πόσιμου νερού με φυτοπροστατευτικές ουσίες, η βιοσυγκέντρωση, η βιοσυσσώρευση και η βιομεγέθυνση αποτελούν ορισμένους μεγάλης σημασίας κινδύνους εξαιτίας της επιβάρυνσης των επιφανειακών αλλά και των υπόγειων νερών με συγκεντρώσεις φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Ως *βιοσυγκέντρωση (bioconcentration)* ορίζεται η συγκέντρωση μίας ουσίας σε έναν οργανισμό (συγκέντρωση στους ιστούς του), σε ποσότητες μεγαλύτερες από ότι στο περιβάλλον του, κυρίως παθητικά. Πιο συγκεκριμένα, το φυτοπροστατευτικό προϊόν από το νερό όπου η συγκέντρωση του μπορεί να είναι πολύ μικρή και ακίνδυνη

για τις διάφορες μορφές ζωής, περνά στο φυτοπλαγκτόν, στο ζωοπλαγκτόν, στα ψάρια, στα πτηνά και τελικά με την τροφή στον άνθρωπο.

Η διαδικασία της *βιοσυσσωρευσης* (*bioconcentration*) περιλαμβάνει τη βιοσυγκέντρωση αλλά και τις ουσίες που προσλαμβάνονται δια μέσου της τροφικής αλυσίδας.

Ως *βιομεγέθυνση* (*biomagnification*) ορίζεται η διεργασία κατά την οποία μια ουσία αυξάνεται σε συγκέντρωση καθώς μεταφέρεται από έναν οργανισμό σε έναν άλλο στις τροφικές αλυσίδες ή δίκτυα. Η διαδοχική αυτή μεταφορά σε ολοένα και υψηλότερο τροφικό επίπεδο έχει ως αποτέλεσμα τη βιοσυγκέντρωση στους οργανισμούς των πρώτων τροφικών επιπέδων και τη βιομεγέθυνση στα ανώτερα (Εικόνα 1.2). Η βιομεγέθυνση αυτή, με την προϋπόθεση ότι η ουσία είναι λιπόφιλη, μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να είναι μέχρι και ένα εκατομμύριο φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση η οποία είναι πολύ τοξική σε κάθε μορφή ζωής (Shaw and Chadwick, 1998, Λόλας, 2003).



**Εικόνα 1.2** Απεικόνιση βιομεγέθυνσης του οργανοχλωρωμένου εντομοκτόνου DDT.

### 1.2.3 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΣΤΑ ΥΠΟΓΕΙΑ ΝΕΡΑ

Ο κίνδυνος ρύπανσης του υπόγειου υδροφορέα με συγκεντρώσεις φυτοπροστατευτικών ουσιών εξαρτάται από τις ιδιότητες των ουσιών, τον τύπο του εδάφους στο οποίο εφαρμόζονται και το ύψος της βροχής και του νερού άρδευσης. Οι πολύ υδρόφοβες ουσίες, όπως οι μη πτητικοί χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες τείνουν να συγκεντρώνονται στο επιφανειακό στρώμα σχεδόν όλων των τύπων εδαφών, ακόμα και των αμμωδών με μεγάλη διαπερατότητα και χαμηλή συγκέντρωση οργανικής ουσίας. Για να παρατηρηθεί μετακίνηση μιας ουσίας προς τα βαθύτερα εδαφικά στρώματα και προς τα υπόγεια νερά θα πρέπει να είναι υδατοδιαλυτή, να μην είναι πτητική, να μη προσροφάται ισχυρά από τα κολλοειδή του εδάφους και να μην αποικοδομείται βιοτικά και αβιοτικά σε μεγάλο βαθμό (Τσιούρης, 2001).

### 1.3 ΟΡΘΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ - ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΝΕΡΩΝ

Η ανάγκη για παραγωγή τροφίμων πρέπει να βρίσκεται σε ισορροπία με την ανάγκη για την προστασία του περιβάλλοντος. Η προστασία των νερών αποτελεί υψηλή προτεραιότητα στην πολιτική της Ε.Ε. Προτού κάποιο φυτοπροστατευτικό προϊόν εισαχθεί στην αγορά, πρέπει να αποδειχθεί η ασφάλεια και αποτελεσματικότητά του ως προς τις απαιτήσεις Ευρωπαϊκών και Εθνικών Αρχών. Οι εταιρείες, εκτός των άλλων, στοχεύουν στην παραγωγή προϊόντων που υπολείμματά τους δεν εμφανίζονται στο έδαφος ή στα επιφανειακά νερά όταν τα προϊόντα χρησιμοποιούνται σωστά από τους αγρότες.

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι ασφαλή για τα νερά όταν χρησιμοποιούνται σωστά. Έστω και μερικές σταγόνες σκευάσματος μπορεί να είναι η αιτία για την υπέρβαση των θεσπισμένων ανωτάτων ορίων υπολειμμάτων στο πόσιμο νερό. Σχεδόν το 50-70% της ρύπανσης των επιφανειακών νερών από τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα προέρχεται από πηγές εισόδου και μπορεί να αποτραπεί. Ως πηγές εισόδου θεωρούνται κυρίως οι απώλειες κατά την παρασκευή του ψεκαστικού υγρού, τον καθαρισμό των μηχανημάτων και τη διαχείριση καταλοίπων φυτοπροστατευτικών προϊόντων, ενώ οι απώλειες αυτές μπορούν να αποφευχθούν με την κατάλληλη υποδομή και τα σωστά μέτρα. Ο σωστός υπολογισμός της ποσότητας

του ψεκαστικού υγρού και του φυτοπροστατευτικού προϊόντος, έτσι ώστε να αποφευχθεί η περίσσεια του ψεκαστικού υγρού, είναι απαραίτητη. Όσον αφορά στον τεχνολογικό εξοπλισμό, πρέπει να είναι σωστά ρυθμισμένος και ελεγχμένος για την ύπαρξη τυχόν διαρροών. Σημαντικό σημείο είναι η απαγόρευση σύνδεσης του ψεκαστικού υγρού με την παροχή του νερού, όπως επίσης και η αποφυγή υπερχειλίσης του βυτίου. Κατά τη διαδικασία της παρασκευής του ψεκαστικού διαλύματος, εάν αυτή γίνει στο αγρόκτημα, τότε είναι αναγκαία η ύπαρξη προληπτικών μέτρων, όπως η διαθεσιμότητα πλαστικού δίσκου συλλογής πιτσιλιών και απορροφητικών υλικών για την απομάκρυνση διαρροών. Η προστασία των νερών μπορεί επίσης να επιτευχθεί όταν δεν ψεκάζονται απευθείας επιφάνειες νερού ή σε περιοχές που γειτνιάζουν με πηγές νερού. Μάλιστα, όταν ο κίνδυνος απορροής είναι μεγάλος ή όταν υπάρχει πλημμυρισμένο έδαφος πρέπει να αποφεύγεται ο ψεκασμός. Επιπλέον, κατά τη σχολαστική καθαριότητα όλου του εξοπλισμού, η ύπαρξη τρεχούμενου νερού είναι αναγκαία. Τέλος, τα ανεπιθύμητα αποθέματα δεν θα πρέπει σε καμία περίπτωση να ρίχνονται σε αυλάκια ή να θάβονται, ενώ τα υγρά κατάλοιπα δεν πρέπει να πετάγονται σε σημεία όπου μπορεί να καταλήξουν σε πηγές νερού.

Με τη βέλτιστη πρακτική των χρηστών, η ρύπανση των νερών μπορεί να μειωθεί κατά τη διάρκεια όλων των διαδικασιών μεταφοράς, αποθήκευσης, διαχείρισης πριν, κατά τη διάρκεια και μετά τον ψεκασμό, όπως και κατά την διαχείριση καταλοίπων φυτοπροστατευτικών προϊόντων ([www.esyf.gr](http://www.esyf.gr)).

Η θέσπιση νόμων και η εντατικοποίηση των ελέγχων που αφορούν στην περιβαλλοντική ρύπανση, συνδέονται άμεσα τα τελευταία τριάντα χρόνια με την αφύπνιση των πολιτών σε σχέση με τα περιβαλλοντικά θέματα. Ειδικότερα, έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στον τρόπο χρήσης των συνθετικών χημικών ουσιών, στις οποίες περιλαμβάνονται και τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, αλλά και στην ικανότητα τους να ρυπαίνουν τον υδροφόρο ορίζοντα αλλά και το έδαφος. Η χημική ρύπανση χαρακτηρίζεται συνήθως ως *σημειακή ρύπανση* (Point-Source Pollution) και ως *μη σημειακή ρύπανση* (Non Point-Source Pollution). Η σημειακή ρύπανση παρατηρείται σε μια συγκεκριμένη, γνωστή περιοχή και οφείλεται σε ατυχήματα, απόνερα από πλύσιμο δοχείων, διαρροές σε αποθήκες ΦΠ και σε μη ορθή διαχείριση αδιάθετων ποσοτήτων ή κενών δοχείων. Η μη σημειακή ρύπανση παρατηρείται σε μεγάλο εύρος περιοχή και οφείλεται σε διασπορά στον αέρα των φυτοπροστατευτικών ουσιών κατά τον ψεκασμό (spray drift), σε επιφανειακή απορροή και σε έκπλυσή τους στα υπόγεια νερά. Η περιβαλλοντική τύχη τόσο των εγκεκριμένων όσο και των νέων ΦΠ αποτελεί



αντικείμενο έρευνας σε ακαδημαϊκό, βιομηχανικό, εθνικό και διεθνές επίπεδο, καθώς κρίνεται αναγκαία η άντληση πληροφοριών για την κινητικότητα τους στο έδαφος, το ρυθμό, την οδό αποδόμησής τους και τους παράγοντες που επηρεάζουν όλα τα παραπάνω (Roberts, 1990, Μενκίσογλου-Σπυρούδη, 2005).

#### 1.4 NOMΟΘΕΣΙΑ

Σήμερα, τα όρια ποιότητας νερού για τα φυτοφάρμακα θεσπίζονται από τη νομοθεσία κάθε κράτους μέλους και την Κοινοτική νομοθεσία. Οι Κανονισμοί Πόσιμου Νερού (HMSO, 2000) με την Οδηγία Πόσιμου Νερού ΕΚ (98/83/EC) θέτουν ως την ελάχιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση στο νερό τα 0.1 µg/L. Μέχρι τον Δεκέμβριο του 2003, το όριο συγκέντρωσης που είχε τεθεί για ορισμένες κατηγορίες φυτοφαρμάκων συμπεριλαμβανομένου του aldrin, του dieldrin και του heptachlor ανερχόταν στα 30 ng/L (Lapworth and Gooddy, 2005). Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί σε δώδεκα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που έχουν χαρακτηριστεί ως «Βρώμικη Δωδεκάδα» (Dirty Dozen), κάποια από τα οποία έχουν απαγορευτεί στην Ελλάδα και τα οποία παρατίθενται παρακάτω (Ιατρού, 2009):

- DDT: Εντομοκτόνο. Απαγόρευση χρήσης στην Ελλάδα το 1972. Προκαλεί καρκίνο και βλάβες στο νευρικό σύστημα. Παρουσιάζει μεγάλη υπολειμματικότητα στο έδαφος.
- Lindane: Εντομοκτόνο. Περιορισμένη χρήση στην Ελλάδα. Απαγορευμένο σε πολλές χώρες. Παρουσιάζει μεγάλη υπολλειμματικότητα.
- Drins (Dieldrin, Aldrin): Εντομοκτόνα. Απαγόρευση χρήσης τους στην Ελλάδα το 1972. προκαλούν καρκίνο και σοβαρές βλάβες στον εγκέφαλο.
- 2,4,5-T: Ζιζανιοκτόνο. Απαγορευμένο στην Ελλάδα. Περιέχει προσμίξεις 2,3,7,8-τετραχλωροδιοξίνης που είναι ισχυρά καρκινογόνα ουσία.
- Heptachlor: Εντομοκτόνο. Απαγόρευση χρήση στην Ελλάδα. Καρκινογόνο.
- Paraquat: Ζιζανιοκτόνο. Επιτρέπεται η χρήση του στην Ελλάδα. Απαγορευμένο σε πολλές χώρες. Ισχυρά τοξικό για όλα σχεδόν τα ζώα και τον άνθρωπο.
- Pentachlorophenol: Εντομοκτόνο. Επιτρέπεται η χρήση του στην Ελλάδα στην συντήρηση ξύλων. Προκαλεί βλάβες στο συκώτι και το νευρικό σύστημα.
- Camphechlor: Εντομοκτόνο. Απαγορευμένο στην Ελλάδα. Σε πολλές χώρες έχει αντικαταστήσει το DDT, όμως έχει τις ίδιες παρενέργειες με αυτό.

- Parathion: Εντομοκτόνο. Επιτρέπεται η χρήση του στην Ελλάδα. Ισχυρό καρκινογόνο.
- Ethylene Dibromide: Μυκητοκτόνο. Επιτρέπεται η χρήση του στην Ελλάδα. Ισχυρό καρκινογόνο.
- Chlodimeform: Εντομοκτόνο. Απαγορευμένο στην Ελλάδα. Ισχυρά τοξικό. Καρκινογόνο. Προκαλεί βλάβες στο στομάχι.

### 1.5 ΤΡΙΑΖΟΛΙΚΑ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

Τα τριαζολικά μυκητοκτόνα (3 άτομα αζώτου στις θέσεις 1, 2 και 4) ανήκουν στην κατηγορία των διασυστηματικών μυκητοκτόνων, τα οποία χαρακτηρίζονται από το γεγονός ότι προσλαμβάνονται από το φυτό και μετακινούνται στο εσωτερικό αυτού. Η μετακίνηση των τριαζολίων, όπως και των υπόλοιπων γεωργικών φαρμάκων γίνεται είτε αποπλαστικά είτε συμπλαστικά. Η αποπλαστική κίνηση γίνεται διαμέσου των νεκρών κυττάρων του ξυλώματος των φυτών και αποτελεί συνήθως μαζική ροή από το ριζικό σύστημα των φυτών με το ρεύμα της διαπνοής προς τα υπέργεια τμήματα του φυτού. Αντίθετα, κατά τη συμπλαστική κίνηση (κίνηση προς τα κάτω) τα τριαζόλια μετακινούνται με ενεργή μεταφορά διαμέσου του πρωτοπλάσματος των φυτικών κυττάρων. Η ανακάλυψη των διασυστηματικών μυκητοκτόνων αύξησε σημαντικά τις δυνατότητες για αποτελεσματική αντιμετώπιση των μυκητολογικών ασθενειών. Τα διασυστηματικά μυκητοκτόνα και κατά συνέπεια τα τριαζόλια πλεονεκτούν καθώς:

- εφαρμόζονται τοπικά στα φυτά, χωρίς να είναι απαραίτητος ο καθολικός ψεκασμός του φυτού, αλλά παρέχουν προστασία σε ολόκληρο το φυτό και στη νεαρή βλάστηση που προκύπτει μετά τον ψεκασμό, γεγονός που επιτρέπει την εφαρμογή μικρότερων δόσεων και μειώνοντας τον κίνδυνο επιβάρυνσης του περιβάλλοντος.
- έχουν και θεραπευτική δράση καθώς μπορούν να αναστείλουν και να θεραπεύσουν ήδη εγκατεστημένες μυκητολογικές ασθένειες,
- παρέχουν εξειδικευμένη δράση σε συγκεκριμένα παθογόνα (η εξειδικευμένη δράση οδηγεί βέβαια στην εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών μυκήτων).

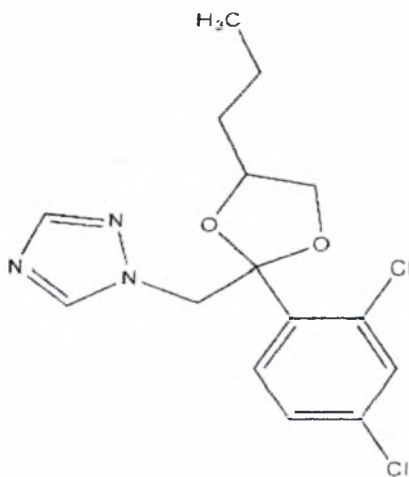
Τα τριαζόλια ως προς το μηχανισμό δράσης τους κατηγοριοποιούνται στην ομάδα των παρεμποδιστών σύνθεσης της εργοστερόλης και πιο συγκεκριμένα στους

αναστολείς της C<sup>14</sup> απομεθυλάσης (SBIs I). Οι SBIs I παρεμποδίζουν την απομεθυλίωση του C<sup>14</sup> στο μόριο της λανοστερόλης (πρόδρομης ουσίας της εργοστερόλης) (Καρπούζας, 2003).

Η παρεμπόδιση της σύνθεσης της εργοστερόλης η οποία (όπως όλες οι στερόλες) έχει βασικό ρόλο στη δομική σταθεροποίηση των κυτταρικών μεμβρανών των μυκήτων, έχει ως αποτέλεσμα την αντιμετώπιση των μυκητολογικών ασθενειών, καθώς, όχι μόνο επηρεάζεται η φυσική σταθερότητα και ρευστότητα των μεμβρανών αλλά και η λειτουργικότητα των διαφόρων ενζυμικών συστημάτων που συνδέονται με τις κυτταρικές μεμβράνες.

Ορισμένα από τα βασικά μέλη της ομάδας των τριαζολικών μυκητοκτόνων είναι οι κετάλες propiconazole και etaconazole, καθώς και τα: triadimefon, bitertanol, diclobutrazole, κ.ά (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991).

### 1.5.1 PROPICONAZOLE



**Chemical Name:** propiconazole

**Molecular Formula:** C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**IUPAC name:** 1-[[2-(2,4-dichlorophenyl)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-yl]methyl]-1H-1,2,4-triazole

Πίνακας 1.1 Φυσικές ιδιότητες του propiconazole (www.fao.org)

ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ PROPICONAZOLE	
Μοριακό βάρος	342,2 g mol <sup>-1</sup>
Σημείο βρασμού	180°C
Τάση ατμών	0.056 mPa (25 °C)
Συντελεστής κατανομής οκτανόλης / νερού	Log $K_{ow}$ = 3.72 at pH 6.6 at 25 °C
Υδατοδιαλυτότητα	100 ppm (mg/L) (20 °C)
Διαλυτότητα σε άλλους διαλύτες	Μεθανόλη, βενζένιο, ακετόνη, χλωροφόρμιο, αιθέρας, εξάνιο

Το propiconazole παρασκευάστηκε για πρώτη φορά το 1979 στο Βέλγιο. Είναι ένα διασυστηματικό φυλλικό μυκητοκτόνο με ευρύ φάσμα δράσης. Έχει προστατευτική, θεραπευτική και συστηματική δράση. Χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση μυκητολογικών ασθενειών στο καλαμπόκι, στο ρύζι, στα μανιτάρια, στα αμύγδαλα, στα φιστίκια, στο σόργο, στη βρώμη, στα βερίκοκα, στα ροδάκινα, στα νεκταρίνια, στα δαμάσκηνα, κ.ά. Στα σιτηρά χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση μυλητολογικών ασθενειών που οφείλονται στα είδη *Erysiphe graminis*, *Leptosphaeria nodorum*, *Pseudocerosporella herpotrichoides*, *Puccinia spp.*, *Pyrenophora teres*, *Rhynchosporium secalis*, and *Septoria spp.* Η ουσία τυποποιείται ως γαλακτοποιήσιμο συμπύκνωμα ή βρέξιμη σκόνη. Επίσης, τυποποιείται μαζί με άλλες φυτοπροστατευτικές ουσίες.

Ο τρόπος δράσης του propiconazole, ως τριαζόλη, βασίζεται στην απομεθυλίωση του C14 κατά τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης, η οποία είναι βασική στερόλη στο σχηματισμό της κυτταρικής μεμβράνης των μυκήτων. Η παρεμπόδιση παραγωγής της εργοστερόλης καθυστερεί ή αναστέλλει την ανάπτυξη του μύκητα, προλαμβάνοντας αποτελεσματικά την περεταίρω μυκητολογική προσβολή του φυτικού ιστού. Για το λόγο αυτό το propiconazole θεωρείται περισσότερο μυκητοστατικό ή αναστολέας ανάπτυξης των μυκήτων, παρά μυκητοκτόνο (extoxnet.orst.edu).

Το propiconazole (Technical) είναι υγρό άοσμο, κίτρινου χρώματος. Είναι μέτριας τοξικότητας: η δόση οξείας τοξικότητας διά στόματος στα ποντίκια είναι LD<sub>50</sub>=1500 mg/kg. Όσον αφορά στη μακρόχρονη έκθεση του ανθρώπου στην ουσία δεν υπάρχουν στοιχεία. Ωστόσο, βάσει στοιχείων ερευνών σε τρωκτικά, έχει κατηγοριοποιηθεί από την EPA (US Environmental Protection Agency) ως πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο (Group C). Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει συμπεριλάβει το propiconazole στη

λίστα (κανονισμός EEC/414/91) με τις έμμονες και πιθανώς τοξικές ουσίες στα επιφανειακά νερά, για τις οποίες απαιτούνται επιπλέον στοιχεία αναφορικά με την τύχη τους στο περιβάλλον. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία ο χρόνος ημίσειας ζωής σε αεριζόμενα εδάφη είναι 40-70 ημέρες, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η βιοαποδόμηση της ουσίας είναι σχετικά αργή διαδικασία. Στα επιφανειακά νερά, ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι μικρότερος, υποδεικνύοντας την πιθανή φωτοχημική αποδόμηση της ουσίας (Vialaton et al., 2001).

Σε μελέτες χρόνιας τοξικότητας σε ποντίκια, οι οποίες διήρκησαν 2 χρόνια το NOEL (no-effect-level) προσδιορίστηκε στα 100mg/L, ενώ σε παρόμοιες μελέτες σε αρουραίους το NOEL προσδιορίστηκε ίσο με 250mg/L. Βάσει μελετών χρόνιας τοξικότητας η RfD (Reference Dose) του propiconazole προσδιορίστηκε από την EPA στα 0.013 mg/kg/day. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι από την έκθεση ποντικών σε διάφορες δόσεις της ουσίας δεν προέκυψαν ενδείξεις για τερατογένεση, μετάλλαξη ή καρκινογένεση, ωστόσο έχει θεσπιστεί η RfD για τον άνθρωπο (0.013 mg/kg/day) έτσι ώστε να αποφεύγεται οποιαδήποτε επίδραση της χρόνιας έκθεσης, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου.

