

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Προσδιορισμός των συγκεντρώσεων
υπερφωσφορικού λιπάσματος,
οργανοφωσφορικού παρασιτοκτόνου και
συνδυασμού αυτών που επιφέρουν οξεία
θνησιγόνο δράση σε χρονική περίοδο 96 ωρών
(96h LC50) επί του είδους
Dicentrarchus labrax.

Υπόψη καθηγητή Νικολάου Τσιμενίδη

Δημήτρης Μαρινέλλης

Απρίλιος 1998

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Comment [P1]:

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους βοήθησαν στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης και ιδιαιτέρως στην καθηγήτρια Μαρία Κεντούρη, στο Δρ Μιχάλη Πασπάτη και στην κυρία Μαρίνα Καγκαρά.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1. Γενικά Στοιχεία Τοξικολογίας	
1.1.1. Τοξικά στο Υδάτινο Περιβάλλον	1
1.1.2. Επιχειρηματολογία της Παρούσης Μελέτης	1
1.1.3. Διαφορές Θαλασσίων και Γλυκέων Υδάτων	1
1.1.4. Σημαντικότητα Επίπτωσης Τοξικού	2
1.2. Εισαγωγή στα Γεωργικά Παρασιτοκτόνα	
1.2.1. Τα Παρασιτοκτόνα ως Μέθοδος Ελέγχου Παρασίτων	3
1.2.2. Είδη Παρασιτοκτόνων	3
1.2.2.1. Οργανοχλωρικά Παρασιτοκτόνα	3
1.2.2.2. Οργανοφωσφορικά Παρασιτοκτόνα	3
1.2.3. Συμπεριφορά Παρασιτοκτόνων στο Περιβάλλον	3
1.2.3.1. Λιθόσφαιρα	3
1.2.3.2. Υδρόσφαιρα	4
1.2.3.2.1. Συμπεριφορά στην Υδρόσφαιρα	4
1.2.3.2.2. Απομάκρυνση από την Υδρόσφαιρα	4
1.2.4. Η Τοξικότητα των Παρασιτοκτόνων	5
1.3. Εισαγωγή στα Γεωργικά Λιπάσματα	
1.3.1. Διαχωρισμός Λιπασμάτων	6
1.3.1.1. Οργανικά Λιπάσματα	6
1.3.1.1.1. Μέθοδος Δράσης	6
1.3.1.2. Ανόργανα Λιπάσματα	7
1.3.1.2.1. Απλά Ανόργανα Λιπάσματα	7
1.3.1.2.2. Μεικτά Ανόργανα Λιπάσματα	7
1.3.1.2.3. Μεικτά Πλήρη Ανόργανα Λιπάσματα	7
1.4. Βιολογικά Στοιχεία του Λαβρακιού	
1.4.1. Συστηματική Θέση	8
1.4.2. Γεωγραφική Κατανομή	8
1.4.3. Οικονομική Σημασία	8
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ - ΥΛΙΚΑ	
2.1. Πειραματικές Εγκαταστάσεις	
2.1.1. Δεξαμενές 500 Λίτρων	9
2.1.2. Δεξαμενές Προπειραμάτων	9
2.1.3. Εισαγωγή Ψαριών	10

2.2. Προετοιμασία Διαλυμάτων Τοξικών	
2.2.1. Διάλυμα Υπερφωσφορικού Λιπάσματος	11
2.2.2. Διάλυμα Οργανοφωσφορικού Παρασιτοκτόνου	11
2.3. Προετοιμασία Πειραματικών Δεξαμενών	
2.3.1. Δεξαμενές 60 Λίτρων	12
2.3.2. Δεξαμενές 500 Λίτρων	12
2.4. Εισαγωγή Διαλυμάτων Τοξικών	
2.4.1. Επιλογή Συγκεντρώσεων Λιπάσματος στο Προπείραμα	13
2.4.1.1. Εισαγωγή των Προκαθορισμένων Συγκεντρώσεων Λιπάσματος σε Δεξαμενές 500 Λίτρων	13
2.4.2. Επιλογή Συγκεντρώσεων Παρασιτοκτόνου στο Προπείραμα	14
2.4.2.1. Εισαγωγή Προκαθορισμένων Συγκεντρώσεων Παρασιτοκτόνου σε Δεξαμενές 500 Λίτρων	14
2.4.2.2. Εισαγωγή Συνδυασμού Λιπάσματος - Παρασιτοκτόνου	15
2.5. Έλεγχος Περιβαλλοντικών Συνθηκών Κατά τη Διάρκεια των Πειραμάτων	
2.5.1. Θερμοκρασία, Αλατότητα και Διαλυμένο Οξυγόνο	16
2.5.2. Έλεγχος Λοιπών Παραγόντων	16
2.6. Μεθοδολογία Ιστολογικών Τομών	
2.6.1. Τοποθέτηση Ψαριών σε Θερμοκρασία Συντήρησης	17
2.6.2. Προετοιμασία Ιστών για Ιστολογική Μελέτη	17
2.6.2.1. Απομάκρυνση και Κοπή Ήπατος	17
2.6.2.2. Απομάκρυνση και Κοπή Βραγχίων	18
2.6.2.3. Αφυδάτωση Ιστών σε Ιστοκινέτα	18
2.6.2.4. Έγκλιση ιστών σε Παραφίνη	18
2.6.3. Κοπή Ιστολογικών Τομών	18
2.6.3.1. Κοπή και Επεξεργασία Τομών σε 20 μm και 7μm	18
2.6.4. Χρώση Τομών	19
2.6.5. Παρατήρηση στο Μικροσκόπιο και Λήψη Φωτογραφιών	19
Σχήμα 2.6.-1: Απεικόνιση βραχγιακών μονάδων	20
Φωτ. 2.6.2.1-1: Απομάκρυνση βραγχίων και ήπατος	21
2.7. Μεθοδολογία Στατιστικής Ανάλυσης	
2.7.1. Ανάλυση Διακύμανσης (ANOVA)	22
2.7.2. Μέθοδος Πολλαπλών Συγκρίσεων	22

