

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Σχολή Γεωπονικών Επιστημών
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«Μεταφορά υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στα διάφορα
επίπεδα της τροφικής αλυσίδας.»

Θεοδούλα Παπαδοπούλου

Βόλος, 2017

«Μεταφορά υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στα διάφορα
επίπεδα της τροφικής αλυσίδας.»

Θεοδούλα Παπαδοπούλου

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Σφουγγάρης Αθανάσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Διαχείρισης Οικοτόπων και Βιοποικιλότητας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

Τσιρόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αντωνιάδης Βασίλειος, Επίκουρος Καθηγητής Εδαφολογίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Copyright © Θεοδούλα Παπαδοπούλου, 2017

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναγράφεται η πηγή προέλευσης.

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αν. Καθηγητή κύριο Σφουγγάρη Αθανάσιο για την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση που μου έδειξε αναθέτοντας μου αυτή την εργασία, και κυρίως για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον αντικείμενο. Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Καθηγητή κύριο Τσιρόπουλο Νικόλαο για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση και υποστήριξη που μου προσέφερε κατά την διεξαγωγή της μελέτης καθώς και για το χρόνο που αφιέρωσε για τη διόρθωση του γραπτού κειμένου της παρούσας διατριβής. Ευχαριστώ επίσης τον Επ. Καθηγητή κύριο Αντωνιάδη Βασίλειο για τη συμμετοχή του στην αξιολόγηση της εργασίας αυτής. Ακόμη ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω και στους Κωνσταντίνο Βλαχόπουλο, Μαρία Μακρή και Δότη Παπαδημητρίου για την παροχή χρήσιμων γνώσεων, καθοδήγησης και βοήθειας στις εργασίες πεδίου που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου και τον αδερφό μου για την υποστήριξη και κατανόηση τους σε όλες μου τις προσπάθειες.

Περίληψη

Τα τελευταία 50 χρόνια η ανάγκη για την αύξηση των παραγόμενων τροφίμων έχει οδηγήσει στην εντατικοποίηση της γεωργίας με τη χρήση καλλιεργειών υψηλής απόδοσης, την αλλαγή χρήσεων γης και τη συστηματική χρήση λιπασμάτων και φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Ωστόσο, οι ενέργειες αυτές σε συνδυασμό με τις βιοτικές αλληλεπιδράσεις προκαλούν σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον σε παγκόσμιο επίπεδο. Μια από τις σημαντικότερες επιπτώσεις είναι η υποβάθμιση των οικοσυστημάτων και η απώλεια της βιοποικιλότητας. Πολλές είναι οι μελέτες που αποδεικνύουν ότι η συνεχής χρήση εντομοκτόνων και ζιζανιοκτόνων σημειώνουν σημαντική μείωση της βιοποικιλότητας. Η αερομεταφορά των δραστικών ουσιών πολλών γεωργικών φαρμάκων, που εφαρμόζονται με τη μορφή ψεκασμού, τα έμμονα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, καθώς και τα παράγωγά τους, βιοσυσσωρεύονται στα διάφορα επίπεδα των τροφικών αλυσίδων και έχουν σοβαρές επιπτώσεις τόσο στην ανθρώπινη υγεία όσο και στην ζωτικότητα της πανίδας και της χλωρίδας των διαφόρων οικοσυστημάτων.

Λόγω του ότι η ποικιλότητα των φυτών και των ζώων αποτελεί δομικό χαρακτηριστικό των διαφόρων οικοσυστημάτων, χρησιμοποιείται ως δείκτης περιβαλλοντικών επιπτώσεων για τον έλεγχο της υπολειμματικότητας των γεωργικών φαρμάκων στις περιοχές ανάπτυξης και εφαρμογής των προϊόντων αυτών.

Με την εφαρμογή των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο έδαφος, που πραγματοποιείται με δύο τρόπους, μέσω ψεκασμού και μέσω κοκκίων με απευθείας εφαρμογή στο έδαφος, είναι δυνατή η παρουσία των δραστικών ουσιών των εκάστοτε χρησιμοποιούμενων γεωργικών φαρμάκων, ειδικά των έμμονων τόσο στους φυτικούς ιστούς όσο και στα έντομα, τα παράσιτα και τα ωφέλιμα όταν αυτά τρέφονται από τα φυτά. Στη συνέχεια, όταν τα συγκεκριμένα έντομα καταναλωθούν από εντομοφάγα πουλιά ή θηλαστικά, μετακινούν τις ουσίες αυτές στον οργανισμό των ζώων. Οι δραστικές ουσίες, κυρίως αυτές με έμμονη δράση, συσσωρεύονται πολύ εύκολα στους οργανισμούς και προκαλούν σημαντικές επιπτώσεις και σε ακραίες περιπτώσεις μέχρι και θανάτωση κάποιων ατόμων. Κατά αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η μετακίνηση και η βιοσυσσώρευση των διαφόρων δραστικών ουσιών μέχρι τα ανώτερα τροφικά επίπεδα.

Η εργασία αυτή ασχολείται με τη μελέτη της μεταφοράς των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στα διάφορα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας και διεξήχθη σε βαμβακοκαλλιέργεια του Θεσσαλικού κάμπου. Επιλέχθηκε η συγκεκριμένη περιοχή λόγω του ότι αποτελεί το κέντρο της τροφοληπτικής δραστηριότητας του Κικκινεζιού (*Falco naumanni*), ενός προστατευόμενου αρπακτικού, εντομοφάγου αποδημητικού πουλιού, το οποίο διαχειμάζει στην Αφρική και κατά τους εαρινούς και θερινούς μήνες δραστηριοποιείται σε αρκετές περιοχές της Ευρώπης. Η έρευνα ξεκίνησε από τα χαμηλότερα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας, το έδαφος, συνεχίστηκε στα φυτά, επεκτάθηκε στα έντομα (οικογένειες Κολεοπτέρων και Ορθοπτέρων) και κατέληξε στο ανώτερο επίπεδο της τροφικής αλυσίδας που αποτελούν τα αρπακτικά πουλιά.

Η επιλογή των δραστικών ουσιών που προσδιορίστηκαν έγινε σύμφωνα με τα γεωργικά φάρμακα (ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα) που εφαρμόζονται στην καλλιέργεια αυτή καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου, και επιπλέον συμπεριέλαβε και κάποιες έμμονες ουσίες, όπως τα οργανοχλωριωμένα παρασιτοκτόνα, και οι οποίες σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία συναντώνται σε ιστούς αρπακτικών.

Στο έδαφος της βαμβακοκαλλιέργειας προσδιορίστηκαν δυο δραστικές ουσίες: το ζιζανιοκτόνο pendimethalin και το εντομοκτόνο chlorantraniliprole, με την πρώτη να εμφανίζεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τη δεύτερη, αλλά σχετικά μικρές,

διαπίστωση αναμενόμενη, καθώς ως ζιζανιοκτόνο εφαρμόζεται απευθείας στο έδαφος και επίσης έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής. Στα φύλλα προσδιορίστηκε το chlorantraniliprole, που εφαρμόζεται απευθείας στα φύλλα.

Στα έντομα και συγκεκριμένα σε διάφορα είδη της οικογένειας των Κολεοπτέρων, σε Δερμάπτερα και στην οικογένεια Gryllidae, δεν προσδιορίστηκε κάποια από τις δραστικές ουσίες- στόχους που εφαρμόστηκαν στην καλλιέργεια, αλλά ούτε από τα έμμονα οργανοχλωριωμένα, που ελέγχθηκαν ως στόχοι της ανάλυσης. Ωστόσο, στα διάφορα είδη Ορθοπτέρων προσδιορίστηκαν, σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, τα pendimethalin, fluometuron και chlorantraniliprole.

Τέλος, στους ηπατικούς ιστούς Κιρκινεζιού, όπου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία συσσωρεύονται οι οργανοχλωριωμένες ουσίες, προσδιορίστηκαν σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, τα Dieldrin και DDE, ακόμα και σε νεοσσούς. Το εύρημα αυτό αποδεικνύει τη βιοσυσσώρευση και τη βιομεγέθυνση τέτοιων έμμονων ουσιών σε είδη ανώτερων επιπέδων της τροφικής πυραμίδας.

Λέξεις κλειδιά: Αγροτικά οικοσυστήματα, Βιοποικιλότητα, Οργανοχλωριωμένα παρασιτοκτόνα, αρπακτικά πουλιά

Summary

In the last 50 years the need to increase the produced crops has led to the intensification of agriculture by using high yield crops, land use change and the systematic use of fertilizers and plant protection products. However, these actions combined with biotic interactions cause a serious environmental impact at a global level. One of the main effects is the degradation of ecosystems and loss of biodiversity. There are many studies showing that continued use of insecticides and herbicides are causing a significant reduction in biodiversity. The airborne transportation of the active ingredients of many pesticides, applied in spray form, the persistence plant protection products and their derivatives, causes the bioaccumulation at different levels of the food chain and have a serious impact on both human health and the health of the fauna and flora of different ecosystems.

Because plant and animal biodiversity is a structural feature of the different ecosystems, it is used as an environmental impact indicator to control pesticide residue in the areas of development and application of these products.

This study deals with the transport of pesticides at different levels of the food chain and is conducted in a cotton field in Thessaly. This area was chosen because it is the center of the feeding activity of *Falco naumanni*, a protected predator as well as an insectivorous migratory bird, which overwinters in Africa and during the spring and summer months is active in several regions of Europe. The research started from the lowest levels of the food chain, the soil, continued on to the plants, expanded to insects (Coleoptera and Orthoptera families) and reached the upper level of the food chain that constitutes the birds of prey.

The selection of the active substances which were detected was made according to the pesticides (herbicides and insecticides) applied to this crop throughout the cultivating season. This selection included also some persistent compounds, such as organochlorine pesticides, which, according to international bibliography, are detected in predator tissues.

Two active substances were detected in the cotton fields' soil, herbicide pendimethalin and insecticide chlorantraniliprole, with the former showing higher concentrations than the latter, but relatively low. This is obvious since it is applied directly to the soil, moreover, as it is a persistent compound. Chlorantraniliprole was determined in cotton leaves, as is a substance that is directly applied to them.

As far as insects are concerned, specifically in the species of Coleoptera, Dermaptera and Gryllidae family, there was no determination of any compound. However, in the various species of Orthoptera, the substances pendimethalin, fluometuron and chlorantraniliprole, were determined in relatively low concentrations.

Finally, in liver tissues of *Falco naumanni*, where organochlorine compounds are accumulated, dieldrin and DDE have been detected in relatively low concentrations even in juveniles. This demonstrates the bioaccumulation and biomagnification of such persistent substances in species of the higher-level food pyramid.

Key words: Agro-ecosystems, Biodiversity, Organochlorine pesticides, birds of prey

Εγώ, η Θεοδούλα Παπαδοπούλου, είμαι η συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρος της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής. Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.

Ως επιβλέπων της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή, δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα Θεοδούλα Παπαδοπούλου

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Summary	6
1. Εισαγωγή	11
1.1 Γεωργία και Βιοποικιλότητα	11
1.2 Η επίδραση της γεωργίας στο έδαφος και τη χλωρίδα	13
1.3 Η επίδραση της γεωργίας στην πανίδα	15
1.3.1 Φυτοφάρμακα και έντομα	15
1.3.2 Φυτοφάρμακα και πουλιά	16
1.4 Αναλυτική μεθοδολογία για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων και μέθοδοι ανάλυσης	18
1.4.1 Υγρή και Αέρια Χρωματογραφία	20
2. Σκοπός της έρευνας	22
3. Υλικά και Μέθοδοι	24
3.1 Γενικά στοιχεία περιοχής έρευνας	24
3.1.2 Χρήσεις γης	24
3.1.3 Περιοχή μελέτης	25
3.1.4 Σταθμός Δειγματοληψίας	26
3.2 Μεθοδολογία Δειγματοληψίας και Προετοιμασίας Δειγμάτων	28
3.2.1 Δειγματοληψία εδάφους	28
3.2.2 Δειγματοληψία φύλλων	29
3.2.3 Μέθοδος συλλογής αρθρόποδων- Παγίδες παρεμβολής (pitfall traps)	30
3.2.4 Τοποθέτηση παγίδων παρεμβολής (pitfall traps) και δειγματοληψία	31
3.2.5 Μέθοδος συλλογής Ορθοπτέρων με δίχτυ σάρωσης (sweep net)	33
3.2.6 Συλλογή Ορθοπτέρων με δίχτυα σάρωσης (sweep nets)	34
3.3 Ταξινομική κατάταξη οργανισμών	35
3.4 Εκχύλιση και Ανάλυση ιστών	41
3.4.1 Εκχύλιση εδαφικού δείγματος	41
3.4.2 Εκχύλιση και ανάλυση ιστού φυλλικής επιφάνειας και ανάλυση	41
3.4.3 Εκχύλιση και ανάλυση εντόμων	41
3.4.3.1 Εκχύλιση και ανάλυση δειγμάτων οικογένειας Κολεοπτέρων	41
3.4.3.2 Εκχύλιση και ανάλυση δειγμάτων των οικογενειών των Ορθοπτέρων	42
3.4.3.3 Εκχύλιση και ανάλυση δειγμάτων ηπατικού ιστού Κιρκινεζιών	42
3.4.3.4 Αναλυτικά συστήματα αέριας και υγρής χρωματογραφίας και προσδιορισμός των ουσιών στόχων	43
4. Αποτελέσματα	46
4.1 Υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων στα εδαφικά δείγματα	46
4.2 Ανάλυση φυτικών ιστών	50
4.3 Ανάλυση εντόμων	51
4.4 Ανάλυση ήπατος Κιρκινεζιού	53
5. Συζήτηση	55
Βιβλιογραφία	58

Κατάλογος Εικόνων, Πινάκων & Διαγραμμάτων

Εικόνα 1: Χρήσεις γης στον Θεσσαλικό κάμπο.....	24
Εικόνα 2: Περιοχή προγράμματος Life για το Κιρκινέζι.....	26
Εικόνα 3: Αγροτική περιοχή Ριζόμυλου και δειγματοληπτική επιφάνεια.....	27
Εικόνα 4: Δειγματοληπτική επιφάνεια με καλλιέργεια βαμβακιού.	27
Εικόνα 5: Δειγματοληψία εδάφους με καρτότο.....	28
Εικόνα 6: Διαδικασία παραλαβής τελικού δείγματος.....	29
Εικόνα 7: Ομογενοποίηση δειγμάτων φύλλων.....	30
Εικόνα 8: Τοποθέτηση παγίδας παρεμβολής.....	32
Εικόνα 9: Τοποθέτηση καλύμματος στην παγίδα.....	32
Εικόνα 10: Υγρό συντηρητικό παγίδας παρεμβολής.....	32
Εικόνα 11: Δίχτυ Σάρωσης.....	35
Εικόνα 12: Τοποθέτηση Ορθοπτέρων σε αεροστεγές σακουλάκι με πληροφορίες.....	35
Εικόνα 13: Αναγνώριση εντόμων που συλλέχθηκαν με τις παγίδες παρεμβολής, με τη χρήση στερεομικροσκοπίου.....	36
Εικόνα 14: Αναγνώριση Ορθοπτέρων που συλλέχθηκαν με δίχτυα σάρωσης.....	36
Εικόνα 15: Διαδικασία παραλαβής ήπατος Κιρκινεζιού.....	43
Διάγραμμα 1: Μετακίνηση γεωργικών φαρμάκων μετά την εφαρμογή του σε μια καλλιέργεια.....	14
Διάγραμμα 2: Στάδια Αναλυτικής Διαδικασίας.....	20
Διάγραμμα 3: Καλλιεργήσιμη έκταση στην Περιφέρεια Θεσσαλίας.....	25
Πίνακας 1: Τοποθέτηση παγίδων παρεμβολής (pitfall traps) στις διάφορες δειγματοληπτικές φάσεις του πειράματος. Ο αρχικός αριθμός των παγίδων αφορά τον αριθμό που τοποθετήθηκε στην βαμβακοκαλλιέργεια και ο τελικός αριθμός που συμπεριλήφθηκε στην αναγνώριση και ανάλυση των δειγμάτων.....	33
Πίνακας 2: Αναγνώριση taxa από την σύλληψη εντόμων με παγίδες παρεμβολής (pitfall traps).....	38
Πίνακας 3: Αναγνώριση οικογενειών Ορθοπτέρων από τη σύλληψη τους με δίχτυ σάρωσης (sweep net).....	40
Πίνακας 4: Δραστικές ουσίες- στόχοι της ανάλυσης στα εδαφικά δείγματα.....	47
Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις υπολειμμάτων ουσιών- στόχων σε εδάφη του αγροοικοσυστήματος. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε ng δραστικής ουσίας/g εδάφους. (Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με HPLC/UV).....	49
Πίνακας 6: Αποτελέσματα αναλύσεων με υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography) σε εκχυλίσματα φυτικών ιστών με βάση τις δειγματοληπτικές περιόδους. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε ng ουσίας/g φυτικού ιστού.....	50
Πίνακας 7: Αποτελέσματα αναλύσεων με υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography) σε εκχυλίσματα ιστού Ορθοπτέρων, με βάση τις δειγματοληπτικές περιόδους. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε ng ουσίας/g ιστού.....	51
Πίνακας 8: Αποτελέσματα αναλύσεων με υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography) σε εκχυλίσματα ιστού Gryllidae, με βάση τις δειγματοληπτικές περιόδους. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε ng ουσίας/g ιστού.....	52
Πίνακας 9: Αποτελέσματα αναλύσεων με υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography) σε εκχυλίσματα ηπατικού ιστού Κιρκινεζιού (Falco naumanni).....	53
Πίνακας 10: Αποτελέσματα αναλύσεων με αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography-ECD) σε εκχυλίσματα ηπατικού ιστού Κιρκινεζιού (Falco naumanni) για την ανίχνευση οργανοχλωριωμένων ουσιών (OCs).....	54

1. Εισαγωγή

1.1 Γεωργία και Βιοποικιλότητα

Η γεωργία τον 21^ο αιώνα αντιμετωπίζει τεράστιες προκλήσεις. Εκτιμάται ότι ο ανθρώπινος πληθυσμός θα φτάσει μέχρι το 2050 τα 9,7 δισεκατομμύρια (United Nations, Department of Economic and Social Affairs & Population Division, 2015). Με βάση το γεγονός ότι η γεωργία αποτελεί την κυρίαρχη χρήση γης σε παγκόσμιο επίπεδο, είναι άξιο απορίας πού και πώς θα παράγονται τα τρόφιμα και η ενέργεια για την υποστήριξη του αυξανόμενου πληθυσμού (Foley *et al.*, 2011).

Τα τελευταία 50 χρόνια η επέκταση της γεωργίας οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή τροφίμων με τη χρήση καλλιεργειών υψηλής απόδοσης, την εφαρμογή λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων και την άρδευση. Ωστόσο οι αλλαγές χρήσεων γης και η εντατικοποίηση της γεωργίας, σε συνδυασμό με τις βιοτικές αλληλεπιδράσεις και τη διαθεσιμότητα των πόρων στα οικοσυστήματα, προκαλούν σοβαρές τοπικές και παγκόσμιες περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Matson *et al.*, 1997). Επιπλέον οι παρεμβάσεις αυτές οδηγούν στην απώλεια της βιοποικιλότητας και την υποβάθμιση των οικοσυστημάτων (Henle *et al.*, 2008).

Τα αγροτικά οικοσυστήματα είναι ο πιο εκτεταμένος βιότοπος για τη βιοποικιλότητα στην Ευρώπη (Donald *et al.*, 2006). Έρευνες έχουν δείξει ότι η σύγχρονη γεωργία αποτελεί την ανθρωπογενείς απειλή για τη βιοποικιλότητα σε σημείο που συγκρίνεται με την παγκόσμια κλιματική αλλαγή και την ικανότητα της να επηρεάζει ταυτόχρονα μεγάλες εκτάσεις. Ο Tilman και άλλοι (2001) εκτιμούν ότι κατά τα επόμενα 50 χρόνια η μετατροπή φυσικών οικοτόπων σε εκμεταλλεζόμενες γεωργικές εκτάσεις θα υπερβεί τα ενός δισεκατομμυρίου εκτάρια στις αναπτυσσόμενες χώρες (όπου κατέχουν την μεγαλύτερη βιοποικιλότητα), καθώς και τον διπλασιασμό ή ακόμα και τριπλασιασμό του χημικού ευτροφισμού των υδάτινων οικοσυστημάτων και της ρύπανσης από φυτοφάρμακα.

Σε επίπεδο εδάφους, η γεωργική εντατικοποίηση, η οποία αποδεικνύεται με την αύξηση των χημικών εισροών, την αλλαγή χρήσεων γης και με τη μείωση ποικιλομορφίας στις καλλιέργειες, οδηγεί σε αυξημένη απόδοση. Σε επίπεδο παραγωγής, η εξάπλωση γεωργικών καλλιεργειών οδηγεί σε απώλεια και κατακερματισμό φυσικών και ημιφυσικών οικοτόπων (Doxa *et al.*, 2012). Μετά από χιλιετίες αλλαγών χρήσεων γης, ένα υψηλό ποσοστό της Ευρωπαϊκής βιοποικιλότητας επιβιώνει σε αγροτικά ενδιαιτήματα (Krebs *et al.*, 1999). Οι αλλαγές στη δομή των οικοτόπων έχουν μειώσει τη διαθεσιμότητα τροφής και καταφυγίου για τους οργανισμούς, καθώς επίσης και σημαντικές αλλαγές στην αφθονία και την ποικιλία των ειδών (Ings *et al.*, 2009). Τα φυτά, τα έντομα και ειδικότερα τα πουλιά έχουν μειωθεί σε σημαντικό βαθμό σε όλες τις γεωργικές εκτάσεις τόσο σε επίπεδο πληθυσμού όσο και σε επίπεδο ενδιαιτημάτων (Billetter *et al.*, 2008).