Όσον αφορά στους οργανισμούς μη-στόχους δεν παρατηρήθηκαν τοξικές επιδράσεις λόγω έκθεσης στο propiconazole (extoxnet.orst.edu).

Οι τιμές του EC<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> του propiconazole είναι:

- *D. magna*: 6,75 µg/L (www.pesticideinfo.org),
- Algae: 5,4 mg/L (72h) (Bumper Technical Bulletin).

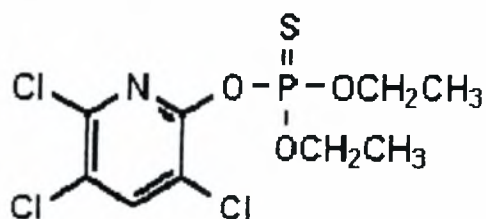
## 1.6 ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ

Τα οργανοφωσφορικά είναι η κατηγορία η οποία περιέχει τα περισσότερα εντομοκτόνα που κυκλοφορούν στη διεθνή αγορά. Πρόκειται για εστέρες του πεντασθενούς φωσφόρου, η πλειοψηφία των οποίων είναι φωσφορικοί, φωσφοροθειοϊκοί, φωσφοροθειονικοί και φωσφοροθειολικοί εστέρες. Τα μέλη της ομάδας των οργανοφωσφορικών είναι υγρά με χαρακτηριστική οσμή, μέτρια έως σημαντική υδατοδιαλυτότητα και μέτρια τάση ατμών. Ορισμένα είναι πολύ πτητικά (Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, 1991). Είναι εντομοκτόνα επαφής και ορισμένα είναι διασυστηματικά. Η εντομοκτόνος δράση τους εκδηλώνεται εντός λίγων λεπτών ή

ωρών. Κάποια οργανοφωσφορικά είναι και ακαρεοκτόνα, νηματωδοκτόνα και μαλακιοκτόνα. Έχουν υπολειμματικότητα από μικρή έως σχετικά μεγάλη, ενώ ορισμένα είναι εκλεκτικά και ενδείκνυνται για προγράμματα ολοκληρωμένης καταπολέμησης. Ωστόσο, η οξεία τοξικότητά των περισσότερων οργανοφωσφορικών για τα θερμόαιμα είναι μεγάλη (Τζανακάκης, 1995).

Τα οργανοφωσφορικά δρουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων ως αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE), του ενζύμου που υδρολύει την ακετυλοχολίνη. Πιο συγκεκριμένα, με φωσφορυλίωση σχηματίζεται ισχυρός δεσμός του οργανοφωσφορικού εντομοκτόνου με την ενεργό θέση της AChE, παρεμποδίζοντας έτσι την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης. Έτσι, δημιουργείται περίσσεια ακετυλοχολίνης η οποία προκαλεί πληθώρα νευρομεταδόσεων στους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Τελικά, ο θάνατος του εντόμου επέρχεται έπειτα από υπερδιέγερση και παράλυση (Ware, 1989).

### 1.6.1 CHLORPYRIFOS



**Chemical Name:** Chlorpyrifos

**Molecular Formula:** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>PS

**IUPAC name:** O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate

**Πίνακας 1.2** Φυσικές ιδιότητες του chlorpyrifos (Exttoxnet, 1996).

<b>ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ CHLORPYRIFOS</b>	
<b>Μοριακό βάρος</b>	350,62 g mol <sup>-1</sup>
<b>Σημείο βρασμού</b>	160°C
<b>Σημείο τήξης</b>	41,5-44 °C
<b>Πυκνότητα</b>	1,4 g/cm <sup>3</sup>
<b>Τάση ατμών</b>	2,5 mPa (25 °C)
<b>Συντελεστής κατανομής οκτανόλης / νερού</b>	Log K <sub>ow</sub> = 4,7-5,27
<b>Υδατοδιαλυτότητα</b>	1,4 mg/L (25 °C)
<b>Διαλυτότητα σε άλλους διαλύτες</b>	βενζένιο, ακετόνη, χλωροφόρμιο, διθειάνθρακας, διαιθυλαιθέρας, ξυλένιο, χλωρομεθυλένιο, μεθανόλη

Το chlorpyrifos είναι ένα οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο, ένας φωσφοροθειονικός εστέρας που περιέχει πυριδινικό δακτύλιο. Είναι μη διασυστημικό και δρα δια επαφής, στόματος ή ατμών. Χρησιμοποιείται ευρέως, τόσο στη γεωργική πρακτική όσο και στην αντιμετώπιση εχθρών υγειονομικής σημασίας. Χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση προνυμφών Noctuidae, κολεοπτέρων Galerucidae, Δίπτερων, κατσαριδών, ψύλλων, τερμιτών, μυρμηγκιών και ψειρών. Επιπλέον, χρησιμοποιείται και ως ακαρεοκτόνο. Εφαρμόζεται σε διάφορες καλλιέργειες, όπως βαμβάκι, καρυδιές, λαχανικά και καλλωπιστικά φυτά (Cáceres et al., 2007). Επίσης, χρησιμοποιείται απευθείας σε οικόσιτα ζώα για την αντιμετώπιση παρασίτων, καθώς και σε κτίρια και αποθηκευτικούς χώρους (EXTOXNET, 1996). Η χρήση του chlorpyrifos στις Η.Π.Α έχει περιοριστεί πλέον μόνο στην αντιμετώπιση τερμιτών και οικιακών εχθρών, καθώς πρόσφατες έρευνες απέδειξαν πως έχει αρνητικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία (EPA, 2000). Ωστόσο, στην Αυστραλία και στην Ευρώπη χρησιμοποιείται ακόμη ως εντομοκτόνο στη γεωργική πρακτική (Cattani et al., 2001, Coppola et al., 2007). Σύμφωνα με τον κανονισμό Νο 396/2005 της Ευρωπαϊκής Ένωσης τα Μέγιστα Επιτρεπτά Όρια Υπολειμμάτων (MRLs) για το chlorpyrifos, σε διάφορα διατροφικά είδη, κυμαίνονται από 0,01 έως 5 mg/kg (Regulation EC No 396/2005, Official Journal of the E.U).

Σε καλλιέργειες εσπεριδοειδών (πορτοκάλια, λεμόνια, μανταρίνια, γκρέιπ φρούτ), για την αντιμετώπιση ψευδόκοκκου, κόκκινης ψώρας, μαύρης ψώρας, θριπών και

μελίγκρας και σε καλλιέργειες μηλοειδών και πυρηνοκάρπων για την αντιμετώπιση ψώρας, βαμβακάδας, φυλλοδέτη, καρπόκαψας, θριπών και μελίγκρας, η συνιστώμενη δόση εφαρμογής είναι 100-125 cm<sup>3</sup> ανά 100L νερού. Σε καλλιέργειες λαχανικών, πατάτας και βαμβακιού η συνιστώμενη δόση εφαρμογής είναι 200-250cm<sup>3</sup> ανά στρέμμα. Σε κάθε περίπτωση, η εφαρμογή γίνεται 1-2 φορές ανά καλλιεργητική περίοδο (Dow AgroSciences, Technical bulletin).

Ο χρόνος ημίσειας ζωής του chlorpyrifos στο έδαφος εξαρτάται από τον τύπο του εδάφους και τις κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες. Η σταθερότητα του είναι μέτρια. Ο υδροφοβικός χαρακτήρας του chlorpyrifos (Log K<sub>ow</sub> = 4,7) (Racke et al., 1993), του προσδίδει την ιδιότητα να προσροφάται ισχυρά από το έδαφος, ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής του ποικίλει από 10 έως 120 ημέρες (Singh et al., 2003), και δύσκολα καταλήγει στα υπόγεια ύδατα. Η αποικοδόμησή του επιτελείται μέσω διαδικασιών χημικής υδρόλυσης και μικροβιακής διάσπασης, οι οποίες εξαρτώνται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία και το ποσοστό υγρασίας του εδάφους (Racke et al., 1993, Getzin, 1981, Racke et al., 1988, Racke et al., 1996). Ο κύριος μεταβολίτης του, το 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP), δεν προσροφάται ισχυρά και παρουσιάζει χημική σταθερότητα και μέτρια κινητικότητα στο έδαφος.

Παρατηρήθηκε ότι η ρύπανση σε ποτάμια και λίμνες μπορεί να φτάσει και να ξεπεράσει τα 4,3μg/L, όταν το chlorpyrifos εφαρμόζεται απευθείας σε υδάτινους όγκους για την αντιμετώπιση κουνουπιών ή όταν σημειώνεται απορροή από παρακείμενους αγρούς (Thomas and Nicholson, 1989, Richards and Baker, 1993, Wood and Stark, 2002). Η συγκέντρωση και η σταθερότητα του chlorpyrifos στα νερά εξαρτάται από τον τύπο του σκευάσματος. Η εξάτμιση είναι η κύρια οδός μείωσης της συγκέντρωσης της ουσίας στο νερό, ενώ η υδρόλυσή της είναι σταθερή σε νερά με όξινο έως ουδέτερο pH και αυξάνεται όταν το pH γίνεται αλκαλικό.

Σε ορισμένα φυτά, όπως το μαρούλι εμφανίζονται φαινόμενα φυτοτοξικότητας από chlorpyrifos. Τα υπολείμματά του παραμένουν στη φυλλική επιφάνεια 10-14 ημέρες, ενώ έρευνες έχουν δείξει πως η ουσία και οι μεταβολίτες της συσσωρεύονται σε συγκεκριμένες καλλιέργειες (EXTOXNET, 1996).

Το chlorpyrifos είναι μέτρια τοξικό στον άνθρωπο. Επηρεάζει το κεντρικό νευρικό σύστημα, το καρδιαγγειακό και το αναπνευστικό σύστημα. Επιπλέον, ερεθίζει το δέρμα και τα μάτια. Η απορρόφηση μέσω του δέρματος είναι περιορισμένη. Τα συμπτώματα που προκαλούνται στον ανθρώπινο οργανισμό από ουσίες που παρεμποδίζουν την χολινεστεράση είναι μούδιασμα, αίσθημα φαγούρας,



αποπροσανατολισμός, πονοκέφαλος, ζάλη, ρίγος, ναυτία, στομαχικοί σπασμοί, εφίδρωση, περιορισμένη όραση, δύσπνοια και βραδυκαρδία. Σε υψηλές δόσεις προκαλούν λιποθυμία, σπασμούς ή ακόμη και θάνατο. Επαναλαμβανόμενη ή παρατεταμένη έκθεση σε οργανοφωσφορικά προκαλεί συμπτώματα όμοια με αυτά που προκαλεί η στιγμιαία έκθεση. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί απώλεια μνήμης και συγκέντρωσης, σύγχυση, δυσκολίες στην ομιλία, μείωση αντανακλαστικών και αϋπνία. Από διάφορες έρευνες προκύπτει ότι το chlorpyrifos δεν επηρεάζει αρνητικά την αναπαραγωγή πειραματόζωων όταν αυτά εκτίθενται σε δόσεις μέχρι 1,2mg/kg/day. Ενδείξεις ότι το chlorpyrifos προκαλεί μεταλλάξεις τερατογενέσεις και καρκινογενέσεις δεν έχουν προκύψει. Το chlorpyrifos και οι κύριοι μεταβολίτες του αποικοδομούνται με γρήγορους ρυθμούς στο ανθρώπινο σώμα. Ο μεταβολισμός γίνεται μέσω των νεφρών. Σε αρουραίους αποβάλλεται με τα ούρα και τα περιττώματα. Έπειτα από παροχή τροφής με δόση Dursban σε αγελάδες, βρέθηκαν υπολείμματα της ουσίας στα περιττώματά τους αλλά όχι στα ούρα και στο γάλα (EXTOXNET, 1996).

Το chlorpyrifos είναι μέτρια έως πολύ τοξικό στα πτηνά και μέτρια έως πολύ τοξικό στα ψάρια του γλυκού νερού, στα υδρόβια ασπόνδυλα και στους θαλάσσιους οργανισμούς. Από μελέτες σχετικές με την ανάλυση επικινδυνότητας (risk assessment), προκύπτει ότι ο κίνδυνος για τα ασπόνδυλα και κυρίως τα οστρακοειδή, είναι εξαιρετικά μεγάλος (Giesy et al., 1999). Η υπολειμματικότητα του chlorpyrifos σε ορισμένα εδάφη, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση τοξικότητας σε οργανισμούς-μη στόχους, όπως θηλαστικά (Zhao et al., 2006) και μικροοργανισμούς (Martínez et al., 1992). Επίσης, φαινόμενα οξείας τοξικότητας παρουσιάζονται και σε μέλισσες, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι το chlorpyrifos βιοσυσσωρεύεται διαμέσου της τροφικής αλυσίδας (EXTOXNET, 1996).

Η LC<sub>50</sub> του chlorpyrifos για τη *D. magna* και για το *Selenastrum capricornutum* (*P. Subcapitata*) είναι 1,05μg/L και 1,00μg/L (72 h), αντίστοιχα (PAN pesticide database: [www.pesticideinfo.org/EN](http://www.pesticideinfo.org/EN)).

## 2. ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ- ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ-ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

### 2.1 ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Η περιβαλλοντική ρύπανση επηρεάζει αρνητικά τα βιολογικά συστήματα, καθώς αυτά εκτίθενται σε τοξικές και επικίνδυνες χημικές ουσίες, φυσικούς παράγοντες (π.χ. ακτινοβολία) και παθογόνους οργανισμούς, με αποτέλεσμα να προκαλούνται σε αυτά φθορά, νοσηρότητα, ακόμα και θνησιμότητα. Η Τοξικολογία ως επιστήμη μελετά τις τοξικές επιδράσεις, κυρίως χημικών ουσιών, δίνοντας έμφαση στον άνθρωπο (Βαλαβανίδης, 2007).

Η Τοξικολογία (*toxicology*) αποτελούσε επιστήμη κατά την αρχαιότητα και αφορούσε αποκλειστικά σε τοξικολογικά περιστατικά που καταγραφόταν στην καθημερινότητα των ανθρώπων. Πρωτοπόροι στον τομέα της Τοξικολογίας υπήρξαν διάφοροι φιλόσοφοι-επιστήμονες, όπως ο Ιπποκράτης από τον 4ο αιώνα π.Χ. που διατύπωσε τις πρώτες σκέψεις για τις τοξικές ιδιότητες μετάλλων και ουσιών (π.χ. του μόλυβδου). Αργότερα, ο Γαληνός (131-201 μ.Χ.) περιέγραψε τις δηλητηριάσεις από μονοξείδιο του άνθρακα (CO), ενώ ο Παράκελσος (1493-1541), Ελβετός γιατρός, αλχημιστής και φιλόσοφος εξέφρασε τη βασική αρχή της τοξικολογίας, σύμφωνα με την οποία «όλες οι ουσίες είναι δηλητήρια και η δόση διαφοροποιεί την τοξική δράση». Αυτή η αλήθεια ήταν γνωστή και στον απλό κόσμο εδώ και αιώνες. Μια φράση η οποία λεγόταν συχνά από χωρικούς στην Ελλάδα είναι ότι «το δηλητήριο σε μικρή δόση είναι φάρμακο». Ωστόσο, είναι λογικό να θεωρούνται τοξικές οι ουσίες εκείνες που σε μικρή δόση ή συγκέντρωση μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στην υγεία ή και θάνατο, όπως το κυανιούχο κάλιο, οι διοξίνες, ο υδράργυρος, κ.ά. (Βαλαβανίδης, 2007, Κούγκολος, 2007).

Όταν μιλάμε για τοξικές ουσίες αναφερόμαστε πάντα σε δόση ή συγκέντρωση της τοξικής ουσίας. Για τους οργανισμούς της ξηράς η δόση μετράται πάντα mg τοξικής ουσίας/kg βάρους του οργανισμού. Για υδρόβιους οργανισμούς (ψάρια, ζωοπλαγκτόν, φυτοπλαγκτόν), το κριτήριο για την τοξικότητα μιας ουσίας είναι η συγκέντρωσή της στο νερό σε mg/L ή μg/L της ουσίας. Μια δόση ή συγκέντρωση συνήθως θεωρείται τοξική όταν προκαλεί το θάνατο κάποιων οργανισμών. Όμως σε και σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από αυτή που προκαλεί το θάνατο, είναι δυνατό να προκαλέσει κάποια βλάβη στον οργανισμό. Έτσι, ως *τοξική δόση ή συγκέντρωση*

ορίζεται εκείνη που προκαλεί αναστολή σε κάποια φυσιολογική λειτουργία ενός οργανισμού (π.χ. αναστολή στην ικανότητα αναπαραγωγής) (Κούγκολος, 2007).

### *2.1.1 ΤΡΟΠΟΙ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΟΞΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ*

Η έκθεση των ζωντανών οργανισμών σε τοξικές και επικίνδυνες χημικές ουσίες μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους, μέσω της επαφής με το δέρμα, με την εισπνοή, την κατάποση ή μέσω της διατροφής. Οι βλάβες που μπορούν να προκληθούν εξαρτώνται από τη συγκέντρωση και τη διάρκεια έκθεσης των τοξικών ουσιών, τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, τις μεταβολικές διεργασίες και την τοξικολογία των παραγώγων και την κατάσταση υγείας του οργανισμού που εκτίθεται.

Η έκθεση του οργανισμού μέσω της *εισπνοής* (inhalation) θεωρείται ότι είναι η πλέον αποτελεσματική και επικίνδυνη για τοξικά αέρια, ατμούς και εισπνεόμενα σωματίδια. Οι πνεύμονες του ανθρώπου έχουν περίπου 300 εκατομμύρια κυψελίδες και επιφάνεια περίπου 70 τετραγωνικά μέτρα. Ιδιαίτερα για τα εισπνεόμενα σωματίδια, όσο μικρότερη η αεροδυναμική διάμετρος (μεταξύ 1-10  $\mu\text{m}$ ) τόσο βαθύτερα εισχωρούν στο αναπνευστικό σύστημα και τις κυψελίδες των πνευμόνων.

Η *κατάποση* χημικών ουσιών μπορεί να γίνει είτε κατά τη διάρκεια της εργασίας ενός εργαζομένου σε ρυπασμένους εργασιακούς και εσωτερικούς χώρους, ενώ σε άλλους βιολογικούς οργανισμούς με την παραμονή τους στο έδαφος, τα νερά και τον αέρα.

Η *διατροφή* των ζωντανών οργανισμών αποτελεί το σημαντικότερο τρόπο παραλαβής και έκθεσης σε περιβαλλοντικούς ρύπους, τοξικές φυσικές και συνθετικές ουσίες. Τοξικολογικά, η διατροφή μελετάται ως διαφορετικός τρόπος έκθεσης σε ρύπους, λόγω της πολυπλοκότητας των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα μέσω της διατροφής σε έναν ζωντανό οργανισμό. Στην περιβαλλοντική τοξικολογία και οικοτοξικολογία, η διατροφή αποτελεί σημαντικό παράγοντα συσσώρευσης και βιομεγέθυνσης μη βιοδιασπάσιμων χημικών ουσιών-ρύπων σε έναν οργανισμό μέσω της τροφικής αλυσίδας.

Έκθεση σε τοξικές ουσίες μέσω *δερματικής επαφής* είναι ένας ιδιαίτερος τρόπος, αλλά καθίσταται σημαντικός για μερικές τοξικές ουσίες που έχουν την ικανότητα να διαχέονται μέσω της επιδερμίδας. Οι ζωντανοί οργανισμοί που ζουν

στο νερό έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να εκτεθούν σε τοξικές υδατοδιαλυτές και μη υδατοδιαλυτές ουσίες-ρύπους, οι οποίες ανάλογα με την εξωτερική κατάσταση του δέρματος του οργανισμού μπορούν να διεισδύσουν εσωτερικά ή να προκαλέσουν εξωτερικές αλλοιώσεις και παθολογικά συμπτώματα.

Οι βασικές αρχές της τοξικολογίας αναπτύχθηκαν για τις περιπτώσεις δηλητηριάσεων του ανθρώπου, ιδιαίτερα στο εργασιακό περιβάλλον, αλλά σε μεγάλο βαθμό μπορούν να εφαρμοσθούν στην περιβαλλοντική τοξικολογία που διαπραγματεύεται τη μελέτη τοξικών επιδράσεων σε μεγάλη ποικιλία ζωντανών οργανισμών, όπως φυτά, έντομα, πτηνά, ασπόνδυλα, θηλαστικά, κ.λπ, που έχουν σημαντικές σωματικές διαφορές, τρόπους έκθεσης σε ρύπους ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο ζουν, ρυθμούς μεταβολισμούς, είδος και ποσότητες διατροφής και διάφορες άλλες παραμέτρους (Βαλαβανίδης, 2007).

### *2.1.2 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ - ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ*

Στην Τοξικολογία οι επιδράσεις των χημικών ουσιών στους οργανισμούς μελετώνται και ερμηνεύονται βάσει της σχέσης δόση-αντίδραση. Ο όρος *τοξικότητα* δηλώνει την ικανότητα μιας χημικής ουσίας να προκαλεί βλάβη σε έναν οργανισμό ενώ ο όρος *επικινδυνότητα* δηλώνει την πιθανότητα μια χημική ουσία να εμφανίσει τοξικότητα εάν χρησιμοποιηθεί υπό ορισμένες συνθήκες. Συνεπώς, για τα γεωργικά φάρμακα, όπως και για όλες τις συνθετικές ουσίες, ο κίνδυνος που προκαλείται από τη χρήση τους εξαρτάται όχι μόνο από την τοξικότητα της εκάστοτε ουσίας, αλλά και από την πιθανότητα ένας οργανισμός να εκτεθεί σε τοξικές ποσότητές της. Έτσι, ανάλογα με τις συνθήκες που χρησιμοποιείται ένα γεωργικό φάρμακο, μπορεί να είναι τοξικό στον άνθρωπο και στο περιβάλλον (Μενκίσογλου-Σπυρούδη, 1998).