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Φυσικοχημικές Συνθήκες Μελέτης	
3.1.1. Θερμοκρασία και Αλατότητα	23

3.1.2. Διαλελυμένο Οξυγόνο	23
3.2. Αποτελέσματα Θνησιγόνου Δράσης Τοξικών	
3.2.1. Σύνολα Νεκρών ανά Ημέρα	23
3.2.2. Ηθολογία του <u>D. labrax</u> μετά την Εισαγωγή Τοξικών	23
3.2.3. Μικροσκοπική Εξέταση Οργάνων	24
Πίνακας 3.1-1: Φυσικοχημικές συνθήκες μελέτης	25
Πίνακας 3.2-1: Αποτελέσματα θνησιγόνου δράσης τοξικών	26
Φωτ. 3.2.3-1: Ιστολογικές τομές ήπατος	27
Φωτ. 3.2.3-2: Ιστολογικές τομές βραγχίων	28
3.3. Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων	
3.3.1. Σύγκριση Αριθμού Θανάτων Μεταξύ των Τεσσάρων Treatments Χρησιμοποιώντας το Μέσο Όρο Κάθε Ημέρας	29
3.3.2. Σύγκριση Αριθμού Θανάτων Μεταξύ των Ημερών, Ανεξάρτητα Από το Είδος του Τοξικού	29
3.3.3. Σύγκριση Αριθμού Θανάτων ανά Μονάδα Χρόνου και ανά Είδος Τοξικού	29
3.3.4. Σύγκριση Αριθμού θανάτων Μεταξύ των Ειδών Τοξικών για Κάθε Ημέρα	29
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	31
Σχήμα 4.2.3-1: Ορολογία που χρησιμοποιείται στην περιγραφή της δράσης δύο τοξικών	36
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	
I.i. Ειδικά Προβλήματα Πειραματικών Συνθηκών	37
I.ii. Παραγόμενα Γραφήματα από Μελέτες Τοξικότητας	38
Γράφημα I.ii-1: Probit lines ως αποτέλεσμα ποσοστιαίας θνησιμότητας σε κάθε δεξαμενή συναρτήσει του χρόνου	40
Γράφημα I.ii-2: Καμπύλη τοξικότητας που συσχετίζει μέσο χρόνο επιβίωσης με την συγκέντρωση τοξικού	41
Γράφημα I.ii-3: Τοξικότητα απορρυπαντικού με 2 τοξικούς μηχανισμούς στην Ιριδίζουσα πέστροφα	42
Γράφημα I.ii-4: Υποθετικές καμπύλες τοξικότητας για ουσίες Α και Β	43
Γράφημα I.ii-5: Καμπύλη τοξικότητας για την Ιριδίζουσα πέστροφα εκτεθειμένα σε κάδμιο	44
Γράφημα I.ii-6: Καμπύλες τοξικότητας διαφόρων τοξικών επί διαφόρων ειδών	45
I.iii. Επιρροή Περιβαλλοντικών Παραγόντων	46

Γράφημα I.iii-1: Επιπτώσεις θερμοκρασίας στην τοξικότητα υδροθείου στο Χρυσόψαρο	48
I.iv. Επιρροή Συνδυασμού Τοξικών	49
Πίνακας I.iv-1: Περίληψη των σημαντικότερων επιπτώσεων στην φυσιολογία και βιοχημεία υδροβίων οργανισμών	50
I.v. Ιστορικά και Στατιστικά στοιχεία Γεωργικής Παραγωγής	51
I.vi. Χημική Σύνθεση Οργανοχλωρικών Παρασιτοκτόνων	53
Πίνακας I.vi-1: Τάξεις παρασιτοκτόνων, εφαρμογή και ονομαστική προέλευση	54
Σχήμα I.vi-1: Χημική σύνθεση DDT	55
I.vii. Χημική Σύνθεση Οργανοφωσφορικών Παρασιτοκτόνων	56
Σχήμα I.vii-1: Υποτάξεις οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων	58
I.viii. Συμπεριφορά Παρασιτοκτόνων στο Περιβάλλον - Λιθόσφαιρα	59
Πίνακας I.viii-1: Προτεινόμενοι μηχανισμοί προσρόφησης παρασιτοκτόνων σε κολλοειδή του εδάφους	61
Πίνακας I.viii-2: Χρόνοι ημιζωής ορισμένων σχετικά παραμενόντων εντομοκτόνων στο έδαφος	63
Πίνακας I.viii-3: Σύνολο θανάτων από δηλητηριάσεις στις ΗΠΑ	64
I.ix. Μεταφορά και Διαφοροποίηση Παρασιτοκτόνων στους Οργανισμούς	65
Πίνακας I.ix-1: Συσχέτιση υδροδιαλυτότητας παρασιτοκτόνου και συσσώρευσης στα ψάρια	68
Πίνακας I.ix-2: Εισαγωγή παρασιτοκτόνων σε υδρόβια είδη	69
Πίνακας I.ix-3: Μεταφορά καταλοίπων στις τροφικές αλυσίδες	70
Πίνακας I.ix-4: Ενζυμικά συστήματα που μεταβολίζουν παρασιτοκτόνα	71
Πίνακας I.ix-5: Παραδείγματα αντιδράσεων απότοξικοποίησης παρασιτοκτόνων από οργανισμούς	72
I.x. Η τοξικότητα των Παρασιτοκτόνων	74
Πίνακας I.x-1: Τιμές οξείας τοξικότητας οργανοχλωρικών και οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων σε διάφορους οργανισμούς	77