Σε γενικές γραμμές η απώλεια της βιοποικιλότητας έχει συνδεθεί με την ανάγκη παραγωγής μεγαλύτερων ποσοτήτων τροφής, τη σπορά ανταγωνιστικών καλλιεργούμενων ειδών φυτών, τη ρύπανση με άζωτο και την κλιματική αλλαγή (Butchart *et al.*, 2010). Όλες αυτές οι οπτικές για την κρίσιμη κατάσταση της βιοποικιλότητας είναι εμφανείς και αποδεκτές, ωστόσο πρέπει να αναφερθεί και η επίδραση της χρήσης των φυτοφαρμάκων στις καλλιέργειες και η επιρροή τους στη μείωση της βιοποικιλότητας.

Έρευνες αποδεικνύουν ότι σημειώνεται μια σημαντική μείωση της βιοποικιλότητας που προκαλείται από τη χρήση εντομοκτόνων (Luzardo *et al.*, 2014) και ζιζανιοκτόνων (Chiron *et al.*, 2014) που συχνά δρουν σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες καταπόνησης (Goulson *et al.*, 2015). Τα γεωργικά φάρμακα με μεγάλο χρόνο ημιζωής καθώς και η αερομεταφορά των δραστικών ουσιών από την εφαρμογή φυτοφαρμάκων με τη μορφή ψεκασμού, μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά τη βιοποικιλότητα ακόμα και σε προστατευόμενες περιοχές (Martín-López *et al.*, 2011).

Επιπλέον μερικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα ανάλογα με την εμμογή τους στο περιβάλλον καθώς και παράγωγά τους (μεταβολίτες, προϊόντα αποδόμησης και διάσπασης φυτοπροστατευτικών προϊόντων, προϊόντα αντίδρασης), βιοσυσσωρεύονται στις τροφικές αλυσίδες προκαλώντας επιπτώσεις τόσο στην ανθρώπινη υγεία όσο και στην υγεία άλλων ειδών (πανίδα και χλωρίδα) με τη διασπορά και τη διάχυση τους στο περιβάλλον.

Όπως επισημαίνει ο Edwards (2002) οι αλλαγές στη βιοποικιλότητα που προκαλούνται από τα χημικά, μπορεί να είναι γενετικές, φυσιολογικές ή ανωμαλίες στη συμπεριφορά, πληθυσμιακές και λειτουργικές αλλαγές, αλλαγές στη χημική σύνθεση (π.χ συγκέντρωση ουσιών στον αέρα ή στο νερό), αλλαγές στις παραμέτρους που καθορίζουν τη λειτουργία του οικοσυστήματος (π.χ πρωτογενής και δευτερογενής παραγωγικότητα) ή αλλαγές στον χώρο και την ετερογένεια των οικοσυστημάτων.

Ο Βαλαβανίδης (2008) σημειώνει ότι οι διάφοροι οργανισμοί αντιδρούν διαφορετικά στις χημικές ουσίες λόγω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ έμβιων και αβιογενών παραμέτρων του περιβάλλοντος. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα ζιζανιοκτόνα που έχουν επιλεκτική τοξική δράση στα φυτά, στα ζιζάνια, στους μικροοργανισμούς και στα έντομα που ζουν στο τροφικό πλέγμα των αγρών. Τα ζιζανιοκτόνα που δεν βιοδιασπώνται, βιοσυγκεντρώνονται στα έμβια όντα και βιομεγθενώνται μέσω της τροφικής αλυσίδας. Αποτέλεσμα αυτού είναι η επιλεκτική απομάκρυνση ενός είδους που υπάρχει στο οικοσύστημα, προκαλώντας τη μείωση της βιοποικιλότητας των ειδών και την αλλαγή στην ισορροπία και τη δομή των κοινοτήτων του οικοσυστήματος.

Ωστόσο η τοξικολογική έρευνα σε αγροτικά οικοσυστήματα είναι ένα δύσκολο έργο διότι πρέπει να ληφθούν υπόψη πολύπλοκοι παράγοντες και σύνθετες διαδικασίες, όπως οι αλληλεπιδράσεις των διαφόρων πληθυσμών και ειδών με το αβιοτικό περιβάλλον. Συνήθως οι τοξικολογικές μετρήσεις γίνονται σε εργαστηριακό επίπεδο λόγω ευκολίας, καθώς στο πεδίο υπάρχουν δυσκολίες εξ' αιτίας των μεταβολών που επέρχονται με την πάροδο του χρόνου.

Οι οικολογικές επιπτώσεις που προκαλούνται στα αγροτικά οικοσυστήματα από τη χρήση χημικών ουσιών, επηρεάζουν τη βιοποικιλότητα σε πολλαπλά επίπεδα (Edwards, 2002). Αυτά είναι:

- Πληθυσμιακό επίπεδο, μεμονωμένων ατόμων (ποσοστό γεννήσεων, θνησιμότητα κλπ).
- Κοινοτικό επίπεδο, όσον αφορά τις επιπτώσεις στις φυτικές/ φυτικές, φυτικές/ μικροβιακές ή φυτικές/ φυσικές αλληλεπιδράσεις και τις ποικιλίες ειδών.
- Επίπεδο οικοσυστήματος, επιπτώσεις σε πρωτογενή και δευτερογενή παραγωγικότητα, ανάλυση της οργανικής ύλης, ο κύκλος των θρεπτικών υλικών.
- Επίπεδο τοπίου, μεταβολές στη χωρική ετερογένεια των φυτών και των οργανισμών του εδάφους, μεταφορά υλικού του εδάφους και των θρεπτικών συστατικών και οι υδρολογικές μεταφορές θρεπτικών ουσιών.

1.2 Η επίδραση της γεωργίας στο έδαφος και τη χλωρίδα

Η υπερεκμετάλλευση των γεωργικών εκτάσεων, το βαθύ όργωμα, οι μη ορθολογικές γεωργικές πρακτικές, η υπερβολική χρήση των λιπασμάτων και η αλόγιστη εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων για την προστασία των καλλιεργειών, οδηγούν στη διάβρωση και απώλεια παραγωγικών εδαφών.

Το έδαφος μαζί με τα υδάτινα οικοσυστήματα αποτελούν τους βασικούς αποδέκτες της ανθρωπογενούς ρύπανσης (Βαλαβανίδης, 2008). Στις περισσότερες περιπτώσεις στόχος των γεωργικών φαρμάκων αποτελούν τα φυτά και εφαρμόζονται στο έδαφος, στο φύλλωμα ή ως επενδυτικά σπόρων. Το έδαφος προσλαμβάνει τις δραστικές ουσίες των γεωργικών φαρμάκων, που ρυπαίνουν τις καλλιεργήσιμες εκτάσεις και έχουν διαφορετική τοξικότητα στα φυτά και τα χερσαία ζώα, διασπώνται με φυσικές διεργασίες μέσα στο έδαφος και βιοαποικοδομούνται μέσω των εδαφικών μικροοργανισμών.

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι το μέσο καταπολέμησης ζιζανίων και επιβλαβών για τα φυτά εντόμων που βοηθούν στην προστασία και τις αποδόσεις των καλλιεργειών και συμβάλλουν στην οικονομία. Παρόλο που τα γεωργικά φάρμακα αποτελούν σημαντικό παράγοντα της σύγχρονης γεωργίας, η υπερβολική χρήση τους οδηγεί στη ρύπανση των εδαφών και την επιδείνωση της ποιότητας του εδάφους και του περιβάλλοντος.

Η ανησυχία για τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις της επαναλαμβανόμενης χρήσης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων οδήγησε στην έρευνα της περιβαλλοντικής τύχης αυτών των ουσιών, τα οποία μπορούν να μετακινηθούν από τις καλλιεργούμενες εκτάσεις στον αέρα, σε άλλα εδάφη και στα υδάτινα οικοσυστήματα, προκαλώντας σημαντικά προβλήματα στη βιοποικιλότητα. Ο χρόνος παραμονής του γεωργικού φαρμάκου στο έδαφος εξαρτάται από το πόσο ισχυρά δεσμεύονται οι ουσίες αυτές από το έδαφος καθώς και από το πόσο εύκολα αποδομούνται. Επίσης, σημαντικό ρόλο παίζουν και οι περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την εφαρμογή τους, όπως για παράδειγμα η υγρασία του εδάφους.

Ένα μεγάλο ποσοστό των φυτοπροστατευτικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται στην γεωργία δεν φτάνει ποτέ στους οργανισμούς- στόχους (Niti *et al.*, 2013).

Υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι με τους οποίους εισέρχονται οι δραστικές ουσίες των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος. Ο πρώτος είναι μέσω ψεκασμού κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών για την προστασία του φυλλώματος (Rial-Otero *et al.*, 2003) και ο δεύτερος μέσω των κοκκίων που εφαρμόζονται απευθείας στο έδαφος (López-Pérez *et al.*, 2006). Στην περίπτωση της απευθείας εφαρμογής των γεωργικών φαρμάκων στο έδαφος, τα κατάλοιπα αυτών και οι μεταβολίτες τους μπορούν να συσσωρευτούν στο έδαφος σε πολύ υψηλά επίπεδα.

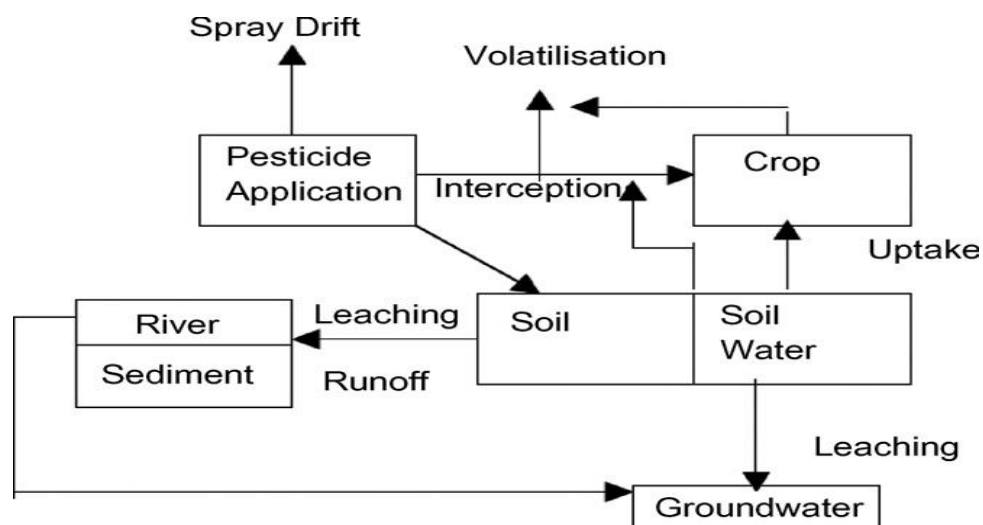
Η συμπεριφορά των γεωργικών φαρμάκων στα εδάφη εξαρτάται από μια πληθώρα σύνθετων φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών, όπως είναι η εκρόφιση, η προσρόφιση, η έκπλυση, η απορροή, η χημική και βιολογική αποδόμηση καθώς και η απορρόφιση από τα φυτά. Αυτές είναι οι διαδικασίες που μεταφέρουν τις δραστικές ουσίες των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο έδαφος και από το έδαφος στον αέρα, στο νερό ή στα τρόφιμα.

Το έδαφος αποτελεί έναν αποδέκτη πολλών ρυπαντικών ουσιών, όπως είναι τα υγρά, στερεά, γεωργικά και κτηνοτροφικά απόβλητα, λιπάσματα. Οι οργανικοί και ανόργανοι ρύποι, που βρίσκονται στο νερό, απορροφούνται από το έδαφος και στη συνέχεια μεταφέρονται στα διάφορα εδαφικά επίπεδα μέσω κατακρημνισμάτων και υπογείων νερών (Βαλαβανίδης, 2008).

Οι τοξικές ουσίες έχουν έμμεσες επιδράσεις στα εδαφικά οικοσυστήματα μεταβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο τις σχέσεις θηρευτή και θηράματος και προκαλώντας δραστικές αλλαγές στους τροφικούς ιστούς των εδαφών (Edwards, 1999).

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το έδαφος παίζει σημαντικό ρόλο και στη συγκέντρωση τοξικών ουσιών στα φυτά. Οι τρόποι με τους οποίους μπορεί να μετακινηθούν τα γεωργικά φάρμακα μεταξύ των φυτών και του εδάφους στο οποίο καλλιεργούνται είναι δύο. Αρχικά μπορεί το προϊόν να πέσει στο έδαφος ενώ η εφαρμογή του γίνεται πάνω στο φυτό, είτε να μεταφερθεί μετά από κάποια βροχόπτωση από το φυτό στο έδαφος. Δεύτερον τα υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων που παραμένουν στο έδαφος, ειδικά τα έμμονα, παραμένουν στο περιβάλλον λόγω της εμμοσύνης τους και έτσι έχουν τη δυνατότητα να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα λόγω της απορρόφησης τους από τα φυτά, μέσω του ριζικού τους συστήματος (Fantke and Jolliet, 2015). Βεβαία και πάλι η συγκέντρωση υπολειμμάτων ποικίλει ανάλογα με το είδος του φυτού, καθώς επίσης και με τον τύπο εδάφους, τη φύση και τη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας του γεωργικού φαρμάκου και την πηγή του ρύπου (Gaw *et al.*, 2008).

Επίσης κατά την εφαρμογή ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος μέσω του φυλλώματος η ποσότητα του προϊόντος που παραμένει στην επιφάνεια του φύλλου, μετά την εξάτμιση του νερού του ψεκαστικού υγρού, δημιουργεί ένα στρώμα πάνω στη φυλλική επιφάνεια που εμπεριέχει τις δραστικές ουσίες του γεωργικού φαρμάκου. Το στρώμα αυτό μπορεί να απομακρυνθεί με έκπλυση λόγω κατακρημνισμάτων, εξάτμισης, ανέμου ή τη διεξαγωγή διαφόρων καλλιεργητικών εργασιών εντός της καλλιέργειας. Το ποσοστό της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων που παραμένουν στη φυτική επιφάνεια ή στο φυτικό ιστό εξαρτώνται από την ταχύτητα μετακίνησης του προϊόντος προς άλλους ιστούς (ζωικούς και φυτικούς), από την ταχύτητα μεταβολισμού του φαρμάκου και από την ταχύτητα αύξησης του φυτικού ιστού και περισσότερο του καρπού. Έτσι μπορεί να συμπεράνει κανείς ότι ενώ αρχικά η συγκέντρωσή τους αυξάνεται με τον χρόνο, στη συνέχεια μειώνεται λόγω της αύξησης της φυτικής μάζας (Παπαδοπούλου- Μουρκίδου και Πατσιάς, 2009). Ωστόσο με τη συγκέντρωση των υπολειμμάτων στους φυτικούς ιστούς είναι δυνατή η μετακίνηση των δραστικών ουσιών, του εκάστοτε προϊόντος, στην τροφική αλυσίδα τόσο μέσω της τροφής με την κατάποση όσο και με τη δερματική επαφή.



Διάγραμμα 1: Μετακίνηση γεωργικών φαρμάκων μετά την εφαρμογή του σε μια καλλιέργεια (M. Arias-Estévez *et al.*, 2008).

1.3 Η επίδραση της γεωργίας στην πανίδα

Η χρήση των γεωργικών φαρμάκων για την προστασία των καλλιεργειών αναμένεται να αυξηθεί λόγω της μεγάλης αύξησης του πληθυσμού και της ανάγκης για παραγωγή περισσότερων τροφίμων. Ωστόσο καθώς η χρήση των ουσιών αυτών αυξάνει την αγροτική παραγωγή, η βιοσυσσώρευση μέσω της τροφικής αλυσίδας μπορεί τελικά να προκαλέσει κίνδυνο στην πανίδα των οικοσυστημάτων, διότι τα φυτοφάρμακα προκαλούν πολλές επιπτώσεις. Για το λόγο αυτό επειδή η ποικιλότητα τόσο των φυτών όσο και των ζώων αποτελεί τα δομικά χαρακτηριστικά όλων των οικοσυστημάτων, χρησιμοποιείται ως δείκτης περιβαλλοντικών επιπτώσεων σε όλους τους τύπους των οικοσυστημάτων, για τον έλεγχο της υπολειμματικότητας των φυτοφαρμάκων στις περιοχές ανάπτυξης και δραστηριοποίησης τους.

1.3.1 Φυτοφάρμακα και έντομα

Τα φυτοφάρμακα καταστρέφουν τόσο τους παρασιτικούς οργανισμούς (ζωικοί ή φυτικοί) σε μια καλλιέργεια όσο και τους ωφέλιμους οργανισμούς σε ένα αγροτικό οικοσύστημα, διαταράσσοντας έτσι τη φυσική ισορροπία και λειτουργία μεταξύ παρασίτων και επιβλαβών για αυτά εντόμων. Οι ωφέλιμοι οργανισμοί πραγματοποιούν πολλές λειτουργίες σε ένα αγροοικοσύστημα, όπως την επικονίαση, το φυσικό αερισμό του εδάφους, την ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών καθώς και το φυσικό έλεγχο των παρασίτων. Με την εφαρμογή των φυτοπροστατευτικών προϊόντων οι καλλιέργειες απαλλάσσονται όχι μόνο από τα ζιζάνια αλλά και από τους ωφέλιμους οργανισμούς (Zacharia, 2011).

Οι πληθυσμοί των παρασιτικών οργανισμών ανακάμπτουν σχετικά γρήγορα λόγω του αριθμού τους και της ικανότητας τους να αντιστέκονται και να αποκτούν ανθεκτικότητα στις δραστικές ουσίες των γεωργικών φαρμάκων, με αποτέλεσμα την αναζωπύρωση του πληθυσμού των παρασίτων καθώς και άλλων δευτερογενών παρασίτων που αναπαράγονται με ταχείς ρυθμούς χωρίς την αντιμετώπιση τους από φυσικούς «θηρευτές». Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη χρήση περισσότερων φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τους αγρότες για τον έλεγχο και την αντιμετώπιση του προβλήματος, με στόχο τη βέλτιστη απόδοση της συγκομιδής τους (Zacharia, 2011).

Τα έντομα λόγω του μεγάλου πληθυσμού τους και της ευρείας διασποράς τους χρησιμοποιούνται ως βιολογικοί ανιχνευτές για τον εντοπισμό τοξικών ουσιών και βαρέων μετάλλων σε μελέτες βιολογικής παρακολούθησης (Bromenshenk *et al.*, 1985; Voshell *et al.*, 1985), επιπλέον αποτελούν ένα σημαντικό τμήμα του συνόλου των ειδών και της βιομάζας στα οικοσυστήματα που σχετίζονται με το έδαφος. Ωστόσο για τα έντομα το να κατοικούν σε ένα ρυπασμένο περιβάλλον είναι ένα είδος συμβιβασμού. Συνήθως κάτι τέτοιο έχει ως αποτέλεσμα τη δαπάνη ενέργειας των εντόμων σε διαδικασίες αυτοάμυνας, ενώ αυτή η ενέργεια θα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί στην ατομική ανάπτυξη του εντόμου ή στην αναπαραγωγική του διαδικασία. Οι αλλαγές που μπορεί να προκληθούν σε έναν οργανισμό, που επιτρέπουν την ελαχιστοποίηση των αρνητικών επιπτώσεων από την επίδραση των τοξικών ουσιών, συνήθως αφορούν ένα άτομο και βασίζονται στη φαινοτυπική πλαστικότητα και σε άλλες μορφές μη γενετικών ή και γενετικών τροποποιήσεων στα κύτταρα. Στην περίπτωση της πανίδας που κατοικεί σε ρυπασμένες περιοχές μπορεί να

παρατηρηθεί φυσική επιλογή, παρόλο που μια γενετική προσαρμογή απαιτεί την πάροδο εκατοντάδων χρόνων (Abdelfattah *et al.*, 2017).

Οι δραστικές ουσίες των φυτοφαρμάκων λόγω της διαλυτότητας τους στο νερό, της έκπλυσης και της μετακίνησης τους προκαλούν τη ρύπανση του εδάφους και όπως προαναφέρθηκε μπορούν να ανιχνευτούν ακόμα και μετά από αρκετά χρόνια. Με τη συστηματική και έντονη χρήση γεωργικών φαρμάκων, τα φυτά απορροφούν από το έδαφος τις τοξικές ουσίες, οι οποίες μεταφέρονται στους ιστούς μέσω του αγγειακού τους συστήματος, με αποτέλεσμα τα έντομα (παράσιτα και ωφέλιμα) μέσω της κατανάλωσης των φύλλων ή των ριζών να απορροφούν κάποιες από αυτές τις δραστικές ουσίες όταν τρέφονται από τα φυτά αυτά (Jeschke *et al.*, 2011; Krischik *et al.*, 2015). Η απορρόφηση των δραστικών ουσιών από τα έντομα είναι δυνατό να συμβεί και μέσω της επαφής τους με τα διάφορα περιβαλλοντικά υποστρώματα που περιέχουν υπολείμματα των ουσιών αυτών.

Τα έντομα που δραστηριοποιούνται σε ρυπασμένες περιοχές μπορεί να έχουν υψηλές συγκεντρώσεις τοξικών ουσιών (Kovats *et al.*, 1993) και να μεταφέρουν την τοξικότητα αυτή στα οικοσυστήματα λόγω της υψηλής παραγωγικότητας τους (Fairchild *et al.*, 1993). Τα έντομα λοιπόν μπορούν μέσω της τροφικής αλυσίδας να μετακινήσουν τις τοξικές ουσίες, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να συσσωρεύονται πολύ εύκολα στους οργανισμούς (Nakata *et al.*, 2002), σε εντομοφάγα θηλαστικά, προκαλώντας διάφορες αρνητικές επιπτώσεις στον οργανισμό αυτών, μέχρι και τη θανάτωση κάποιων ατόμων.

1.3.2 Φυτοφάρμακα και πουλιά

Η εντατικοποίηση της γεωργίας έχει οδηγήσει στην απώλεια ενδιαιτημάτων σημαντικών για τη βιοποικιλότητα, όπως τα λιβάδια, οι υδροβιότοποι και τις χρήσεις γης χαμηλής έντασης. Επιπλέον λόγω των σύγχρονων μεθόδων καλλιέργειας έχει αλλάξει η ποιότητα των αγροοικοσυστημάτων (π.χ. μονοκαλλιέργειες, αλλαγές τύπων καλλιέργειας), τις μεταβολές στο χρόνο σποράς και συγκομιδής, τις αλλαγές στην υγρασία του εδάφους καθώς και την αυξημένη χρήση αγροχημικών (φυτοφαρμάκων, λιπασμάτων κ.α) (Fuller, 2000; Newton, 2004).