Η τοξικότητα μιας ουσίας διακρίνεται σε οξεία και χρόνια, εξαρτάται από τη δόση και εκφράζεται αριθμητικά ως μέση θανατηφόρος δόση LD<sub>50</sub>, δηλαδή η δόση που σκοτώνει το 50% του πληθυσμού των πειραματόζωων που χρησιμοποιούνται υπό τις συνθήκες του πειράματος. Η μονάδα μέτρησης της LD<sub>50</sub> είναι mg τοξικής ουσίας ανά kg βάρους σώματος. Η τιμή της μέσης θανατηφόρου δόσης πρέπει πάντα να αναφέρεται μαζί με το είδος του πειραματόζωου και τον τρόπο που αυτό εκτέθηκε στην ουσία που μελετάται. Από τις διαδικασίες προσδιορισμού των τοξικών

ιδιοτήτων των διαφόρων ουσιών με χρήση πειραματόζωων, προκύπτουν αποτελέσματα τα οποία στη συνέχεια γενικεύονται και για τον άνθρωπο (Μενκίσογλου-Σπυρούδη, 1998).

Η τύχη και η συμπεριφορά μιας ουσίας αμέσως μετά την εισαγωγή της στο περιβάλλον ελέγχεται από παράγοντες οι οποίοι εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ίδιας της ουσίας, από τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες του οικοσυστήματος καθώς και από τις πηγές και το ρυθμό εισροής της ουσίας στο περιβάλλον (Γατίδου, 2005). Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να χωριστούν σε 4 μεγάλες κατηγορίες, για δεδομένης τοξικότητα ουσία (Βαγή, 2007, Γατίδου, 2005):

- Παράγοντες που σχετίζονται με την ουσία (Φυσικοχημικές Ιδιότητες, τρόπος δράσης κλπ.)
- Συνθήκες έκθεσης ή δηλητηρίασης (δοσολογία, οδός εισόδου στον οργανισμό, χρονική διάρκεια της έκθεσης, είδος έκθεσης κλπ.)
- Ατομικοί παράγοντες (φύλλο, ηλικία, βάρος σώματος, διατροφή, φυσική κατάσταση)
- Περιβαλλοντικούς παράγοντες (μετεωρολογικοί παράγοντες περιβάλλοντος, χημικοί παράγοντες, pH, θερμοκρασία, αλατότητα, κλπ).

Οι επικρατέστεροι και ευρέως χρησιμοποιούμενοι τοξικολογικοί όροι είναι οι εξής (Βαγή, 2007, Βαλαβανίδης, 2007):

- $LD_{50}$  (*Lethal Dose*): δόση της χημικής ουσίας (σε mg τοξικής ουσίας / kg σωματικού βάρους), που προκαλεί το θάνατο στο 50% του πληθυσμού που έρχεται εκτίθεται σε αυτή.
- $ED_{50}$  (*Effective Dose*): δόση της χημικής ουσίας που προκαλεί κάποιο επιθυμητό αποτέλεσμα (πχ. αναισθησία), στο 50% του πληθυσμού που εκτίθεται σε αυτή.
- $TD_{50}$  (*Toxic Dose*): δόση της χημικής ουσίας που προκαλεί κάποιο τοξικό αποτέλεσμα (π.χ. βλάβη στο συκώτι), στο 50% του πληθυσμού που εκτίθεται σε αυτή.
- $LT_{50}$  (*Lethal Time*): χρόνος που απαιτείται για το θάνατο του 50% του πληθυσμού εκτέθηκε σε τοξική ουσία.
- $LC_{50}$  (*Lethal Concentration*): συγκέντρωση της χημικής ουσίας που προκαλεί το θάνατο στο 50% του πληθυσμού που εκτίθεται σε αυτή.

- $EC_{50}$  (*Effective Concentration*) ή  $IC_{50}$  (*Inhibition Concentration*): συγκέντρωση της χημικής ουσίας που μειώνει ή αναχαιτίζει κατά 50% τη μετρούμενη παράμετρο (ανάπτυξη, αναπνοή, κ.ο.κ.).
- $NOEC$  (*No Observed Effect Concentration*): υψηλότερη συγκέντρωση της χημικής ουσίας η οποία δεν είναι επιβλαβής σε σχέση με την καλλιέργεια αναφοράς.
- $LOEC$  (*Lowest Observed Effect Concentration*): χαμηλότερη συγκέντρωση της χημικής ουσίας η οποία επιφέρει δυσμενή επίπτωση σε σχέση με την καλλιέργεια αναφοράς.

Υπάρχουν και άλλοι πολλοί όροι τοξικολογικών πειραμάτων που αφορούν σε εξειδικευμένα πειράματα οικοτοξικολογίας.

Βάσει των τιμών της  $LD_{50}$  ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχει κατατάξει τα γεωργικά φάρμακα σε κατηγορίες τοξικότητας για τον άνθρωπο, οι οποίες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 2.1** Κατηγορίες τοξικότητας γεωργικών φαρμάκων για τον άνθρωπο σύμφωνα με τον WHO (Μενκίσογλου-Σπυρούδη, 1998).

Κατηγορία	Κατάποση		Δερματική επαφή		Πιθανή θανατηφόρος ποσότητα δια στόματος για τον άνθρωπο
	$LD_{50}$ (mg/kg)		$LD_{50}$ (mg/kg)		
	Στερεά	Υγρά	Στερεά	Υγρά	
Ia εξαιρετικά τοξικά	<5	<20	<10	<40	1 κόκκος
Ib πολύ τοξικά	5-50	20-200	10-100	40-400	1 κουτ. μικρό
II μέτρια τοξικά	50-500 2000	200-	100-1000	400-4000	1-2 κουτ. μικρά
III σχετικά μη τοξικά	>500	>2000	>1000	>4000	

## 2.2 ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ-ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Οι εφαρμογές των βασικών αρχών της Τοξικολογίας και των πειραματικών μεθοδολογιών που μελετούσαν τις επιβλαβείς επιδράσεις των χημικών ρύπων, αλλά με έμφαση την περιβαλλοντική ρύπανση δημιούργησαν τις επιστήμες της *Περιβαλλοντικής Τοξικολογίας (environmental toxicology)* και *Οικοτοξικολογίας (ecotoxicology)*. Η περιβαλλοντική τοξικολογία μελετά την έκθεση, τις τοξικοκινητικές και τοξικοδυναμικές μεταβολές, και τις αρνητικές επιπτώσεις των συνθετικών και επικίνδυνων χημικών παραγόντων σε ζωντανούς οργανισμούς στα περιβαλλοντικά διαμερίσματα. Η Οικοτοξικολογία, που είναι νεότερη επιστήμη, λαμβάνει υπόψη της τις οικολογικές διαστάσεις και την πολυπλοκότητα των αλληλοεπιδράσεων μεταξύ των βιολογικών οργανισμών και των οργανισμών με το φυσικό περιβάλλον μέσα στο οποίο αναπτύσσονται (Βαλαβανίδης, 2007).

Κατά τις 3-4 τελευταίες δεκαετίες του 20<sup>ου</sup> αιώνα η Οικοτοξικολογία αναπτύχθηκε ως μια επιστήμη ανεξάρτητη και η διαφορά της από την κλασική Τοξικολογία έγκειται στο πρόθεμα οικο- (σύντμηση της λέξης οικοσύστημα). Ουσιαστικά η οικοτοξικολογία διαφοροποιείται καθώς ασχολείται με την επίδραση των τοξικών ουσιών γενικά στους οργανισμούς του οικοσυστήματος. Περιλαμβάνει στοιχεία από πολλούς επιστημονικούς κλάδους όπως η Βιολογία, η Μικροβιολογία, η Οικολογία, η Ιατρική, η Κτηνιατρική, η Γεωπονία, η Χημεία, η Περιβαλλοντική και Χημική Μηχανική, τα Μαθηματικά και η Στατιστική (Κούγκολος, 2007).

Οι κυριότερες έρευνες Περιβαλλοντικής Τοξικολογίας αφορούν σε οργανισμούς που μπορούν να βρεθούν στη φύση σε αφθονία, που είναι εύκολη η εκτροφή και ανάπτυξή τους στο εργαστήριο και τα βιολογικά τους χαρακτηριστικά να υποβοηθούν τις τοξικολογικές αναλύσεις, χωρίς να επεκτείνονται στο οικολογικό υπόβαθρο. Παραδείγματα τέτοιων ερευνών αφθονούν στην επιστημονική βιβλιογραφία και τα αποτελέσματα των τοξικολογικών αναλύσεων χρησιμοποιούνται για την καθιέρωση νομοθετικών διατάξεων προστασίας του περιβάλλοντος, περιβαλλοντικά πρότυπα για ανεκτά όρια ρύπων στον αέρα, τα νερά και το έδαφος. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν γίνει σημαντικές ανακαλύψεις για τη δράση τοξικών ρύπων στο περιβάλλον και ιδιαίτερα σε συγκεκριμένους οργανισμούς. Αλλά η επιστημονική επιβεβαίωση του χημικού παράγοντα που προκαλεί την περιβαλλοντική ρύπανση και των μηχανισμών μέσω των οποίων συσσωρεύεται ή δρα στους βιολογικούς οργανισμούς αποδείχθηκε αρκετά επίπονη και χρονοβόρα. Η

Περιβαλλοντική Τοξικολογία ήταν ο επιστημονικός κλάδος που χειρίστηκε τα θέματα αυτά και τεκμηρίωσε τους τοξικούς χημικούς ρύπους που προκαλούσαν την ρύπανση και τις δυσμενείς επιπτώσεις στους ζωντανούς οργανισμούς. Η Οικολογική Τοξικολογία (Οικοτοξικολογία) προχώρησε ένα βήμα παραπάνω και διεύρυνε περαιτέρω τις έρευνες αυτές στο σύνολο του οικολογικού κύκλου που περιβάλλει τους ζωντανούς οργανισμούς, την αλληλεπίδραση μεταξύ των οργανισμών και σε συνδυασμό με τις παραμέτρους του φυσικού περιβάλλοντος. Τις τελευταίες δεκαετίες, με τη βοήθεια νέων επιστημονικών εννοιών και αναλυτικών τεχνικών, προχωρημένων στατιστικών αναλύσεων δεδομένων, μεθολογικών προσεγγίσεων για την εκτίμηση κινδύνου από χημικές ουσίες και πολυάριθμων μεθόδων διαχείρισης της περιβαλλοντικής ρύπανσης, οι οικοτοξικολόγοι κατάφεραν να επιλύσουν και να τεκμηριώσουν επιστημονικά ένα σημαντικό αριθμό περιβαλλοντικών και οικοτοξικολογικών προβλημάτων (Βαλαβανίδης, 2007).

### 2.3 ΥΔΑΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Η *Υδατική Τοξικολογία (Aquatic Toxicology)* είναι το κομμάτι εκείνο της Οικοτοξικολογίας που ασχολείται με την τοξικότητα ουσιών που βρίσκονται διαλυμένες ή εν αιωρήσει στα νερά. Κατά συνέπεια, οι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως δείκτες στην υδατική τοξικολογία είναι υδρόβιοι οργανισμοί.

Οι αναλύσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν σε ένα δείγμα νερού ή υγρών είναι τεσσάρων ειδών και είναι οι εξής (Κούγκολος, 2007):

- Φυσικές αναλύσεις (προσδιορισμός φυσικών ιδιοτήτων του δείγματος),
- Χημικές αναλύσεις (ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των χημικών ουσιών του δείγματος),
- Μικροβιολογικές αναλύσεις (ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών του δείγματος),
- Οικοτοξικολογικές αναλύσεις (προσδιορισμός τοξικής επίδρασης δείγματος σε ορισμένους ευαίσθητους οργανισμούς που χρησιμοποιούνται ως δείκτες τοξικότητας).

Παρά το γεγονός ότι οι οικοτοξικολογικές αναλύσεις είναι αναγκαίες και πρέπει να γίνονται συμπληρωματικά προς τις χημικές αναλύσεις, στην χώρα μας πραγματοποιούνται μόνο οι τρεις πρώτες κατηγορίες των παραπάνω αναλύσεων. Έτσι, δημιουργείται ο κίνδυνος να μην ανιχνευθεί η ύπαρξη σε κάποια νερά τοξικών



ουσιών σε επικίνδυνες συγκεντρώσεις. Και αυτό γιατί οι χημικές αναλύσεις είναι στοχευμένες, ανάλογα με τις ουσίες που αναμένεται να ανιχνευθούν σε κάθε περίπτωση. Με αυτό τον τρόπο όμως δεν καλύπτεται ολοκληρωτικά το φάσμα των τοξικών ουσιών που ενδεχομένως να υπάρχουν σε ένα συγκεκριμένο δείγμα νερού. Ωστόσο, οι οικοτοξικολογικές αναλύσεις από μόνες τους δεν δύνανται να ταυτοποιήσουν και να ποσοτικοποιήσουν τις τοξικές ουσίες ενός υδατικού δείγματος. Όμως βάσει αυτών των αναλύσεων μπορούμε να αποφανθούμε για την τοξικότητα του δείγματος αυτού και για το εάν το συγκεκριμένο νερό μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Οι λόγοι λοιπόν για τους οποίους οι οικοτοξικολογικές αναλύσεις είναι αναγκαίες είναι (Κούγκολος, 2007):

- Είναι τεχνικά και οικονομικά αδύνατο σε ένα δείγμα νερών ή αποβλήτων να γίνει μεγάλος αριθμός αναλύσεων. Οι οικοτοξικολογικές αναλύσεις μπορούν να δείξουν ποια δείγματα είναι τοξικά ώστε να επιμείνουμε και να κάνουμε περισσότερες αναλύσεις ώστε να βρούμε σε τι οφείλεται η τοξικότητα,
- Οι οικοτοξικολογικές αναλύσεις προσδιορίζουν εάν ένα δείγμα είναι τοξικό, γεγονός το οποίο είναι το αποτέλεσμα της ύπαρξης τοξικών ουσιών σε ένα δείγμα, ενώ οι χημικές αναλύσεις δείχνουν που οφείλεται η τοξικότητα, δηλαδή την αιτία της ύπαρξης τοξικότητας,
- Το φαινόμενο του συνεργισμού (συνδυασμένη τοξικότητα ανάμεσα σε δύο ουσίες) το οποίο περιγράφεται παρακάτω δεν προβλέπεται με τις χημικές αναλύσεις,
- Η ευαισθησία στις τοξικές ουσίες ποικίλει ανάλογα με τον οργανισμό, οπότε χρειάζεται μια σειρά πειραμάτων με διαφορετικούς οργανισμούς ώστε να διαπιστωθεί η τοξικότητα ενός δείγματος.

### 2.3.1 ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ

Στην Οικοτοξικολογία και την Υδατική τοξικολογία για να γίνει εκτίμηση της επίδρασης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων ή άλλων ουσιών στα οικοσυστήματα, χρησιμοποιούνται έμβιοι οργανισμοί ως δείκτες, πραγματοποιούνται δηλαδή βιοδοκιμές ή βιολογικές δοκιμασίες (*biassays*). Με τις βιοδοκιμές προσδιορίζουμε τις συγκεντρώσεις των τοξικών ουσιών που επιδρούν στους οργανισμούς δείκτες, είτε

προκαλώντας βλάβη σε κάποια ζωτική τους λειτουργία είτε θανατώνοντάς τους (Κούγκολος, 2007). Οι υδρόβιοι οργανισμοί είναι αυτοί που δέχονται πρώτοι την επίδραση των διαφόρων χημικών ρύπων με την έκλυση ή απόρριψη χημικών φυτοπροστατευτικών ουσιών και αποβλήτων που καταλήγουν σε υδατικούς αποδέκτες (Βαλαβανίδης, 2007). Οι βιοδοκιμές όσον αφορά στην Υδατική Τοξικολογία, είναι δυνατό να γίνουν σε στατικά συστήματα αλλά και σε συστήματα συνεχούς ροής. Το πρόβλημα με τα στατικά συστήματα είναι η απώλεια της ουσίας που οφείλεται στην πτητικότητα της ή στην απορρόφηση της στα τοιχώματα των γυάλινων δοχείων δοκιμών. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί σε συστήματα συνεχούς ροής όπου δίνονται και περισσότερο ακριβή αποτελέσματα για την τιμή LC<sub>50</sub> καθώς προσομοιάζουν περισσότερο την έκθεση των ατόμων στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα στο φυσικό περιβάλλον. Τα στατικά συστήματα όμως είναι χρήσιμα για πειράματα συγκριτικών μελετών αλλά και για μια πρώτη εκτίμηση της οξείας ή χρόνιας τοξικότητας των ενώσεων. Άρα, τα βέλτιστα αποτελέσματα για την τοξικότητα φυτοπροστατευτικών ενώσεων μπορούν να προκύψουν με τη χρήση και των δυο μεθόδων (Βαγή, 2007).

Τα κριτήρια επιλογής ενός πειράματος προσδιορισμού τοξικότητας είναι (Κούγκολος, 2007):

- Πρέπει να μην είναι χρονοβόρο και να μην κοστίζει πολύ,
- Ο οργανισμός δείκτης πρέπει να είναι κατά το δυνατό ευαίσθητος
- Πρέπει να υπάρχει επαναληψιμότητα στα αποτελέσματα,
- Πρέπει να υπάρχει δυνατότητα να γίνονται πολλά πειράματα, ώστε να μπορούν να ελεγχθεί κάθε νέα ουσία.

Τα πιο διαδεδομένα πειράματα προσδιορισμού τοξικότητας στην Υδατική Τοξικολογία είναι:

- Το πείραμα ακινητοποίησης της *Daphnia magna* (24 or 48 hour acute immobilization test), το οποίο έχει το βασικό πλεονέκτημα ότι η μετρήσεις γίνονται με γυμνό οφθαλμό,
- Το πείραμα της επίδρασης στην ανάπτυξη του μικροφύκου *Pseudokirchneriella subcapitata*, το οποίο συνήθως διαρκεί 3 ημέρες και απαιτεί όργανο (φωτόμετρο) για τις μετρήσεις και

- Το Microtox test. Είναι ένα πολύ σύντομο τεστ (15-30 λεπτά), στο οποίο μετράται η αναστολή στη βιοφωταύγεια του βακτηρίου *Vibrio fischeri*.

Άλλα πειράματα είναι το πείραμα της επίδρασης στην ανάπτυξη του μικροφύκου *Chlorella ellipdoidea*, τα πειράματα με ψάρια και με καλλιεργημένα κύτταρα ψαριών, τα πειράματα με τους οργανισμούς *Brahionus plicatilis* και *Artemia fransiscana* (Κούγκολος, 2007).

### 2.3.2 DAPHNIA MAGNA KAI PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA

Η *D. magna* είναι ένα καρκινοειδές, πολυκύτταρος οργανισμός. Κατά τη γέννησή της έχει μήκος περί τα 0,5mm, ενώ ως ενήλικο περί τα 5mm. Κατά τα πειράματα προσδιορισμού τοξικότητας με *D. magna* (πειράματα ακινητοποίησης της), ελέγχεται το ποσοστό των ζώων που έχουν ακινητοποιηθεί (συνήθως η ακινησία σημαίνει και θάνατο), 24 ώρες μετά την έκθεσή τους σε τοξικές ουσίες. Για τα πειράματα χρησιμοποιούνται μόνο νεογνά και όχι ενήλικα ζώα. Το βασικό πλεονέκτημα της *D. magna* είναι ότι είναι ένας οργανισμός ευαίσθητος στις περισσότερες τοξικές ουσίες (η ευαισθησία ενός πειράματος προσδιορισμού τοξικότητας εξαρτάται από τον οργανισμό δείκτη και από την τοξική ουσία, άρα είναι επιθυμητό οι οργανισμοί δείκτες να είναι κατά το δυνατό ευαίσθητοι). Επιπλέον, η *D. magna* πλεονεκτεί από πρακτικής άποψης γιατί οι παρατηρήσεις στα συγκεκριμένα πειράματα γίνονται με γυμνό οφθαλμό. Το κυριότερο μειονέκτημα αυτής της βιοδοκιμής είναι ότι είναι δύσκολο σε ένα πείραμα να χρησιμοποιηθεί μεγάλος αριθμός ζώων και έτσι ορισμένες φορές η επαναληψιμότητα δεν είναι καλή (Κούγκολος, 2007).

Το *P. subcapitata* (παλαιότερη ονομασία *Selenastrum capricornutum* και πρώτη ονομασία *Raphidocelis subcapitata*) επιλέχθηκε γιατί αντιπροσωπεύει ένα διαφορετικό τροφικό επίπεδο σε σχέση με τη *D. magna* και γιατί παρουσιάζει ευαισθησία, απλή δομή και εύκολη τυποποίηση. Πρόκειται για έναν από τους περισσότερο χρησιμοποιούμενους οργανισμούς σε βιοδοκιμές.

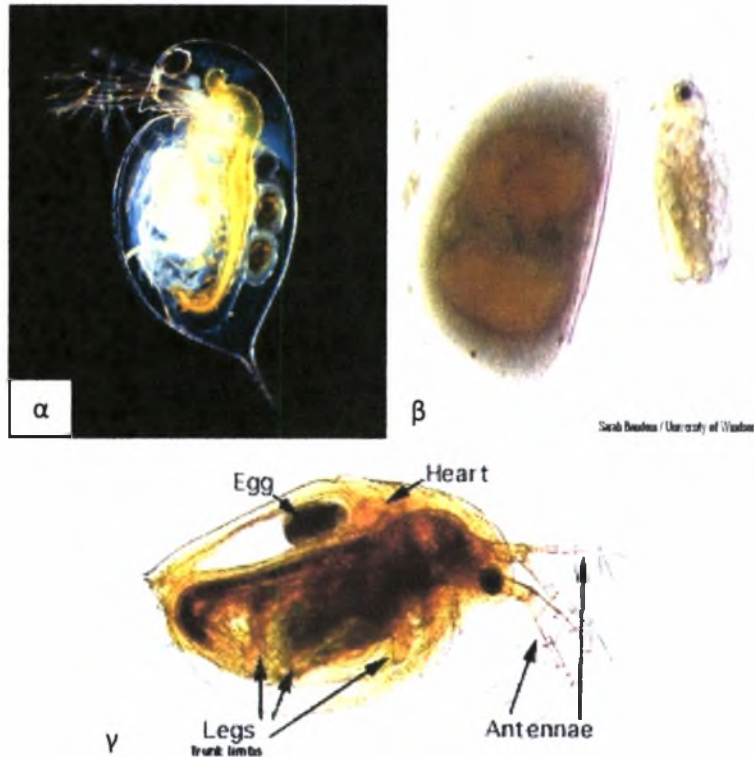
Η συστηματική ταξινόμηση των παραπάνω οργανισμών δεικτών είναι η εξής:

*Daphnia magna*

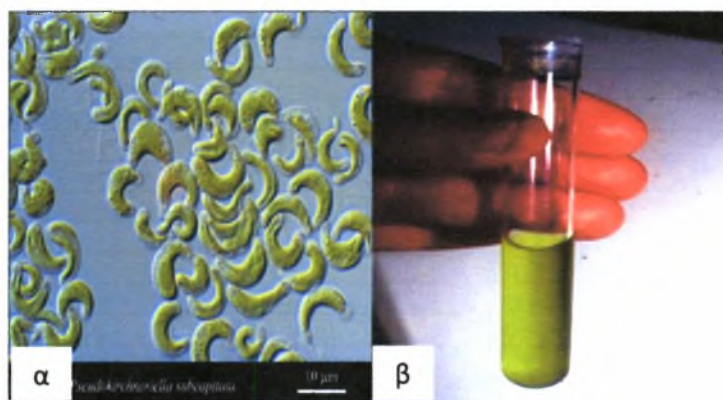
Βασίλειο: Animalia  
Φύλο: Arthropoda  
Υποφύλο: Crustacea  
Κλάση: Brachiopoda  
Τάξη: Cladocera  
Οικογένεια: Daphnidae  
Γένος: Daphnia  
(animaldiversity.ummz.umich.edu)

*Pseudokirchneriella subcapitata*

Υπερβασίλειο: Eukaryota  
Βασίλειο: Plantae  
Υποβασίλειο: Viridaeplantae  
Φύλο: Chlorophyta  
Κλάση: Chlorophyceae  
Γένος: Pseudokirchneriella  
(www.algaebase.org)



**Εικόνα 2.1** *Daphnia magna*. Ενήλικο (α). Εφίππιο (αυγό) και νεογνό που μόλις εκκολάφθηκε (β). Σωματική δομή της *Daphnia magna* (γ).