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Πίνακας II.i-1: Αριθμός σειράς πειραμάτων, συγκέντρωση δραστικής ουσίας και επαναλήψεις	79
Πίνακας II.i-2: Αριθμός σειράς πειραμάτων, συγκέντρωση δραστικής ουσίας και επαναλήψεις	80

II.iii.	Παρασκευή Bouin Holland	81
II.iv.	Αφυδάτωση, Διαύγηση, Παραφίνωση	82
II.v.	Χρώση Αιματοξυλίνη - Εωσίνη	83

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

III.	Συνάθροιση Συστολής στους Μύες	84
	Γράφημα III.i.: Αντιδράσεις μύωνων χημικοηλεκτρικό ερέθισμα νευρώνα	85

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά Στοιχεία Τοξικολογίας

1.1.1. Τοξικά στο Υδάτινο Περιβάλλον

Ο κίνδυνος που διατρέχει το υδάτινο περιβάλλον είναι τόσο ποσοτικός, από τον τεράστιο όγκο χημικών ενώσεων που καταλήγουν στη θάλασσα, όσο και ποιοτικός, από τις ιδιότητες κάθε χημικού ξεχωριστά ή σε συνέργεια. Ο Maugh (1978) υπολογίζει τον αριθμό των χημικών ενώσεων σε παραγωγή γύρω στις 4.000.000. Ο αριθμός αυτός αυξάνεται κατά 300.000 κάθε χρόνο. Το σημαντικότερο όμως στοιχείο της έρευνας αυτής είναι ότι 10.000 από τις ενώσεις αυτές παράγονται σε ποσότητες μεγαλύτερες των 500 Kg κάθε χρόνο.

Ο γενικότερος σκοπός των προγραμμάτων προστασίας, όπως εδραιώνονται από όλους τους φορείς παγκοσμίως, είναι η διατήρηση παραγόντων όπως θερμοκρασία, θολερότητα, σύνθεση υποστρώματος και χημικών παραμέτρων σε ορισμένα "ανεκτά" επίπεδα. Συχνά όμως τα όρια αυτά τίθενται πρόχειρα και με έλλειψη θεώρησης των δυναμικών σχέσεων μεταξύ βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων (Abel, 1989).

1.1.2. Επιχειρηματολογία της Παρούσας Μελέτης

Η παρούσα μελέτη ερευνά τη θνησιγόνο τοξική δράση δύο ουσιών, οργανοφωσφορικού παρασιτοκτόνου και υπερφωσφορικού γεωργικού λιπάσματος, επί του είδους *Dicentrarchus labrax*. Σκοπός της μελέτης είναι να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του κάθε τοξικού ξεχωριστά αλλά και σε συνδυασμό, που προκαλεί το θάνατο στο 50% του πληθυσμού των πειραματόζων σε 96 ώρες (96hr LC50). Τα συγκεκριμένα τοξικά επιλέχθηκαν για δύο λόγους: πρώτον περιέχουν και τα δύο όμοια χημική βάση, αυτή της παρουσίας φωσφόρου και δεύτερον είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα βοηθήματα στις γεωργικές καλλιέργειες. Το πρώτο επιχείρημα είναι σημαντικό καθώς περιορίζεται η πιθανότητα ανάμιξης των τοξικών δράσεων και άλλων τοξικών. Η δε χρονική περίοδος των 96 ωρών επιλέχθηκε καθώς πρέπει να υπάρχει συμβατότητα και με άλλες μελέτες τοξικολογίας στις οποίες χρησιμοποιείται το ίδιο χρονικό διάστημα. Επιπλέον οι 96 ώρες είναι βολικές για την εργαστηριακές μελέτες για τους εξής λόγους:

1. Τα αποτελέσματα είναι στατιστικά αποδεκτά
2. Περιορίζονται οι πιθανότητες σφάλματος λόγω λανθασμένων εργαστηριακών χειρισμών
3. Σε περίπτωση που επιλεγόταν μεγαλύτερη χρονική περίοδος θα διέφευγε από τα πλαίσια της 'οξείας τοξικής δράσης'

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας γεωργικά βοηθήματα βελτιστοποίησης των καλλιεργειών, καθώς συχνά υπάρχει εισροή των δύο ουσιών (παρασιτοκτόνα και λιπάσματα) στον υδάτινο αποδέκτη μέσω διαφόρων διαδικασιών, όπως βροχόπτωση και διάχυση (βλ. Παραγράφους 1.2.3.1. και 1.2.3.2.). Σε ορισμένες περιπτώσεις δύναται να υπάρχει εγκατάσταση ιχθυοκαλλιέργειας σε άμεση γειτνίαση με γεωργικές καλλιέργειες. Έτσι είναι λογική συνέπεια ορισμένα από τα τοξικά φορτία να καταλήγουν στο βιολογικό σύστημα της

ιχθυοκαλλιέργειας. Η μελέτη των επιπτώσεων των γεωργικά εφαρμόσιμων τοξικών βοηθά στην κατανόηση των προβλημάτων τοξικότητας που δύνανται να προέλθουν από εισροή των πρώτων στο υδάτινο οικοσύστημα.

1.1.3. Διαφορές Θαλασσίων και Γλυκών Υδάτων

Χαρακτηριστικό του θαλασσίου περιβάλλοντος είναι κυρίως ο τεράστιος όγκος νερού ο οποίος επιτρέπει μεγάλα περιθώρια διάλυσης. Έτσι πολύ σπάνια οι τιμές ρύπων φτάνουν σε επικίνδυνα επίπεδα, σε αντίθεση με τα γλυκά νερά όπου συχνά τα όρια επιφυλακής ξεπερνώνται. Με βάση τη διάλυση των τοξικών στη θάλασσα πρέπει να υπάρχει αναθεώρηση πολλών μελετών τοξικότητας, κυρίως αυτών που ερευνούν τη θνησιγόνο τοξικότητα σε οργανισμούς.