Έτσι λοιπόν μια από τις πολυσυζητημένες πτυχές της εντατικοποίησης της γεωργίας είναι η χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων, λόγω των άμεσων και έμμεσων επιπτώσεων που προκαλεί στο επίπεδο του ατόμου, του πληθυσμού και της κοινότητας της άγριας πανίδας (Guerrero *et al.*, 2011; Mitra *et al.*, 2011). Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει το συγκεκριμένο θέμα με διαφορετικές μεθόδους. Οι τοξικές επιδράσεις των δραστικών ουσιών μπορούν να προκύψουν αμέσως μετά την εφαρμογή των γεωργικών φαρμάκων (Mitra *et al.*, 2011), ενώ οι έμμεσες εμφανίζονται στους πληθυσμούς μετά από την πάροδο κάποιων χρόνων.

Η τοξικότητα των φυτοπροστατευτικών ουσιών όπως και άλλων έμμεσων περιβαλλοντικών ρύπων μπορεί να ποικίλει, με τις ισχυρά τοξικές ουσίες να προκαλούν σοβαρότερα προβλήματα στα πτηνά από ότι οι λιγότερο τοξικές ουσίες. Ωστόσο είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι η τοξικότητα μπορεί να ποικίλει ακόμα και ανάμεσα σε άτομα του ίδιου είδους, που αυτόματα καθιστά μια έρευνα αρκετά πολύπλοκη διαδικασία. Επιπλέον είναι απαραίτητες κάποιες πληροφορίες όπως οι διατροφικές συνήθειες των πτηνών καθώς και το εύρος του δείγματος του πληθυσμού, η ηλικία αλλά και η φυσική κατάσταση του πτηνού.

Στη συνέχεια αυτές οι πληροφορίες θα πρέπει να αξιολογούνται με άξονα τη μεταβολική και χημική δραστηριότητα των διαφόρων χημικών ουσιών.

Πολλές μελέτες έχουν ερευνήσει τη συγκέντρωση φυτοφαρμάκων σε πουλιά. Τα πτηνά θεωρούνται εδώ και αρκετά χρόνια ως είδη παρακολούθησης για τις τοξικές επιπτώσεις από έμμονες ρυπογόνες ουσίες. Τα αρπακτικά είδη πουλιών τροφοδοτούνται από υψηλά επίπεδα της τροφικής αλυσίδας και συσσωρεύουν ουσίες μέσω της βιοσυσσωρεύσης και της βιομεγέθυνσης, καθιστώντας τα ευαίσθητα στη ρύπανση του περιβάλλοντος. Τα περισσότερα πουλιά έχουν συγκεκριμένες μεταναστευτικές και διατροφικές συνήθειες κάτι που βοηθά και στην έρευνα σεναρίων, υπολειμματικότητας διαφόρων τοξικών ουσιών, ευρύτερης κλίμακας.

Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ότι κάθε χρόνο χιλιάδες πουλιά πεθαίνουν λόγω της αυξημένης χρήσης φυτοφαρμάκων. Ωστόσο οι θάνατοι αυτοί είναι δύσκολο να καταγραφούν για πολλούς λόγους, όπως για παράδειγμα το ότι ένα δηλητηριασμένο πουλί μπορεί να απομακρυνθεί σε μεγάλη απόσταση από το σημείο εφαρμογής των γεωργικών φαρμάκων ή και το ότι μπορεί να καταναλωθεί από άλλα αρπακτικά πουλιά. Επιπλέον η αποσύνθεση των νεκρών πτηνών είναι ταχεία, κάτι που καθιστά δύσκολη τη συλλογή στοιχείων.

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους τα γεωργικά φάρμακα μπορούν να επηρεάσουν τα πτηνά. Η έκθεση τους στις ουσίες αυτές μπορεί να γίνει μέσω της κατάποσης, της εισπνοής και της απορρόφησης από το δέρμα. Λόγω της διατροφής τους τα πτηνά μπορεί να εισάγουν τις τοξικές ουσίες από σπόρους που ενδέχεται να έχουν ψεκάσει με κάποιο φυτοπροστατευτικό προϊόν, έντομα που ζουν στο περιβάλλον της καλλιέργειας είτε από τα φυτά της καλλιέργειας στα οποία έχουν εφαρμοστεί φυτοπροστατευτικά προϊόντα, καθώς και από ρυπασμένο πόσιμο νερό ή και ακόμη με την κατανάλωση μικρότερων θηλαστικών που έχουν εκτεθεί προηγουμένως σε τοξικές ουσίες. Η εισπνοή των τοξικών ουσιών είναι πιθανό να συμβεί είτε κατά ή και μετά από την εφαρμογή των φυτοπροστατευτικών προϊόντων (κυρίως με ψεκασμό) μέσω των σταγονιδίων του ψεκαστικού υγρού, της ποσότητας του φυτοφαρμάκου που πτητικοποιείται είτε και από αιωρούμενα σταγονίδια – σκόνη στην περιοχή της καλλιέργειας. Τέλος η δερματική προσβολή συμβαίνει είτε με την επαφή και παραμονή τους σε ρυπασμένα υδάτινα οικοσυστήματα, είτε με την απορρόφηση μέσω των ταρσών τους όταν δραστηριοποιούνται και διαμένουν σε ενδιαίτηματα με έδαφος και φυτά στα οποία έχουν εφαρμοστεί γεωργικά φάρμακα (<https://assets.lawrenceks.org>).

Ωστόσο στους χερσαίους οργανισμούς η παράμετρος που έχει καθοριστικό και το σημαντικότερο ρόλο στη βιοσυσσωρεύση είναι η διατροφή. Οι έμμονοι ρύποι βιομεγενθύνονται και παρουσιάζουν υψηλές συγκεντρώσεις στα ανώτερα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας . Ωστόσο παρουσιάζονται πολλές διαφορές μεταξύ των ειδών και οι συγκρίσεις κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων μιας έρευνας, πρέπει να αφορούν τα ίδια τμήματα λιπαρών ιστών ή οργάνων. Τέλος οι αναλύσεις των δειγμάτων είναι δύσκολο να αντιπροσωπεύουν το σύνολο ενός πληθυσμού ειδών (Moriarty, 1985) και θα πρέπει όσο είναι εφικτό να κατηγοριοποιούνται ανά φύλο, ηλικία, κ.α.

Όπως προαναφέρθηκε πολλοί έμμονοι ρύποι, όπως τα οργανοχλωριωμένα (παρασιτοκτόνα και πολυχλωριωμένα διφαινύλια - PCBs), λόγω της λιποδιαλυτότητας τους και της δυσκολίας που παρουσιάζουν κατά τη χημική και βιολογική αποικοδόμηση, αλλά και λόγω των παρόμοιων ιδιοτήτων των μεταβλητών τους, οδηγούν στη βιοσυσσωρεύση στα πτηνά μέσω της κατάποσης καθ' όλης της διάρκειας της ζωής τους καθώς και στη βιομεγέθυνση στα διάφορα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας (Gioia *et al.*, 2013). Η

βιοσυσσώρευση των ουσιών αυτών εμφανίζεται ιδιαίτερα στους λιπώδης ιστούς των πτηνών. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι συγκεντρώσεις έμμοων ρύπων είναι μεγαλύτερες στο ήπαρ από ότι στο σωματικό λίπος, ανάλογα με την κατάσταση του πτηνού και τη χρονική περίοδο, μπορεί να διαφοροποιηθεί σημαντικά και μάλιστα σε αρκετές περιπτώσεις δειγμάτων έχει παρατηρηθεί να μη διαθέτουν σημαντικές αποθήκες λίπους. Ωστόσο η μεταβολή των επιπέδων των ουσιών αυτών μπορεί να οφείλεται και στις διαφορετικές αιτίες θανάτου, που επιδρούν στα επίπεδα λίπους στο σώμα, καθώς επίσης και στις διατροφικές και μεταναστευτικές συνήθειες των πτηνών (Hela *et al.*, 2005). Πολλές είναι οι παρενέργειες της βιοσυσσώρευσης τοξικών ουσιών στον οργανισμό των πτηνών. Κάποιες από αυτές είναι η λέπτυνση του κελύφους των αυγών, η μειωμένη αναπαραγωγική επιτυχία, η μειωμένη φυσιολογική σεξουαλική συμπεριφορά, το μικρότερο μέγεθος εγκεφάλου ή και νευροτοξικολογικά προβλήματα (Iwaniuk *et al.*, 2006). Με βάση αποτελέσματα διαφόρων ερευνών οι τοξικές ουσίες, όπως τα οργανοχλωριωμένα, θεωρούνται υπεύθυνες για τη σημαντική μείωση του πληθυσμού πολλών αρπακτικών ειδών πουλιών παγκοσμίως, κάποια από τα οποία πλέον αναγνωρίζονται ως απειλούμενα είδη.

1.4 Αναλυτική μεθοδολογία για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων και μέθοδοι ανάλυσης

Πέρα από τις ποσότητες των γεωργικών φαρμάκων ή των τοξικών προϊόντων στους ιστούς των καλλιεργούμενων φυτών, κάποιες ποσότητες των φυτοπροστατευτικών προϊόντων μετακινούνται σε όλα τα στάδια της χρήσης τους ή μετά την εφαρμογή τους στο περιβάλλον ή προσλαμβάνονται και από άλλους ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς, τους οργανισμούς μη στόχους.

Τα γεωργικά φάρμακα εισέρχονται στο περιβάλλον και σε άλλους οργανισμούς κυρίως με δύο τρόπους:

- Με την απευθείας εφαρμογή τους στο περιβάλλον,
- Εμμέσως με την ρύπανση που προκαλείται από διάφορες πηγές, όπως από βιομηχανικά απόβλητα, από συσκευασίες γεωργικών φαρμάκων, από την τυχαία μεταφορά του νέφους ψεκασμού σε μεγάλες αποστάσεις, μέσω του ανέμου, από τη μετακίνηση τους λόγω των κατακρημνισμάτων από τα αγροοικοσυστήματα σε υδάτινα οικοσυστήματα κτλ.

Έχει παρατηρηθεί ότι για κάποιες φυτοπροστατευτικές ουσίες που είτε εφαρμόζονται απευθείας σε κάποια καλλιέργεια, ή έχουν ως τελικό αποδέκτη διάφορα τμήματα του περιβάλλοντος, υπάρχει έντονη πιθανότητα διασποράς με ποικίλους μηχανισμούς σε μια ευρύτερη περιοχή σε σχέση με την τοποθεσία εφαρμογής τους (Παπαδοπούλου- Μουρκίδου και Πατσίας, 2009).

Η ανάλυση των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων πραγματοποιείται με τεχνικές ενόργανης χημείας και κυρίως με χρωματογραφικές μεθόδους ανάλυσης. Η ενόργανη χημική ανάλυση είναι η μέτρηση μιας ιδιότητας ενός συστατικού κάποιου ιστού, με την χρήση οργάνων, με τελικό στόχο την μετατροπή του μεγέθους της ιδιότητας της δραστικής ουσίας σε απόκριση (π.χ. ηλεκτρικό σήμα). Η χημική αυτή ανάλυση περιλαμβάνει μεθόδους που βασίζονται στις φυσικοχημικές ιδιότητες των στοιχείων και των ενώσεων οποιασδήποτε δραστικής ουσίας. Μετρώντας δηλαδή την τιμή μιας τέτοιας ιδιότητας μιας δραστικής ουσίας είναι δυνατός ο ποσοτικός της προσδιορισμός, δηλαδή ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του σε κάποιο ιστό. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία εκλεκτικοί

ανιχνευτές, όπως ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD), που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος ως προς τις οργανοχλωριωμένες ενώσεις και ο ανιχνευτής αζώτου φωσφόρου (NPD), που είναι εκλεκτικός ως προς τις ενώσεις που φέρουν N και P στο μόριό τους (π.χ. οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα). Τα τελευταία χρόνια έχει προστεθεί στο οπλοστάσιο της ενόργανης ανάλυσης και η χρήση ανιχνευτών φασματομετρίας μάζας διαφόρων τεχνολογιών.

Τα πλεονεκτήματα αυτού του τύπου αναλύσεων είναι τα εξής:

- Έχουν μεγάλη ευαισθησία,
- Έχουν σχετικά μικρό χρόνο ανάλυσης,
- Είναι δυνατή η αυτοματοποίηση κάποιων σταδίων.

Ωστόσο υπάρχουν και μειονεκτήματα που παρατίθενται παρακάτω:

- Απαιτείται η χρήση πρότυπων ουσιών και διαλυμάτων για τη βαθμονόμηση των οργάνων,
- Το κόστος των οργάνων είναι υψηλό όπως και η απαιτούμενη τεχνογνωσία.

Τα στάδια εργασιών για τον προσδιορισμό των δραστικών ουσιών είναι:

- Δειγματοληψία/ αρχικό δείγμα
- Προεργασία δείγματος
- Μείωση αρχικού δείγματος σε εργαστηριακό δείγμα
- Προετοιμασία δείγματος (δείγμα σε μορφή διαλύματος κατάλληλη για την εισαγωγή του στο αναλυτικό όργανο, απαλλαγή από παρεμποδίζουσες ουσίες του υποστρώματος, κατάλληλη συγκέντρωση αναλυτών για τον ακριβή προσδιορισμό τους, πιθανή ανάγκη μετατροπής των αναλυτών σε μορφή κατάλληλη ανάλογα με την εφαρμογή που χρησιμοποιείται)
- Μέτρηση στο αναλυτικό όργανο
- Βαθμονόμηση αναλυτικού οργάνου
- Αξιολόγηση και επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου
- Επεξεργασία χρωματογραφικού σήματος και μετατροπή του σε αποτέλεσμα, δηλαδή σε συγκέντρωση του αναλυτή στο υπόστρωμα
- Αποτίμηση χημικής πληροφορίας

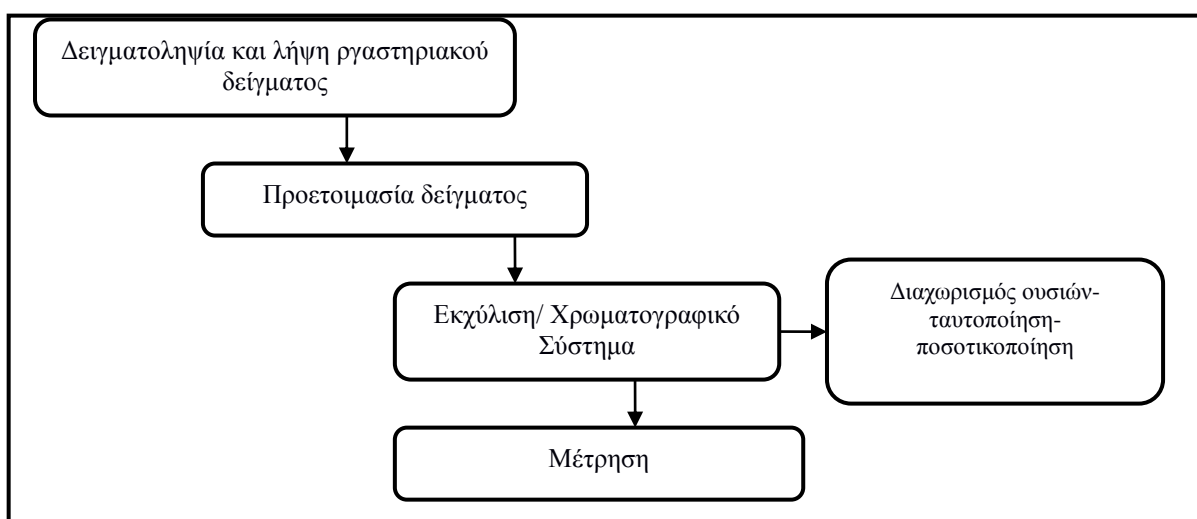
Συγκεκριμένα το δείγμα που φτάνει στο εργαστήριο, το οποίο πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό του υπό μελέτης ιστού, επεξεργάζεται και από το σύνολο του χρησιμοποιείται μια ποσότητα, συνήθως γραμμάρια, η οποία επεξεργάζεται και στη συνέχεια αναλύεται για τον προσδιορισμό των φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Το υπόλοιπο δείγμα τοποθετείται σε αεροστεγές σακουλάκια και αποθηκεύεται στην κατάψυξη του εργαστηρίου σε περίπτωση που είναι αναγκαία περαιτέρω ανάλυση.

Στη συνέχεια ακολουθεί η εκχύλιση του δείγματος. Εκχύλιση είναι η διαδικασία κατά την οποία ο αναλύτης (το προσδιοριζόμενο συστατικό σε μια ανάλυση, π.χ. μια δραστική ουσία) λαμβάνεται από το υπόστρωμα (ο αναλυόμενος ιστός από τον οποίο προσδιορίζονται οι ουσίες), με τη βοήθεια κατάλληλων εκχυλιστικών διαλυμάτων. Ο σκοπός της εκχύλισης είναι αρχικά να εκχυλιστούν ποσοτικά οι ενώσεις- στόχοι της ανάλυσης και δευτερευόντως να εκχυλιστούν όσο το δυνατόν λιγότερες άλλες ουσίες- συστατικά του υποστρώματος που μπορεί να προκαλέσουν παρεμβολές στην ανάλυση (εκλεκτική εκχύλιση). Ανάλογα με τη φύση του υποστρώματος χρησιμοποιούνται διαφορετικά εκχυλιστικά διαλύματα, τα οποία πρέπει να διαθέτουν μεγάλη εκχυλιστική ικανότητα, ώστε οι δραστικές ουσίες- στόχοι να εκχυλιστούν από το

υπόστρωμα στο τελικό διάλυμα. Γενικότερα ισχύει ότι για την εκχύλιση υδρόφιλων ουσιών χρησιμοποιούνται υδρόφιλοι διαλύτες και για την εκχύλιση λιπόφιλων ουσιών, λιπόφιλοι διαλύτες. Οι πιο διαδεδομένοι διαλύτες είναι η ακετόνη, το ακετονιτρίλιο, η μεθανόλη, το εξάνιο κ.α. Συχνά βέβαια χρησιμοποιούνται και μίγματα διαλυτών ως εκχυλιστικά μέσα.

Στη μεθοδολογία που ακολουθήσαμε, έπεται η φυγοκέντρωση του εκχυλίσματος και για κάποιους από τα διάφορα είδη ιστών που αναλύσαμε, ακολούθησε συμπύκνωση του εκχυλίσματος. Η συμπύκνωση έχει ως στόχο την αύξηση της συγκέντρωσης των δραστικών ουσιών. Κάτι τέτοιο είναι δυνατό με την χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα (Rotary Evaporator), που εξατμίζει το εκχύλισμα υπό κενό, σε υψηλές θερμοκρασίες, μέχρι τους 40°C. Μετά την συμπύκνωση η αραίωση γίνεται συνήθως με κάποιον άλλο διαλύτη, από αυτόν που χρησιμοποιήσαμε στην εκχύλιση του ιστού, λόγω της ανάλυσης που έπεται στον χρωματογράφο.

Μετά από όλη αυτή την διαδικασία ακολουθεί ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων που αποτελεί μια μέθοδο της αναλυτικής χημείας και πραγματοποιείται με την χρήση εξειδικευμένων ενόργανων συστημάτων ανάλυσης, συγκεκριμένα του υγρού ή του αέριου χρωματογράφου. Κατά την ποιοτική ανάλυση πραγματοποιείται η ανίχνευση- ταυτοποίηση των δραστικών ουσιών, με την βοήθεια πρότυπων διαλυμάτων. Στην ποσοτική ανάλυση γίνεται ποσοτικοποίηση (υπολογισμός συγκέντρωσης) και προσδιορισμός των ουσιών που ανιχνεύτηκαν.



Διάγραμμα 2: Στάδια Αναλυτικής Διαδικασίας

1.4.1 Υγρή και Αέρια Χρωματογραφία

Ως χρωματογραφία ορίζεται η αναλυτική μέθοδος διαχωρισμού μίγματος διαφόρων ουσιών που είναι αποτέλεσμα ποικιλίας διεργασιών, που βασίζονται στη διαφορετική εκλεκτική συνάφεια του κάθε συστατικού του μίγματος ως προς δύο μη αναμειγνύομενες φάσεις, που βρίσκονται σε μια σχετική κίνηση ή μια προς την άλλη. Η μια φάση παραμένει σταθερή και ονομάζεται στατική φάση και η άλλη φάση που διέρχεται μέσα ή πάνω από τη στατική ονομάζεται κινητή φάση. Η ανάγκη για την καταγραφή των διαχωρισθέντων ουσιών κατά την έξοδο τους από τη στατική φάση οδήγησε στη δημιουργία της αέριας και της υγρής

χρωματογραφίας που αποτελούν δύο από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές των μεθόδων ανάλυσης. Η επιλογή της μεθόδου για την ανάλυση και τον προσδιορισμό κάποιας δραστικής ουσίας γίνεται με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες του αναλύτη.