**Εικόνα 2.2** *Pseudokirchneriella subcapitata* σε μεγέθυνση (α) και σε ενεργοποιημένη μορφή για βιοδοκιμή (β).

### 2.3.3 ΔΟΚΙΜΕΣ ΤΟΧΚΙΤΣ

Τα τεστ τοξικότητας Τοχkits αναπτύχθηκαν κατά τη δεκαετία του '90 στο Βέλγιο. Πρόκειται για πλήρη σετ που περιέχουν όσα υλικά χρειάζονται για τη διεξαγωγή των βιοδοκιμών. Τα πλεονεκτήματα των Τοχkits είναι ότι είναι εύχρηστα, με αναλυτικές οδηγίες, έχουν μικρό κόστος, ακολουθούν τις πρότυπες μεθόδους διεθνών οργανισμών, έχουν υψηλή ευαισθησία και απαιτούν ελάχιστο εργαστηριακό εξοπλισμό. Τα μειονεκτήματά τους είναι ότι τα περισσότερα δεδομένα της βιβλιογραφίας δεν αναφέρονται σε Τοχkits, αλλά σε κλασσικές βιολογικές δοκιμές, οι οργανισμοί που χρησιμοποιούνται δεν προέρχονται από το φυσικό περιβάλλον και σε ορισμένες χώρες η πλειοψηφία των επιστημόνων δεν θεωρεί αξιόπιστα τα αποτελέσματα των Τοχkits (Κούγκολος 2007).

Οι πρότυπες μέθοδοι δοκιμών που υπάρχουν σήμερα και χρησιμοποιούνται έχουν αναπτυχθεί από διάφορους οργανισμούς:

- Αμερικάνικη Ένωση Δημόσιας Υγείας (American Public Health Association-APHA)
- Διεύθυνση Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (U.S. Environmental Protection Agency-U.S.EPA)
- Αμερικάνικη Εταιρεία Δοκιμών και Υλικών (American Society for Testing and Materials-ASTM),
- Οργανισμός για Οικονομική Συνεργασία και Ανάπτυξη (Organization for Economic Cooperation and Development-OECD),
- Διεθνής Οργανισμός για Πιστοποίηση (International Organization for Standardization – ISO),
- Πρόγραμμα για το Περιβάλλον των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Environment Program-UNEP).

Παρά τα θετικά που έχει η χρήση των πρότυπων μεθόδων καθώς θεωρητικά μεγιστοποιεί την αξιοπιστία, την επαναληψιμότητα και τη δυνατότητα σύγκρισης, υπάρχει ο κίνδυνος της «υπερ-πιστοποίησης», διότι με τη χρήση τους κάποιες φορές «αποθαρρύνεται η καινοτομία». Αυτό συμβαίνει στις περιπτώσεις εκείνες όπου η χρήση μιας πρότυπης μεθόδου είναι υποχρεωτική αλλά συγχρόνως ακατάλληλη όταν εφαρμόζεται χωρίς να λαμβάνονται υπόψη τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του

περιβάλλοντος όπου ζει ο υπό εξέταση οργανισμός ή όταν ο πρότυπος οργανισμός που χρησιμοποιείται για την διεξαγωγή των πειραμάτων δεν ζει στο εξεταζόμενο περιβάλλον (Γατίδου, 2005).

#### *2.3.4 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΜΙΓΜΑΤΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ*

Καθημερινά απελευθερώνονται στο περιβάλλον πλήθος χημικών ουσιών βιομηχανικής, γεωργικής, οικιακής ή άλλης προέλευσης. Οι ζωντανοί οργανισμοί λοιπόν εκτίθενται σε μίγματα ουσιών ποικίλης δράσης και συγκέντρωσης. Τα αποτελέσματα της δράσης αυτής είναι απαραίτητα να εκτιμηθούν για όσο το δυνατό περισσότερους συνδυασμούς περιβαλλοντικά σημαντικών ουσιών, αλλά και περιβαλλοντικών παραμέτρων (Gennings, 2004).

Στη φύση οι διάφορες χημικές ουσίες δεν βρίσκονται ποτέ μεμονωμένες αλλά σε μίγματα και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Γι' αυτό η εύρεση της τοξικότητας κάποιων ουσιών στο περιβάλλον, συνιστά την εύρεση της αλληλεπίδρασης τους με άλλες ουσίες που βρίσκονται στο πεδίο και γι' αυτό το σκοπό αναπτύχθηκαν και οι μελέτες αλληλεπίδρασης για τον εντοπισμό της τοξικότητας πολλών ουσιών ως μίγματα και όχι μόνο ως μεμονωμένες ουσίες (Hoffman et al, 2003).

Τα μίγματα χημικών ουσιών πλεονεκτούν στη χρήση τους ορισμένες φορές, συγκριτικά με τη χρήση μεμονωμένων χημικών ουσιών και συχνά ονομάζονται και ως μελέτες αλληλεπίδρασης, επειδή παρουσιάζουν τα εξής θετικά (Γατίδου, 2005) :

- Αυξημένη αποτελεσματικότητα εναντίον των οργανισμών – στόχων,
- Αυξημένη ασφάλεια για οργανισμούς μη – στόχους,
- Απαιτήση χρήσης μικρότερων ποσοτήτων των ουσιών για το ίδιο αποτέλεσμα,
- Μικρότερο κόστος,
- Πιο ακριβή αποτελέσματα,
- Δυνατότητα εξέτασης της τοξικής συμπεριφοράς μιας ουσίας σε περισσότερο πραγματικές συνθήκες, καθώς ποτέ μια ουσία δεν βρίσκεται μόνη της στο περιβάλλον,
- Δυνατότητα εξέτασης της τοξικής συμπεριφοράς μιας ουσίας σε περισσότερο πραγματικές συνθήκες, καθώς ποτέ μια ουσία δεν βρίσκεται μόνη της στο περιβάλλον.

### 2.3.5 ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η πιο διαδεδομένη θεωρία πρόβλεψης συνδυασμένης τοξικότητας δύο ή περισσότερων τοξικών ουσιών προτάθηκε από τον Gowling το 1960. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή έστω ότι ένα μίγμα ουσιών αποτελείται από:

την ουσία Α με συγκέντρωση  $a$  που προκαλεί ένα αποτέλεσμα  $P(a)$  και

την ουσία Β με συγκέντρωση  $b$  προκαλεί ένα αποτέλεσμα  $P(b)$ .

Τα  $P(a)$  και  $P(b)$  εκφράζονται σε % θνησιμότητα ή αναστολή κάποιας λειτουργίας του οργανισμού δείκτη. Τότε, το αναμενόμενο συνδυασμένο αποτέλεσμα  $P(e)$  θα είναι:

$$P(e) = P(a) + P(b) \times [100 - P(a)] / 100 \quad [1]$$

Έτσι, αν το παρατηρούμενο πειραματικά αποτέλεσμα είναι το  $P(o)$  η επίδραση ενός μίγματος χημικών ουσιών μπορεί να είναι:

- Ανταγωνιστική επίδραση (Antagonistic interactive effect) αν  $P(o) < P(e)$ ,
- Προσθετική επίδραση (Additive interactive effect) αν  $P(o) = P(e)$ ,
- Συνεργιστική επίδραση (Synergistic interactive effect) αν  $P(o) > P(e)$ .

Πρέπει να τονιστεί ότι ο Gowling κατέληξε στα παραπάνω υποθέτοντας ότι η επίδραση των δύο ουσιών είναι διαδοχική. Ωστόσο, άλλοι επιστήμονες κατέληξαν στο ίδιο αποτέλεσμα βασιζόμενοι στη θεωρία των πιθανοτήτων και θεωρώντας ότι η επίδραση των ουσιών είναι ταυτόχρονη (Κούγκολος, 2007).

Ένα τέτοιο μοντέλο περιγράφεται στη συνέχεια. Έστω ότι  $P_1$  είναι η επίδραση που προκαλεί μια συγκεκριμένη συγκέντρωση της ουσίας  $A_1$  και  $P_2$  είναι η επίδραση που προκαλεί μια συγκεκριμένη συγκέντρωση της ουσίας  $A_2$ . Τότε, η θεωρητικά αναμενόμενη προσθετική επίδραση  $P(E)$ , όταν οι δύο αυτές συγκεντρώσεις των δύο χημικών ουσιών εφαρμόζονται μαζί, δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$P(E) = P_1 + P_2 - P_1P_2/100 \quad [2]$$

η οποία όπως προαναφέρθηκε βασίζεται στη υπόθεση ότι τα δύο χημικά επιδρούν στο οργανισμό-δείκτη ταυτόχρονα και όχι το ένα μετά το άλλο. Πιο συγκεκριμένα, η αρχική υπόθεση είναι ότι σε όλες τις περιπτώσεις η συνδυασμένη επίδραση είναι προσθετική. Για να διαπιστωθεί η ορθότητα της αρχικής υπόθεσης, συγκρίνονται για κάθε

συνδυασμό συγκεντρώσεων των ουσιών, οι παρατηρούμενες τοξικότητες με την αναμενόμενη τοξικότητα, η οποία προκύπτει από τον τύπο [2] (Kungolos et al., 2009).

Οι αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν μάλλον μεταξύ των φυσιολογικών συστημάτων των οργανισμών και των χημικών ουσιών παρά μεταξύ των χημικών ουσιών. Οι περισσότερες αλληλεπιδράσεις είναι πολύπλοκες και ο μηχανισμός τους παραμένει άγνωστος. Είναι πάντως σίγουρο ότι η απλή καταγραφή και περιγραφή αυτών υποβοηθά την κατανόησή τους. Η μελέτη της τοξικότητας του συνδυασμού φυτοφαρμάκων ή φυτοφαρμάκων και άλλων χημικών ουσιών αποτελεί ένα πεδίο που δεν έχει διευρυνθεί αρκετά, ίσως λόγω του μεγάλου αριθμού των δυνατών συνδυασμών (Hoffman et al., 2003, Gatidou et al., 2007).

Ο ανταγωνισμός είναι ένα πολύ σημαντικός μηχανισμός μεταξύ δυο χημικών ουσιών, από περιβαλλοντικής άποψης, καθώς μειώνει την πιθανότητα «ζημιάς» σ' έναν οργανισμό που μπορεί να προκαλέσει και μια ουσία μόνη της. Αφού το τοξικό αποτέλεσμα, όταν χορηγηθούν και οι δύο ουσίες μαζί, είναι μικρότερο από το άθροισμα του τοξικού αποτελέσματος της κάθε μιας ξεχωριστά. Γι' αυτό το λόγο, ο ανταγωνισμός είναι μια πολύ ενδιαφέρουσα τοξικολογική ιδιότητα και χρησιμοποιείται στην παρασκευή αντιδότητων (Ιατρού, 2009).



### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Για τα πειράματα τοξικότητας επιλέχθηκαν οι φυτοπροστατευτικές ουσίες propiconazole και chlorpyrifos και χρησιμοποιήθηκαν τα σκευάσματα Bumper 25EC και Dursban\* 480EC, αντίστοιχα.

Οι οργανισμοί δείκτες που επιλέχθηκαν για τις μετρήσεις τοξικότητας και συνδυασμένης τοξικότητας των παραπάνω φυτοπροστατευτικών ουσιών ήταν το καρκινοειδές *Daphnia magna* και τα μικροφύκη *Pseudokirchneriella subcapitata*.

#### 3.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα εξής σκεύη, όργανα και συσκευές:

- ογκομετρικές φιάλες
- σифόνια πλήρωσης
- ποτήρια ζέσεως
- πιπέττες
- φυγόκεντρος
- φωτόμετρο
- ισοθερμικός θάλαμος για την επώαση των οργανισμών δεικτών
- φωτεινή επιφάνεια
- στερεοσκόπιο
- ψυγείο συντήρησης των πυκνών διαλυμάτων (stock) των φυτοπροστατευτικών προϊόντων και των οργανισμών δεικτών σε απενεργοποιημένη μορφή.

### 3.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

#### 3.3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ *D. MAGNA*

Κατά τα πειράματα τοξικότητας με το καρκινοειδές, *Daphnia magna*, πραγματοποιήθηκε έλεγχος του ποσοστού των ζώων που ακινητοποιήθηκαν 24 ώρες μετά την έκθεσή τους στις φυτοπροστατευτικές ουσίες propiconazole, chlorpyrifos και σε μίγματα αυτών (ISO, 1982). Το σημείο αναφοράς του πειράματος για τον προσδιορισμό της τοξικότητας και της συνδυασμένης τοξικότητας των παραπάνω ουσιών, ήταν η ακινητοποίηση των οργανισμών εξαιτίας του γεγονότος ότι ο θάνατός τους δεν ανιχνεύεται εύκολα. Ένας οργανισμός θεωρείται ακίνητος εάν δεν κινηθεί εντός της κυψελίδας έπειτα από 15 δευτερόλεπτα από τη στιγμή της ενόχλησής του με τη βοήθεια μικροσιφωνίου (ISO, 1982).

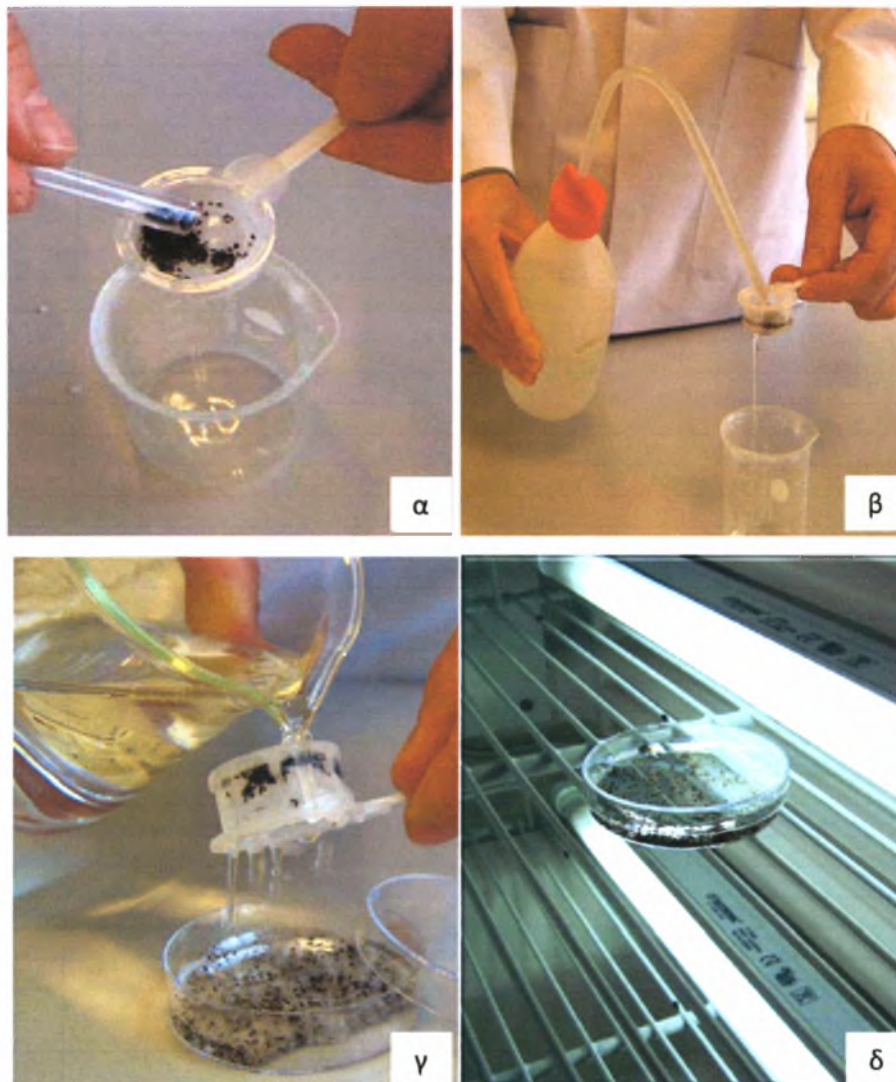
Το Daftokit F<sup>TM</sup> magna που χρησιμοποιήθηκε περιείχε:

- φιαλίδια με εφίππια *Daphnia magna*,
- τριβλία επώασης του οργανισμού,
- δισκία με 30 κυψελίδες,
- ταινίες parafilm,
- μικροσιφόνια ,
- μικροκόσκινο.



**Εικόνα 3.1** Σετ μέτρησης τοξικότητας με το καρκινοειδές *Daphnia magna* (Daftokit F<sup>TM</sup> magna).

Τρεις ημέρες (το μέγιστο 90 ώρες) πριν την έναρξη της δοκιμής μέτρησης τοξικότητας, ενεργοποιούμε τα φιαλίδια με τα εφίπια *Daphnia magna*. Για την ενεργοποίηση, αδειάζουμε το περιεχόμενο ενός φιαλιδίου στο μικροκόσκινο και ξεπλένουμε τα εφίπια πολύ καλά με νερό βρύσης. Στη συνέχεια, μεταφέρουμε τα εφίπια σε ένα τρυβλίο επώασης, προσθέτουμε 15mL εμφιαλωμένου νερού και εκθέτουμε το τρυβλίο σε πηγή φωτός 6000 lux εντός ισοθερμικού θαλάμου επώασης στους 20-22°C. Έπειτα από 72-80 ώρες, λήφθηκαν τα νεογνά της *Daphnia magna*, τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα τοξικότητας. Η πρότυπη πειραματική μέθοδος της μέτρησης τοξικότητας υποδεικνύει τα νεογνά που χρησιμοποιούνται να είναι μικρότερα από 24 ωρών (>24 ώρες θεωρούνται ενήλικα) κατά την έναρξη του πειράματος. Η παραπάνω διαδικασία απεικονίζεται στην εικόνα 3.2 (α) έως (δ).



**Εικόνα 3.2** Ενεργοποίηση επιπύων της *D. magna*. Μεταφορά επιπύων αρχικά στο μικροκόσκινο (α), ξέπλυμα στο μικροκόσκινο με νερό βρύσης (β), απόπλυση με εμφιαλωμένο νερό σε τριβλίο (γ) και στη συνέχεια τοποθέτηση σε θάλαμο με ελεγχόμενη θερμοκρασία και φως για επώαση για 72 ώρες (δ).

*Προσδιορισμός IC<sub>50</sub> και δοκιμές τοξικότητας.*

Μετά το τέλος της επώασης των εφιπίων, προετοιμάστηκε μια σειρά διαλυμάτων σε εμφιαλωμένο νερό για τον προσδιορισμό του IC<sub>50</sub> και τη διεξαγωγή των πειραμάτων τοξικότητας. Τα τελικά διαλύματα προέκυψαν από τα πυκνά (stock) διαλύματα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, με διαδοχικές αραιώσεις σε ογκομετρικές φιάλες των 100mL.