Η δεύτερη διαφοροποίηση βασίζεται στη χημική σύσταση του ίδιου του νερού η οποία έχει επιπτώσεις στη συμπεριφορά των τοξικών. Για παράδειγμα τα βαρέα μέταλλα σε μικρές συγκεντρώσεις υφίστανται καθίζηση και δεν επηρεάζουν τους οργανισμούς (Abel, 1989).

1.1.4. Σημαντικότητα Επίπτωσης Τοξικού

Σημαντική θεωρείται κάθε επίπτωση που επηρεάζει τη φυσιολογία ή την συμπεριφορά του οργανισμού. Οι επιπτώσεις διαχωρίζονται σε άμεσες και έμμεσες. Οι άμεσες περιλαμβάνουν την ικανότητα αύξησης, την αναπαραγωγή ή θνησιμότητα και τη διασπορά. Έμμεσες επιπτώσεις είναι αυτές που έχουν οικολογική εξέλιξη ή εμφανίζονται μέσω πιο περίπλοκων διαδικασιών όπως οι σχέσεις θηρευτή - θηράματος και οι σχέσεις δύο ανταγωνιστικών ειδών. Συμπερασματικά οι επιπτώσεις τοξικών δύνανται να κατανοηθούν σε συνάρτηση με τις τροφικές, ανταγωνιστικές και άλλες διαειδικές σχέσεις και όχι απλοϊκά από τις άμεσες συνέπειες σε έναν οργανισμό (Abel, 1989).

1.2. Εισαγωγή στα Γεωργικά Παρασιτοκτόνα

1.2.1. Τα Παρασιτοκτόνα ως Μέθοδος Ελέγχου Παρασίτων

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη διαχείριση κάθε είδους παρασίτου είναι γνωστές ως παρασιτοκτόνα. Στον χώρο των αγροτικών καλλιεργειών με τον όρο παράσιτα εννοούνται τα έντομα και άλλα αρθρόποδα που τρέφονται με τα αγροτικά προϊόντα, υδρόβια φυτά που δημιουργούν εμπλοκές στα αποχετευτικά δίκτυα και δίκτυα ύδρευσης, γαστερόποδα μαλάκια, τρωκτικά και πτηνά τα οποία καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες φυτών και φυτικών προϊόντων και ασθένειες φυτών που δημιουργούνται από μύκητες, βακτήρια, ιούς και νηματώδεις (Ware, 1991).

Οι παγκόσμιες απώλειες από παράσιτα, ασθένειες και ζιζάνια εκτιμούνται σε 140 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως. Έτσι γίνεται εμφανές ότι ο έλεγχος των βλαβερών οργανισμών είναι υψίστης σημαντικότητας για τις αγροτικές καλλιέργειες, τη βιομηχανία και τη δημόσια υγεία. Κατά συνέπεια η χρήση παρασιτοκτόνων επιβάλλεται για τον περιορισμό των βλαβερών οργανισμών ούτως ώστε να διασφαλίζεται με υγιεινή και επάρκεια η διατροφή, ένδυση και προστασία του παγκόσμιου πληθυσμού (Ware, 1991).

1.2.2. Είδη Παρασιτοκτόνων

1.2.2.1. Οργανοχλωρικά Παρασιτοκτόνα (organochlorines)

Πρόκειται για εντομοκτόνα τα οποία περιέχουν άνθρακα (C), χλώριο (Cl), υδρογόνο (H) και σε ορισμένες περιπτώσεις οξυγόνο (O). Δεν είναι άμεσα διασπώμενα από μικροοργανισμούς, ένζυμα, υψηλή θερμοκρασία ή υπεριώδη ακτινοβολία. Τα χαρακτηριστικά αυτά θεωρούνται θετικά για την εφαρμογή τους ως εντομοκτόνα, αρνητικά δε για το περιβάλλον (Παράρτημα I.vi.)

1.2.2.2. Οργανοφωσφορικά Παρασιτοκτόνα (organophosphates)

Τα οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα που αφορούν στην συγκεκριμένη μελέτη, προέρχονται από το φωσφορικό οξύ, του οποίου ο χημικός τύπος φαίνεται στο Παράρτημα I.vii. Είναι τα πλέον τοξικά στα σπονδυλωτά από όλα τα παρασιτοκτόνα.

Τα οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα έχουν δύο μοναδικά χαρακτηριστικά: πρώτον είναι περισσότερο τοξικά στα σπονδυλωτά από τα οργανοχλωρικά και δεύτερον, συσσωρεύονται σε πολύ μικρότερο βαθμό. Το τελευταίο τους χαρακτηριστικό είναι αυτό που τα έφερε επί σκηνής ως αντικαταστάτες των οργανοχλωρικών, ιδιαιτέρως του DDT (Παράρτημα I.vii.).

1.2.3. Συμπεριφορά Παρασιτοκτόνων στο Περιβάλλον

1.2.3.1. Λιθόσφαιρα

Η συμπεριφορά των παρασιτοκτόνων στη λιθόσφαιρα σχετίζεται με το λεπτό εξωτερικό στρώμα, βάθους ορισμένων μέτρων, της επιφάνειας της γης (Robinson, 1973). Τα παρασιτοκτόνα εισέρχονται στο έδαφος μέσω άμεσης εφαρμογής, απόθεσης σκόνης, βροχόπτωσης, πλημμυρών ποταμών και διάθεσης

απορριμάτων. Η αλληλεπίδραση μεταξύ παρασιτοκτόνων και εδάφους εξαρτάται από ορισμένους σημαντικούς παράγοντες που περιγράφονται στο Παράρτημα I.viii.