- Η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography- GC) αναπτύχθηκε ως τεχνική ανάλυσης τα τελευταία 50 περίπου χρόνια και αποτελεί μια απλή σχετικά τεχνική. Με την τεχνική αυτή μια μικρή ποσότητα διαλύματος της τάξης του 1 μL εισάγεται μέσω μιας μικροσύριγγας στον εισαγωγέα όπου εξατμίζεται και εισάγεται σε χρωματογραφική στήλη (στατική φάση) καθώς μετακινείται από αδρανές φέρον αέριο (κινητή φάση). Ο διαχωρισμός του εκχυλίσματος πραγματοποιείται με κατανομή του αναλύτη μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Οι θερμοκρασίες που επικρατούν για το διαχωρισμό είναι υψηλές (μέχρι ~ 300°C). Ο χρόνος παραμονής κάθε ουσίας στη στήλη εξαρτάται από τις ιδιότητες της και βοηθάει στο διαχωρισμό των ουσιών και στον ποιοτικό προσδιορισμό τους. Το μέγεθος (ύψος και επιφάνεια) της κορυφής που καταγράφεται από τον ανιχνευτή, κατά την έξοδο από τη στήλη, είναι αυτό που αξιοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ανιχνευόμενης ουσίας. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για ουσίες που έχουν ικανοποιητική πτητικότητα, μεγάλη τάση ατμών και θερμική σταθερότητα. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν οι οργανοχλωριωμένες ουσίες, οι οργανοφωσφορικές, οι τριαζίνες, τα πυρεθροειδή και οι στρομπιλουρίνες κ.α.
- Στην υγρή χρωματογραφία ή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography- HPLC) ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης της στατικής και της κινητής φάσης, όπου η κινητή φάση είναι υγρή, σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία, και η στατική φάση είναι στερεή ή υγρή. Το δείγμα εισάγεται στη στήλη και με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκλύονται το ένα μετά το άλλο. Οι ουσίες που αναλύονται μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης, λόγω του ότι κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης με διαφορετικό τρόπο. Γενικά η υγρή χρωματογραφία βρίσκει μεγάλη εφαρμογή με μόνο εμπόδιο τον περιορισμό της ικανότητας διαλυτοποίησης των αναλυόμενων ουσιών κατά στην κινητή φάση. Οι ουσίες που αναλύονται αποκλειστικά με υγρή χρωματογραφία, είναι ουσίες μη πτητικές και ευαίσθητες θερμικά καθώς και ουσίες μεγάλης πολικότητας. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα, οι φαινυλουρίνες, οι πολικές οργανοφωσφορικές ενώσεις και αρκετά ζιζανιοκτόνα όπως οι βενζιμιδαζόλες και οι σουλφονυλουρίνες.

Για τον χρωματογραφικό προσδιορισμό των οργανικών ουσιών σε περιβαλλοντικά δείγματα χρησιμοποιούνται κυρίως πολύ-υπολειμματικές μέθοδοι με τις οποίες είναι δυνατό με μία χρωματογραφική ανάλυση να ανιχνευθεί και να προσδιοριστεί ένας μεγάλος αριθμός οργανικών ουσιών. Επίσης, σήμερα χρησιμοποιούνται τόσο για την ταυτοποίηση των χρωματογραφικών ευρημάτων, όσο και για την ποσοτικοποίηση τους οι δυνατότητες σύζευξης των χρωματογραφικών συστημάτων αέριας ή υγρής χρωματογραφίας με συστήματα φασματομετρίας μάζας διαφόρων τεχνολογιών (GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS, LC-MS/MS).

2. Σκοπός της έρευνας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της μεταφοράς επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών προϊόντων στα διάφορα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας. Η έρευνα αποτελεί ένα συνδυασμό πειράματος αγρού και εργαστηριακού πειράματος που επιχειρεί να ελέγξει την πιθανότητα μετακίνησης διαφόρων δραστικών ουσιών από το σημείο εφαρμογής τους, το έδαφος, μέχρι την τελική βαθμίδα της τροφικής αλυσίδας στην άγρια ζωή, που αποτελούν τα αρπακτικά πουλιά. Πρόκειται δηλαδή για ένα πείραμα που επιχειρεί να ποσοτικοποιήσει τη συγκέντρωση και βιοσυσώρευση φυτοπροστατευτικών ουσιών τόσο στα αγροτικά οικοσυστήματα όσο και στην πανίδα που δραστηριοποιείται σε αυτά.

Η έρευνα διεξήχθη στο αγροτικό τοπίο του Θεσσαλικού κάμπου, όπου επιλέχθηκε ένα αγροτεμάχιο με καλλιέργεια βαμβακιού, μια θερινή καλλιέργεια, η οποία καταλαμβάνει μεγάλες εκτάσεις στην περιοχή μελέτης. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν κατά τους μήνες Ιούνιο έως Σεπτέμβριο το 2016 και επικεντρώθηκαν τόσο στο έδαφος και σε φύλλα της καλλιέργειας όσο και σε έντομα που δραστηριοποιούνταν σε μικρή ακτίνα από το υπό μελέτη αγροτικό οικοσύστημα. Υπήρξαν τρεις διαδοχικές δειγματοληπτικές περιόδους, ώστε να καλυφθούν οι διαφορετικές φάσεις της ανάπτυξης της καλλιέργειας. Η πρώτη δειγματοληψία έγινε πριν από τη χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων, ακριβώς μετά την εφαρμογή τους και τέλος μια χρονική στιγμή αρκετά μετά την εφαρμογή για τον έλεγχο παραμονής τους στο περιβάλλον.

Η συλλογή του εδάφους έγινε με ειδικό δειγματολήπτη από διάφορα σημεία του αγροτεμαχίου, αποφεύγοντας τα εξωτερικά όρια της καλλιέργειας. Τα φύλλα συλλέχθηκαν από τους κύριους βλαστούς φυτών από όλο το μήκος της καλλιέργειας. Η δειγματοληψία εντόμων έγινε με δύο τρόπους. Αρχικά με τη χρήση εδαφικών παγίδων παρεμβολής και στη συνέχεια έγινε δειγματοληψία Ορθοπτέρων με δίχτυ χειρός ή απόχη (sweep net). Στην ανάλυση των εντόμων επικεντρωθήκαμε σε δύο τάξεις, αυτές των Κολεοπτέρων και αυτές των Ορθοπτέρων. Τα έντομα αυτά επιλέχθηκαν λόγω των διατροφικών τους συνηθειών. Τα Κολεόπτερα κατά κύριο λόγο στο σύνολο των οικογενειών τους είναι φυτοφάγα, υπάρχουν όμως και τα μυκητοφάγα, κοπροφάγα, σαρκοφάγα και νεκροφάγα είδη. Η πλειονότητα των Ορθοπτέρων τρέφεται με φυτικά τμήματα, αποτελώντας κάποια από αυτά σημαντικούς εχθρούς κάποιων καλλιεργειών. Ωστόσο ορισμένα από αυτά είναι αρπακτικά άλλων εντόμων, παμφάγα ή και νεκροφάγα (Αντωνάτος, 2011).

Για τον έλεγχο της βιοσυσώρευσης στα πτηνά χρησιμοποιήθηκαν δείγματα Κιρκινεζιού (*Falco naumanni*) που πρόκειται για ένα μεταναστευτικό, αρπακτικό πτηνό της τάξης Ιερακόμορφα (*Falconiformes*). Το Κιρκινέζι δραστηριοποιείται κατά κύριο λόγο σε αγροτικές περιοχές λόγω της δυνατότητας εντοπισμού της τροφής του. Θεωρείται εντομοφάγο είδος, με ιδιαίτερη προτίμηση στα Κολεόπτερα και τα Ορθόπτερα, ενώ ορισμένες φορές τρέφεται και με μικρά θηλαστικά. Αυτός είναι και ο λόγος που επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένες τάξεις εντόμων για τον έλεγχο ύπαρξης υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων. Τα δείγματα των Κιρκινεζιών που αναλύθηκαν στα πλαίσια της έρευνας, παραχωρήθηκαν από το πρόγραμμα LIFE11NAT/GR/001011 με τίτλο «Διατήρηση και διαχείριση του κιρκινεζιού (*Falco naumanni*) σε τρεις Ζώνες Ειδικής Προστασίας (ΖΕΠ) της Ελλάδας» και συγκεντρώθηκαν από το εργαστήριο Διαχείρισης Οικοτόπων και Βιοποικιλότητας του Τμήματος

Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, στα πλαίσια του προγράμματος.

Ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων πραγματοποιήθηκε με Υγρή και Αέρια Χρωματογραφία (HPLC, GC), που αποτελούν τις ενόργανες τεχνικές διαχωρισμού χημικών ουσιών, που εφαρμόζονται στον προσδιορισμό υπολειμμάτων, ακολουθώντας την ανάλογη αναλυτική μεθοδολογία. Ο έλεγχος για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε όλα τα δείγματα δεν περιορίστηκε μόνο στις ουσίες που εφαρμόστηκαν στη βαμβακοκαλλιέργεια, αλλά και σε άλλες δραστικές ουσίες περιβαλλοντικού και τοξικολογικού ενδιαφέροντος σε μια προσπάθεια εντοπισμού έμμενων ρύπων από παλαιότερες ή παράνομες χρήσεις ή και από προερχόμενων από άλλες πηγές – περιοχές (π.χ. χώρες διαχείμασης πτηνών κ.α.).

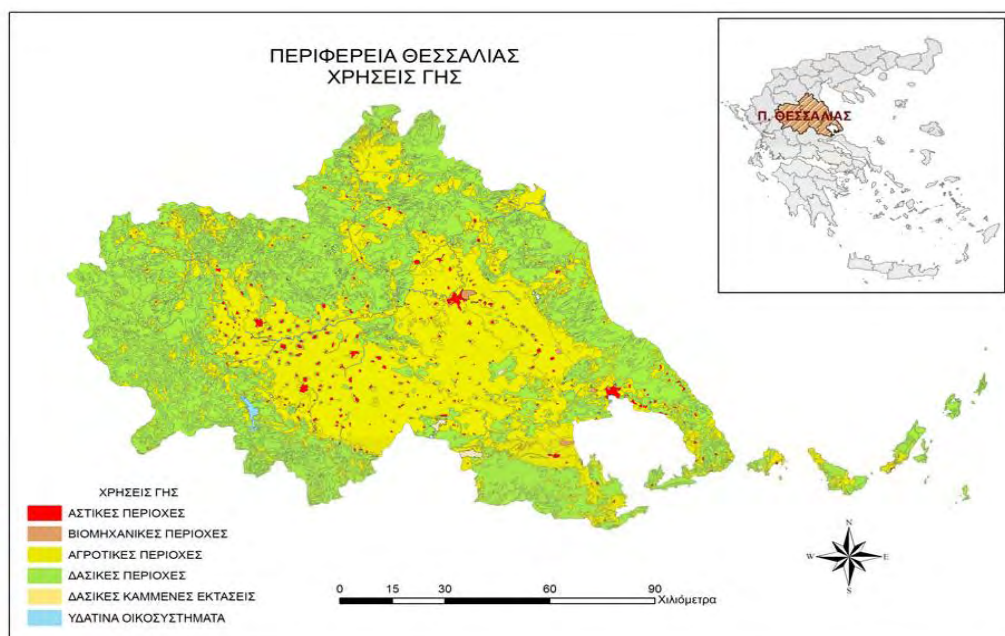
3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Γενικά στοιχεία περιοχής έρευνας

Η Θεσσαλία ανήκει στον ηπειρωτικό κορμό της Ελλάδας και καταλαμβάνει μια έκταση των 14.037 km² που αντιπροσωπεύει περίπου το 11% της συνολικής έκτασης της ελληνικής επικράτειας. Η Περιφέρεια Θεσσαλίας συνορεύει προς βορρά με τις Περιφέρειες Δυτικής και Κεντρικής Μακεδονίας, προς νότο με την Περιφέρεια Στερεάς Ελλάδος, δυτικά με την Περιφέρεια Ηπείρου, ενώ ανατολικά βρέχεται από το Αιγαίο Πέλαγος. Η Θεσσαλία παρουσιάζει μια γεωμορφολογική εικόνα σχετικά απλή, με τα ορεινά της τμήματα περιμετρικά και τα πεδινά στις κεντρικές περιοχές. Το έδαφος της είναι, ως προς τη διαμόρφωση του, 45% ορεινό, 17% ημιορεινό και 36% πεδινό περιλαμβάνοντας την μεγαλύτερη πεδιάδα της Ελλάδας, τον Θεσσαλικό κάμπο, που διαρρέεται από τον Πηνειό, το τρίτο μεγαλύτερο ποτάμι της χώρας (ΕΠΠΕΡ, 2009). Η Θεσσαλία είναι ταυτισμένη με τον κάμπο που την επηρεάζει τόσο μορφολογικά όσο και οικονομικά.

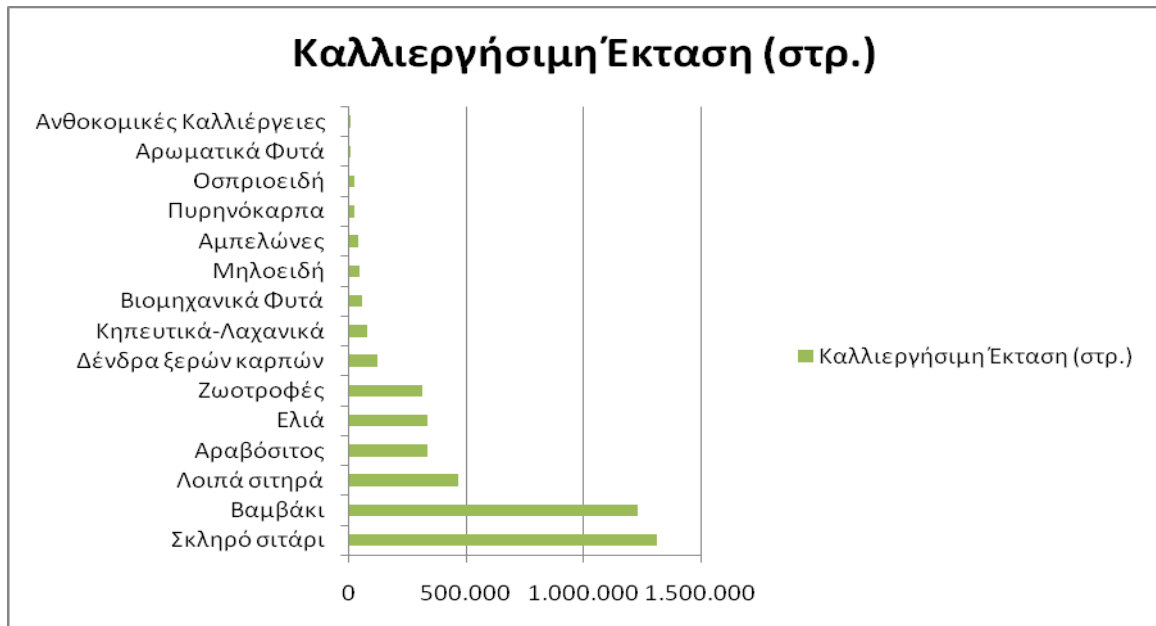
3.1.2 Χρήσεις γης

Η καλλιεργήσιμη έκταση στον Θεσσαλικό κάμπο ανέρχεται στα 4.999.353 στρ., καλύπτοντας το 12,68% της συνολικής καλλιεργήσιμης έκτασης της χώρας.



Εικόνα 1: Χρήσεις γης στον Θεσσαλικό κάμπο (Πηγή: Περιφέρεια Θεσσαλίας, 2011).

Οι καλλιέργειες που κυριαρχούν στη Θεσσαλία είναι οι αροτραίες καλλιέργειες που αποτελούν περίπου το 80% των καλλιεργούμενων εκτάσεων. Με την πάροδο των χρόνων (1978-2008) παρατηρείται μείωση στις καλλιεργούμενες εκτάσεις, ειδικά στις αροτραίες καλλιέργειες και στις αμπέλους, ενώ αύξηση έχει σημειωθεί στις δενδρώδεις καλλιέργειες και στα κηπευτικά. Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται οι σημαντικότερες καλλιέργειες σε σχέση με τη συνολική καλλιεργήσιμη έκταση της Θεσσαλίας (Περιφέρεια Θεσσαλίας, 2011).



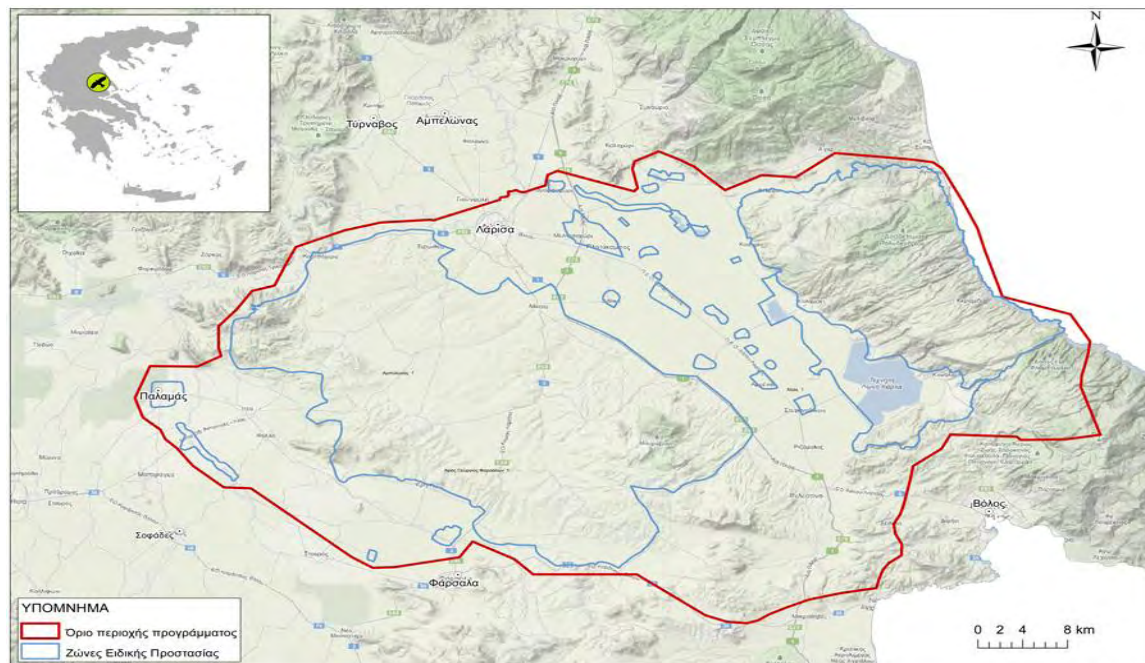
Διάγραμμα 3: Καλλιεργήσιμη έκταση στην Περιφέρεια Θεσσαλίας (Πηγή: Περιφέρεια Θεσσαλίας, 2011).

3.1.3 Περιοχή μελέτης

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στη Θεσσαλία, στην περιοχή του Θεσσαλικού κάμπου, στο χωριό Ριζόμυλος και ανήκει στο Δήμο Ρήγα Φεραίου, που βρίσκεται μεταξύ των νομών Μαγνησίας και Λάρισας. Ο Δήμος Ρήγα Φεραίου έχει έκταση 549.77 τ.χλμ και πληθυσμό 10.933 κάτοικους σύμφωνα με την απογραφή του 2011.

Το σημείο που διεξήχθη το πείραμα ήταν ένα επιλεγμένο σημείο στο πεδινό τμήμα της περιοχής, όπου κυριαρχούν οι αροτραίες καλλιέργειες. Οι κυριότερες καλλιέργειες της συγκεκριμένης περιοχής είναι τα σιτηρά, το βαμβάκι και τα ψυχανθή (π.χ. μηδική, φακές, ρεβίθια κ.α.) καθώς και κάποιες δενδρώδεις καλλιέργειες. Ανάμεσα σε αυτές τις καλλιέργειες υπάρχουν μικρά χέρσα τμήματα ακαλλιεργήτα, αγροτεμάχια που βρίσκονται σε αγρανάπαυση ή χρησιμοποιούνται για κτηνοτροφική χρήση καθώς και κάποια αγροτεμάχια που έχουν μετατραπεί σε φωτοβολταϊκά πάρκα. Λόγω της αγροτικής φύσης της περιοχής η εισροή φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην τροφική αλυσίδα της άγριας ζωής είναι έντονη και σύμφωνα με αυτό το κριτήριο η επιλογή της συγκεκριμένης περιοχής αποτελεί ένα καλό υλικό. Επιπλέον η συγκεκριμένη τοποθεσία είναι σημείο της δραστηριοποίησης και φωλεοποίησης του Κιρκινεζιού, που αποτελεί την κορυφή της τροφικής αλυσίδας, και βρίσκεται εντός των ορίων της περιοχής του προγράμματος LIFE11NAT/GR/001011 με

τίτλο «Διατήρηση και διαχείριση του κερκινεζιού (*Falco naumanni*) σε τρεις Ζώνες Ειδικής Προστασίας (ΖΕΠ) της Ελλάδας». Οι ζώνες αυτές είναι η Περιοχή του Θεσσαλικού κάμπου (GR1420011), το Όρος Μαυροβούνι (GR 1420006) και η Περιοχή ταμιευτήρων πρώην λίμνης Κάρλας (GR 1430007) και διατηρούν πάνω από το 75% του πληθυσμού του Κερκινεζιού στην Ελλάδα (<http://www.lifelesserkestrel.eu>).



Εικόνα 2: Περιοχή προγράμματος Life για το Κερκινέζι (Πηγή:<http://www.lifelesserkestrel.eu>).

3.1.4 Σταθμός Δειγματοληψίας

Ο σταθμός δειγματοληψίας επιλέχθηκε τυχαία. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σε ένα αγροτεμάχιο εντός του Θεσσαλικού κάμπου, στην αγροτική περιοχή δίπλα στον οικισμό του Ριζόμυλου (Εικόνα), με τύπο καλλιέργειας βαμβάκι.

Η καλλιέργεια βαμβακιού αποτελεί μιας από τις πιο διαδεδομένες καλλιέργειες και αποτελεί φυτό μεγάλης οικονομικής σημασίας σε παγκόσμιο επίπεδο. Για την αντιμετώπιση πιθανών ασθενειών και εχθρών συχνά απαιτείται η χρήση γεωργικών φαρμάκων για την εξάλειψη τους. Οι σημαντικότεροι εχθροί μιας βαμβακοκαλλιέργειας είναι οι σιδηροσκώληκες, ο λύγκος, οι αφίδες, το πράσινο και το ρόδινο σκουλήκι κ.α. Για την αντιμετώπιση των προαναφερθέντων κρίνεται συχνά απαραίτητη η εφαρμογή εντομοκτόνων τόσο προαιρετικά όσο και για την αντιμετώπιση της ασθένειας μετά την προσβολή της καλλιέργειας. Επίσης επειδή σε γενικά πλαίσια το βαμβάκι έχει μικρή ανταγωνιστική ικανότητα σε σχέση με άλλες καλλιέργειες, όπως το καλαμπόκι, και για τη σωστή ανάπτυξη του απαιτείται μια περίοδος 8-12 εβδομάδων χωρίς την παρουσία ζιζανίων, είναι πολύ συχνή η χρήση προσπαρτικών και προφυτρωτικών ζιζανιοκτόνων στις καλλιέργειες για την αντιμετώπιση πιθανής προσβολής της καλλιέργειας από ζιζάνια.