Για τον προσδιορισμό του IC<sub>50</sub> παρασκευάστηκαν:

- πέντε διαλύματα για το propiconazole (P): 0,2 – 2 – 5 – 20 – 50 mg/L,
- πέντε διαλύματα για το chlorpyrifos (C): 0,05 – 0,2 – 2 – 5 – 20 mg/L.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων τοξικότητας και συνδυασμένης τοξικότητας παρασκευάστηκαν:

- τρία διαλύματα για το propiconazole: P1 = 1mg/L, P2 = 5mg/L και P3 = 10mg/L,
- δύο διαλύματα για το chlorpyrifos (C): 0,1mg/L και 0,5mg/L,

καθώς και τα εξής μίκτα διαλύματα:

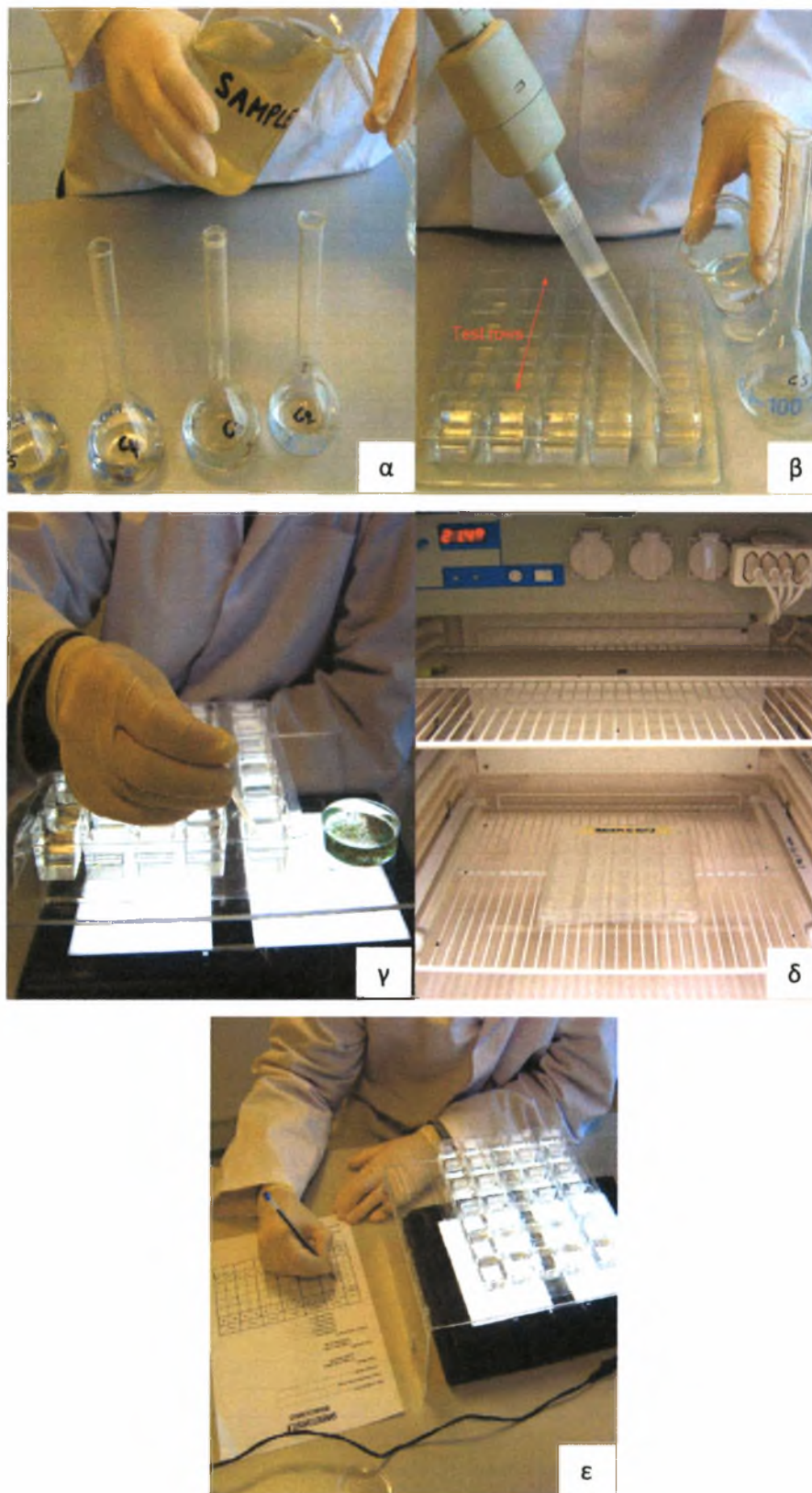
- (A): C1P1,
- (B): C2P1,
- (Γ): C1P2,
- (Δ): C2P2,
- (E): C1P3 και
- (Z): C2P3.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δισκία με 30 κυψελίδες (σε μορφή πίνακα). Κάθε δισκίο έχει μια σειρά από 4 κυψελίδες (4 επαναλήψεις) για το μάρτυρα (εμφιαλωμένο νερό), καθώς και 5 επιπλέον σειρές (με 4 κυψελίδες-επαναλήψεις η κάθε μια). Η κάθε μια από τις 6 συνολικά σειρές, περιλαμβάνει και μια επιπλέον αριστερή βοηθητική κυψελίδα στην οποία τοποθετούνται αρχικά τα νεογνά της *D. magna* πριν μοιραστούν στις 4 κυψελίδες, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

Σε κάθε σειρά με τη βοήθεια πιπέττας, τοποθετήθηκαν 40mL από κάθε ένα από τα διάφορα υπό εξέταση διαλύματα (10mL/κυψελίδα). Μετά την τοποθέτηση των διαλυμάτων στις κυψελίδες, έγινε μεταφορά νεογνών από το τρυβλίο επώασης στις βοηθητικές κυψελίδες, με προσεκτικές κινήσεις προς αποφυγή τραυματισμού των οργανισμών. Η μεταφορά έγινε επάνω σε φωτεινή επιφάνεια, με γυμνό οφθαλμό και με χρήση μικροσιφωνίου. Μεταφέρθηκαν 20 περίπου νεογνά ανά βοηθητική κυψελίδα και

στη συνέχεια αυτά μοιράστηκαν στις 4 κυψελίδες της κάθε σειράς (5 νεογνά/κυψελίδα). Έπειτα, κάθε δισκίο καλύφθηκε με parafilm, με σκοπό να αποτραπεί η μετακίνηση των νεογνών από τη μια κυψελίδα στην άλλη. Τέλος, τα δισκία τοποθετήθηκαν σε ισοθερμικό θάλαμο στους 20°C στο σκοτάδι για 24 ώρες.

Μετά την παρέλευση των 24 ωρών συντήρησης των οργανισμών έγινε καταμέτρηση των ακινητοποιημένων οργανισμών ανά διάλυμα (δηλαδή ανά σειρά). Το πείραμα θεωρήθηκε έγκυρο αφού το ποσοστό θνησιμότητας στο δείγμα του μάρτυρα δεν ξεπερνούσε το 10% (Daphtoxkit F<sup>TM</sup> magna). Η παραπάνω διαδικασία απεικονίζεται στην εικόνα 3.3 (α) έως (ε).



**Εικόνα 3.3** Προετοιμασία διαλυμάτων των ουσιών (α). 40mL από το κάθε διάλυμα τοποθετούνται στην κάθε σειρά του δισκίου (10mL/κυψ.) (β). Μεταφορά 20 νεογ./βοηθ. κυψ. από το τρυβλίο επώασης και μοίρασμα (5 νεογ./κυψ.) στις κυψελίδες που περιέχουν

διάλυμα (γ). Τοποθέτηση δισκίου καλυμμένου με πλαστική μεμβράνη για 24h, στους 20°C, στο σκοτάδι (δ). Καταμέτρηση ακινητοποιημένων νεογνών μετά από 24 ώρες (ε).

### 3.3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ *P. SUBCAPITATA*

Κατά τα πειράματα τοξικότητας με το φυτοπλαγκτόν *Pseudokirchneriella subcapitata*, η τοξική επίδραση των ουσιών propiconazole και chlorpyrifos, καθώς και η συνδυασμένη τοξικότητα αυτών προσδιορίστηκε βάσει του ποσοστού αναστολής της ανάπτυξης της μικροάλγης. Το ποσοστό αυτό υπολογίστηκε έπειτα από μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας διαλυμάτων των ουσιών στα οποία είχε προστεθεί το φυτοπλαγκτόν, όπως περιγράφεται στη συνέχεια. Το πείραμα επαναλήφθηκε 2 φορές.

Το Algaltoxkit F<sup>TM</sup> που χρησιμοποιήθηκε περιείχε:

- σωληνάρια με απενεργοποιημένη μορφή-σφαιρίδια (immobilized algal beads) της μικροάλγης *Pseudokirchneriella subcapitata*,
- φιαλίδια με πρότυπα θρεπτικά διαλύματα (nutrient stock vials)(A, B, C, D),
- φιαλίδιο με το Matrix Dissolving Medium,
- κυβέλες των 10cm για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στο φωτόμετρο,
- πρωτόκολλα μέτρησης οπτικής πυκνότητας,
- διάγραμμα οπτικής πυκνότητας/αριθμό κυττάρων (OD/N).

Ένα βασικό πλεονέκτημα του Algaltoxkit είναι ότι οι βιοδοκιμές μπορούν να αρχίσουν σε 30 λεπτά από την ενεργοποίηση του φυτοπλαγκτού. Επιπλέον, οι μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας στο φωτόμετρο είναι πολύ σύντομες και απλές.





**Εικόνα 3.4** Σετ μέτρησης τοξικότητας με τα μικροφύκη *Pseudokirchneriella subcapitata* (Algaltoxkit F™).

*Προετοιμασία του διαλύματος Algal Culturing Medium.*

Για την παρασκευή του Algal Culturing Medium σε ογκομετρική φιάλη των 100mL τοποθετήθηκαν: 1mL από το θρεπτικό διάλυμα A, 0,1mL από το θρεπτικό διάλυμα B, 0,1mL από το θρεπτικό διάλυμα C, 0,1mL από το θρεπτικό διάλυμα D και η φιάλη συμπληρώθηκε στο σύνολο του όγκου της με απιονισμένο νερό (Εικόνα 3.5). Η σύσταση των θρεπτικών διαλυμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.1.



**Εικόνα 3.5** Θρεπτικά διαλύματα για την προετοιμασία του Algal Culturing Medium.

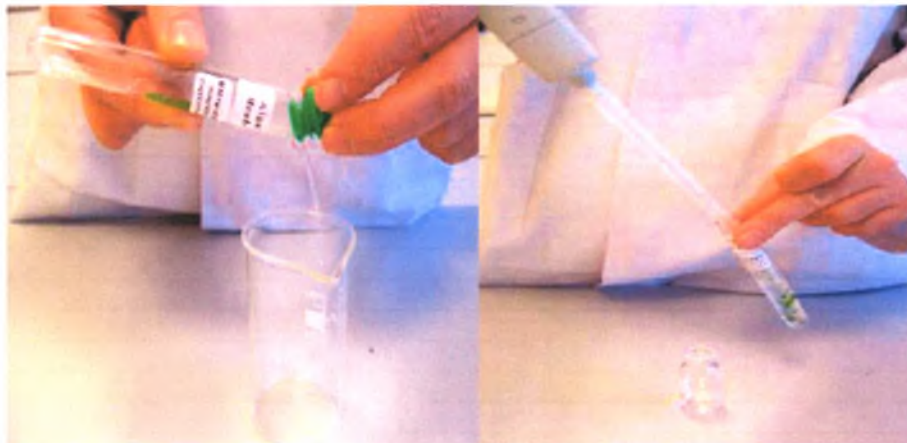
**Πίνακας 3.1** Σύσταση πρότυπου διαλύματος για μετρήσεις τοξικότητας με τα μικροφύκη *P. subcapitata* (OECD, 1984).

Συστατικό		Συγκέντρωση
Θρεπτικά (mg/L) (Α)	NH <sub>4</sub> Cl	15
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	12
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	18
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.6
Fe-EDTA (μg/L) (Β)	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	64
	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	100
Ιχθυοστοιχεία (μg/L) (Γ)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	415
	ZnCl <sub>2</sub>	3
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.5
	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7
NaHCO <sub>3</sub> (mg/L) (Δ)	NaHCO <sub>3</sub>	50

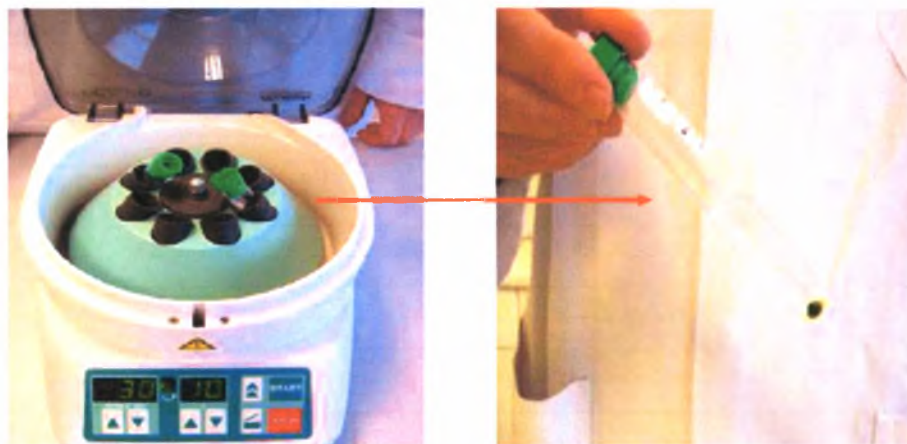
25mL από το Algal Culturing Medium τοποθετήθηκαν σε μια κυψελίδα των 10cm και χρησιμοποιούταν για τη βαθμονόμηση (calibration) του φωτόμετρου κάθε φορά πριν τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων. Επιπλέον, το Algal Culturing Medium χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή του Algal Stock, όπως αυτή περιγράφεται παρακάτω.

*Ενεργοποίηση της Pseudokirchneriella subcapitata και προετοιμασία του διαλύματος Algal Stock.*

Από ένα σωληνάριο με 5 σφαιρίδια απενεργοποιημένης άλγης αφαιρέθηκε με προσοχή το διάλυμα συντήρησης και προστέθηκαν 4mL Matrix Dissolving Medium (Εικόνα 3.6). Ακολούθησε ανακίνηση για να διαλυθούν τα σφαιρίδια και στη συνέχεια φυγοκέντριση για 10 λεπτά (3000rpm) (Εικόνα 3.7). Μετά τη φυγοκέντριση, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο διάλυμα και προστέθηκαν 10mL Algal Culturing Medium. Μετά από ανακίνηση το περιεχόμενο του σωληναρίου μεταφέρθηκε σε κυψελίδα των 10cm και αραιώθηκε με περίπου 3mL Algal Culturing Medium. Ακολούθησε νέα ανακίνηση και στη συνέχεια, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα του διαλύματος στο φωτόμετρο (OD1). Με τη βοήθεια του διαγράμματος OD/N βρέθηκε σε ποιο αριθμό κυττάρων (N1) αντιστοιχεί η OD1. Από την αναλογία N1/N2 ( $N2=1 \cdot 10^6$  algae/mL) υπολογίσαμε τον συντελεστή αραιώσης, έτσι ώστε να φτάσουμε στην οπτική πυκνότητα (OD2) που αντιστοιχεί στον πληθυσμό N2.



**Εικόνα 3.6** Αφαίρεση διαλύματος συντήρησης και προσθήκη 4mL M. Dis. Medium.



**Εικόνα 3.7** Φυγοκέντριση διαλύματος του μικροφύκου για 10 λεπτά (3000rpm).

*Παρασκευή διαλυμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών.*

Προετοιμάστηκε μια σειρά διαλυμάτων σε απιονισμένο νερό για τον προσδιορισμό του IC<sub>50</sub> και τη διεξαγωγή των πειραμάτων τοξικότητας. Τα τελικά διαλύματα προέκυψαν από τα πυκνά (stock) διαλύματα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, με διαδοχικές αραιώσεις σε ογκομετρικές φιάλες των 100mL.

Για τον προσδιορισμό του IC<sub>50</sub> παρασκευάστηκαν:

- πέντε διαλύματα για το propiconazole (P): 0,2 – 2 – 5 – 20 – 50mg/L,
- πέντε διαλύματα για το chlorpyrifos (C): 0,2 – 2 – 5 – 20 – 50mg/L.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων τοξικότητας και συνδυασμένης τοξικότητας παρασκευάστηκαν:

- δύο διαλύματα για το propiconazole (P): P1 = 0,5mg/L και P2 = 5mg/L,
- τρία διαλύματα για το chlorpyrifos (C): C1 = 0,5mg/L, C2 = 5mg/L και C3 = 20mg/L,

καθώς και τα εξής μικτά διαλύματα:

- (Α): C1P1
- (Β): C2P1
- (Γ): C3P1
- (Δ): C1P2
- (Ε): C2P2
- (Ζ): C3P2.

*Προετοιμασία μαρτύρων για τα πειράματα τοξικότητας.*

Για την δημιουργία των τριών μαρτύρων (3 επαναλήψεις), σε τρεις κυψελίδες των 10cm τοποθετήθηκαν 75mL Algal Culturing Medium (25mL/κυψελίδα). Στη συνέχεια προστέθηκε 0,75mL Algal Stock σε κάθε κυψελίδα.

Για να θεωρηθούν αξιόπιστα τα τεστ τοξικότητας και να γίνουν αποδεκτά, μεταξύ άλλων πρέπει ο αριθμός των κυττάρων του φυτοπλαγκτού στις κυψελίδες του μάρτυρα να αυξηθεί τουλάχιστον κατά 16 φορές, κατά τη διάρκεια των 72 ωρών που ο οργανισμός εκτίθεται στις τοξικές ουσίες (OECD, 1984).

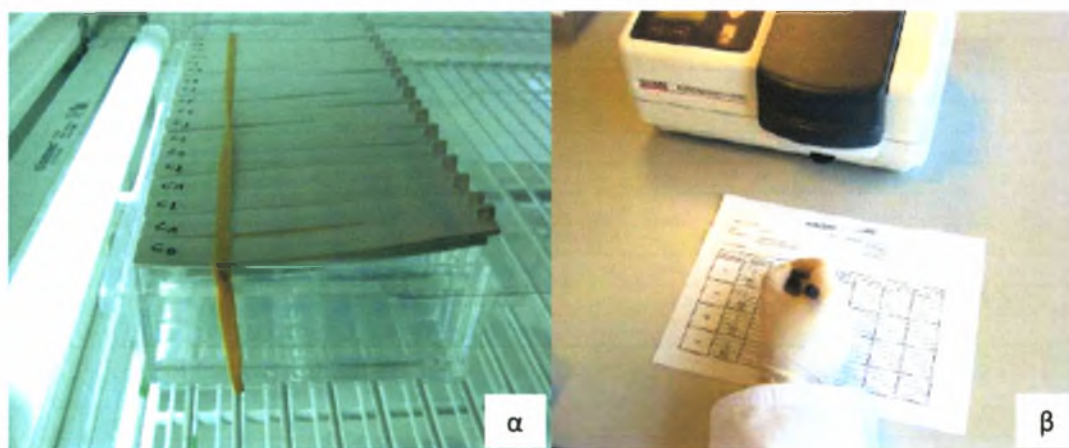
*Προετοιμασία δειγμάτων με Pseudokirchneriella subcapitata και δειγμάτων blank.*

Σε κάθε φιάλη των 100mL με τα παραπάνω διαλύματα προστέθηκαν οι εξής ποσότητες θρεπτικών διαλυμάτων: 1mL A - 0,1mL B - 0,1mL C - 0,1mL D. Έπειτα από ανακίνηση, 25mL από κάθε φιάλη τοποθετήθηκαν σε κυψελίδες των 10cm έτσι ώστε για κάθε διάλυμα να προκύψει ένα δείγμα blank.

Στην ποσότητα που απέμεινε σε κάθε φιάλη (75mL) προστέθηκαν 0,75mL Algal Stock. Το περιεχόμενο των φιαλών μοιράστηκε ισομερώς σε τρεις κυψελίδες, οπότε προέκυψαν τρία δείγματα (3επαναληψεις) των 25mL περίπου για το κάθε διάλυμα.

*Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων.*

Οι μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στο φωτόμετρο πραγματοποιούνταν στα 670nm, στις 0, 24, 48 και 72 ώρες μετά την έκθεση του οργανισμού στις τοξικές ουσίες (Εικόνα 3.8.β). Για κάθε διάλυμα υπολογιζόταν ο μέσος όρος των μετρούμενων οπτικών πυκνοτήτων των τριών επαναλήψεων. Πριν την κάθε μέτρηση πραγματοποιούνταν βαθμονόμηση (calibration) του φωτόμετρου με τη βοήθεια του Algal Culturing Medium Cell. Κατά τη διάρκεια των 72 ωρών τα δείγματα παρέμεναν σε ισοθερμικό θάλαμο στους  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , υπό συνεχή φωτισμό 7000lux (Εικόνα 3.8.α).



**Εικόνα 3.8** Επώαση 72 ωρών των δειγμάτων σε ισοθερμικό θάλαμο στους  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , υπό συνεχή φωτισμό 7000lux (α) και μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στο φωτόμετρο (β).

### 3.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο υπολογισμός της τιμής  $IC_{50}$  για τις δύο φυτοπροστατευτικές ουσίες και τους οργανισμούς δείκτες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, έγινε με χρήση της στατιστικής μεθόδου *Probit Analysis*, του στατιστικού πακέτου *SPSS 16.0*.

Η συνδυασμένη τοξικότητα των δύο φυτοπροστατευτικών ουσιών προσδιορίστηκε βάσει συγκρίσεως της πειραματικά παρατηρούμενης τοξικότητας του μίγματος των δύο ουσιών  $P(O)$  και της θεωρητικά αναμενόμενης προσθετικής τοξικότητας  $P(E)$ , η οποία προκύπτει από την εξίσωση [2] που προαναφέρθηκε και εξηγήθηκε στην παράγραφο 2.3.5.

Στην περίπτωση που η διαφορά μεταξύ  $P(O)$  και  $P(E)$  δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $\alpha = 0,05$ ), τότε η αρχική υπόθεση θεωρούταν αποδεκτή και κατά συνέπεια, η συνδυασμένη τοξικότητα προσθετική. Αντίθετα, η αρχική υπόθεση απορριπτόταν και η συνδυασμένη τοξικότητα θεωρούταν ανταγωνιστική ή συνεργιστική, όταν η  $P(O)$  συγκριτικά με την  $P(E)$  ήταν χαμηλότερη ή υψηλότερη, αντίστοιχα (Kungolos et al., 2009).

#### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

##### 4.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ IC<sub>50</sub>

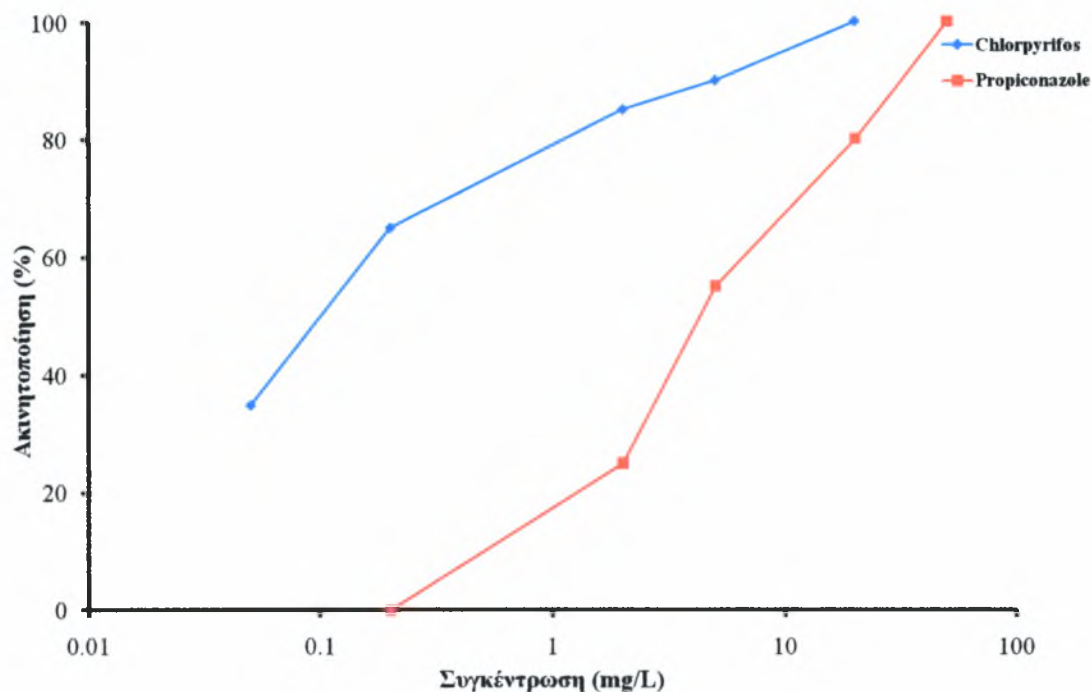
Στους πίνακες 4.1, 4.2, 4.3 και 4.4 και στα γραφήματα 4.1 και 4.2 παρουσιάζονται τα ποσοστά θνησιμότητας και αναστολής ανάπτυξης των οργανισμών δεικτών που μετρήθηκαν κατά τα πειράματα προσδιορισμού του IC<sub>50</sub> των δύο ουσιών.