1.2.3.2. Υδρόσφαιρα

Η υδρόσφαιρα λειτουργεί ως σημαντικός χώρος αποθήκευσης για τα παραμένοντα κατάλοιπα των παρασιτοκτόνων. Τα παρασιτοκτόνα εισέρχονται στο υδάτινο οικοσύστημα μέσω διαφόρων οδών όπως οι εξής:

- ◆ Άμεση εφαρμογή για περιορισμό της διάδοσης ασθενειών και παρασίτων
- ◆ Οικιακά λύματα και βιομηχανικά απόβλητα
- ◆ Εκροές από αγροτικές καλλιέργειες
- ◆ Απόσταξη από το έδαφος
- ◆ Αέρια σωματιδιακή κατάθεση - βροχόπτωση
- ◆ Εισροή από την αέρια φάση στο μεσοδιάστημα ατμόσφαιρας - ύδατος

Συνολικά η σημαντικότερη εισροή επιτυγχάνεται από την χρήση παρασιτοκτόνων σε αγροτικές καλλιέργειες και από τη χρήση τους για τον περιορισμό των ασθενειών (Kerr & Vass, 1973). Οι Goldberg *et al.* (1971) εκτίμησαν την εισροή παρασιτοκτόνων τύπου DDT από την ατμόσφαιρα στο υδάτινο περιβάλλον σε 2.4×10^7 Kg, ποσότητα που αντιστοιχούσε στο 25% της τότε παγκόσμιας παραγωγής.

1.2.3.2.1. Συμπεριφορά στην Υδρόσφαιρα

Πολλά παρασιτοκτόνα είναι ισχυρώς λιπόφιλα και μη διαλυτά στο νερό. Για παράδειγμα τα οργανοχλωρικά έχουν διαλυτότητα $<10 \text{ g l}^{-1}$ (Edwards, 1973). Στα φυσικά νερά το μεγαλύτερο μέρος των λιπόφιλων παρασιτοκτόνων είτε προσροφώνται σε αιωρούμενα και έχοντα υποστεί καθίζηση σωματίδια είτε διαμερίζονται σε οργανικά υποστρώματα. Αυτά τα παρασιτοκτόνα επιδεικνύουν έντονη τάση προς ένωση με τα λιπώδη στοιχεία νεκρής και ζωντανής οργανικής ύλης. Ο βαθμός στον οποίο αυτό συμβαίνει εξαρτάται από τα χημικά χαρακτηριστικά και τη διαλυτότητα του παρασιτοκτόνου όπως και από τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος - για παράδειγμα η περιεκτικότητα σε οργανικά, η περιεκτικότητα σε πηλό, το pH και η θερμοκρασία (Connell & Miller, 1986).

1.2.3.2.2. Απομάκρυνση από την Υδρόσφαιρα

Η απομάκρυνση από την υδρόσφαιρα δύναται να συμβεί με τους εξής τρεις τρόπους:

- ◆ Απορρόφηση από υδρόβιους οργανισμούς
- ◆ Πτητικότητα
- ◆ Καθίζηση σωματιδίων στα οποία προσροφώνται τα παρασιτοκτόνα (Robinson, 1973)

Η απομάκρυνση λόγω διάσπασης συμβαίνει με μεταλλαγή και τελικά, μεταλλοποίηση. Από μελέτες συμπεραίνεται ότι η απομάκρυνση των παρασιτοκτόνων από την υδρόσφαιρα μέσω απορρόφησης από την πανίδα και χλωρίδα είναι περιορισμένης σημαντικότητας. Οι Woodwell *et al.* (1971)

συμπέραναν ότι η παγκόσμια πανίδα και χλωρίδα περιέχει περίπου 5.4×10^9 g, λιγότερο από το 1/30 της παγκόσμιας ετήσιας παραγωγής στα μέσα του 1960.

Απομάκρυνση από τη στήλη μπορεί να συμβεί με τους εξής τρόπους:

- ◆ Προσρόφηση στο ίζημα
- ◆ Μικροβιακή διάσπαση
- ◆ Εισαγωγή σε οργανισμούς
- ◆ Περαιτέρω διάλυση (Hasset & Lee, 1975)

Στην άβυσσο, ο ρυθμός μεταφοράς στα ιζήματα μπορεί να εκτείνεται από εκατοντάδες μέχρι χιλιάδες χρόνια. Από την στιγμή της εισαγωγής στο ίζημα ένα παρασιτοκτόνο οδηγείται κατά τις εξής περιπτώσεις:

- ◆ Επαναπελευθέρωση στη στήλη
- ◆ Απορρόφηση από οργανισμούς
- ◆ Μεταλλαγή ή διάσπαση από μικροοργανισμούς
- ◆ Προσωρινή παραμονή στο ίζημα (Connell & Miller, 1986).

1.2.4. Η Τοξικότητα των Παρασιτοκτόνων

Στο μεγάλο φάσμα των παρασιτοκτόνων, εξ ορισμού είναι όλα δηλητήρια, αλλά η τοξικότητα και οι κίνδυνοι των διαφόρων παρασιτοκτόνων ποικίλλουν. Οι όροι τοξικότητα και κίνδυνος διαφοροποιούνται εκτενώς. Ο όρος "τοξικότητα" αναφέρεται στο βαθμό στον οποίο ένα παρασιτοκτόνο είναι τοξικό σε έναν οργανισμό. Με τον όρο "κίνδυνος" εννοείται η πιθανότητα δηλητηρίασης κατά τη χρήση του χημικού και ορισμένες φορές χρησιμοποιείται ο όρος "κίνδυνος χρήσης" (use hazard) (Ware, 1991).