Σε αυτό το αγροτεμάχιο έγινε η δειγματοληψία του εδάφους και η τοποθέτηση των παγίδων για τη σύλληψη εντόμων. Τα κριτήρια με τα οποία

πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες ήταν σύμφωνα με την εφαρμογή του φυτοφαρμάκου που χρησιμοποιήθηκε για την καλύτερη απόδοση της καλλιέργειας. Το σημείο δειγματοληψίας συνορεύει με καλλιέργειες ομοίου τύπου, δενδρώδης καλλιέργειες και καλλιέργειες με σιτηρά και ψυχανθή. Σε αυτήν την ευρύτερη περιοχή πραγματοποιήθηκε η συλλογή των Ορθοπτέρων.



Εικόνα 4: Αγροτική περιοχή Ριζόμυλου και δειγματοληπτική επιφάνεια (Πηγή: Google Earth).



Εικόνα 3: Δειγματοληπτική επιφάνεια με καλλιέργεια βαμβακιού.

3.2 Μεθοδολογία Δειγματοληψίας και Προετοιμασίας Δειγμάτων

3.2.1 Δειγματοληψία εδάφους

Οι δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν στο επιλεγμένο αγροτεμάχιο, έγιναν σε 4 διαφορετικές χρονικές στιγμές για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος αλλά και σε παρελθοντικές εποχικές καλλιέργειες. Κάθε δείγμα αποτελούνταν από πολλά επιμέρους δείγματα, ώστε να είναι πιο αντιπροσωπευτικό το τελικό δείγμα και τα αποτελέσματα της ανάλυσης. Ο δειγματισμός έγινε σε όλο το μήκος του αγροτεμαχίου και σε κάθε δειγματοληψία υπήρχαν έξι επιμέρους δείγματα. Οι δειγματοληψίες έγιναν προς το εσωτερικό τμήμα της καλλιέργειας, επίσης αποφεύχθηκαν ανώμαλα σημεία του αγροτεμαχίου και σημεία στα οποία μπορεί συστηματικά να συγκεντρώνονται λιπάσματα, γεωργικά φάρμακα και νερό. Το κάθε δείγμα παραλήφθηκε με ειδικό δειγματολήπτη (καρότο) σε βάθος 5 cm και τοποθετούνταν σε χάρτινες σακούλες. Μετά από κάθε δειγματοληψία, τα επιμέρους δείγματα αναμιγνύονταν και απλωνόταν σε πλαστικά δοχεία ώστε να στεγνώσουν και αποθηκευόταν σε κάποιο σκοτεινό δροσερό σημείο για περίπου δύο με τρεις ημέρες ανάλογα με την υγρασία που είχε το κάθε δείγμα. Στη συνέχεια αλεθόταν σε πύλινο γουδί ώστε να διασπαστούν χωμάτινα κομμάτια που μπορεί να υπήρχαν και κοσκινιζόταν για να μην υπάρχουν πλέον στο δείγμα φερτά υλικά όπως ξύλα και πέτρες. Από κάθε δείγμα γινόταν λήψη 10 g εδάφους ως αναλυτικό δείγμα, το οποίο εκχυλιζόταν ώστε να ακολουθήσει η ανάλυση τους για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων δραστικών ουσιών.



Εικόνα 5: Δειγματοληψία εδάφους με καρότο.



Εικόνα 6: Διαδικασία παραλαβής τελικού δείγματος.

3.2.2 Δειγματοληψία φύλλων

Η δειγματοληψία των φύλλων έγινε σε τέσσερις χρονικές περιόδους κατά τα πρώτα στάδια της παραγωγικής ηλικίας του φυτού. Αρχικά η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε πριν από την εφαρμογή εντομοκτόνου στην καλλιέργεια για την αντιμετώπιση βλαβερών για το φυτό εντόμων, ακριβώς μετά τον ψεκασμό της καλλιέργειας και στη συνέχεια 2 χρονικές στιγμές αρκετά μετά τη χρήση του φυτοπροστατευτικού προϊόντος. Σε κάθε δειγματοληψία επιλεγόταν περίπου 20 φύλλα, κατά μήκος όλης της έκτασης του αγροτεμαχίου, από διάφορα άτομα φυτών, από τον κύριο βλαστό, από σημεία που δεν σκιάζονταν και δεν είχαν προσβληθεί από κάποιο έντομο. Τα φυτά από τα οποία συλλέχθηκαν τα φύλλα ήταν όλα της ίδιας ανάπτυξης και βρισκόταν στο εσωτερικό τμήμα της καλλιέργειας. Στη συνέχεια τα φύλλα τοποθετήθηκαν σε πλαστικά δοχεία και διατηρήθηκαν σε σκιερό και δροσερό μέρος για περίπου τρεις ημέρες ώστε να αποβάλλουν όλη την υγρασία τους και να ξεραθούν. Έπειτα όλα τα φύλλα από κάθε δειγματοληψία ομογενοποιήθηκαν σε ηλεκτρική συσκευή blender, ώστε το τελικό δείγμα που θα αναλυθεί να είναι όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτικό γίνεται.



Εικόνα 7: Ομογενοποίηση δειγμάτων φύλλων.

3.2.3 Μέθοδος συλλογής αρθροπόδων- Παγίδες παρεμβολής (pitfall traps)

Μία από τις πιο ευρέως διαδεδομένες μεθόδους δειγματοληψίας εδαφοβίων αρθροπόδων είναι οι παγίδες παρεμβολής (pitfall traps) (Spence and Niemelä, 1994). Οι κύριοι λόγοι για τους οποίους είναι τόσο διαδεδομένη αυτή η μέθοδος είναι το γεγονός ότι αποτελεί έναν απλό και οικονομικό τρόπο για τη δειγματοληψία ειδών που δραστηριοποιούνται επιφανειακά (Prasifka *et al.*, 2006). Οι παγίδες παρεμβολής χρησιμοποιούνται για τη δειγματοληψία πολλών οικογενειών αρθροπόδων όπως τα Κολεόπτερα (Coleoptera) (Arbogast *et al.* 2000), τα Μυρμήγκια (Formicidae) (Abensperg *et al.*, 1995), τις Αράχνες (Araneae) κ.α., και είναι αποτελεσματικότερες στις εκτάσεις με χαμηλή ή καθόλου βλάστηση. Επίσης η μέθοδος αυτή μπορεί να παγιδεύσει και Ορθόπτερα, κυρίως όμως Γρύλλους (Gryllidae) που είναι μια οικογένεια Ορθοπτέρων που δραστηριοποιείται κοντά στο έδαφος ή και υπογείως (Rebek *et al.*, 1995).

Γενικά δεν υπάρχει ένας συγκεκριμένος τύπος παγίδων παρεμβολής, αφού διαφέρουν ανάλογα με τις ανάγκες της έρευνας. Επίσης ο σχεδιασμός της παγίδας αλλάζει ανάλογα με την περιοχή που τοποθετείται. Για παράδειγμα σε υγροτόπους, χρησιμοποιούνται κύπελλα με αποστράγγιση για την αποφυγή της υπερχειλίσης (Wardle *et al.* 1993).

Ο βασικός τύπος μιας παγίδας παρεμβολής είναι απλός. Συνήθως αποτελείται από ένα δοχείο συλλογής θαμμένο στο έδαφος, με την επιφάνεια του να βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με την επιφάνεια του εδάφους, το οποίο συλλέγει παθητικά διάφορα είδη οργανισμών που δραστηριοποιούνται στο έδαφος (έντομα, θηλαστικά, ερπετά κ.α.), που πέφτουν τυχαία μέσα στην παγίδα. Οι παγίδες παρεμβολής συλλέγουν ασταμάτητα το υλικό μελέτης μέχρι τη στιγμή της συλλογής τους (Woodcock, 2005). Οι παγίδες περιλαμβάνουν ένα είδος καλύμματος, που τοποθετείται πάνω από το δοχείο προκειμένου να αποφεύγεται η υπερχειλίση του δοχείου σε περίπτωση βροχής αλλά και η εξάτμιση του υγρού

που εμπεριέχεται στο δοχείο. Όταν η παγίδα δεν χρησιμοποιείται για να εγκλωβίσει ζωντανά τα έντομα χρησιμοποιείται ένα υγρό διάλυμα για την αποτελεσματικότητα στην πρόληψη της αποσύνθεσης τους, για τη μείωση των επιπέδων διαφυγής τους καθώς και την αποφυγή κανιβαλισμού μεταξύ διαφόρων εντόμων (Woodcock, 2005). Στις παγίδες μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα ευρύ φάσμα διαλυμάτων όπως νερό, βενζοϊκό/ οξικό οξύ, αλκοόλη, μεθανάλη κ.α. Τα πιο διαδεδομένα υλικά συντήρησης είναι τα αντιψυκτικά αυτοκινήτων (αιθυλενογλυκόλη ή προπυλενογλυκόλη) (Woodcock, 2005).

Κάθε είδος ανταποκρίνεται διαφορετικά στις παγίδες παρεμβολής και η αναλογία τους στις παγίδες δεν αντιπροσωπεύει απαραίτητα την αφθονία τους στον χώρο δειγματοληψίας. Ωστόσο πολλοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν τη συλλογή των διαφόρων τάξεων εντόμων. Αβιοτικοί παράγοντες, όπως είναι η επιλογή του μεγέθους, του σχήματος, του χρώματος και του υλικού του δοχείο, το ίδιο ισχύει και για τον αριθμό παγίδων, τη μεταξύ τους απόσταση και βιοτικοί παράγοντες όπως η δομή του ενδιαίτηματος που τοποθετείται η παγίδα, εάν υπάρχει καθόλου χαμηλή ή πυκνή βλάστηση και ο χρόνος παραμονής της παγίδας στο έδαφος (Skvarla, 2014).

3.2.4 Τοποθέτηση παγίδων παρεμβολής (pitfall traps) και δειγματοληψία

Στο σημείο δειγματοληψίας έγινε τοποθέτηση παγίδων παρεμβολής (pitfall traps) με σκοπό τη συλλογή εντόμων που δραστηριοποιούνται στο έδαφος. Στόχος ήταν η παγίδευση συγκεκριμένων οικογενειών που μπορεί να βρισκόταν στο σημείο μελέτης. Αυτό αφορούσε τις οικογένειες των Κολεοπτέρων, Ορθοπτέρων και Δερμαπτέρων. Οι συγκεκριμένες οικογένειες επιλέχθηκαν με βάση τις διατροφικές προτιμήσεις του Κικκινεζιού.

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε τέσσερις χρονικές περιόδους και προγραμματίστηκαν με βάση τη στιγμή εφαρμογής εντομοκτόνου στο συγκεκριμένο αγροτεμάχιο. Επομένως πραγματοποιήθηκαν δύο δειγματοληψίες πριν τον ψεκασμό του γεωργικού φαρμάκου, μια αμέσως μετά την εφαρμογή αυτού και η τελευταία μετά την πάροδο σαράντα ημερών από τη στιγμή του ψεκασμού.

Σε κάθε δειγματοληψία τοποθετούνταν έξι παγίδες στο εσωτερικό τμήμα του αγροτεμαχίου, αποφεύγοντας τα όρια αυτού, σε ευθεία γραμμή, με απόσταση 10 m μεταξύ τους. Η παγίδα κατασκευάστηκε με απλά υλικά και αποτελούνταν από το δοχείο όπου τοποθετούνταν το συντηρητικό υγρό και ήταν περιεκτικότητας 1 L, με διάμετρο στομίου 13 cm. Με τη βοήθεια ενός φτυαριού τοποθετούνταν στο έδαφος σε βάθος τέτοιο ώστε το στόμιο του να βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με την επιφάνεια του εδάφους. Το υγρό συντηρητικό που τοποθετούνταν στο δοχείο ήταν 330 ml διαλύματος και ήταν ένα μείγμα από 250 ml νερού, 80 ml ψυκτικό υγρό αυτοκινήτου (Parafly) και τρίμματα από πράσινο σαπούνι. Πάνω από την παγίδα στερεωνόταν πλαστικό κάλυμμα, για την αποφυγή υπερχειλίσης του δοχείου σε περίπτωση βροχών αλλά και την αποφυγή πτώσης μεγαλύτερων ζώων (βατράχια, ποντίκια κ.α.).

Οι παγίδες παρέμεναν στο πεδίο για μια εβδομάδα από τη στιγμή τοποθέτησής τους. Κατά τη συλλογή τους, οι οργανισμοί κάθε παγίδας απομονώνονταν με βοήθεια σουρωτηριού και τοποθετούνταν σε αεροστεγές σακουλάκι με ετικέτα πληροφοριών. Στη συνέχεια η διατήρηση των δειγμάτων μέχρι τη στιγμή της αναγνώρισης και της εργαστηριακής τους ανάλυσης γινόταν σε καταψύκτη του εργαστηρίου στους -20°C.



Εικόνα 8: Τοποθέτηση παγίδας παρεμβολής.



Εικόνα 9: Τοποθέτηση καλύμματος στην παγίδα.



Εικόνα 10: Υγρό συντηρητικό παγίδας παρεμβολής.

Τοποθετήθηκαν συνολικά 24 παγίδες παρεμβολής (pitfall traps) στο υπό μελέτη αγροτεμάχιο με καλλιέργεια βαμβακιού, σε πέντε δειγματοληπτικές φάσεις, με τρεις παγίδες ανά κάθε φάση, εκτός από δύο δειγματοληπτικές περιόδους όπου ο αριθμός των παγίδων ανήλθε στις έξι. Ο προγραμματισμός των δειγματοληπτικών περιόδων βασίστηκε στη χρήση του εντομοκτόνου που εφαρμόστηκε στην καλλιέργεια για την αντιμετώπιση του πράσινου σκουληκιού που απειλούσε την καλλιέργεια προς το τέλος της καλοκαιρινής περιόδου. Ωστόσο ο αρχικός αριθμός παγίδων που τοποθετήθηκαν δεν συνάδει με τον τελικό διότι τυγχάνει να υπήρξαν κάποιες καταστροφές παγίδων λόγω καιρικών συνθηκών είτε λόγω περάσματος κάποιου ζώου κτλ. (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Τοποθέτηση παγίδων παρεμβολής (pitfall traps) στις διάφορες δειγματοληπτικές φάσεις του πειράματος. Ο αρχικός αριθμός των παγίδων αφορά τον αριθμό που τοποθετήθηκε στην βαμβακοκαλλιέργεια και ο τελικός αριθμός που συμπεριλήφθηκε στην αναγνώριση και ανάλυση των δειγμάτων.

<i>Δειγματοληψία</i>	1^η	2^η	3^η	4^η	5^η
<i>Εφαρμογή εντομοκτόνου</i>	<i>Πριν τον ψεκασμό</i>			<i>Μετά τον ψεκασμό</i>	
<i>Δειγματοληπτική περίοδος</i>	1/6/16- 9/6/16	14/7/16- 19/7/16	19/7/16- 25/7/16	1/8/16- 5/8/16	14/9/16- 21/9/16
<i>Αρχικός αριθμός παγίδων</i>	3	3	3	6	6
<i>Αριθμός παγίδων που συλλέχθηκαν</i>	3	3	3	5	5

3.2.5 Μέθοδος συλλογής Ορθοπτέρων με δίχτυ σάρωσης (sweep net)

Το δίχτυ σάρωσης είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη μέθοδος για τον υπολογισμό της σχετικής αφθονίας του πληθυσμού και της σύνθεσης ειδών των Ορθοπτέρων στα διάφορα οικοσυστήματα, καθώς είναι η ταχύτερη και λιγότερο εντατική μέθοδος πεδίου. Ωστόσο η αφθονία ενός είδους σχετίζεται με τη συχνότητα εμφάνισης του, επομένως το δίχτυ σάρωσης δεν παρέχει ακριβή εκτίμηση ούτε της συχνότητας αλλά ούτε και της πυκνότητας, καθώς ερευνά έναν υποθετικό όγκο πάνω από ένα ενδιαίτημα (Gardiner, 2005). Το πιο συνηθισμένο μέγεθος δικτυού είναι διαμέτρου 38 cm (O' Neill, 2003), ωστόσο και δίχτυα διαμέτρου 30 cm (Foord *et al.*, 2002), 40.6 cm (Quinn *et al.* 2000) και 49 cm (Dawes, 2002) έχουν χρησιμοποιηθεί. Λίγα είναι τα στοιχεία που έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία σχετικά με τον τύπο υφάσματος της απόχης και το μέγεθος του πλέγματος.

Ο τρόπος χρήσης της απόχης, ο αριθμός των σαρώσεων και τα σημεία στα οποία γίνεται κάθε σάρωση ποικίλει και ορισμένες φορές προσαρμόζεται ανάλογα με τις εκτιμήσεις της μεταβλητότητας του πληθυσμού που καταμετρήθηκαν σε προηγούμενες δειγματοληψίες ή και την έκταση της περιοχής δειγματοληψίας (Mukerji *et al.* 1981). Ωστόσο επειδή στη συγκεκριμένη έρευνα ήταν απαραίτητη μόνο η συλλογή τους δεν ακολούθησε κάποιο συγκεκριμένο πρωτόκολλο.

Η δειγματοληψία Ορθοπτέρων με το δίχτυ σάρωσης επηρεάζεται επίσης και από τις καιρικές συνθήκες καθώς ο αριθμός των εντόμων που συλλέγονται μπορεί να είναι χαμηλός όταν ο καιρός είναι δροσερός και υγρός (Richards and Waloff, 1954). Ο Gardiner (2005), σε βιβλιογραφική έρευνα που πραγματοποίησε, πρότεινε πως η καλύτερη χρονική στιγμή της ημέρας για την καταγραφή των Ορθοπτέρων είναι ευκολότερη νωρίς το πρωί (μεταξύ των ωρών

9:30 και 11:30) ή και αργά το απόγευμα (από τις 16:00 η ώρα και μετά), λόγω του ότι τα Ορθόπτερα είναι λιγότερο δραστήρια εκείνες τις ώρες και είναι ευκολότερο να αιχμαλωτιστούν.

Τα Ορθόπτερα είναι ένα σημαντικό μέρος των οικοσυστημάτων, φυσικών και αγροτικών καθώς αποτελούν τμήμα της διατροφής πολλών ειδών πουλιών και αραχνών (Belovsky and Slade 1993; Oedekoven and Joern 1998). Με αυτήν ακριβώς τη λογική έγινε και ο σχεδιασμός του συγκεκριμένου πειράματος, βάση του γεγονότος ότι τα Ορθόπτερα συμπεριλαμβάνονται στη βασική διατροφή του Κιρκινεζιού

3.2.6 Συλλογή Ορθοπτέρων με δίχτυα σάρωσης (sweep nets)

Η δειγματοληψία δεν περιορίστηκε στο αγροτεμάχιο που επιλέχθηκε για τη μελέτη, αλλά πραγματοποιήθηκε στο ευρύτερο αγροτικό οικοσύστημα. Τα γειτονικά αγροτεμάχια είχαν καλλιέργειες βαμβακιού, ψυχανθών, σιτηρών και κάποιες δενδρώδης καλλιέργειες. Ο αριθμός των δειγματοληψιών ήταν στο σύνολο του πέντε και πραγματοποιήθηκαν με γνώμονα την περίοδο ψεκασμού της βαμβακοκαλλιέργειας που αποτελούσε το σημείο μελέτης. Επομένως έγιναν τρεις δειγματοληψίες πριν και δύο μετά τον ψεκασμό του αγροτεμαχίου.

Η δειγματοληψίες ήταν προγραμματισμένες τις πρωινές ώρες και διαρκούσαν δύο με τρεις ώρες. Συγκεκριμένα το ωράριο ήταν 9:00 έως 13:00. Το δίχτυ σάρωσης είχε διάμετρο 35 cm και το εσωτερικό στρώμα της απόχης ήταν από λευκό μονόφυλλο, ενώ το εξωτερικό από σκούρο πράσινο ύφασμα πολυαμιδίου. Η διαδικασία συλλογής ξεκινούσε μαρκάροντας μια περιοχή, συνήθως κάποιο αγροτεμάχιο γειτονικό του σημείου μελέτης, και διανύοντας μια διαδρομή (transect) απόστασης περίπου 50 m. Περιπατώντας σε μια σταθερή ταχύτητα, σαρώθηκε επανειλημμένα την απόχη, από τη μια πλευρά στην άλλη, μέσα από τη βλάστηση. Στο τέλος κάθε διαδρομής (transect) διπλωνόταν το δίχτυ ώστε να αποφευχθεί η διαφυγή των εντόμων που εγκλωβίζόταν. Τα έντομα που δεν ανήκαν στην οικογένεια των Ορθοπτέρων απελευθερωνόταν. Στη συνέχεια τα Ορθόπτερα τοποθετούνταν σε αεροστεγές σακουλάκι με ετικέτα πληροφοριών και μέχρι την αναγνώριση και ανάλυση τους μεταφερόταν στον καταψύκτη του εργαστηρίου στους -20°C.



Εικόνα 11: Δίχτυ Σάρωσης.



Εικόνα 12: Τοποθέτηση Ορθοπτέρων σε αεροστεγές σακουλάκι με πληροφορίες.

3.3 Ταξινομική κατάταξη οργανισμών

Για την αναγνώριση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από τις παγίδες παρεμβολής, αποψύχθηκε το υλικό και καθαρίστηκε με τρεχούμενο νερό. Η καταμέτρηση και η αναγνώριση τους έγινε με τη βοήθεια στερεομικροσκοπίου. Η ταξινόμηση έγινε σε επίπεδο οικογένειας για τα Κολεόπτερα και τα Ορθόπτερα, ενώ για τα υπόλοιπα είδη έγινε σε ανώτερο ταξινομικό επίπεδο.



Εικόνα 13: Αναγνώριση εντόμων που συλλέχθηκαν με τις παγίδες παρεμβολής, με τη χρήση στερεομικροσκοπίου.