**Πίνακας 4.1** Ποσοστό ακινητοποίησης της *D. magna* λόγω επίδρασης των διαφόρων επιπέδων συγκέντρωσης του chlorpyrifos.

Επίπεδο συγκέντρωσης (mg/L)	Ακινητοποίηση (%)
0.05	35
0.20	65
2	85
5	90
20	100

**Πίνακας 4.2** Ποσοστό ακινητοποίησης της *D. magna* λόγω επίδρασης των διαφόρων επιπέδων συγκέντρωσης του propiconazole.

Επίπεδο συγκέντρωσης (mg/L)	Ακινητοποίηση (%)
0.2	0
2	25
5	55
20	80
50	100



**Γράφημα 4.1** Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της μεταβολής της συγκέντρωσης των δύο φυτοπροστατευτικών ουσιών στην ακινήτοποίηση της *D. magna*.

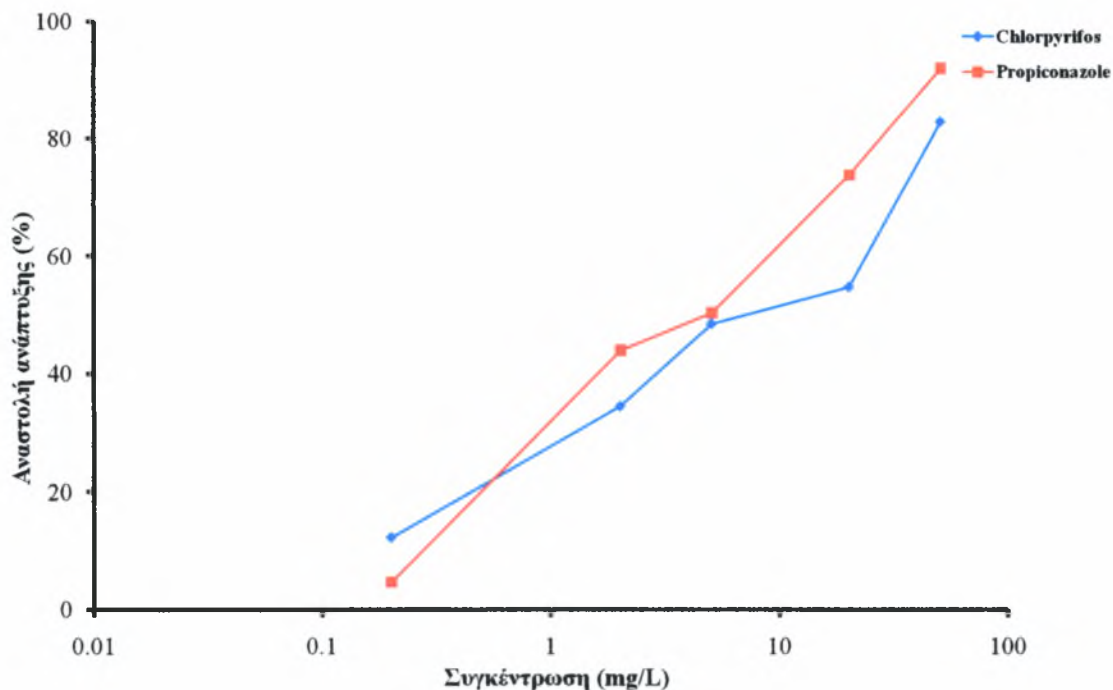
**Πίνακας 4.3** Ποσοστό αναστολής ανάπτυξης του *P. subcapitata* λόγω επίδρασης των διαφόρων επιπέδων συγκέντρωσης του chlorpyrifos.

Επίπεδο συγκέντρωσης (mg/L)	Αναστολή ανάπτυξης (%)
0.2	12.24
2	34.36
5	48.35
20	54.61
50	82.69

**Πίνακας 4.4** Ποσοστό αναστολής ανάπτυξης του *P. subcapitata* λόγω επίδρασης των διαφόρων επιπέδων συγκέντρωσης του propiconazole.

Επίπεδο συγκέντρωσης (mg/L)	Αναστολή ανάπτυξης (%)
0.2	4.69
2	43.87
5	50.28
20	73.70
50	91.86





**Γράφημα 4.2** Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της μεταβολής της συγκέντρωσης των δύο φυτοπροστατευτικών ουσιών στην ανάπτυξη του *P. subcapitata*.

Όπως προκύπτει από την ακινητοποίηση της *D. magna* που παρατηρήθηκε για τις διάφορες συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, το Chlorpyrifos παρουσίασε σαφώς μεγαλύτερη τοξικότητα σε σχέση με το Propiconazole, καθώς σε χαμηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης τα ποσοστά θνησιμότητας του οργανισμού δείκτη ήταν υψηλότερα. Αντίθετα, για το *P. subcapitata*, το Propiconazole εμφανίζεται πιο τοξικό, χωρίς όμως τα επίπεδα τοξικότητάς του να είναι κατά πολύ μεγαλύτερα από αυτά του Chlorpyrifos. Επιπλέον, στο χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης (0,2mg/L) το Chlorpyrifos εμφανίζεται πολύ πιο τοξικό από το Propiconazole.

Στον πίνακα 4.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα προσδιορισμού των τιμών του IC<sub>50</sub> και για τις δυο ουσίες στους οργανισμούς-δείκτες.

**Πίνακας 4.5** Τιμές του IC<sub>50</sub> για τις δύο ουσίες στους οργανισμούς-δείκτες.

Ουσία	<i>D. magna</i>	<i>P. subcapitata</i>
	IC <sub>50</sub> (mg/L)	IC <sub>50</sub> (mg/L)
Chlorpyrifos	0,11	8,47
Propiconazole	4,83	4,12

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα το Chlorpyrifos είναι πολύ πιο τοξικό για τη *D. magna* σε σχέση με το Propiconazole, γεγονός που συμφωνεί με ευρήματα και άλλων μελετητών. Σύμφωνα με τους Ren et al. (2007) και Palma et al. (2008), τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, στα οποία ανήκει και το Chlorpyrifos, παρουσιάζουν υψηλή τοξικότητα στα οστρακόδερμα, στα οποία ανήκουν και οι δαφνίδες, σε σχέση με άλλες ομάδες γεωργικών φαρμάκων, άποψη που επιβεβαιώνει τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, παρόλο που οι τιμές του IC<sub>50</sub> που προσδιορίστηκαν από τους προαναφερθέντες μελετητές είναι μικρότερες (δηλαδή η ουσία βρέθηκε πιο τοξική) από την τιμή που υπολογίστηκε εδώ.

Ομοίως και οι τιμές του IC<sub>50</sub> για το Propiconazole στη *D. magna* που συναντώνται σε ορισμένα επιστημονικά άρθρα είναι χαμηλότερες από αυτή που υπολογίστηκε εδώ (Banke and Cedergreen, 2010). Αυτό ίσως εξηγείται από το γεγονός ότι κατά το πειραματικό μέρος της διατριβής χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα των εμπορικών σκευασμάτων των ουσιών, ενώ σε άλλες περιπτώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί οι καθαρές δραστικές ουσίες (όπου η καθαρότητα προσεγγίζει το 100%) και κατά συνέπεια, δεν υπήρχε πιθανή μείωση της τοξικής δράσης τους λόγω της παρουσίας προσθετικών ουσιών, που σχεδόν πάντα υπάρχουν στα σκευάσματα.

Ωστόσο, οι Ochoa-Acuña et al. (2009) υπολόγισαν ότι το IC<sub>50</sub> (24h) του Propiconazole για τη *D. magna* ίσο με 9,5 mg/L, δηλαδή η ουσία βρέθηκε να είναι λιγότερο τοξική στο συγκεκριμένο οργανισμό-δείκτη από ότι στην παρούσα εργασία.

Για το *P. subcapitata*, το Propiconazole σε αντίθεση με πριν, εμφανίζεται περισσότερο τοξικό από το Chlorpyrifos, σε μικρότερο όμως βαθμό. Οι τιμές του IC<sub>50</sub> που έχουν προσδιοριστεί πειραματικά και για τις δυο ουσίες από διάφορους μελετητές,

είναι και σε αυτή την περίπτωση μικρότερες από τις τιμές που αναφέρονται στον πίνακα 4.5.

Από τους Ochoa-Acuña et al. (2009) αναφέρεται ότι το IC<sub>50</sub> (72h) του Propiconazole για το *P. subcapitata* ήταν 0,39 mg/L, δηλαδή η ουσία βρέθηκε περισσότερο τοξική για το μικροφύκος.

Οι Peterson et al. (1994) βρήκαν ότι η τοξικότητα του Propiconazole στο *P. subcapitata* ήταν σχετικά χαμηλή, όταν αυτό εκτέθηκε σε δόση ίση με 0,083 mg/L (η αναμενόμενη να βρεθεί στα υδατικά οικοσυστήματα του Καναδά) και παρόλο που δεν υπολόγισαν το IC<sub>50</sub> βρήκαν ότι η αναστολή της ανάπτυξης του μικροφύκου ήταν μικρότερη του 20%.

Γενικά, η ύπαρξη διαφορών στις τιμές του IC<sub>50</sub>, ακόμη και αν είναι σημαντικές δεν είναι κάτι σπάνιο. Αντίθετα, η έλλειψη ομοιομορφίας των αποτελεσμάτων σε πειράματα τοξικότητας που πραγματοποιούνται σε διαφορετικά εργαστήρια, είναι συχνό φαινόμενο (Νασοπούλου, 2006).

#### 4.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ

Ταυτόχρονα με τη μελέτη της συνδυασμένης τοξικότητας, πραγματοποιήθηκε και μελέτη της μεμονωμένης τοξικότητας των δύο γεωργικών φαρμάκων στους οργανισμούς δείκτες, στα επίπεδα συγκέντρωσης που είχαν επιλεγεί για τη μελέτη της συνδυασμένης τοξικότητας.

Και πάλι ο προσδιορισμός της τοξικότητας των ουσιών σε διάφορα επίπεδα συγκέντρωσής τους, εκφράστηκε από το ποσοστό ακινητοποίησης της *D. magna* και από το ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης του *P. subcapitata*.

Τα αποτελέσματα της μελέτης της μεμονωμένης δράσης των δύο ουσιών στους οργανισμούς δείκτες παρουσιάζονται στους πίνακες 4.6 και 4.7.

Πίνακας 4.6 Μεμονωμένη επίδραση των δύο φυτοπροστατευτικών ουσιών στη *D. magna*.

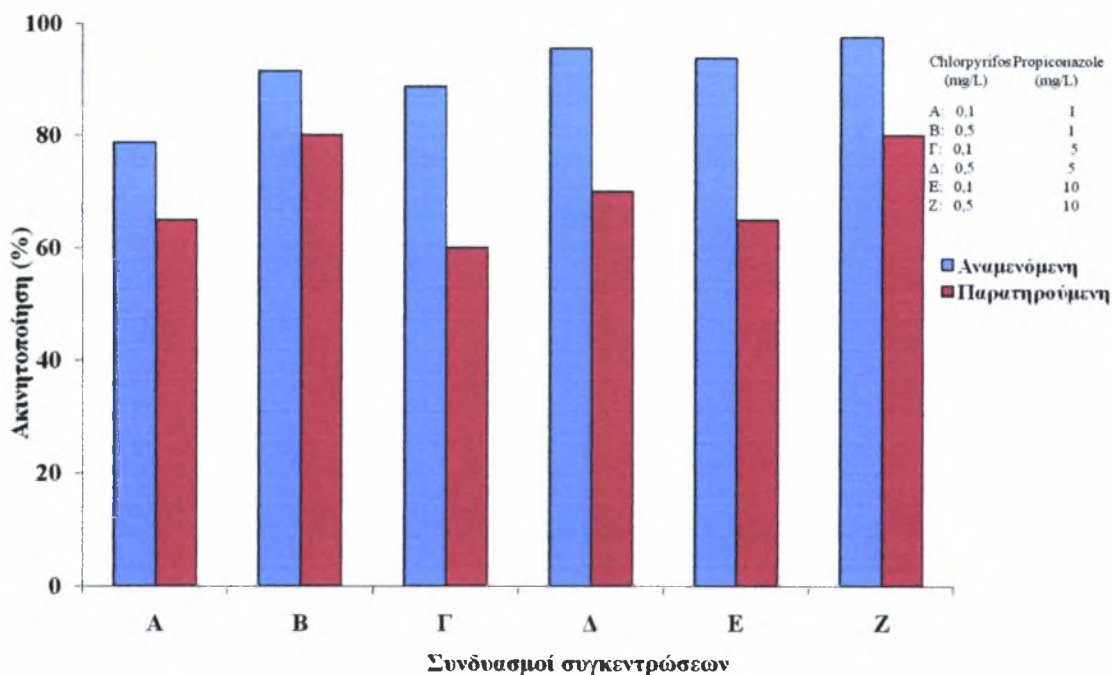
Ουσία	Επίπεδο συγκέντρωσης (mg/L)	Ακινητοποίηση (%)
<b>Chlorpyrifos</b>		
C1	0.1	75
C2	0.5	90
<b>Propiconazole</b>		
P1	1	15
P2	5	55
P3	10	75

Πίνακας 4.7 Μεμονωμένη επίδραση των δύο φυτοπροστατευτικών ουσιών στο *P. subcapitata*.

Ουσία	Επίπεδο συγκέντρωσης (mg/L)	Αναστολή ανάπτυξης (%)
<b>Chlorpyrifos</b>		
C1	0.5	11.5
C2	5	30.3
C3	20	63.0
<b>Propiconazole</b>		
P1	0.5	10.9
P2	5	35.7

Όπως προκύπτει από τους παραπάνω πίνακες, για τη *D. magna* το Chlorpyrifos ήταν πολύ πιο τοξικό, καθώς σε επίπεδα συγκέντρωσης δέκα φορές χαμηλότερα από αυτά του Propiconazole, τα ποσοστά ακινητοποίησης ήταν κατά πολύ μεγαλύτερα, ενώ για το *P. subcapitata* τα επίπεδα τοξικότητας και των δύο ουσιών δεν παρουσίασαν μεγάλες διαφορές, με το Chlorpyrifos να φαίνεται ελάχιστα πιο τοξικό στη χαμηλή συγκέντρωση (0,5 mg/L) και το Propiconazole κατά 5,4% πιο τοξικό στο υψηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης (5 mg/L).

Τα αποτελέσματα της συνδυασμένης επίδρασης των δύο ουσιών παρουσιάζονται στα γραφήματα 4.3 και 4.4 και στους πίνακες 4.8 και 4.9.



**Γράφημα 4.3** Σύγκριση μεταξύ θεωρητικά αναμενόμενης (P(E)) και παρατηρούμενης (P(O)) επίδρασης διαφόρων συνδυασμών συγκεντρώσεων των δύο φυτοπροστατευτικών ουσιών στην ακινήτοποίηση της *D. magna*.

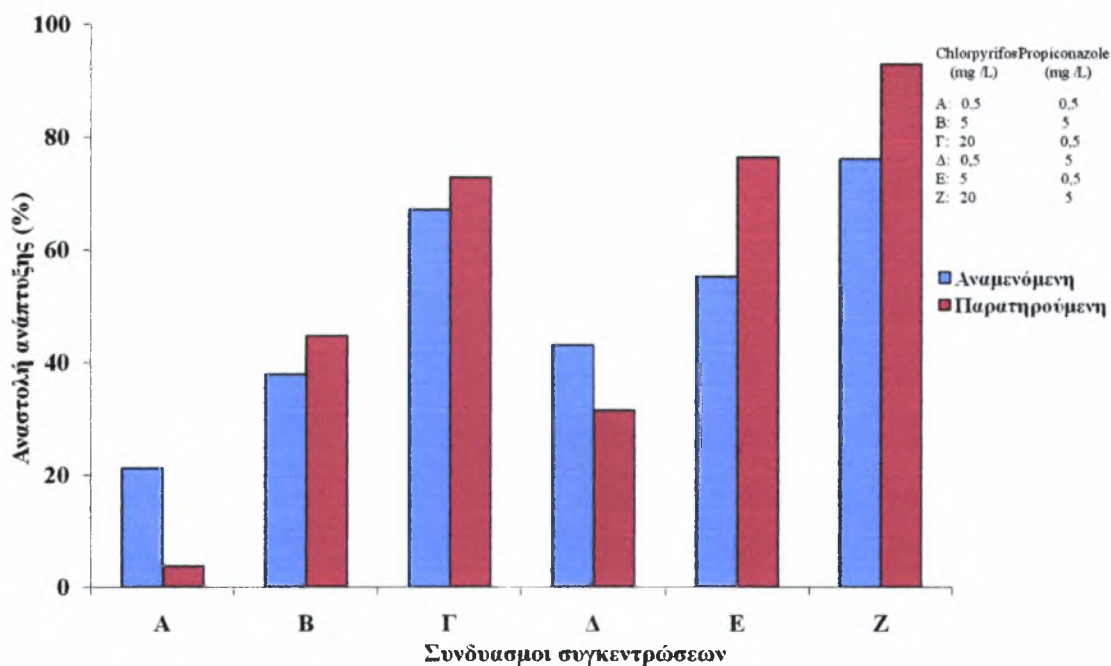
Έπειτα από στατιστική σύγκριση της P(E) και P(O) ( $\alpha = 0,05$ ), για τη συνδυασμένη τοξικότητα στη *D. magna*, προέκυψαν τα αποτελέσματα του πίνακα 4.8.

**Πίνακας 4.8** Συνδυασμένη επίδραση των διαφόρων μιγμάτων Chlorpyrifos (C) και Propiconazole (P) στην *D. magna*.

Συνδυασμοί συγκεντρώσεων	Συνδυασμένη τοξικότητα
A: 0,1 mg/L C - 1mg/L P	Προσθετική
B: 0,5 mg/L C - 1 mg/L P	Προσθετική
Γ: 0,1 mg/L C - 5 mg/L P	Ανταγωνιστική
Δ: 0,5 mg/L C - 5 mg/L P	Ανταγωνιστική
E: 0,1 mg/L C - 10 mg/L P	Ανταγωνιστική
Z: 0,1 mg/L C - 10 mg/L P	Ανταγωνιστική

Όσον αφορά στη *D. magna* παρατηρούμε ότι στους δύο πρώτους συνδυασμούς με τη χαμηλότερη συγκέντρωση του Propiconazole, συνδυασμένη τοξικότητα είναι προσθετική, ενώ στις υπόλοιπες τέσσερις περιπτώσεις φαινόμενο είναι ανταγωνιστικό. Η απουσία συνεργιστικής δράσης υποδεικνύει ότι η συνύπαρξη των δύο ουσιών δεν θέτει σε μεγαλύτερο κίνδυνο τα υδατικά περιβάλλοντα, από ότι η μεμονωμένη παρουσία της κάθε ουσίας.

Σύμφωνα με τους Nørgaard and Cedergreen (2010), όταν το Propiconazole αναμίχθηκε με alpha-cypermethrin η συνδυασμένη τοξικότητα για τη *D. magna* ήταν συνεργιστική, γεγονός που δεν συνέβη όταν υπήρχε ως μίγμα με το Chlorpyrifos.



**Γράφημα 4.4** Σύγκριση μεταξύ θεωρητικά αναμενόμενης (P(E)) και παρατηρούμενης (P(O)) επίδρασης διαφόρων συνδυασμών συγκεντρώσεων των δύο φυτοπροστατευτικών ουσιών στην αναστολή ανάπτυξης του *P. subcapitata*.

Έπειτα από στατιστική σύγκριση της P(E) και P(O) ( $\alpha = 0,05$ ), για τη συνδυασμένη τοξικότητα στο *P. subcapitata*, προέκυψαν τα αποτελέσματα του πίνακα 4.9.

**Πίνακας 4.9** Συνδυασμένη επίδραση των διαφόρων μιγμάτων Chlorpyrifos (C) και Propiconazole (P) στο *P. subcapitata*.

Συνδυασμοί συγκεντρώσεων	Συνδυασμένη επίδραση
<b>A: 0,5 mg/L C - 0,5 mg/L P</b>	Προσθετική
<b>B: 5 mg/L C - 5 mg/L P</b>	Προσθετική
<b>Γ: 20 mg/L C - 0,5 mg/L P</b>	Προσθετική
<b>Δ: 0,5 mg/L C - 5 mg/L P</b>	Ανταγωνιστική
<b>E: 5 mg/L C - 0,5 mg/L P</b>	Συνεργιστική
<b>Z: 20 mg/L C - 5 mg/L P</b>	Συνεργιστική

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα όσον αφορά στο *P. subcapitata*, μόνο σε δύο συνδυασμούς η επίδραση των δύο ουσιών είναι συνεργιστικό φαινόμενο. Μπορεί να θεωρηθεί λοιπόν, ότι ένα υδατικό περιβάλλον τίθεται σε κίνδυνο στις περιπτώσεις που οι δυο ουσίες συνυπάρχουν, στα συγκεκριμένα επίπεδα συγκεντρώσεων.