Για πολλά παρασιτοκτόνα είναι γνωστή η περιοχή όπου εστιάζεται η αρχική τοξική δράση, αλλά οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επέρχεται η δράση αυτή είναι συχνά μη κατανοητοί (Cobett, 1974). Στο Σχήμα 1.χ-1 του Παραρτήματος 1.χ. φαίνονται οι μηχανισμοί δράσης κάποιων παρασιτοκτόνων. Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα δρούν εμπλεκόμενα στη μεταφορά των φορτίων στο νευρικό σύστημα. Στις σημαντικότερες περιοχές δράσης διαφόρων εντομοκτόνων περιλαμβάνονται η αξονική μετάδοση και οι υποδοχείς ακετυλοχολίνης ή ακετυλοχολινεστεράσης. Στο ίδιο Παράρτημα συζητείται η τοξική δράση των οργανοχλωρικών και οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων.

1.3. Εισαγωγή στα Γεωργικά Λιπάσματα

1.3.1. Διαχωρισμός Λιπασμάτων

Τα λιπάσματα διαχωρίζονται βασικά σε δύο κατηγορίες, τα οργανικά και τα ανόργανα. Ο διαχωρισμός τους βασίζεται στην σύνθεσή τους η οποία μπορεί να αποτελείται από φυσικές οργανικές ενώσεις ή ανόργανες χημικές.

1.3.1.1. Οργανικά Λιπάσματα

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται κυρίως τα περιπτώματα ζώων και πτηνών, στερεά και υγρά καθώς και τα φυτικά υπολείμματα. Συνήθως εμφανίζονται αναμειγμένα ως κοπριά και στρωμνή (=το άχυρο από διάφορα δημητριακά το οποίο στρώνεται στις κτηνοτροφικές κατασκευές) η οποία δεν έχει καμμία θρεπτική αξία. Η περιεκτικότητά τους στα κύρια στοιχεία N, P και K και ιχνοστοιχεία είναι πτωχή έως ανύπαρκτη.

Η πολύτιμη ιδιότητα που χαρακτηρίζει τα οργανικά λιπάσματα είναι αυτή της μετάπλασης του εδάφους. Αυτό σημαίνει ότι μετά την εφαρμογή οργανικών λιπασμάτων επέρχεται αφρατοποίηση του εδάφους, διευκόλυνση της βλάστησης των σπόρων, της ανάπτυξης του ριζικού συστήματος, της διείσδυσης σε βάθος και γενικά της εγκατάστασης των φυτών. Επιπλέον διευκολύνουν τα ριζικά τριχίδια στην απορρόφηση των διαφόρων στοιχείων.

1.3.1.1.1. Μέθοδος Δράσης

Το κυριότερο στοιχείο της σύνθεσης των λιπασμάτων είναι το άζωτο. Για να γίνει σωστή απορρόφηση από το φυτό, το άζωτο πρέπει να μετατραπεί σε νιτρική μορφή. Η μετατροπή αυτή γίνεται με φυσιολογικές διεργασίες εντός του εδάφους, όπως ο αναβολισμός των μικροοργανισμών ή μέσω των αζωτοβακτηρίων τα οποία συμβιών στα φυμάτια των ριζών των ψυχανθών. Οι διεργασίες αυτές ουσιαστικά καταλήγουν στον κύκλο του αζώτου, δηλαδή το άζωτο μετατρέπεται σε αμμωνία, αυτή σε νιτρικά, τα νιτρικά σε νιτρώδη και τέλος επέρχεται η αφομίωση από τα φυτά.

Ο φώσφορος απορροφάται ως πεντοξείδιο του φωσφόρου (P_2O_5) και το κάλιο ως υποξείδιο του καλίου (K_2O). Ωστόσο και τα δύο στοιχεία δεσμεύονται από τα ιόντα του εδάφους και παραδίδονται στο φυτό μετά χρονική περίοδο 2-4 μηνών και άρα δεν είναι άμεσα αφομιώσιμα μέχρι της αποδέσμευσής τους από τα σύμπλοκα του εδάφους. Η αφομίωση επέρχεται αφού διασπαστεί το σθένος της ρίζας φωσφόρου και καλίου μέσω του κύκλου αναβολισμού τους.

Πρακτικά και βάσει σημερινών δεδομένων τα οργανικά λιπάσματα δεν μπορούν να καλύψουν τις ανάγκες των διαφόρων σύγχρονων καλλιεργειών. Η δράση τους είναι συμπληρωματική και κυρίως ως μεταπλαστικά των διαφόρων εδαφών.

1.3.1.2. Ανόργανα Λιπάσματα

Τα ανόργανα λιπάσματα χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες βάσει της περιεκτικότητας των κυρίων στοιχείων και ιχνοστοιχείων που περιέχουν:

1.3.1.2.1. Απλά Ανόργανα Λιπάσματα

Περιέχουν ένα κύριο στοιχείο, N, P ή K (π.χ. θειική αμμωνία 21-0-0, νιτρική αμμωνία 33,5-0-0, θειική αμμωνία 0-0-48, υπερφωσφορικό 0-16-0 και 0-46-0). Χρησιμοποιούνται κυρίως στις μεγάλες, αροτριάες καλλιέργειες όπως τα σιτηρά, το βαμβάκι κ.ά. Κατά την εφαρμογή τους επιβάλλεται η μείξη τους με άλλα λιπάσματα.