Ως αναφορά την αναγνώριση των Ορθοπτέρων που συλλέχθηκαν με το δίκτυο σάρωσης, έγινε απόψυξη των δειγμάτων και συστηματική ταξινόμηση τους σε επίπεδο οικογένειας.



Εικόνα 14: Αναγνώριση Ορθοπτέρων που συλλέχθηκαν με δίκτυα σάρωσης.

Ο συνολικός αριθμός αρthropόδων που συλλέχθηκε με τη βοήθεια των παγίδων παρεμβολής, σε όλες τις δειγματοληπτικές περιόδους, ανήλθε στα 2101 άτομα. Η συστηματική ταξινόμηση των ατόμων έγινε σε επίπεδο οικογενειών για τα Κολεόπτερα και τα Ορθόπτερα και σε άλλα taxon για τα υπόλοιπα άτομα.

Ορισμένα από τα Κολεόπτερα δεν ήταν δυνατόν να αναγνωριστούν και έτσι κατατάχθηκαν σε άλλη κατηγορία, χωρίς ταυτοποίηση. Συνολικά αναγνωρίστηκαν αρκετά taxa, που ανήκουν κυρίως στην συνομοταξία των Αρθροπόδων, αλλά και των Γαστεροπόδων μαλάκιων. Επίσης σε κάποια παγίδα εντοπίστηκε και ένα αμφίβιο. Από τα Αρθρόποδα προσμετρήθηκαν διάφορες τάξεις εντόμων και συγκεκριμένα 1 οικογένεια Ορθοπτέρων, 12 οικογένειες Κολεοπτέρων, Μυρμήγκια, και διάφορα Υμενόπτερα όπως Δίπτερα, Ημίπτερα, Δερμάπτερα, Χειλόποδα, αλλά και Ισόποδα και Αράχνες. Καταμετρήθηκαν επίσης και κάποιες προνύμφες Κολεοπτέρων (Πίνακας 2).

Η σύλληψη Ορθοπτέρων πραγματοποιήθηκε στο σημείο μελέτης αλλά και στις γειτονικές σε αυτό το αγροτεμάχιο καλλιέργειες. Το σύνολο των δειγματοληψιών ήταν 5 και προγραμματίστηκαν σύμφωνα με την περίοδο ψεκασμού της βαμβακοκαλλιέργειας με εντομοκτόνο. Ωστόσο ορισμένα από το σύνολο των ατόμων που αιχμαλωτίστηκαν και στη συνέχεια αναλύθηκαν δεν ήταν δυνατό να αναγνωριστούν και γι' αυτό το λόγο συμπεριλήφθηκαν σε άλλες κατηγορίες χωρίς να ταυτοποιηθούν (Πίνακας 3)

Πίνακας 2: Αναγνώριση taxa από την σύλληψη εντόμων με παγίδες παρεμβολής (pitfall traps).

<i>Δειγματοληψία</i>	1 ^η 1/6/2016- 9/6/2016	2 ^η 14/7/2016- 19/7/2016	3 ^η 19/7/2016- 25/7/2016	4 ^η 1/8/2016- 5/8/2016	5 ^η 14/9/2016- 21/9/2016
Arthropoda					
Insecta					
<u>Orthoptera</u>					
<i>Gryllidae</i>					
<u>Coleoptera</u>					
<i>Carabidae</i>	X		x	X	x
<i>Silphidae</i>	X				
<i>Tenebrionidae</i>	X	x		X	
<i>Scarabaeidae</i>	X				
<i>Elateridae</i>		x		X	
<i>Coccinelidae</i>					
<i>Staphylinidae</i>			x		
<i>Curculionidae</i>					x
<i>Cerambycidae</i>					
<i>Anthicidae</i>	X	x	x	X	x
<i>Unidentified</i>		x		X	x
<i>Coleoptera</i>					
<u>Hymenoptera</u>					
<i>Formicidae</i>	X	x	x	X	x
<i>Other</i>	X		x	X	x
<i>Hymenoptera</i>					
<u>Diptera</u>	X	x	x	X	x
<u>Hemiptera</u>			x	X	x
<u>Dermaptera</u>	X	x	x	X	x
<u>Lepidoptera</u>		x			x
<u>Myriapoda</u>					
<i>Chilopoda</i>		x			
<u>Malacostraca</u>					
<i>Isopoda</i>	X	x	x	X	x

Arachnida

Araneae

X

x

x

X

x

Mollusca

Gastropoda

X

Chordata

Amphibia

X

Πίνακας 3: Αναγνώριση οικογενειών Ορθοπτέρων από τη σύλληψη τους με δίχτυ σάρωσης (sweep net).

<i>Δειγματοληψία</i>	1 ^η 9/6/2016	2 ^η 14/7/2016	3 ^η 19/7/2016	4 ^η 1/8/2016	5 ^η 5/8/2016
<i>Orthoptera</i>					
<i>Acrididae</i>					
Calliptamus ssp.	X	x	x	X	x
Locusta migratoria	X	x	x	X	x
Aiolopus spp.	X	x	x	X	x
Chorthippus spp.	X	x			x
Oeidipoda spp.		x		X	x
<i>Unidentified orthoptera 1</i>		x			
<i>Unidentified orthoptera 2</i>		x			
<i>Unidentified orthoptera 3</i>		x			
<i>Unidentified orthoptera 4</i>			x		

3.4 Εκχύλιση και Ανάλυση ιστών

3.4.1 Εκχύλιση εδαφικού δείγματος

Για την ανάλυση των δειγμάτων του εδάφους ακολουθήσαμε την παρακάτω διαδικασία εκχύλισης. Από κάθε δείγμα γινόταν λήψη 10 g εδάφους σε κατάλληλο φιαλίδιο 40mL, προσθήκη 20 mL ακετονιτρίλιου και 5 g χλωριούχου νατρίου και ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 70 min στους 250°C και στο λουτρό υπερήχων για 5 min. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση του μίγματος για 10 min στις 3000 στροφές, παραλαβή 10 mL από την υπερκείμενη φάση, συμπύκνωση σε περιστροφικό εξατμιστήρα μέχρι ξηρού και επαναδιάλυση του υπολείμματος σε 1 mL ακετονιτρίλιο. Το εκχύλισμα πριν την ανάλυση του σε χρωματογραφικό σύστημα διαβιβάζονταν σε φίλτρο Nylon 0,45 μm και αποθηκευόταν σε ειδικά φιαλίδια χρωματογραφίας (τελικό εκχύλισμα). Το εκχύλισμα αυτό στην συνέχεια αναλύθηκε με υγρή χρωματογραφία.

3.4.2 Εκχύλιση και ανάλυση ιστού φυλλικής επιφάνειας και ανάλυση

Για την εκχύλιση των φυτικών ιστών σε γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρου ζυγίστηκαν 5 g δείγματος και σε αυτά προστέθηκαν 20 mL ακετονιτρίλιο. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ο ομοιογενοποιητής Ultra Turax, για την εκχύλιση (1 min) και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min στις 3000 στροφές. Ακολουθούσε παραλαβή 5 mL του υπερκείμενου εκχυλίσματος, μεταφορά σε απιοειδή φιάλη και συμπύκνωση μέχρι ξηρού σε περιστροφικό εξατμιστήρα (Rotary Evaporator) υπό χαμηλή πίεση και σε θερμοκρασία 40°C. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε με 5 mL ακετονιτρίλιο και η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 5 min. Ακολουθούσε φιλτράρισμα του εκχυλίσματος, σε φίλτρο Nylon 0,45 μm και τοποθέτηση του σε φιαλίδια χρωματογραφίας. Τέλος έγινε ανάλυση του εκχυλίσματος με υγρή χρωματογραφία.

3.4.3 Εκχύλιση και ανάλυση εντόμων

3.4.3.1 Εκχύλιση και ανάλυση δειγμάτων οικογένειας Κολεοπτέρων

Για την εκχύλιση των εντόμων ακολουθήσαμε την παρακάτω διαδικασία. Από τα αρχικά δείγματα ζυγίστηκαν 2 g εντόμων και σε αυτά προστέθηκαν 2 g θειϊκό νάτριο, 0,5 g χλωριούχο νάτριο και 0,5 g θειϊκό μαγνήσιο. Στη συνέχεια έγινε πολτοποίηση των εντόμων σε πήλινο γουδί και ακολούθησε μεταφορά τους σε γυάλινο σωλήνα με την προσθήκη 10 mL ακετονιτρίλιου και χρήση της συσκευής Ultra Turax, για καλύτερη διάσπαση των ιστών των δειγμάτων, για την εκχύλιση (1 min). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min στις 3000 στροφές, παραλαβή 5 mL του υπερκείμενου εκχυλίσματος, μεταφορά σε απιοειδή φιάλη και συμπύκνωση μέχρι ξηρού στον περιστροφικό εξατμιστήρα (Rotary Evaporator) υπό χαμηλή πίεση και σε θερμοκρασία 40°C. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε με 1 mL ακετονιτρίλιο και τοποθετήθηκε στο λουτρό υπερήχων για 5 min. Λόγω των εναπομείναντων υπολειμμάτων λίπους από τους ιστούς

έγινε καθαρισμός του εκχυλίσματος με την προσθήκη 0,5 g C₁₈, φιλτράρισμα το εκχυλίσματος σε φίλτρο Nylon 0,45 μm για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων και τοποθέτηση του τελικού εκχυλίσματος σε φιαλίδια χρωματογραφίας. Η ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων έγινε με υγρή και με αέρια χρωματογραφία. Η ανάλυση με υγρή χρωματογραφία έγινε στην συσκευή της Agilent, μοντέλο τύπου HP-1100 και με χρωματογραφική στήλη Thermo 250x4 Betasil C₁₈. Για την ανάλυση του εκχυλίσματος στον αέριο χρωματογράφο έγινε αλλαγή του διαλύτη από ακετονιτρίλιο σε ισοκτάνιο- τολουόλιο με αναλογία 9:1.

3.4.3.2 Εκχύλιση και ανάλυση δειγμάτων των οικογενειών των Ορθοπτέρων

Για την εκχύλιση των εντόμων ακολουθήσαμε την παρακάτω διαδικασία. Από τα αρχικά δείγματα ζυγίστηκαν 2 g εντόμων και προστέθηκαν 2 mL ακετονιτρίλιο, 0,2 g χλωριούχο νάτριο και 0,8 g θειϊκό μαγνήσιο. Το μείγμα αυτό τοποθετήθηκε σε πλαστικό σωλήνα με 2 πέτρες και ακολούθησε ανακίνηση μέχρι την πλήρη διάσπαση των ιστών των Ορθοπτέρων. Ο πλαστικός σωλήνας στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε συσκευή Vortex και στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min στις 3000 στροφές. Από το υπερκείμενο εκχύλισμα έγινε παραλαβή 1 mL και τοποθέτηση και ανακίνηση αυτού, σε ειδικά tubes χωρητικότητας 2 mL μαζί με 150 mg θειϊκό μαγνήσιο, 50 mg C₁₈, 50 mg PSA. Η τοποθέτηση των συγκεκριμένων αλάτων γίνεται για τον καθαρισμό του εκχυλίσματος σε περίπτωση υπολειμμάτων λίπους από τους ιστούς. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος για 20 min στις 3000 στροφές, παραλαβή 500 μL από το τελικό εκχύλισμα και τοποθέτηση τους σε φιαλίδια χρωματογραφίας. Η ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων έγινε με υγρή και με αέρια χρωματογραφία. Για την ανάλυση του εκχυλίσματος στον αέριο χρωματογράφο έγινε αλλαγή του διαλύτη από ακετονιτρίλιο σε ισοκτάνιο- τολουόλιο με αναλογία 9:1. Η ανάλυση με αέρια χρωματογραφία έγινε στην συσκευή της Agilent, μοντέλο 19091J-413, με χρωματογραφική στήλη (30m x 320 μm x 0.25 μm) τύπου HP-5 (5% Phenyl-Methyl-Siloxane) και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (μ-ECD).

3.4.3.3 Εκχύλιση και ανάλυση δειγμάτων ηπατικού ιστού Κιρκινεζιών

Για την εκχύλιση του ηπατικού ιστού ήταν απαραίτητη η λήψη συκωτιού από δείγματα Κιρκινεζιού. Τα δείγματα αυτά βρέθηκαν τυχαία στην ευρύτερη περιοχή του Θεσσαλικού κάμπου, με άγνωστα αίτια θανάτου π.χ. πρόσκρουση σε διερχόμενα οχήματα κ.α. Μετά την συλλογή τους από τα σημεία εύρεσης τους, τοποθετήθηκαν σε καταψύκτη του εργαστηρίου στους -80°C. Αρχικά έγινε απόψυξη του νεκρών πουλιών, ανατομία αυτών και παραλαβή του ήπατος. Μέχρι την εκχύλιση του ηπατικού ιστού, οι λοβοί του συκωτιού κάθε δείγματος τοποθετήθηκαν σε αεροστεγή σακουλάκια με ετικέτα πληροφοριών και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.



Εικόνα 15: Διαδικασία παραλαβής ήπατος Κιρκινεζιού.

Η παραλαβή του εκχυλίσματος από τον συγκεκριμένο ιστό πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία. Από τα αρχικά δείγματα ζυγίστηκαν 5 g ήπατος και προστέθηκαν 5 mL ακετονιτρίλιο, 0.5 g χλωριούχο νάτριο και 2 g θειϊκό μαγνήσιο. Το μίγμα αυτό τοποθετήθηκε σε πλαστικό σωλήνα με 2 πέτρες και ακολούθησε ανακίνηση μέχρι την πλήρη διάσπαση των ιστών του ήπατος. Ο πλαστικός σωλήνας στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε συσκευή Vortex και στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min στις 3000 στροφές. Από το υπερκείμενο εκχύλισμα έγινε παραλαβή 1 mL και τοποθέτηση και ανακίνηση αυτού, σε ειδικά tubes χωρητικότητας 2 mL μαζί με 150 mg θειϊκό μαγνήσιο, 50 mg C₁₈, 50 mg PSA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος για 20 min στις 3000 στροφές, παραλαβή 500 μL από το τελικό εκχύλισμα και τοποθέτηση τους σε φιαλίδια χρωματογραφίας. Η ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων έγινε με υγρή και με αέρια χρωματογραφία. Για την ανάλυση του εκχυλίσματος στον αέριο χρωματογράφο έγινε αλλαγή του διαλύτη από ακετονιτρίλιο σε ισοκτάνιο- τολουόλιο με αναλογία 9:1.

3.4.3.4 Αναλυτικά συστήματα αέριας και υγρής χρωματογραφίας και προσδιορισμός των ουσιών στόχων.

– Σύστημα υγρής χρωματογραφίας (HPLC-UV)

Για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των δραστικών ουσιών chloranthraniliprole και pendimethalin στα εκχυλίσματα του εδάφους και των φύλλων χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), τύπου Hewlett – Packard 1100 Series, με ανιχνευτή υπεριώδους. Στο χρωματογραφικό σύστημα εγχύονταν μέσω βρόχου 20 μL δείγματος. Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε στήλη τύπου C₁₈ (Betasil) διαστάσεων 250 x 4,0 mm με έγχυση μέσω βρόχου 20 μL. Η καταγραφή και

επεξεργασία του χρωματογραφικού σήματος έγινε σε H/Y με το πρόγραμμα ChemStation.

Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου ήταν οι ακόλουθες:

Κινητή φάση A: ακετονιτρίλιο + φορμικό 0,1%

Κινητή φάση B: νερό + φορμικό 0,1%

Προγραμματισμός ροής:

0 - 2 min → A/B = 30/70

8 - 10 min → A/B = 70/30

16 - 22 min → A/B = 85/15

26 - 28 min → A/B = 30/70

Ροή κινητής φάσης: 1 mL/min

Θερμοκρασία στήλης: 40 °C

Μήκος κύματος: 254 nm με αλλαγή στα 12min σε 240 nm.

Ο συνολικός χρόνος του χρωματογραφικού προγράμματος της ανάλυσης ήταν 28 min.

– Σύστημα αέριας χρωματογραφίας (GC-ECD)

Για τον προσδιορισμό των οργανοχλωριωμένων ουσιών χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GC-ECD). Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε στήλη τύπου HP-5 (5% phenyl-methylpolysiloxane) 30m x 0.32mm x 0.25μm. Η καταγραφή και επεξεργασία του χρωματογραφικού σήματος έγινε σε H/Y με το πρόγραμμα Chem Station. Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου ήταν οι ακόλουθες:

- Εγχυτής δείγματος σε λειτουργία «pulsed-splitless».
- Θερμοκρασία εγχυτή 230 °C.
- Όγκος έγχυσης δείγματος 1 μL.
- Θερμοκρασία ανιχνευτή 310 °C.
- Αέρια ανιχνευτή: makeup N₂ (60 mL/ min), makeup He (6 mL/ min)..
- Φέρον αέριο ήλιο, με ροή 1,7 mL/ min.
- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης: αρχική θερμοκρασία φούρνου στους 50 °C και διατήρησή της για 1,0 min. Αύξηση με ρυθμό 20 °C/ min μέχρι τους 180 °C (παραμονή για 1 min), αύξηση με ρυθμό ανόδου 3 °C/ min μέχρι τους 200 °C (παραμονή για 6 min), αύξηση με ρυθμό 6 °C/ min μέχρι τους 250 °C (παραμονή για 8 min), αύξηση με ρυθμό 10 °C/ min μέχρι τους 275 °C και παραμονή για 5 min.

– Ποσοτικοποίηση χρωματογραφικού σήματος

Η ταυτοποίηση των ουσιών στόχων στα χρωματογραφήματα έγινε με βάση το χρόνο κατακράτησης τους, συγκρίνοντας με το χρόνο κατακράτησης των πρότυπων διαλυμάτων, ενώ μερικές φορές χρησιμοποιήθηκε επιπλέον και η τεχνική της προσθήκης στο προς ανάλυση δείγμα..

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων για τις δραστικές ουσίες στόχους της μελέτης στα δείγματα (εδάφους, φύλλων και οργανισμών) πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του εξωτερικού προτύπου με τη χρήση καμπύλης αναφοράς. Παρήχθησαν οι καμπύλες αναφοράς με χρήση πρότυπων διαλυμάτων (σε εκχύλισμα υποστρώματος στην περίπτωση της

αέριος χρωματογραφίας και σε αυτή της υγρής με φασματομετρία μάζας) και μελετήθηκαν η γραμμικότητα και η ευαισθησία του ανιχνευτή για την κάθε μια δραστική ουσία. Οι χρωματογραφικές αποκρίσεις παρουσιάζουν γραμμικότητα στην περιοχή συγκεντρώσεων μελέτης των ουσιών με πολύ καλές τιμές συντελεστών συσχέτισης, που κυμαίνονται από 0,996 έως 0,999.

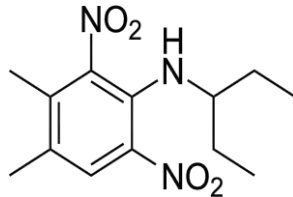
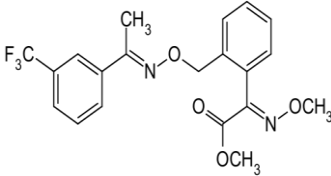
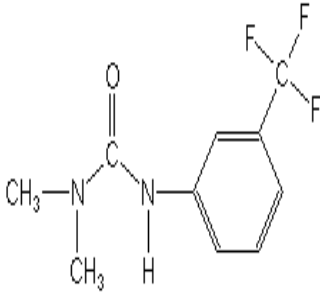
– Για τον έλεγχο της γραμμικότητας του ανιχνευτή παρασκευάστηκαν πρότυπα μικτά διαλύματα βαθμονόμησης, από τα πρότυπα μικτά διαλύματα εργασίας, τόσο σε καθαρό διαλύτη (μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο για την υγρή χρωματογραφία και ισοκτάνιο/ τολουόλιο, 90/10 για την αέρια) όσο και σε εκχύλισμα υποστρώματος. Τα πρότυπα μικτά διαλύματα εργασίας παρασκευάστηκαν από τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης κάθε δραστικής ουσίας με τις κατάλληλες αραιώσεις. Επίσης, από τα μητρικά πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν και πρότυπα διαλύματα εργασίας 10 μg/ml σε μεθανόλη για τα πειράματα ανάκτησης. Για τα πειράματα των ανακτήσεων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα εδάφους και φύλλων που δεν είχαν δεχθεί τις εφαρμογές του πειράματος, τα οποία φορτίστηκαν με την κατάλληλη ποσότητα πρότυπου διαλύματος εργασίας. Κάθε φόρτιση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν (τρεις επαναλήψεις). Στην περίπτωση των οργανισμών για τα πειράματα των ανακτήσεων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα οργανισμών (οικογένειας Κολεοπτέρων και Ορθοπτέρων) που σε προκαταρκτικό έλεγχο δεν εμφάνισαν παρουσία των ουσιών στόχων της μελέτης, τα οποία φορτίστηκαν με την κατάλληλη ποσότητα πρότυπου διαλύματος εργασίας. Στην περίπτωση ανίχνευσης έμμονων ουσιών σε οργανισμούς έγινε πάλι φόρτιση με την κατάλληλη ποσότητα πρότυπου διαλύματος εργασίας και εκτιμήθηκε η αύξηση του χρωματογραφικού σήματος σε σχέση με την πρόσθετη μάζας φόρτισης σε κάθε δείγμα.

4. Αποτελέσματα

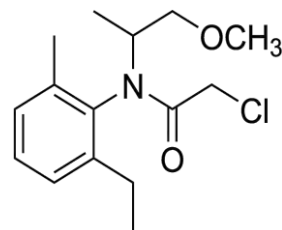
4.1 Υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων στα εδαφικά δείγματα

Στην ανάλυση των δειγμάτων εδαφικού εκχυλίσματος έγινε προσπάθεια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πέντε δραστικών ουσιών. Οι ουσίες αυτές φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4: Δραστικές ουσίες- στόχοι της ανάλυσης στα εδαφικά δείγματα.