Οι Munkegaard et al. (2008) αναφέρουν ότι το Chlorpyrifos ως μίγμα με άλλες δυο οργανοφωσφορικές ουσίες δεν παρουσίασε συνεργιστική τοξικότητα στο *P. subcapitata*, όπως συνέβη όταν αναμίχθηκε με το Propiconazole.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη των μεμονωμένων και συνδυασμένων τοξικών επιδράσεων δύο ευρέως χρησιμοποιούμενων φυτοπροστατευτικών ουσιών στη γεωργική πρακτική στη χώρα μας, του τριαζολικού μυκητοκτόνου propiconazole και του οργανοφωσφορικού εντομοκτόνου chlorpyrifos. Οι οργανισμοί-δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις βιοδοκιμές ήταν το καρκινοειδές *Daphnia magna* και τα μικροφύκη *Pseudokirchneriella subcapitata*, δύο είδη που χρησιμοποιούνται ευρέως σε βιοδοκιμές και αντιπροσωπεύουν διαφορετικό τροφικό επίπεδο.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, το καρκινοειδές *Daphnia magna* ήταν πιο ευαίσθητο στην ουσία Chlorpyrifos ( $IC_{50} = 0,11 \text{ mg/L}$ ), συγκριτικά με το *Pseudokirchneriella subcapitata* ( $IC_{50} = 8,47 \text{ mg/L}$ ). Αντίθετα, το *P. subcapitata* ήταν πιο ευαίσθητο στην ουσία Propiconazole ( $IC_{50} = 4,12 \text{ mg/L}$ ) από ότι η *D. magna* ( $IC_{50} = 8,47 \text{ mg/L}$ ). Οι τιμές του  $IC_{50}$  που υπολογίστηκαν στην παρούσα εργασία και για τις δυο ουσίες στους συγκεκριμένους οργανισμούς δείκτες, είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες που αναφέρονται σε ορισμένες βιβλιογραφικές πηγές. Αυτό όπως προαναφέρθηκε, ίσως εξηγείται από το γεγονός ότι έγινε χρήση των εμπορικών σκευασμάτων των ουσιών και όχι των καθαρών δραστικών ουσιών. Επιπλέον, η ύπαρξη διαφορών στα ευρήματα για την τοξικότητα των διαφόρων χημικών ουσιών είναι συχνό φαινόμενο, καθώς διάφοροι παράγοντες μπορεί να επιδρούν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Όσον αφορά στην συνδυασμένη επίδραση των δύο ουσιών, μόνο στην περίπτωση του *P. subcapitata* υπήρχαν ενδείξεις για ύπαρξη συνεργιστικής δράσης τους και άρα κινδύνου για τα υδατικά οικοσυστήματα εάν οι δυο ουσίες βρεθούν εκεί ως μίγμα (στα επίπεδα συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν), αφού κατά το φαινόμενο του συνεργισμού εντείνεται η τοξική επίδραση των ουσιών ενός μίγματος, συγκριτικά με την τοξική επίδραση που θα είχαν οι ουσίες αν δρούσαν μεμονωμένα.

Πιο συγκεκριμένα, συνεργισμός παρατηρήθηκε για τους συνδυασμούς: 5mg/L Chlorpyrifos και 0,5mg/L Propiconazole και 20mg/L Chlorpyrifos και 5mg/L Propiconazole. Ο τελευταίος ήταν ο συνδυασμός των υψηλότερων συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για το *P. subcapitata*. Για τους υπόλοιπους συνδυασμούς η συνδυασμένη τοξικότητα ήταν προσθετική (δηλαδή η τοξικότητα των δύο ουσιών όταν αυτές βρίσκονται ως μίγμα είναι περίπου ίδια με αυτή που θα παρουσίαζαν εάν



βρισκόταν μεμονωμένες). Σε μία μόνο περίπτωση το φαινόμενο της συνδυασμένης τοξικότητας ανταγωνιστικό (η τοξική επίδραση του μίγματος ήταν μικρότερη από αυτή των μεμονωμένων ουσιών).

Για τη *Daphnia magna* η συνδυασμένη τοξικότητα των Propriconazole και Chlorpyrifos ήταν κυρίως ανταγωνιστική, ενώ μόνο για τους δυο συνδυασμούς των χαμηλότερων επιπέδων συγκέντρωσης των ουσιών ήταν προσθετική. Κατά συνέπεια, οι δυο ουσίες ως μίγμα στα επίπεδα συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν, δεν θέτουν σε μεγαλύτερο κίνδυνο τα υδατικά οικοσυστήματα, από ότι η κάθε ουσία μεμονωμένα.

Όπως εύκολα προκύπτει από τα αποτελέσματα της μεμονωμένης και συνδυασμένης τοξικότητας, η κάθε ουσία και τα διάφορα μίγματά τους επιδρούν με διαφορετικό τρόπο στον κάθε οργανισμό, εξαιτίας του διαφορετικού τρόπου δράσης των ουσιών, αλλά και της διαφορετικότητας των ίδιων οργανισμών. Για το λόγο αυτό, αν ο στόχος μιας μελέτης είναι εξαγωγή όσο το δυνατό πληρέστερων συμπερασμάτων για τη τοξικότητα μιας χημικής ουσίας, θα πρέπει να γίνονται βιοδοκιμές με περισσότερους από έναν οργανισμούς-δείκτες, οι οποίοι θα αντιπροσωπεύουν διαφορετικά τροφικά επίπεδα.

Επιπλέον, εξαιτίας του γεγονότος ότι η τοξικότητα είναι μια περίπλοκη υπόθεση που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως οι ουσίες αυτές καθαυτές, οι συγκεντρώσεις που μελετώνται και φυσικά οι οργανισμοί-δείκτες που χρησιμοποιούνται σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να λάμβάνουμε υπόψη ότι στις βιοδοκιμές χρησιμοποιούνται έμβιοι οργανισμοί και ότι στο εργαστήριο, όπου διεξάγονται τα πειράματα τοξικότητας, είναι απομακρυσμένοι από το φυσικό τους περιβάλλον. Παρόλο που οι πειραματικές μεθοδολογίες περιλαμβάνουν τη δημιουργία συνθηκών κατάλληλων για την ανάπτυξη και επιβίωσή τους, οι συνθήκες αυτές δεν παύουν να είναι τεχνητές. Για το λόγο αυτό, η συμπεριφορά και αντίδραση των οργανισμών αυτών όταν εκτίθενται σε χημικές τοξικές ουσίες, μπορεί να είναι διαφορετική από αυτή που θα εξέφραζαν εάν βρισκόταν σε φυσικές συνθήκες περιβάλλοντος.

Συνεπώς, όταν μελετώνται και ερμηνεύονται αποτελέσματα οικοτοξικολογικών πειραμάτων, θα πρέπει πάντα να συνυπολογίζουμε το γεγονός ότι σε ένα υδατικό οικοσύστημα μπορεί να συνυπάρχουν πολυάριθμες χημικές ουσίες διαφόρων κατηγοριών, σε μεταβαλλόμενες συνθήκες, γεγονότα που ενδεχομένως επηρεάζουν τη συμπεριφορά τόσο των ίδιων των ουσιών, όσο και των αλληλεπιδράσεών τους με τους ζωντανούς οργανισμούς.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

# Probit Analysis

Propiconazole-D.magna

Notes	
Output Created	2011-01-25T22:42:42.106
Comments	
Input	DataSet0
Active Dataset	<none>
Filter	<none>
Weight	<none>
Split File	<none>
N of Rows in Working Data File	5
Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax	PROBIT Dead OF Total WITH Dose /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /NATRES /CRITERIA P(.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Resources	Processor Time 0:00:00.281 Elapsed Time 0:00:00.188

DataSet0]

	N of Cases
Valid	5
Rejected	0
Missing	0
LOG Transform Cannot be Done	0
Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group	0

**Convergence Information**

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	13	Yes

**Parameter Estimates**

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup>						
Dose	1,854,287		6,466,000		1,292	2,417
Intercept	-1,270,384		-3,309,001		-1,654	-886

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX (Covariates X are transformed using the base 10,000 logarithm.)

**Covariances and Correlations of Parameter Estimates**

	Dose	Natural Response
PROBIT		
Dose	,082	,558
Natural Response	,022	,019

Covariances (below) and Correlations (above).

**Natural Response Rate Estimate<sup>a</sup>**

	Estimate	Std. Error

	Chi-Square	df <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	3,676	2	,159 <sup>b</sup>

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than ,150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

#### Cell Counts and Residuals

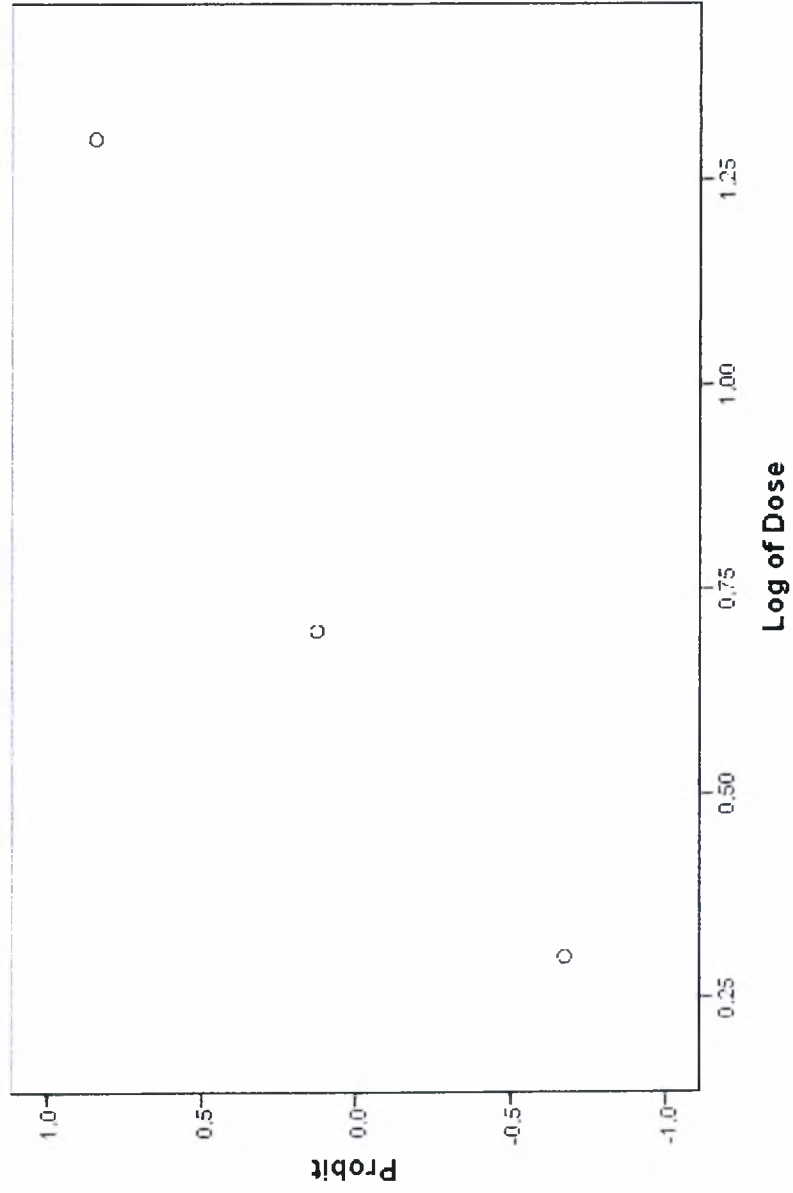
	Number	Dose	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT 1		-,699	40	0	,206	-,206	,005
2		,301	40	10	9,535	,465	,238
3		,699	40	22	20,422	1,578	,511
4		1,301	40	32	34,939	-,939	,873
5		1,699	40	40	38,800	1,200	,970

#### Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Dose			95% Confidence Limits for log(Dose) <sup>a</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ,010	,269	,044	,741	-,570	-,356	-,130
,020	,378	,071	,969	-,423	-,149	-,014
,030	,468	,096	1,150	-,329	-,1018	,061
,040	,550	,120	1,308	-,259	-,919	,117
,050	,628	,145	1,453	-,202	-,839	,162
,060	,702	,169	1,589	-,154	-,771	,201
,070	,774	,194	1,720	-,111	-,712	,235
,080	,845	,220	1,846	-,073	-,659	,266

,150	1,336,414	2,679,126	-383,428	
,200	1,702,578	3,271,231	-238,515	
,250	2,094,768	3,891,321	-115,590	
,300	2,523,989	4,555,402	-105,659	
,350	2,999	5,282,477	,096	,723
,400	3,533	6,092,548	,191	,785
,450	4,140	7,010,617	,281	,846
,500	4,838	8,068,685	,370	,907
,550	5,656	9,314,752	,456	,969
,600	6,627	10,815,821	,543	1,034
,650	7,807	12,674,892	,631	1,103
,700	9,279	15,058,967	,721	1,178
,750	11,179	18,257	1,048,816	1,261
,800	13,758	22,821	1,139,918	1,358
,850	17,522	29,955	1,244	1,476
,900	23,756	42,922	1,376	1,633
,910	25,568	46,942	1,408	1,672
,920	27,693	51,794	1,442	1,714
,930	30,235	57,780	1,481	1,762
,940	33,350	65,379	1,523	1,815
,950	37,297	75,400	1,572	1,877
,960	42,535	89,336	1,629	1,951
,970	49,992	110,345	1,699	2,043
,980	61,968	146,687	1,792	2,166

### Probit Transformed Responses



Notes

Output Created		2011-01-25T22:33:13.283
Comments		
Input	Active Dataset Filter Weight Split File	DataSet0 <none> <none> <none>
Missing Value Handling	N of Rows in Working Data File Definition of Missing	5 User-defined missing values are treated as missing.
Syntax	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model. PROBIT Dead OF Total WITH Dose /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /NATRES /CRITERIA P(.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Resources	Processor Time Elapsed Time	0:00:00.219 0:00:00.188

[DataSet0]

Warnings

Relative Median Potency Estimates are not displayed because there is no grouping variable in the model.



Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group	0

**Convergence Information**

Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	13 Yes

**Parameter Estimates**

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> Dose	,901	,384	2,346	,019	,148	1,653
Intercept	,858	,615	1,396	,163	,243	1,473

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX (Covariates X are transformed using the base 10,000 logarithm.)

**Covariances and Correlations of Parameter Estimates**

	Dose	Natural Response
PROBIT Dose	,147	,938
Natural Response	,259	,517

Covariances (below) and Correlations (above).

**Natural Response Rate Estimate<sup>a</sup>**

	Estimate	Std. Error
PROBIT	,000	,719

a. Control group is not provided.

**Chi-Square Tests**

**Natural Response Rate Estimate<sup>a</sup>**

	Estimate	Std. Error
PROBIT	,000	,719

a. Control group is not provided.

**Chi-Square Tests**

	Chi-Square	df <sup>b</sup>	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	2,353	2	,308 <sup>b</sup>

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than ,150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

**Cell Counts and Residuals**

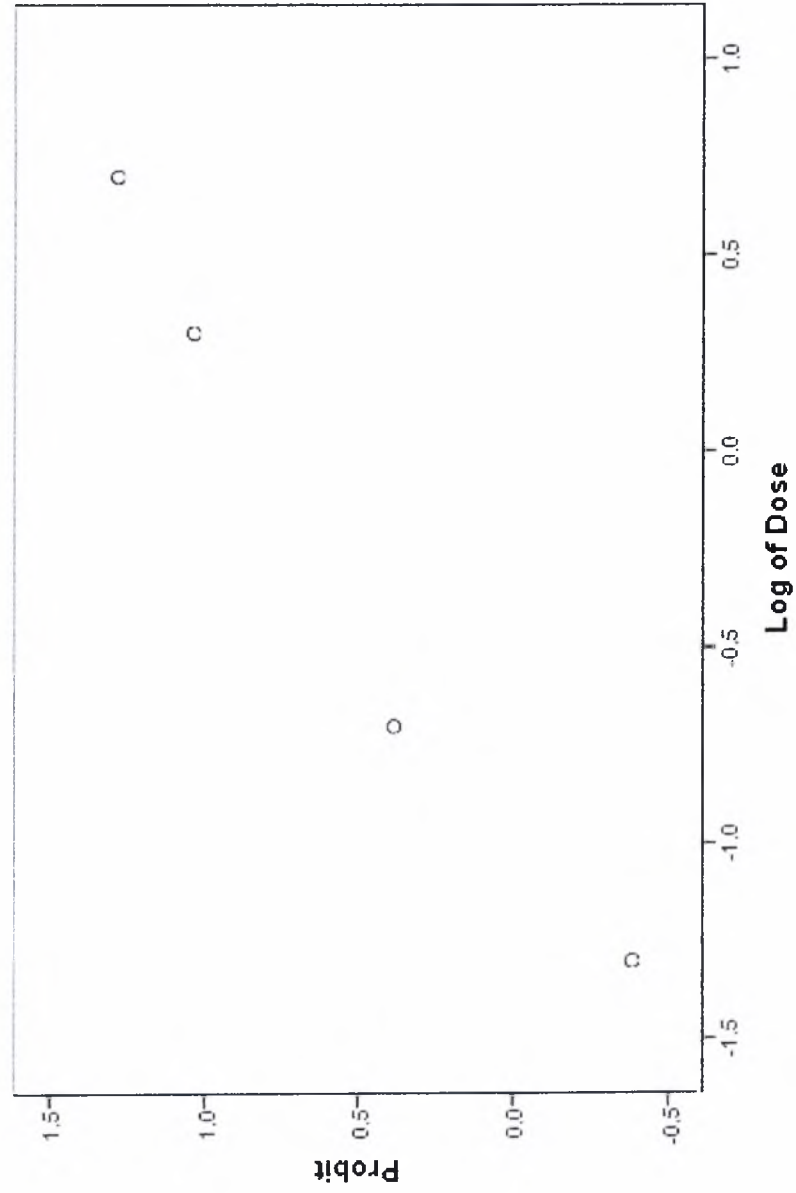
	Number	Dose	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT 1	1	-1,301	40	14	15,078	-1,078	,377
2	2	-,699	40	26	23,618	2,382	,590
3	3	,301	40	34	34,825	-,825	,871
4	4	,699	40	36	37,264	-1,264	,932
5	5	1,301	40	40	39,153	,847	,979

**Confidence Limits**

Probability y	95% Confidence Limits for Dose			95% Confidence Limits for log(Dose) <sup>a</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ,010	,000	,000	,059	-3,536	-28,780	-1,232
,020	,001	,000	,086	-3,233	-26,944	-1,065
,030	,001	,000	,110	-3,041	-25,779	-,958
,040	,001	,000	,133	-2,897	-24,903	-,878
,050	,002	,000	,154	-2,779	-24,190	-,812

,090	,004	,000	,238	-2,442	-22,143	-624
,100	,004	,000	,259	-2,376	-21,744	-587
,150	,008	,000	,368	-2,104	-20,095	-434
,200	,013	,000	,487	-1,887	-18,785	-312
,250	,020	,000	,620	-1,702	-17,661	-207
,300	,029	,000	,771	-1,535	-16,652	-113
,350	,042	,000	,945	-1,381	-15,718	-025
,400	,058	,000	1,147	-1,234	-14,832,060	
,450	,081	,000	1,385	-1,092	-13,975,141	
,500	,111	,000	1,669	-953	-13,132,222	
,550	,154	,000	2,014	-813	-12,290,304	
,600	,213	,000	2,442	-672	-11,434,388	
,650	,298	,000	2,986	-525	-10,552,475	
,700	,426	,000	3,703	-371	-9,623,569	
,750	,625	,000	4,692	-204	-8,622,671	
,800	,958	,000	6,150	-018	-7,511,789	
,850		1,577,000	8,546,198		-6,221,932	
,900		2,951,000	13,367,470		-4,614	1,126
,910		3,433,000	15,021,536		-4,229	1,177
,920		4,047,000	17,141,607		-3,813	1,234
,930		4,849,000	19,978,686		-3,360	1,301
,940		5,934,001	24,004,773		-2,859	1,380
,950		7,470,005	30,240,873		-2,297	1,481
,960		9,791,022	41,370,991		-1,655	1,617
,970		13,655,124	67,051	1,135	-908	1,826

### Probit Transformed Responses



# Probit Analysis

Propiconazole-Algae

## Notes

Output Created	2011-01-25T22:54:27.488
Comments	
Input	DataSet0 <none> <none> <none>
Active Dataset	
Filter	
Weight	
Split File	
N of Rows in Working Data File	5
Missing Value Handling	User-defined missing values are treated as missing.
Definition of Missing	
Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model.
Syntax	PROBIT Dead OF Total WITH Dose /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /NATRES /CRITERIA P(-.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Resources	
Processor Time	0:00:00.281
Elapsed Time	0:00:00.187

[DataSet0]

## Warnings

**Data Information**

	N of Cases
Valid	5
Rejected	0
Missing	0
LOG Transform Cannot be Done	0
Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group	0

**Convergence Information**

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	12	Yes

**Parameter Estimates**

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> Dose	1,150,002		706,003,000		1,147	1,154
Intercept	-,708,002		-319,725,000		-,710	-,706

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX (Covariates X are transformed using the base 10,000 logarithm.)

**Covariances and Correlations of Parameter Estimates**

	Dose	Natural Response
PROBIT Dose	,000	,744
Natural Response	,000	,000

Covariances (below) and Correlations (above).

**Natural Response Rate Estimate<sup>a</sup>**

	Estimate	Std. Error
PROBIT	,000	,001

a. Control group is not provided.