Στα χαρακτηριστικά των ανόργανων λιπασμάτων περιλαμβάνονται το χαμηλό κόστος και η αποτελεσματικότητα, με προϋπόθεση την σωστή επέμβαση αλλά και την απαιτούμενη γνώση κατά την εφαρμογή τους.

1.3.1.2.2. Μεικτά Ανόργανα Λιπάσματα

Τα μεικτά έχουν δύο τουλάχιστον από τα κύρια στοιχεία (π.χ. φωσφορική αμμωνία 16-20-0, φωσφοροκαλιούχα 0-16-32 ή λιπάσματα των τύπων 20-20-20, 12-12-12). Βρίσκονται συχνά σε χειλική μορφή, δηλαδή είναι άμεσα αφομιώσιμα από τα φυτά και δεν απαιτείται χρόνος διάσπασης. Συνήθως είναι ευδιάλυτα και δεν αφήνουν ίζημα (κρυσταλλικές μορφές). Χρησιμοποιούνται κατά κόρον στη γεωργία ελεγχόμενων συνθηκών και στην υπαίθρια λαχανοκομία και δένδροκομία.

1.3.1.2.3. Μεικτά Πλήρη Ανόργανα Λιπάσματα

Αποτελούν εξελικτική μορφή των προηγούμενων και περιέχουν μία πλήρη σειρά από το φάσμα των ιχνοστοιχείων. Είναι σχεδόν πάντοτε σε χειλική μορφή, κρυσταλλικά και κυρίως με ομογενοποίηση των κόκκων (π.χ. Κρύσταλλον[®], Nutrileaf[®], Soloinuf[®], Peter's[®], XL60[®], Complezal[®] κ.ά.). Είναι ευδιάλυτα και δεν αφήνουν ίζημα. Χρησιμοποιούνται κυρίως στη γεωργία ελεγχόμενων συνθηκών και υπάρχουν σε στερεά και υγρή συσκευασία. Τα μεικτά πλήρη δύνανται να χρησιμοποιηθούν και σαν διαφυλλικά λιπάσματα (εισαγωγή από τα στομάτια του φυλλώματος). Είναι τα πιο ακριβά από τα λιπάσματα αλλά σε αυτά μπορούν να αποδοθούν οι θεαματικές ποσοτικές αποδόσεις των καλλιεργειών. Τέλος είναι υπεύθυνα για τη σημαντική μόλυνση του εδαφικού και υδροφόρου ορίζοντα λόγω αλογίστου χρήσης (προσωπική επικοινωνία με Α. Φατούρο, γεωπόνο).

1.4. Βιολογικά Στοιχεία του Λαβρακιού

1.4.1. Συστηματική Θέση

Ο εξεταζόμενος οργανισμός, είδος *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), φέρει την κοινή ονομασία λαβράκι και έχει την ακόλουθη συστηματική θέση:

Ομοταξία	: Osteichthyes (Οστειχθύες)
Υφομοταξία	: Actinopterygii (Ακτινοπτερύγιοι)
Ομάδα	: Neopterygii (Νεοπτερύγιοι)
Υπέρταξη	: Teleostei (Τελεόστειοι)
Τάξη	: Percoidea (Περκοειδείς)
Οικογένεια	: Serranidae
Γένος	: <i>Dicentrarchus</i>
Είδος	: <i>labrax</i>

(Οντριας, 1982)

Στο ίδιο γένος ανήκει και το είδος *Dicentrarchus punctatus* (Χώτος & Ρογδάκης, 1992)

1.4.2. Γεωγραφική Κατανομή - Οικολογία

Το λαβράκι παρουσιάζει αρκετά ευρεία εξάπλωση. Εκτείνεται στον Ατλαντικό Ωκεανό από τις ακτές του Μαρόκου έως τη Βαλτική θάλασσα. Απαντά σε κάθε περιοχή της Μεσογείου και των γύρω Θαλασσών εισχωρώντας στις εκβολές των ποταμών και στις λιμνοθάλασσες. Είναι ψάρι που ζει γενικά κατά μήκος των βραχωδών ζωνών, όμως συχνά ιδίως στις φουσκοθαλασιές, καταφεύγει στις αμμώδεις περιοχές. Οι μεταναστεύσεις που ακολουθεί οφείλονται στις μεταβολές αλατότητας και θερμοκρασίας.

Την άνοιξη πολυάριθμα ιχθύδια προσεγγίζουν τις ακτές και εισέρχονται στις εκβολές ποταμών ή σε λιμνοθάλασσες όπου η θερμοκρασία του νερού κατά κανόνα είναι μεγαλύτερη από της θάλασσας. Είναι κατεξοχήν ευρύαλο και ευρύθερμο είδος. Προσαρμόζεται εύκολα και αναπτύσσεται ακόμη και σε γλυκά νερά. Οι ιδανικές συνθήκες αλατότητας για άριστη ανάπτυξη είναι 20 ‰ - 30 ‰. Η θερμοκρασία στην οποία διατρέφεται είναι 7-30 °C (άριστες 14-28 °C). Κάτω από τους 7 °C σταματά να τρέφεται, ενώ πεθαίνει όταν η θερμοκρασία κατέβει κάτω των 2 °C. Στο σχήμα 4.2-1 φαίνεται η εξωτερική μορφολογία του λαβρακιού (Χώτος & Ρογδάκης, 1992).

1.4.3. Οικονομική Σημασία

Πρόκειται για είδος ψαριού με ιδιαίτερη οικονομική σημασία λόγω της καλλιέργειάς του, η οποία παρουσιάζει αλματώδη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια. Οι λόγοι της εκτεταμένης εκτροφής του είναι η μεγάλη προσαρμοστικότητα του σε συνθήκες καλλιέργειας και η γρήγορη ανάπτυξή του. Ταυτόχρονα με την ευρεία καλλιέργειά του αναπτύχθηκε και η έρευνα γύρω από τον οργανισμό η οποία βοηθά στη κατανόηση της βιολογίας του (Πασπάτης, 1992).