<i>Πρότυπες ουσίες</i>	<i>Μοριακός τύπος</i>	<i>Χημική δομή</i>	<i>Τύπος Σκευάσματος</i>	<i>Χαρακτηριστικά σκευάσματος</i>
<i>pendimethalin</i>	$C_{13}H_{19}NO_4$		Ζιζανιοκτόνο	Αναστολή ανάπτυξης ριζών και βλαστών των ζιζανίων. Καταστολή κατανομής των φυτικών κυττάρων και επιμήκυνσης σε ευαίσθητα καλλιεργούμενα είδη.
<i>Trifloxystrobin</i>	$C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$		Μυκητοκτόνο	Χρησιμοποιείται για προληπτική και θεραπευτική δράση για την καταπολέμηση του ωιδίου. Δρα σαν παρεμποδιστής της μιτοχονδριακής αναπνοής των μυκήτων.
<i>fluometuron</i>	$C_{10}H_{11}F_3N_2O$		Ζιζανιοκτόνο	Χρησιμοποιείται ως προσπαρτικό, προφυτρωτικό ή μεταφυτρωτικό ζιζανιοκτόνο κυρίως σε βαμβάκοκαλλιέργειες. Απορροφάται κυρίως από τις ρίζες και ορισμένες φορές από τα φύλλα και δρα διασυστηματικά παρεμποδίζοντας την φωτοσύνθεση.

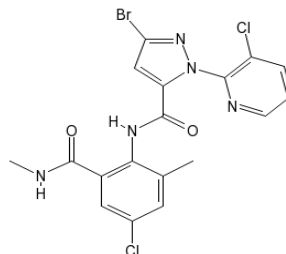
metolachlor



Ζιζανιοκ
τόνο

Απορροφάται κυρίως από το στέλεχος του φυτού και δευτερεύοντος από τις ρίζες. Στα ζιζάνια παρεμποδίζει την διαίρεση των κυττάρων και την ανάπτυξη των βλαστών και των ριζών.

*chlorantranilipr
ole*



Μη
διασυσ-
τηματικό
Έντομοκ
τόνο

Προκαλεί τον θάνατο των εντόμων δια στομάχου κατάποση. Έχει ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα στα λεπιδόπτερα αλλά και σε κολεόπτερα και δίπτερα.

Οι ουσίες αυτές επιλέχθηκαν με βάση την εφαρμογή τους στην καλλιέργεια που βασίστηκε η μελέτη μας. Έχοντας λοιπόν το ιστορικό του συγκεκριμένου αγροτεμαχίου και γνωρίζοντας τη χορήγηση του εντομοκτόνου chlorantraniliprole λόγω εμφάνισης του πράσινου σκουληκιού στην καλλιέργεια έγινε και η επιλογή προσδιορισμού της συγκεκριμένης δραστικής ουσίας, ώστε να καταγραφεί η τύχη της στο αγροοικοσύστημα.

Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις υπολειμμάτων ουσιών- στόχων σε εδάφη του αγροοικοσυστήματος. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε ng δραστικής ουσίας/g εδάφους. (Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με HPLC/UV).

<i>Πρότυπες ουσίες (ng/g)</i> <i>Δειγματολη πτικές Περίοδοι</i>	<i>Pendimethali n</i>	<i>Fluomet uron</i>	<i>Metolac hlor</i>	<i>trifloxystrob in</i>	<i>Chlorantran iliprole</i>
29/7/2016	268	nd*	Nd	nd	Nd
1/8/2016	184	Nd	Nd	nd	38
6/9/2016	158	Nd	Nd	nd	22

nd*: not detected (μη προσδιορίσιμα, <LOQ)

Όπως παρατηρούμε οι δύο ουσίες που ανιχνεύθηκαν και προσδιορίστηκαν είναι το pendimethalin και το chlorantraniliprole. Τα επίπεδα του pendimethalin στο έδαφος κυμαίνονται από 0,16 έως 0,27 µg/g, επίπεδα μάλλον χαμηλά, γεγονός που αιτιολογείται από το σημαντικό διάστημα που παρήλθε από το χρόνο εφαρμογής του ζιζανιοκτόνου (τέλη Απριλίου με αρχές Μαΐου). Το pendimethalin εμφανίζεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το chlorantraniliprole. Αυτό βέβαια δικαιολογείται γιατί είναι μια ουσία που εφαρμόζεται στο έδαφος για την αντιμετώπιση των ζιζανίων και είναι σχετικά έμμονη, αφού έχει χρόνο ημιζωής στο έδαφος γύρω στις 100 ημέρες. Σε αντίθεση, το chlorantraniliprole που είναι μια ουσία που εφαρμόζεται σε φυτικούς ιστούς και συγκεκριμένα στα φύλλα για την αντιμετώπιση των εχθρών της καλλιέργειας, δεν εμφανίζει υψηλές συγκεντρώσεις στο έδαφος, λογικά λόγω του ότι δεν μετακινήθηκε η δραστική ουσία από το φυτό σε αυτό. Η εφαρμογή της συγκεκριμένης δραστικής έγινε στο αγροτεμάχιο στις 30/7/2016. Η συγκέντρωση στο έδαφος δύο ημέρες μετά τον ψεκασμό βρέθηκε στα 38 ng/g και παρέμεινε σχεδόν σταθερή για διάστημα περισσότερο από ένα μήνα καθώς σε περίπου 40 ημέρες μετά την εφαρμογή η μετρηθείσα συγκέντρωση βρέθηκε να είναι 22 ng/g. Αξίζει να σημειωθεί πως ο χρόνος ημιζωής του chlorantraniliprole στο έδαφος ανέρχεται στις 204 ημέρες, είναι δηλαδή μια έμμονη ουσία στο έδαφος. Τέλος ο όρος nd σημαίνει ότι δεν προσδιορίστηκαν ποσοτικά οι υπόλοιπες ουσίες με βάση το όριο προσδιορισμού τους (LOQ) για τη χρησιμοποιούμενη αναλυτική μεθοδολογία του συστήματος HPLC-UV.

4.2 Ανάλυση φυτικών ιστών

Η ανάλυση των εκχυλισμάτων των φυτικών ιστών πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των ουσιών στόχων που φαίνονται στον Πίνακα 4. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα αναλύσεων με υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography) σε εκχυλίματα φυτικών ιστών με βάση τις δειγματοληπτικές περιόδους. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε ng ουσίας/g φυτικού ιστού.

<i>Πρότυπες ουσίες (ng/g) Δειγματολ ηπτικές Περίοδοι</i>	<i>Pendimetha lin</i>	<i>Fluometu ron</i>	<i>Metolac hlor</i>	<i>trifloxystrobi n</i>	<i>chlorantranili prole</i>
14/7/2016	Nd*	nd	Nd	nd	nd
1/8/2016	Nd	nd	Nd	nd	4268
6/9/2016	Nd	nd	Nd	nd	3144
21/9/2016	Nd	nd	Nd	nd	8596

nd*: not detected (μη προσδιορίσιμα, <LOQ)

Όπως παρατηρείται η μόνη ουσία που προσδιορίστηκε στους φυτικούς ιστούς (φύλλα βαμβακιού) είναι το chlorantraniliprole, το οποίο βέβαια εφαρμόστηκε και απευθείας πάνω στο φύλλα. Επομένως έτσι μπορεί να ερμηνευθεί και η παραμονή της στους φυτικούς ιστούς. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες βρέθηκε κυμαίνονται από 3-7 μg/g. Οι υπόλοιπες ουσίες είναι ζιζανιοκτόνα και έχουν εφαρμοσθεί στο έδαφος στην αρχή της βαμβακοκαλλιέργειας, είτε μυκητοκτόνα (trifloxystrobin) και έχει εφαρμοστεί σε διπλανές καλλιέργειες σιτηρών.

4.3 Ανάλυση εντόμων

Η ανάλυση των εκχυλισμάτων των εντόμων πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό εκτός των δραστικών ουσιών που εφαρμόστηκαν κατά την καλλιεργητική περίοδο στην καλλιέργεια (παρουσιάζονται στον Πίνακα 4) και άλλων έμμοων ουσιών αγροχημικής προέλευσης, όπως τα οργανοχλωριωμένα παρασιτοκτόνα. Τα οργανοχλωριωμένα χρησιμοποιούνταν προ του 1974 ευρέως και πλέον έχουν προκαλέσει παγκόσμια ανησυχία λόγω της εμμονής τους στο περιβάλλον και της βιοσυσώρευσής τους στα διάφορα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας. Τα όποια ευρήματα σε οργανοχλωριωμένα αποδίδονται στη βιοσυσώρευση καθώς και στη διαδρομή των ανώτερων αρπακτικών (μεταναστευτικών) σε χώρες όπου τα οργανοχλωριωμένα παρασιτοκτόνα χρησιμοποιούνταν και μετά το 1974 (Βόρειος Αφρική).

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε δείγματα Κολεοπτέρων, Δερμάπττερων, Ορθοπτέρων και σε μια συγκεκριμένη οικογένεια Ορθοπτέρων, τους Γρύλλους (Gryllidae). Στα εκχυλίσματα ιστού από τα δείγματα Κολεοπτέρων και Δερμάπττερων από όλες τις δειγματοληπτικές περιόδους δεν προσδιορίστηκε κάποια από τις δραστικές ουσίες στόχους σε τιμές μεγαλύτερες του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ). Επίσης στον έλεγχο για την παρουσία οργανοχλωριωμένων ουσιών δεν προσδιορίστηκε κάποια από τις ουσίες που ελέγχθηκαν ως στόχοι της ανάλυσης σε τιμές μεγαλύτερες του ορίου ποσοτικοποίησης τους (LOQ). Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα αναλύσεων με υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography) σε εκχυλίσματα ιστού Ορθοπτέρων, με βάση τις δειγματοληπτικές περιόδους. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε ng ουσίας/g ιστού.

<i>Πρότυπες ουσίες (ng/g)</i>	<i>Pendimethalin</i>	<i>fluometuron</i>	<i>metolachlor</i>	<i>trifloxystrobin</i>	<i>chlorantraniliprole</i>
<i>Δειγματοληπτικές Περίοδοι</i>					
19/7/2016	36	nd	nd	nd	nd
5/8/2016	27	nd	nd	nd	nd
21/9/2016	nd*	nd	nd	nd	nd

nd*: not detected (μη προσδιορίσιμα, <LOQ)

Πίνακας 8: Αποτελέσματα αναλύσεων με υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography) σε εκχυλίσματα ιστού Gryllidae, με βάση τις δειγματοληπτικές περιόδους. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε ng ουσίας/g ιστού.

<i>Πρότυπες ουσίες (ng/g)</i>	<i>Pendimethalin</i>	<i>fluometuron</i>	<i>Metolachlor</i>	<i>trifloxystrobin</i>	<i>chlorantraniliprole</i>
<i>Δειγματοληπτικές Περίοδοι</i>					
19/7/2016	49	8,4	Nd	nd	nd
5/8/2016	nd*	nd	Nd	nd	15
21/9/2016	nd	nd	Nd	nd	13

nd*: not detected (μη προσδιορίσιμα, <LOQ)

Όπως παρατηρούμε το pendimethalin, το fluometuron και το chlorantraniliprole προσδιορίστηκαν στα Ορθόπτερα. Πρόκειται για ουσίες με έμμονη δράση (με μεγάλο χρόνο ημιζωής) που εφαρμόζονται στο περιβάλλον και μέσω της βιοσυσσώρευσης καταλήγουν στα ανώτερα τροφικά επίπεδα. Οι συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων δραστικών ουσιών είναι < 50 ng/g ή < 50 ppb. Στα Gryllidae προσδιορίστηκαν σε ένα δείγμα pendimethalin (49 ng/g) και σε δύο chlorantraniliprole (13-15 ng/g). Γενικά οι υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν για το pendimethalin (27-49 ng/g) σε σχέση με το chlorantraniliprole. Από τις ουσίες αυτές το ζιζανιοκτόνο pendimethalin, που εμφανίζει και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, εφαρμόζεται νωρίς την άνοιξη, είναι λιπόφιλο μόριο και αρκετά έμμοно στο έδαφος και έτσι αιτιολογείται η παρουσία του στα ορθόπτερα καθώς μέσω της βιοσυσσώρευσης καταλήγει σε ανώτερη τροφική αλυσίδα. Σχετικά με το εντομοκτόνο, το οποίο προσδιορίστηκε μόνο στα δείγματα μετά το ψεκασμό της καλλιέργειας, η παρουσία του αποδίδεται εκτός της μετακίνησης μέσω της τροφικής αλυσίδας και στην παρουσία των οργανισμών κατά τη διάρκεια του ψεκασμού.

4.4 Ανάλυση ήπατος Κιρκινεζιού

Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι στο σύνολο τους 8. Αφορούν άτομα θηλυκά και αρσενικά, όπως και ανήλικα. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα αναλύσεων με υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography) σε εκχυλίσματα ηπατικού ιστού Κιρκινεζιού (*Falco naumanni*). Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε ng ουσίας/g ιστού.

<i>Πρότυπες ουσίες (ng/g)</i>	<i>Pendimethalin</i>	<i>fluometuron</i>	<i>metolachlor</i>	<i>trifloxystrobin</i>	<i>chlorantraniliprole</i>
<i>Falco naumanni (n=8)</i>					
♀ (n=4)	nd*-20	nd	nd	nd-19	nd-120
♂ (n=2)	20-39	nd	nd	nd	nd
Άγνωστο (n=2)	20	nd	nd	nd	nd

nd*: not detected (μη προσδιορίσιμα, <LOQ).

Πίνακας 10: Αποτελέσματα αναλύσεων με αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography- ECD) σε εκχυλίσματα ηπατικού ιστού Κιρκινεζιού (*Falco naumanni*) για την ανίχνευση οργανοχλωριωμένων ουσιών (OCs). Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται σε ng ουσία/g ιστού.

Πρότυπες ουσίες (ng/g)	<i>Falco naumanni</i> ♀ (n=4)	<i>Falco naumanni</i> ♂ (n=2)	<i>Falco naumanni</i> Unknown (n=2)
<i>a-HCH</i>	nd*	nd	nd
<i>b-HCH</i>	nd	nd	nd
<i>Lindane (c-HCH)</i>	nd	nd	nd
<i>Heptachlor</i>	nd	nd	nd
<i>Heptachlor epoxide</i>	Nd-52	384-710	720-1160
<i>Aldrin</i>	nd	nd	nd
<i>Dieldrin</i>	Nd-20	10-120	160-283
<i>DDE</i>	Nd-35	18-35	nd-3
<i>p,p'-DDD</i>	nd	nd	nd
<i>p,p'-DDT</i>	nd	nd	nd
<i>Endosulfan sulfate</i>	nd	nd	nd
<i>a-endosulfan</i>	nd	nd	nd
<i>b-endosulfan</i>	nd	nd	nd
<i>Chlorpyrifos-methyl</i>	nd	nd	nd
<i>Chlorpyrifos-ethyl</i>	nd	nd	nd

nd*: not detected (μη προσδιορίσιμα, <LOQ).

5. Συζήτηση

Η εντατικοποίηση της γεωργίας έχει οδηγήσει στην απώλεια πολλών ενδαιτημάτων και στην αλλαγή χρήσεων γης. Σε συνδυασμό με την εντατική χρήση γεωργικών φαρμάκων για την καλύτερη παραγωγική απόδοση των καλλιεργειών προκαλείται ανεπανόρθωτη περιβαλλοντική ρύπανση και σημαντικές επιπτώσεις στη βιοποικιλότητα των διαφόρων ενδαιτημάτων, δηλαδή στην πανίδα και στη χλωρίδα.

Με την πάροδο των χρόνων παρατηρήθηκε ότι η μείωση διαφόρων πληθυσμών εντόμων, πτηνών και ψαριών συνέπεσε με την αύξηση της έντασης των γεωργικών πρακτικών και την αυξημένη χρήση γεωργικών φαρμάκων, κάτι που οδήγησε σε περαιτέρω έρευνες.

Ωστόσο τα παράσιτα και τα ζιζάνια είναι δυνατό να καταστούν ανθεκτικά στην επαναλαμβανόμενη χρήση συγκεκριμένων εντομοκτόνων και ζιζανιοκτόνων με αποτέλεσμα να είναι αναγκαία η εφαρμογή μεγαλύτερων δόσεων των γεωργικών φαρμάκων. Απαραίτητη κρίνεται λοιπόν η εύρεση νέων αποτελεσματικών στρατηγικών για την αντιμετώπιση των ζιζανίων και των παρασίτων που εμφανίζονται και επιμένουν στις καλλιέργειες (<https://www.organic-center.org/reportfiles/GE13YearsReport>, Wang Y. *et al*, 2008).

Τα έντομα που δραστηριοποιούνται στα χερσαία οικοσυστήματα όπως οι ακρίδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν περιβαλλοντικοί δείκτες. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν στοιχεία για οικοτοξικολογικές έρευνες και για παρακολούθηση- ανίχνευση των περιβαλλοντικών ρύπων.

Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την διαπίστωση της μεταφοράς γεωργικών υπολειμμάτων από τα φυτά στα έντομα. Ένα παράδειγμα αποτελεί η έρευνα των Krischik V. *et al* (2015), όπου αποδείχθηκε ότι με την εφαρμογή των εντομοκτόνων στο έδαφος είναι δυνατή η μετατόπιση των δραστικών ουσιών του εκάστοτε εντομοκτόνου στη γύρη και το νέκταρ των ανθέων του καλλιεργούμενου φυτού, που μάλιστα μπορεί να ανιχνευτεί και μετά το πέρασμα κάποιων μηνών. Στη συνέχεια μέσω της συγκεκριμένης έρευνας αποδείχθηκε επίσης ότι κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει στη θανάτωση κάποιων ωφέλιμων εντόμων που τρέφονται με το νέκταρ των ανθέων.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες οι διάφορες ασθένειες σε έντομα, αμφίβια, πουλιά και ψάρια έχει συνδεθεί με τη συστηματική χρήση εντομοκτόνων. Η σύνδεση αυτή αρχικά αποτέλεσε μια υπόθεση. Στην αρχή η επίδραση της χρήσης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων ξεκινά από μια περιοχή και με τη συστηματική χρήση τους εξαπλώνεται παγκοσμίως. Έρευνες έχουν δείξει την θανατηφόρο δράση τους όχι μόνο σε αυτούς τους οργανισμούς αλλά και σε άλλα είδη της άγριας πανίδας (Rosemary Mason *et al*, 2012).

Όπως διαπιστώθηκε και από τα αποτελέσματα της έρευνας είναι δυνατή η μετακίνηση των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων από το έδαφος στα φυτά και από τα φυτά στα έντομα κυρίως μέσω της κατάποσης. Η παρουσία των διαφόρων δραστικών ουσιών αν και δεν έχει υψηλά επίπεδα συγκεντρώσεων, μπορεί ανάλογα με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της κάθε ουσίας, να οδηγήσει σε βιοσυσσώρευση και μέσω της τροφικής αλυσίδας να μετακινούνται οι ουσίες αυτές στα ανώτερα τροφικά επίπεδα της άγριας ζωής δημιουργώντας δυσμενή προβλήματα εξαφάνισης (σε ακραίες περιπτώσεις- συνθήκες) σπάνιων πολλές φορές ειδών, όπως το Κιρκινέζι (*Falco naumanni*), ένα προστατευόμενο είδος γερακιού.

Τα γεωργικά φάρμακα έχουν επιπτώσεις τόσο στους ανθρώπους όσο στο περιβάλλον και στην άγρια ζωή, ιδιαίτερα στα πουλιά. Οι τρεις βασικές κατηγορίες

των παρασιτοκτόνων, που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά τις προηγούμενες δεκαετίες, είναι τα οργανοχλωριωμένα, τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά. Τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα δε συσσωρεύονται στις τροφικές αλυσίδες και έχουν μικρή παραμονή στο περιβάλλον. Επίσης σπάνια προκαλούν χρόνιες επιπτώσεις σε πληθυσμούς της άγριας πανίδας, πλην περιπτώσεων οξείας τοξικότητας. Ωστόσο τα οργανοχλωριωμένα, λόγω της έμμονης φύσης τους, αν και δε χρησιμοποιούνται εδώ και χρόνια στις περισσότερες χώρες, ανιχνεύονται σε οργανισμούς. Επίσης κάποια από αυτά (lindane, aldrin, dieldrin, endosulfan κ.α.) είναι ακόμα ή ήταν μέχρι πρόσφατα σε χρήση κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες. Για το λόγο αυτό είχαν αντικατασταθεί και από τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά παρασιτοκτόνα. Τα περισσότερα οργανοχλωριωμένα παρασιτοκτόνα με βάση τον χρόνο δράσης τους επιδρούν στο νευρικό σύστημα και γι' αυτό επηρεάζουν τον εγκέφαλο των πουλιών. Από τη δράση τους είναι δυνατό να προκληθεί μείωση στον πληθυσμό των αρπακτικών πουλιών, όπως έχει συμβεί σε πληθυσμούς διαφόρων ειδών όπως σε πετρίτες (*Falco peregrinus*), ξεφτέρια (*Accipiter nisus*) κ.α. Γνωστή είναι επίσης η επίδραση του εντομοκτόνου DDT, στη λέπτυνση του κελύφους των αυγών, σε αυγά πετρίτων, λόγω του έμμονου μεταβολίτη του, DDE (Anindita Mitra *et al*, 2011) .

Επίσης τα αρπακτικά πουλιά συγκαταλέγονται στα πιο χρησιμοποιούμενα είδη για μελέτες παρακολούθησης έμμονων ρύπων στο περιβάλλον λόγω της θέσης τους στην κορυφή της τροφικής αλυσίδας. Τα είδη των πτηνών στα υψηλά τροφικά επίπεδα φαίνεται ότι επηρεάζονται ιδιαίτερα. Γενικότερα οι συγκεντρώσεις κυρίως οργανοχλωριωμένων είναι μεγαλύτερες στους ηπατικούς ιστούς των πτηνών. Τα οργανοχλωριωμένα μόλις εισέλθουν στον οργανισμό του πτηνού συσσωρεύονται στα λιπώδη όργανα και τους ιστούς, λόγω των λιποφιλικών ιδιοτήτων τους. Αυτό διαπιστώνεται και από το δικό μας πείραμα όπου ακόμα και ιστός συκωτιού νεοσσού Κιρκινεζιού περιείχε σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις του Heptachlor epoxide λόγω βιοσυσώρευσης και βιομεγέθυνσης της ουσίας. Επίσης εμφανής είναι και η παρουσία του DDE που αποτελεί το μεγαλύτερο παράδειγμα βιοσυσώρευσης μιας ουσίας, ακόμα και μετά την απαγόρευση χρήσης του λόγω των επιπτώσεων που δημιούργησε στο περιβάλλον. Πέντε από τα οκτώ δείγματα μας περιείχαν ίχνη της ουσίας αυτής (από nd έως 1060 ng/g), ακόμα και στα μικρά σε ηλικία πουλιά.