**Chi-Square Tests**

	Chi-Square	df <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	43824,765	2,000 <sup>b</sup>

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is less than ,150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

**Cell Counts and Residuals**

	Number	Dose	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	-,699	750000	35162	48933,698	-13771,698	,065
	2	,301	750000	329019	269091,928	59927,072	,359
	3	,699	750000	377125	403716,549	-26591,549	,538
	4	1,301	750000	552743	588659,557	-35916,557	,785
	5	1,699	750000	688949	670295,847	18653,153	,894

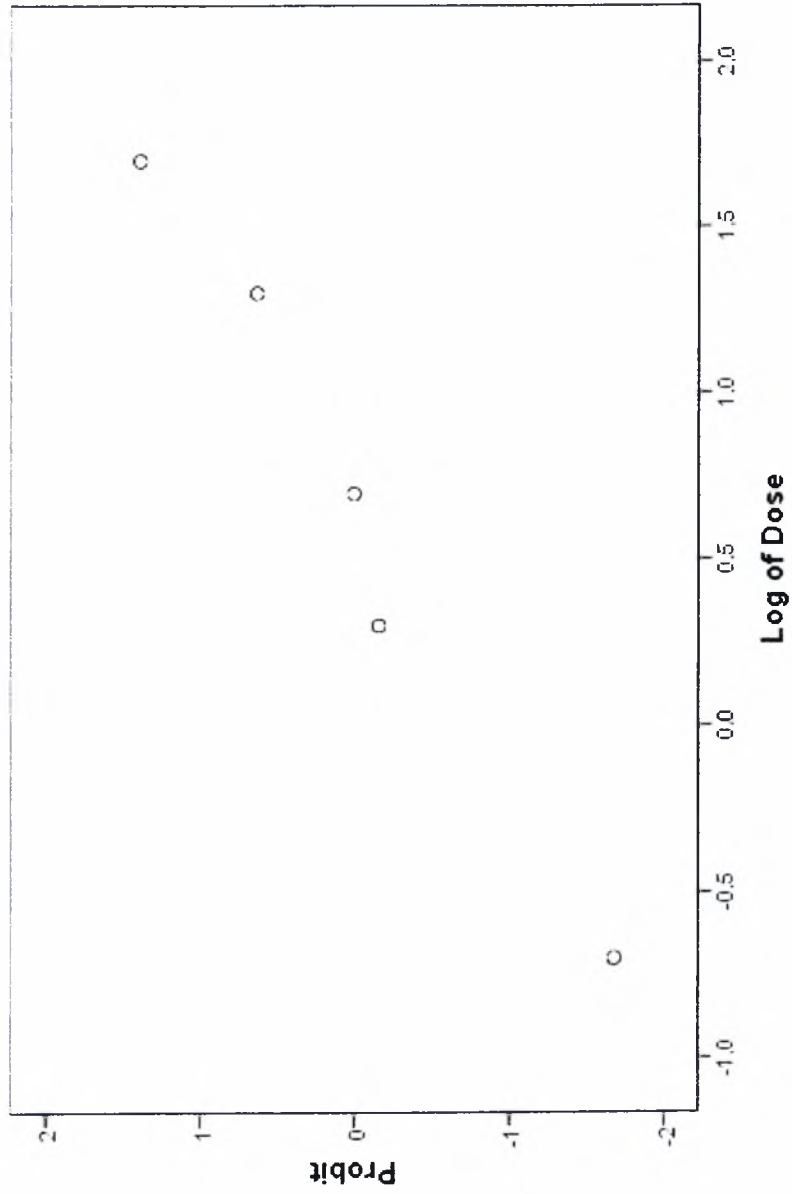
**Confidence Limits**

Probability	95% Confidence Limits for Dose			95% Confidence Limits for log(Dose) <sup>b</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup>	,039	,000	,794	-1,407	-25,535	-,100
	,068	,000	1,075	-1,170	-23,121	,031
	,096	,000	1,304	-1,019	-21,590	,115
	,124	,000	1,511	-,906	-20,438	,179
	,153	,000	1,704	-,814	-19,502	,231

,090	,282	,000	2,419	-550	-16,814,384	
,100	,317	,000	2,592	-499	-16,291,414	
,150	,518	,000	3,471	-285	-14,129,540	
,200	,765	,000	4,412	-116	-12,414,645	
,250		1,069,000	5,461,029		-10,946,737	
,300		1,444,000	6,671,160		-9,631,824	
,350		1,908,000	8,111,280		-8,417,909	
,400		2,484,000	9,889,395		-7,270,995	
,450		3,208,000	12,184,506		-6,169	1,086
,500		4,125,000	15,328,615		-5,095	1,185
,550		5,305,000	20,013,725		-4,037	1,301
,600		6,849,001	27,936,836		-2,989	1,446
,650		8,920,011	44,310,950		-1,957	1,647
,700		11,782,106	91,554	1,071	-973	1,962
,750		15,911,749	327,939	1,202	-126	2,516
,800		22,231	2942,155	1,347,482		3,469
,850		32,832	78841,130	1,516,873		4,897
,900		53,623	7968456,985	1,729	1,158	6,901
,910		60,369	2,520E7	1,781	1,211	7,401
,920		68,662	8,887E7	1,837	1,264	7,949
,930		79,101	3,586E8	1,898	1,319	8,555
,940		92,648	1,718E9	1,967	1,376	9,235
,950		110,952	1,035E10	2,045	1,437	10,015
,960		137,128	8,616E10	2,137	1,505	10,935
,970		177,916	1,178E12	2,250	1,585	12,071
,980		251,506	3,862E13	2,401	1,684	13,587



### Probit Transformed Responses



Chlorpyrifos-Algae

Notes

Output Created		2011-01-25T22:36:28.986
Comments		
Input	Active Dataset Filter Weight Split File	DataSet0 <none> <none> <none>
Missing Value Handling	N of Rows in Working Data File Definition of Missing	5 User-defined missing values are treated as missing.
Syntax	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data for all variables in the model. PROBIT Dead OF Total WITH Dose /LOG 10 /MODEL PROBIT /PRINT FREQ CI /NATRES /CRITERIA P(.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).
Resources	Processor Time Elapsed Time	0:00:00.312 0:00:00.202

[DataSet0]

Warnings

Relative Median Potency Estimates are not displayed because there is no grouping variable in the

		N of Cases
Valid		5
Rejected	Missing	0
	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group		0

#### Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	14	Yes

#### Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup>						
Dose	,887	,002	384,503	,000	,882	,891
Intercept	-.823	,004	-214,416	,000	-.827	-.819

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX (Covariates X are transformed using the base 10,000 logarithm.)

#### Covariances and Correlations of Parameter Estimates

	Dose	Natural Response
PROBIT		
Dose	,000	,866
Natural Response	,000	,000

Covariances (below) and Correlations (above).

Natural Response Rate Estimate<sup>a</sup>

	Estimate	Std. Error
PROBIT	,056	,001

a. Control group is not provided.

#### Chi-Square Tests

	Chi-Square	df <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	54853,561	2	,000 <sup>b</sup>

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is less than ,150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

#### Cell Counts and Residuals

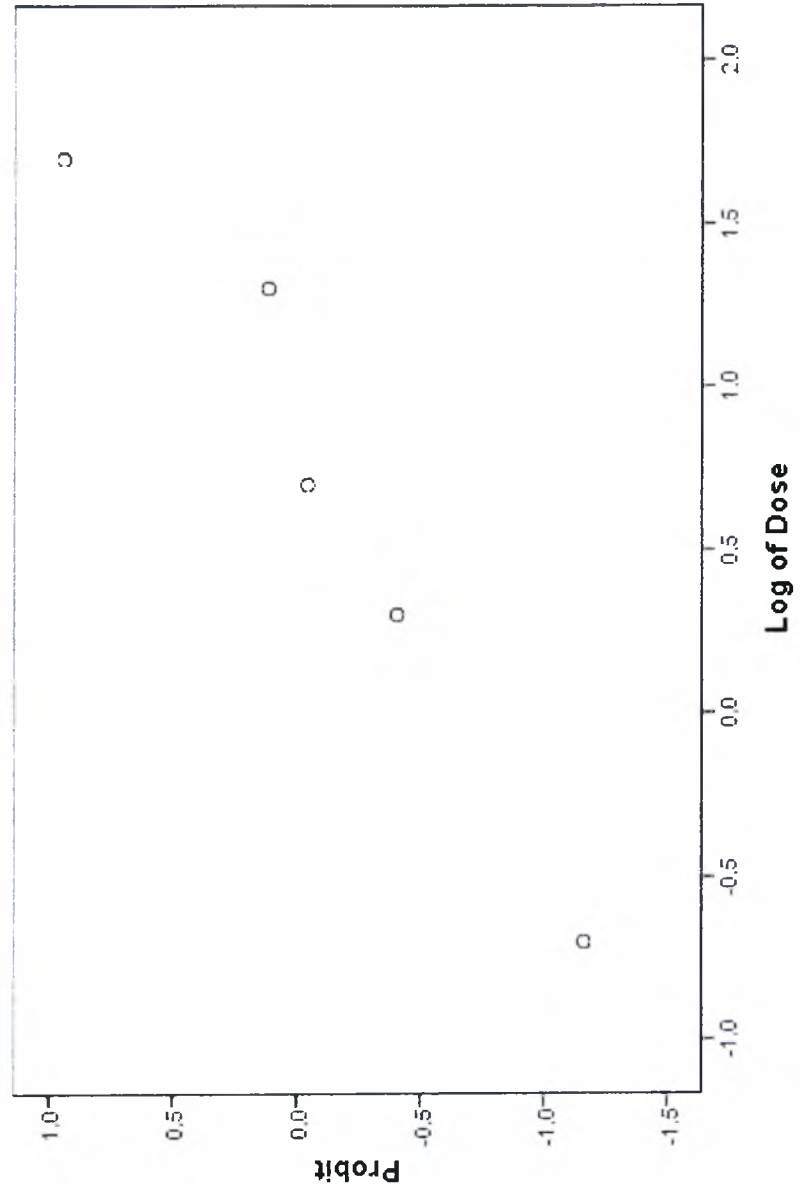
	Number	Dose	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT 1		-,699	750000	91770	94819,807	-3049,807	,126
2		,301	750000	257728	246716,903	11011,097	,329
3		,699	750000	362635	339058,359	23576,641	,452
4		1,301	750000	409583	487802,524	-78219,524	,650
5		1,699	750000	620170	575110,714	45059,286	,767

#### Confidence Limits

Probability y	95% Confidence Limits for Dose			95% Confidence Limits for log(Dose) <sup>b</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> ,010	,020			-1,695		
,020	,041			-1,387		
,030	,064			-1,192		
,040	,090			-1,046		

,090	,261				-,584	
,100	,304				-,517	
,150	,575				-,241	
,200	,953				-,021	
,250		1,471		,168		
,300		2,172		,337		
,350		3,116		,494		
,400		4,389		,642		
,450		6,114		,786		
,500		8,472		,928		
,550		11,741			1,070	
,600		16,355			1,214	
,650		23,038			1,362	
,700		33,055			1,519	
,750		48,804			1,688	
,800		75,316			1,877	
,850		124,890			2,097	
,900		235,985			2,373	
,910		275,191			2,440	
,920		325,197			2,512	
,930		390,732			2,592	
,940		479,653			2,681	
,950		606,020			2,782	
,960		797,640			2,902	
,970		1118,138			3,048	
,980		1751,832			3,243	

### Probit Transformed Responses



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βαγή Μ. (2007) 'Μελέτη της Υδρόλυσης και Προσρόφησης Επιλεγμένων Οργανοφωσφορικών Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων σε Υδατικά και Εδαφικά Συστήματα. Διερεύνηση της Τοξικότητας σε Θαλάσσιους Φυτοπλαγκτονικούς Οργανισμούς', Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη.

Βαλαβανίδης Α. (2007) 'Οικοτοξικολογία και περιβαλλοντική τοξικολογία', Έκδοση Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Βαλαβανίδης Α., Βλαχογιάννη Θ. (2008) 'Περιβαλλοντική χημεία και οικοτοξικολογία: Διαχείριση οικοσυστημάτων – Εκτίμηση οικολογικού κινδύνου', Έκδοση Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Γατίδου Γ. (2005) 'Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων, μελέτη της τοξικότητας τους και ανίχνευση τους στο περιβάλλον', Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη.

Ελευθεροχωρινός Η. Γ. (1996) 'Ζιζανιολογία', Εκδόσεις ΑγροΤύπος Α.Ε., Αθήνα.

Ιατρού Ε. (2009) 'Μελέτη φωτοδιάσπασης φυτοφαρμάκων και εκτίμηση της συνδυασμένης τοξικότητας τους στη *Lemna minor*', Μεταπτυχιακή Διατριβή, Τμήμα Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη.

Καρπούζας Δ. Γ. (2003) 'Γεωργική Φαρμακολογία', Πανεπιστημιακές Παραδόσεις, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Κοτρίκλα Α. (2002) 'Βελτιστοποίηση μεθόδου ανάλυσης ζιζανιοκτόνων σε υδατικά υποστρώματα με HPLC', Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη.

Κούγκολος Γ. Α. (2007) 'Εισαγωγή στην Περιβαλλοντική Μηχανική', Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη.

Λόλας Π. Χ. (2003) 'Ζιζανιολογία. Ζιζάνια-Ζιζανιοκτόνα. Τύχη και Συμπεριφορά στο Περιβάλλον', Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία.

Μενκίσογλου-Σπυρούδη Ο. (1998) 'Γεωργικά Φάρμακα, Τυποποίηση, Έλεγχος Ποιότητας, Ορθή και Ασφαλής Χρήση', Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη.

Μενκίσογλου-Σπυρούδη Ο. (2005) 'Παραδόσεις του μαθήματος Γεωργικά Φάρμακα ΙΙ' (συμπληρωματικές σημειώσεις).

Νασοπούλου Υ. (2006) 'Μελέτη τοξικότητας των φυτοφαρμάκων Fosthiazate, Metalaxyl-M και Imidacloprid στα οστακόδερμα *Daphnia magna* και *Artemia franciscana*', Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.

Παπαδοπούλου-Μουρκίδου Ε. (1991) 'Διδακτικές σημειώσεις κατά τις παραδόσεις του μαθήματος Γεωργικά Φάρμακα, Μέρος Ι', Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Υπηρεσία Δημοσιευμάτων.

Παπαδοπούλου-Μουρκίδου Ε. (1991) 'Διδακτικές Σημειώσεις, Γεωργικά Φάρμακα, Μέρος ΙΙ', Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Υπηρεσία Δημοσιευμάτων.

Τζανακάκης Μ. Ε. (1995) 'Έντομολογία' University Studio Press, Θεσσαλονίκη.

Τσιουρης Σ.Ε. (2001) 'Θέματα προστασίας περιβάλλοντος', Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη.

#### ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Banke Nørgaard K. and Cedergreen N. (2010) 'Pesticide cocktails can interact synergistically on aquatic crustaceans', *Environ Sci Pollut Res*, **17**, 957-967.

Barata C., Solayan A. and Porte C. (2004) 'Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*', *Aquatic Toxicology*, **66**, 125-139.

Cáceres T., Wenxiang H., Naidu R., and Megharaj M. (2007) 'Toxicity of chlorpyrifos and TCP alone in combination to *Dafnia carinata*: The influence of microbial degradation in natural water', *Water Research*, **41**, 4497-4503.

Carter M. R. (2000) 'Herbicide movement in soil: principles, pathways and processes', *Weed Research*, **40**, 113-122.

Catani M., Gena K., Edwards J., and Pisaniello D. (2001) 'Potential dermal and inhalation exposure to chlorpyrifos in Australian pesticide workers', *Ann. Occup. Hyg*, **45**, 299-308.

Coppola L., Castillo M. D. P., Monaci E., and Vischetti C. (2007) 'Adaptation of the biobed composition for chlorpyrifos degradation to Southern Europe conditions', *J. Agric. Food Chem*, **55**, 396-401.

Corbett J. R. (1974) 'The biochemical Mode of Action of Pesticides', Academic Press, London.

Curran S.W. (1998) 'Persistence of herbicides in soil', <http://www.cas.psu.edu>.



Environmental Protection Agency (EPA) (2000) 'Chlorpyrifos Revised Risk Assessment and agreement with registrants', <http://www.epa.gov/pesticides/op/chlorpyrifos/consumerqs.htm>.

EXTOXNET (1996) 'Pesticide Information Profiles: Chlorpyrifos', <http://www.extoxnet.orst.edu/cgwebglimpse/mfs/services/data/info/extoxnet?link=http://ac>.

Gatidou G., Thomaidis N.S. (2007) 'Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays', *Aquatic Toxicology*, **85**, 184 – 191.

Gennings Chris, Carter Jr.W. Hans, Casey Michelle, Moser Virginia, Carchman Richard, Simmons Jane Ellen (2004) 'Analysis of functional effects of a mixture of five pesticides using a ray design', *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **18**, 115 – 125.

Getzin L. W. (1981) 'Degradation of chlorpyrifos in soil: influence of autoclaving, soil moisture, and temperature', *J. Econ. Entomol.*, **74**, 158-162.

Giesy J. P., Solomon K. R., Goats J. R., Dixon K. R., Giddings J. M., and Kenaga E. E. (1999) 'Chlorpyrifos: ecological risk assessment in North American aquatic environments', *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **160**, 1-129.

Harris C. I., E. A. Woolson and B. E. Hummer (1969) 'Dissipation of herbicides at three soil depths', *Weed Science*, **17**, 27-31.

Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton G.A Jr, Cairns J. Jr. (2003) 'Handbook of ecotoxicology', Lewis Publishers, New York.

Hornsby A. G., Wauchope R. D. and Herner A.E. (1998) 'Pesticide Properties in the environment', Florida Cooperative Extension Service, ISBN 0-387-94353-6.

Howard H. P. (1990) 'Handbook of Environmental Fate and Exposure Data For Organic Chemicals', Lewis Publishers, Vol I Large Production and Priority Pollutants, USA.

Kungolos A., Emmanouil C., Tsiridis V. and Tsiropoulos N. (2009) 'Evaluation of toxic and interactive toxic effects of three agrochemicals and copper using a battery of microbiotests', *Science of the Total Environment*, **407**, 4610-4615.

Lapworth D. J and Goody D. C (2005) 'Source and persistence of pesticides in a semi-confined chalk aquifer of southeast England', *Environmental Pollution*, **144**, 1031-1044.

Mackay, D., Fraser, A. (2000) 'Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models', *Environmental Pollution*, **110**, 375-391.

Martinez T. M. V., Salmeron V., and Gonzales J. (1992) 'Effect of the insecticides methyl-pirifos and chlorpyrifos on soil micro-flora in an agricultural loam', *Plant Soil*, **147**, 25-30.

Matolcsy Gy., Nadasy M., Andriská V. (1988) 'Pesticide chemistry', Elsevier, Amsterdam.

Munkengaart M., Abbaspoor M. and Cedergreen N. (2008) 'Organophosphorous insecticides as herbicide synergists on the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and the aquatic plant *Lemna minor*', *Ecotoxicology*, **17**, 29-35.

Ochoa-Acuña H., Bialkowski W., Yale G. and Hann L. (2009) 'Toxicity of soyabean rust fungicides to fresh water algae and *Daphnia magna*', *Ecotoxicology*, **18**, 440-446.

Palma P., Palma V.L. and Fernandes R.M. (2008) 'Acute toxicity of Atrazine, Endosulfan Sulfate and Chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, Relative to Their Concentrations in Surface Waters from the Alentejo Region of Portugal', *Bull Environ Contam Toxicol*, **81**, 485-489.

Palma P., Palma V.L. and Fernandes R.M., Bohn A., Soares A.M.V.M. and Barbosa I.R. (2009) 'Embryotoxic effects of environmental concentrations of chlorpyrifos on the crustacean *Daphnia magna*', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**, 1714-1718.

Peterson H.G., Boutin C., Martin P.A., Freemark K.E., Ruecker N.J. and Moody M.J. (1994) 'Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at Expected Environmental Concentrations', *Aquatic Toxicology*, **28**, 275-292.

Racke K. D., Steel K. P., Yoder R. N., Dick W. A., and Avidov E. (1996) 'Factors affecting the hydrolytic degradation of chlorpyrifos in soil', *J. Agric. Food Chem*, **44**, 1582-1592.

Racke K. D. (1993) 'Environmental fate of chlorpyrifos', *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **131**, 1-154.

Racke K. D., Coats J. R., and Titus K. R. (1988) 'Degradation of chlorpyrifos and its hydrolysis products 3,5,6-trichloro-2-oyrdinol, in soil', *J. Environ. Sci. Health B*, **23**, 527-539.

Ren Z., Zha J., Ma M., Wang Z. and Gerhardt A. (2007) 'The early warning of aquatic organophosphorus pesticide contamination by on-line monitoring behavioral changes of *Daphnia magna*', *Environ Monit Assess*, **134**, 373-383.

Richards R. P., and Baker D. B. (1993) 'Pesticide concentration patterns in agricultural drainage networks in the lake Erie basin', *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**, 13-16.

Roberts T. R. (1990) 'Environmental Fate of Pesticides', Chapter 1. Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Volume 7. A Wiley-Interscience Publication.

Shaw I. C. and Chadwick J (1998) 'Principles of environmental toxicology', Ed. Taylor and Francis, UK USA.

Singh B. K., Walker A., Morgan J. A. W. and Wright D. J. (2003) 'Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium', *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5198-5206.

Soetaert A., Moens L.N., Van der Ven K., Van Leemput K., Naudts B., Blust R. and De Coen W.M. (2006) 'Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array', *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, **142**, 66 – 76.

Thomas K., and Nicholson B. G. (1989) 'Pesticide losses in runoff from a horticultural catchment in South Australia and their relevance to stream and reservoir water quality', *Environ. Technol. Lett.*, **10**, 117-129.

Topp E., Vallaeyts T., and Soulas G. (1997) 'Pesticides: Microbial Degradation and Effects on Microorganisms, Modern Soil Microbiology', Marcel Dekker Inc., Chapter 19.

Vialaton D., Pilichowski J-F., Baglio D., Paya-Perez A., Larsen B. and Richard C. (2001) 'Phototransformation of Propiconazole In Aqueous Media', *J. Agric. Food Chem.*, **49** (11), 5377–5382.

Walker A. (1994) 'Herbicide behavior in Mediterranean climates', Proceedings 5th EWRS Mediterranean Symposium 'Weed control in sustainable agriculture in the Mediterranean area', Perugia, Italy, 211-221.

Ware G. (1989) 'The Pesticide Book' (3rd edn.), Thomson Publs., Fresno, Calif.

Wood B., and Stark J. D. (2002) 'Acute toxicity of drainage ditch water from a Washington State cranberry-growing region to *Dafnia pulex* in laboratory bioassays', *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **53**, 273-280.

World Health Organization (1990) 'Public health impact of pesticides used in agriculture', Geneva.

Zhao Q., Dourson M., and Gadagbui B. A. (2006) 'A review of the reference dose for chlorpyrifos', *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **44**, 111-124.

ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΟΙ ΤΟΠΟΙ

[http://www.minagric.gr/greek/data/axios\\_5.pdf](http://www.minagric.gr/greek/data/axios_5.pdf)

<http://www.esyf.gr/themata.php?s=3>

<http://extoxnet.orst.edu>

[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Evaluation07/Propiconazole.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation07/Propiconazole.pdf)

<http://www.pesticideinfo.org/EN> (PAN pesticide database)

<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/classification/path/Daphnia.html>  
#Daphnia

[http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=47100](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=47100)

[http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/c\\_2.htm](http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/c_2.htm)



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000105693