Οι Hela D. G. *et al* (2005) παρουσίασαν αποτελέσματα σχετικά με διάφορες οργανοχλωριωμένες ουσίες για διάφορα είδη της οικογένειας των Falconidae (*Falco tinnunculus*, *Falco peregrinus*, *Falco eleonorae*). Στη συγκεκριμένη έρευνα μεταξύ άλλων οργανοχλωριωμένων ουσιών, προσδιορίστηκαν και οι συγκεντρώσεις του Heptachlor epoxide (0,12- 2,36 ng/g υγρού ιστού), του Dieldrin (0,32- 57,81 ng/g υγρού ιστού) και του DDE (25,9- 17269,14 ng/g υγρού ιστού). Σύμφωνα με τους συγγραφείς της συγκεκριμένης έρευνας, εκτός από μερικές υψηλές συγκεντρώσεις του DDE στα δείγματα ηπατικού ιστού όλες οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις ήταν κάτω από τα όρια που μπορεί να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στον οργανισμό των πουλιών.

Οι Fabricio D. Cid. *et al* (2007) δημοσίευσαν μια έρευνα σχετικά με τις συγκεντρώσεις διαφόρων οργανοχλωριωμένων ουσιών που προσδιορίστηκαν σε τρία είδη πουλιών του *Phalacrocorax brasilianus*, του *Podiceps major* και ενός είδους της οικογένειας των Pitangus (*Pitangus sulphuratus*). Η έρευνα αφορούσε ενήλικα άτομα θηλυκού και αρσενικού γένους. Κάποιες από τις ουσίες που προσδιορίστηκαν ήταν το Heptachlor epoxide (nd- 2646,37 ng/g λίπους), Lindane (nd- 3106,84 ng/g λίπους), το Endosulfan (nd- 1444,79), το DDE (215,20- 2313,84 ng/g λίπους) κ.α. Και σε αυτή τη μελέτη οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σχετίζονται με το DDE, το οποίο προσδιορίστηκε και στα δώδεκα δείγματα που αναλύθηκαν. Επίσης το Endosulfan είχε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις σε κάποια από τα δείγματα κάτι που μπορεί να

ερμηνευτεί λόγω της έμμονης δράσης του και της συστηματικής χρήσης του τη δεκαετία του '70 σε διάφορες καλλιέργειες όπως φρούτα, λαχανικά, τσάι κ.α. (Barra *et al*, 2002).

Όπως αναφέρουν στην έρευνα τους και οι Hela D. G. *et al* (2005) η μεταφορά των οργανοχλωριωμένων ουσιών παρουσιάζει διαφορές από είδος σε είδος. Για παράδειγμα με συγκεντρώσεις < 10 μg/g ως σύνολο των DDTs παρατηρήθηκαν επιπτώσεις σχεδόν θανατηφόρες σε άτομα πετρίτη (*Falco peregrinus*). Επιπλέον πρέπει να αναφερθεί πως ο μεταβολίτης του DDT, το DDE, μπορεί να επηρεάσει το πάχος του κελύφους των αυγών των πουλιών, κάτι φυσικά που ποικίλει από είδος σε είδος. Υπολογίστηκε λοιπόν ότι συγκεντρώσεις από 2-4 μg/g DDE και 0,9 μg/g Dieldrin μπορεί να προκαλέσουν έως και 5% λέπτυνση του κελύφους του αυγού σε διάφορα είδη αρπακτικών πουλιών. Ωστόσο στην παρούσα μελέτη οι συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών που προσδιορίστηκαν είναι χαμηλότερες από τις προαναφερόμενες.

Η χρήση παρασιτοκτόνων πολλές φορές οδηγεί σε αλλαγές της τροφικών συνηθειών, της συμπεριφοράς και των ενδαιτημάτων των πουλιών, σε ενδοκρινολογικές διαταραχές του οργανισμού τους καθώς και αναπαραγωγικά προβλήματα, κάτι που συχνά οδηγεί σε δραματική μείωση του πληθυσμού τους.

Απαραίτητη κρίνεται λοιπόν η περαιτέρω μελέτη της μετακίνησης των γεωργικών φαρμάκων στα διάφορα τροφικά επίπεδα, παρά τους κατασταλτικούς βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες που επικρατούν σε τέτοιου είδους μελέτες.

Βιβλιογραφία

- Abensperg-Traun, M. and Steven, D. (1995). The effects of pitfall trap diameter on ant species richness (Hymenoptera: Formicidae) and species composition on the catch in a semi-arid eucalypt woodland. *Australian Journal of Ecology* 20, 282–287.
- Anindita Mitra, Chandranath Chatterjee, Fatik B. Mandal (2011). Synthetic chemical pesticides and their effects on birds. *Research Journal of Environmental Toxicology* 5, 2, 81-96.
- Arbogast, R. T., Kendra, P. E., Weaver, D. K. and Subramanyam, B. (2000). Phenology and spatial pattern of *Typhaea stercorea* (Coleoptera: Mycetophagidae) infesting stored grain: Estimation by pitfall trapping. *Journal of Economic Entomology* 93, Issue 2, 240–251.
- Barra R, Colombo JC, Gamboa N, Eguren G, Jardim W. (2002). Regionally based assessment of persistent toxic substances: Eastern and Western South America Regional Report, Argentina, Bolivia, Brazil, Chile, Ecuador, Paraguay, Peru, Uruguay. United Nation Environment Program, Chemicals, UNEP-GEF, Geneva.
- Belovsky G.E. and Slade J.B. (1993). The role of vertebrate and invertebrate predators in a grasshopper community. *Oikos* 68, 193–201.
- Billeter, R., Liira, J., Bailey, D., Bugter, R., Arens, P., Augenstein, I., Aviron, S., Baudry, J., Bukacek, R., Burel, F., Cerny, M., De Blust, G., De Cock, R., Diekotter, T., Dietz, H., Dirksen, J., Dormann, C., Durka, W., Frenzel, M., Hamersky, R., Hendrickx, F., Herzog, F., Klotz, S., Koolstra, B., Lausch, A., Le Coeur, D., Maelfait, J.P., Opdam, P., Roubalova, M., Schermann, A., Schermann, N., Schmidt, T., Schweiger, O., Smulders, M.J.M., Speelmans, M., Simova, P., Verboom, J., van Wingerden, W.K.R.E., Zobel, M., Edwards, P.J. (2008). Indicators for biodiversity in agricultural landscapes: a pan-European study. *Journal of Applied Ecology* 45, 141–150.
- Bromenshenk, J.J., S.R. Carlson, J.C. Simpson and J.M. Thomas (1985). Pollution monitoring of Puget Sound with honey bees. *Science* 221, 632-634.
- Butchart, S.H.M., Walpole, M., Collen, B., van Strien, A., Scharlemann, J.P.W., Almond, R.E.A., Baille, J.E.M., Bomhard, B., Brown, C., Bruno, J., Carpenter, K.E., Carr, G.M., Chanson, J., Chenery, A.M., Csirke, J., Davidson, N.C., Dentener, F., Foster, M., Galli, A., Galloway, J.N., Genovesi, P., Gregory, R.D., Hockings, M., Kapos, V., Lamarque, J.F., Leverington, F., Loh, J., McGeoch, M.A., McRae, L., Minasyan, A., Hernández Morcillo, T., Pauly, D., Quader, S., Revenga, C., Sauer, J.R., Skolnik, B., Spear, D., Stanwell-Smith, D., Stuart, S.N., Symes, A., Tuerney, M., Tyrell, T.D., Vie, J.C., Watson, R. (2010). Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science* 328, 1164–1168.
- Chiron, F., Chargé, R., Julliard, R., Jiguet, F.U., Muratet, A. (2014). Pesticide doses, landscape structure and their relative effects on farmland birds. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 185, 153–160
- D. G. Hela, I. K. Konstantinou, T. M. Sakellarides, D. A. Lambropoulou, T. Akriotis, T. A. Albanis (2006). Persistent Organochlorine Contaminants in Liver and Fat of Birds

of Prey from Greece. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50, 603–613.

Dawes-Gromadzki T.Z. (2002). Trophic trickles rather than cascades: conditional top-down and bottom-up dynamics in an Australian chenopod shrubland. *Austral Ecology* 27, 490–508.

Donald, P.F., Sanderson, F.J., Burfield, I.J., van Bommel, F.P.J. (2006). Further evidence of continent-wide impacts of agricultural intensification on European farmland birds, 1990–2000. *Agriculture Ecosystem and Environment* 116, 189–196.

Doxa, A., Paracchini, M.L., Pointereau, P., Devictor, V., Jiguet, F. (2012). Preventing biotic homogenization of farmland bird communities: the role of High Nature Value farmland. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 148, 83–88.

Edwards C.A. (1999). Soil Invertebrate Controls and Microbial Interactions in Nutrient and Organic Matter Dynamics in Natural and Agroecosystems, in: D.C. Coleman, P. Hendrix (Eds.), 7: Webmaster Functions in Agroecosystems: Invertebrates Climate and Substrate Quality, pp. 141–159.

Edwards, C.A. (2002). Assessing the effects of environmental pollutants on soil organisms, communities, processes and ecosystems. *European Journal of Soil Biology* 38, 225–231.

Eman A. Abdelfattah, Maria Augustyniak, Hesham A. Yousef (2017). Biomonitoring of genotoxicity of industrial fertilizer pollutants in *Aiolopus thalassinus* (Orthoptera: Acrididae) using alkaline comet Assay. *Chemosphere* 182, 762-770.

Fabricio D. Cid, Rosa I. Antón, Enrique Caviedes-Vidal (2007). Organochlorine pesticide contamination in three bird species of the Embalse La Florida water reservoir in the semiarid midwest of Argentina. *Science of the Total Environment* 385, 86–96.

Fairchild, W. L.; Muir, D. C. G.; Currie, R. S.; Yarechewski, A. L. (1992). Emerging insects as a biotic pathway for movement of 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzofuran from lake sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 867–872.

Fantke, P., Jolliet, O. (2015). Life cycle human health impacts of 875 pesticides. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 1-12.

Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., et al. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478, 337–342.

Foord S.H., Ferguson J.W.H. and van Jaarsveld A.S. (2002). Endemicity of Afrotropical grasshopper assemblages: implications for grassland conservation. *African Journal of Ecology*, 40, 318–327.

Fuller, R.J. (2000). Relationships between recent changes in lowland British agriculture and farmland bird populations: an overview. In: Aebischer, N.J., Evans, A.D., Grice, P., Vickery, J.A. (Eds.), *The Conservation and Ecology of Lowland Farmland Birds*. British Ornithologists' Union, Tring, UK, pp. 5–16.

Gardiner T, Hill J, Chesmore D. (2005). Review of the methods frequently used to estimate the abundance of Orthoptera in grassland ecosystems. *Journal of Insect Conservation* 9, Issue 3, 151-173.

Gaw, S.K., Kim, N.D., Northcott, G.L., Wilkins, A.L., Robinson, G. (2008). Uptake of Sigma DDT, arsenic, cadmium, copper, and lead by lettuce and radish grown in contaminated horticultural soils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56, 6584–6593.

Gioia R, Akindele AJ, Adebuseye SA, Asante KA, Tanabe S, Buekens A, Annie J. Sasco (2013). Polychlorinated biphenyls (PCBs) in Africa: a review of environmental levels. *Environmental Science and Pollutant Research*.

Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., Rotheray, E.L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides and lack of flowers. *Science* 347, Issue 6229. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1255957>.

Guerrero, I., Morales, M.B., Oñate, J.J., Aavik, T., Bengtsson, J., Berendse, F., Clement, L.W., Dennis, C., Eggers, S., Emmerson, M., Fischer, C., Flohre, A., Geiger, F., Hawro, V., Inchausti, P., Kalamees, A., Kinks, R., Liira, J., Meléndez, J., Pärt, T., Thies, C., Tschardtke, T., Olszewski, A., Weisser, W.W. (2011). Taxonomic and functional diversity of farmland bird communities across Europe: effects of biogeography and agricultural intensification. *Biodiversity and Conservation* 20, 3663–3681.

Henle K., Alard D., Clitherow J., Cobb P., Firbank L., Kull T., McCracken D., Moritz R.F.A., Niemela J., Rebane M., Wascher D., Watt A., Young J. (2008). Identifying and Managing the Conflicts between Agriculture and Biodiversity Conservation in Europe, A Review. *Agriculture Ecosystem and Environment* 124, 60-71.

Ings, T.C., Montoya, J.M., Bascompte, J., Bluthgen, N., Brown, L., Dormann, C.F., Edwards, F., Figueroa, D., Jacob, U., Jones, J.I., Lauridsen, R.B., Ledger, M.E., Lewis, H.M., Olesen, J.M., Van Veen, F.J.F., Warren, P.H., Woodward, G. (2009). Ecological networks—beyond food webs. *Journal of Animal Ecology* 78, 253–269.

Iwaniuk AN, Koperski DT, Cheng KM, Elliott JE, Smith LK, Wilson LK, Douglas R.W. Wylie (2006). The effects of environmental exposure to DDT on the brain of a songbird: changes in structures associated with mating and song. *Behavioural Brain Research* 173, Issue 1, 1–10.

Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., X, A.E. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 59, 2897–2908.

Kovats, Z. E.; Ciborowski, J. J. H. (1993). Organochlorine contaminant concentrations in caddisfly adults (Trichoptera) collected from Great Lakes connection channels. *Environmental Monitoring and Assessment* 27, 135–158.

Krebs, J.R., Wilson, J.D., Bradbury, R.B., Siriwardena, G.M. (1999). The second silent spring. *Nature* 400, 611–612.

Krischik, V., Rogers, M., Gupta, G., Varshney, A. (2015). Soil-applied imidacloprid translocates to ornamental flowers and reduces survival of adult *Coleomegilla maculata*, *Harmonia axyridis*, and *Hippodamia convergens* lady beetles, and larval *Danaus plexippus* and *Vanessa cardui* butterflies. *PLoS One* 10 (3), Article e0119133.

Lopez-Pérez, G.C., Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Soto-González, B., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. (2006). Dynamics of pesticides in potato crops. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54, Issue 5, 1797–1803.

Luzardo, O.P., Ruiz-Suárez, N., Valerón, P.F., Camacho, M., Zumbado, M., Henríquez-Hernández, L.A., Boada, L.D. (2014). Methodology for the identification of 117 pesticides commonly involved in the poisoning of wildlife using GC-MS-MS and LC-MSMS. *Journal of Analytical Toxicology* 38, 155–163.

Manuel Arias-Estévez, Eugenio López-Periago, Elena Martínez-Carballo, Jesús Simal-Gándara, Juan-Carlos Mejuto, Luis García-Río (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 123, 247–260.

Martín-López, B., García-Llorente, M., Palomo, I., Montes, C. (2011). The conservation against development paradigm in protected areas: valuation of ecosystem services in the Doñana social-ecological system (south-western Spain). *Ecological Economics* 70, 1481–1491.

Matson P. A., Parton W. J., Power A. G., Swift M. J. (1997). Agricultural Intensification and Ecosystem Properties. *Science* 277, 504-509.

Mitra, A., Chatterjee, C., Mandal, F.B. (2011). Synthetic chemical pesticides and their effects on birds. *Research Journal of Environmental Toxicology* 5, 81–96.

Moriarty F. (1985). Bioaccumulation in terrestrial food chains. In : Sheehan P, Korte F, Klein W, Bourdeau P, eds. *Appraisal of Tests to Predict the Environmental Behaviour of Chemicals*. Wiley, Chichester, pp. 257-284.

Mukerji M.K., Ewen A.B., Craig C.H. and Ford R.J. (1981). Evaluation of insecticide treated bran baits for grasshopper control in Saskatchewan (Orthoptera: Acrididae). *The Canadian Entomologist* 113, 705–710.

Nakata H., M. Kawazoe, K. Arizono, *et al.*, Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl residues in foodstuffs and human tissues from China: status of contamination, historical trend, and human dietary exposure, *Arch. Environmental Contamination of Toxicology* 43, 473–480.

Newton, I. (2004). The recent declines of farmland bird populations in Britain: an appraisal of causal factors and conservation actions. *Ibis* 146, Issue 2, 579–600.

Niti, C., Sunita, S., Kamlesh, K., Rakesh, K. (2013). Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. *Research Journal of Chemical and Environmental Science* 17, 88–105.

O' Neill K.M., Olson B.E., Rolston M.G., Wallander R., Larson, D.P. and Seibert C.E. (2003). Effects of livestock grazing on rangeland grasshopper (Orthoptera: Acrididae) abundance. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 97, 51–64.

Oedekoven M.A. and Joern A. (1998). Stage-based mortality of grassland grasshoppers (Acrididae) from wandering spider (Lycosidae) predation. *Acta Oecologica* 19, Issue 6, 507–515.

Prasifka, J.R., Lopez, M.D., Hellmich, R.L., Lewis, L.C., Dively, G.P. (2006). Comparison of pitfall traps and litter bags for sampling ground-dwelling arthropods. *Journal of Applied Entomology* 131, 115-120.

Quinn M.A., Foster R.N., Cushing W.J., Hirsch D.C., Winks K. and Reuter K.C. (2000). The North Dakota Grasshopper Integrated Pest Management Demonstration Project. United States Department of Agriculture, Washington.

Rebek E.J., Hogg D.B. and Young D.K., (1994). Pitfall trap analysis of soil Macroarthropods associated with the Wisconsin integrated cropping systems trial. University of Wisconsin- Madison. Report No. 5.

Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Simal-Gándara, J. (2003). Procedure for the measurement of soil inputs of plant-protection agents washed off through vineyard canopy by rainfalls. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51, Issue 17, 5041–5046.

Richards O.W. and Waloff N. (1954). Studies on the biology and population dynamics of British grasshoppers. *Anti-Locust Bull.* 17, 1–182.

Rosemary Mason, Henk Tennekes, Francisco Sánchez-Bayo, Palle Uhd Jepsen (2012). Immune uppression by Neonicotinoid Insecticides at the Root of Global Wildlife Declines. *Journal of Environmental Immunology and Toxicology* X, X.

Skvarla, M. J., Larson, J. L. & Dowling, A. P. G. (2014). Pitfalls and preservatives: a review. *Journal of the Entomological Society of Ontario* 145, 15-43.

Spence, J.R., Niemelä, J. (1994). Sampling carabid assemblages with pitfall traps: the madness and the method. *Canadian Entomologist* 126, 881-894.

Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., Schlesinger, W.H., Simberloff, D., Swackhamer, D. (2001). Forecasting agriculturally driven global environment change. *Science* 292, 281–284.

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, & Population Division. (2015). World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables. In Working Paper No. ESA/P/WP.241.

Voshell, Jr., J.R., J.S. Eldridge and T.W. Oakes (1985). Transfer of ¹³⁷Cs and ⁶⁰Co in a waste retention pond with emphasis on aquatic insects. *Health Physics* 49, 777-789.

Wang Yanhua, Jin Chen, Yu Cheng Zhu, Chongyong Ma, Yue Huang, Jinliang Shen (2008). Susceptibility to neonicotinoids and risk of resistance development in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal) ° (Homoptera: Delphacidae). *Pest Manag Sci* 64,1278-84.

Wardle, D. A., Nicholson, K. S., Yeates, G. W. (1993) Effect of weed management strategies on some soil-associated arthropods in maize and asparagus ecosystems. *Pedobiologia* 37, 257–269.

Woodcock, B. A. (2005). Pitfall trapping in ecological studies. In: *Insect sampling in forest ecosystems*. Oxford: Blackwell Science Ltd, pp. 37-57.

Zacharia, James Tano (2011). Pesticides in the modern world- Risks and Benefits. InTech, Chapter 7, pp. 129-142.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Αντωνάτος Σπυρίδων Α. (2011). Ποιοτική και Ποσοτική Μελέτη Ορθοπτέρων των Λιβαδειών. Διδακτορική Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας.

Βαλαβανίδης Αθανάσιος (2008). Οικοτοξικολογία και Περιβαλλοντική Τοξικολογία: Ερευνητική Μεθοδολογία και Εκτίμηση Οικολογικού Κινδύνου από Επικίνδυνες Χημικές Ουσίες, Κεφ. 6, σελ. 185-202. Έκδοση Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

ΕΠΠΕΡ (2009). «Ολοκλήρωση του σχεδιασμού των υπολειπόμενων έργων Δ.Α και ΕΕΛ οικισμών Γ' προτεραιότητας με πληθυσμό αιχμής > 2.000 Μ.Ι.Π, ωρίμανση έργων και ΔΑ και ΕΕΛ οικισμών Γ' προτεραιότητας με χαμηλή ή καμία ωριμότητα και πρόγραμμα αποκατάστασης λειτουργικότητας ΕΕΛ σε αδράνεια». Περιφέρεια Θεσσαλίας.

Παπαδοπούλου- Μουκίδου Ευθυμία, Πατσιας Ιωάννης (2009). Χρωματογραφία και Εργαστηριακές Τεχνικές, μελέτη φυσικοχημικών και βιολογικών ιδιοτήτων και αναλύσεων υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων. Εκδόσεις Μέθεξις, Θεσσαλονίκη.

Περιφέρεια Θεσσαλίας (2011). Επιχειρησιακό σχέδιο « Καλάθι προϊόντων Περιφέρειας Θεσσαλίας».

Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

<https://assets.lawrenceks.org/assets/swm/recycling/pdf/facts-birdspests>

<http://www.lifelesserkestrel.eu>

<https://www.organic-center.org/reportfiles/GE13YearsReport>,