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ- ΥΛΙΚΑ

2.1. Πειραματικές Εγκαταστάσεις

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι δεξαμενών διαφορετικής χωρητικότητας. Μικρές δεξαμενές χωρητικότητας 60 λίτρων στις οποίες πραγματοποιήθηκαν προπείραματα εκτίμησης των απαιτούμενων συγκεντρώσεων τοξικών, που θα επέφεραν το θεμιτό τοξικολογικό αποτέλεσμα, όπως αυτό περιγράφεται στην εισαγωγή, και μεγαλύτερες δεξαμενές χωρητικότητας 500 λίτρων (δεξαμενές πάχυνσης) στις οποίες τοποθετήθηκε μεγαλύτερος αριθμός ατόμων με σκοπό τη δημιουργία στατιστικά αποδεκτού αποτελέσματος.

2.1.1. Δεξαμενές 500 λίτρων

Οκτώ δεξαμενές χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες του πειράματος, χωρητικότητας 500 λίτρων, κυλινδρικού σχήματος για την αποφυγή δημιουργίας νεκρών ζωνών, και με εσωτερικό σκούρο χρώμα για την μείωση ευδοκίμησης μικροοργανισμών. Τροφοδοτούνται από μείγμα θαλασσινού νερού (αλατότητας περίπου 40‰) και υφάλμυρου νερού από πηγάδι (αλατότητας περίπου 20‰). Η ροή του νερού που εισάγεται σε κάθε δεξαμενή προσαρμόζεται στις ανάγκες διατήρησης σταθερής αλατότητας περίπου 38‰, ούτως ώστε να προσομοιώνει τις τιμές του φυσικού περιβάλλοντος. Η εισαγωγή του νερού γίνεται σε πλάγια θέση και όχι κάθετα προς τα τοιχώματα προς αποφυγή ζωνών ανοξίας.

Στην αίθουσα υπάρχει κεντρικό σύστημα αερισμού με το οποίο εισάγεται ατμοσφαιρικός αέρας σε κάθε δεξαμενή, ούτως ώστε να διατηρούνται οι τιμές διαλυμένου οξυγόνου σε ανεκτά επίπεδα. Σε περίπτωση που δημιουργηθεί πρόβλημα έλλειψης οξυγόνου υπάρχει σύστημα ασφαλείας με το οποίο δύνανται να εισαχθεί καθαρό οξυγόνο από φιάλες. Τμήμα του συγκεκριμένου συστήματος χρησιμοποιήθηκε για την οξυγόνωση των δεξαμενών κατά την παρούσα μελέτη. Ο αέρας μεταφέρεται στις δεξαμενές μέσω εύκαμπτων σωλήνων που καταλήγουν σε πέτρες διάχυσης. Η ροή ρυθμίζεται με βάνες. Οι υπόλοιποι αβιοτικοί παράγοντες που χαρακτηρίζουν τις χημικές και βιολογικές ιδιότητες του νερού όπως η θερμοκρασία, το pH, η χημική σύνθεση κ.ά. εξαρτώνται από τις ιδιότητες του εισαχθέντος ύδατος.

2.1.2. Δεξαμενές Προπείραματων

Χρησιμοποιήθηκαν ακόμα πλαστικές δεξαμενές χωρητικότητας 60 λίτρων. Έχουν σχήμα κυλινδρικό και δεν υπάρχει σύστημα συνεχούς εισαγωγής ύδατος. Η αλατότητα εξαρτάται από αυτή των μεγαλύτερων δεξαμενών απ'όπου γεμίζονται. Ο σκοπός της χρήσης τους συνοψίζεται στα παρακάτω σημεία:

- ♦ Μείωση του ποσοστού θανατωμένων ψαριών, τουλάχιστον σε στάδιο όπου δεν υπάρχει αναγκαιότητα για στατιστικά αποδεκτό δείγμα.
- ♦ Αυξημένη λειτουργικότητα, λόγω μειωμένου όγκου νερού και κατά συνέπεια μεγαλύτερη ακρίβεια στις εισαχθείσες συγκεντρώσεις τοξικών.
- ♦ Περιορισμός των εσφαλμένων αποτελεσμάτων λόγω τριτογενών παραγόντων, π.χ. ατυχήματα όπως διαρροές, λανθασμένο άνοιγμα της βάνας νερού κ.ά.

- ♦ Επιλογή των ατόμων με σκοπό την αντικειμενικότερη εξέλιξη του πειράματος λόγω ομοίου μεγέθους, απόρριψη ασθενών ατόμων και κατά συνέπεια μείωση της πιθανότητας κανιβαλισμού.

2.1.3. Εισαγωγή Ψαριών

Τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες του πειράματος προήλθαν από απόθεμα (stock) του Ι.ΘΑ.ΒΙ.Κ. το οποίο περιελάμβανε μεικτό πληθυσμό ατόμων ομοίου βάρους 263g. Τα ψάρια είχαν εγκλιματιστεί σε συνθήκες εκτροφής και έτσι δεν είχε απαιτηθεί παρά μόνο διάστημα μίας εβδομάδας για να εγκλιματιστούν μετά τη μεταφορά τους από τις δεξαμενές αποθέματος. Επελέγη ιχθυοφόρτιση της τάξης των 8 Kg m^{-3} για την τήρηση της οποίας τοποθετήθηκαν 4 άτομα σε κάθε δεξαμενή των 60 λίτρων και 20 σε κάθε δεξαμενή των 500 λίτρων.

2.2. Προετοιμασία Διαλυμάτων Τοξικών

Δύο είδη τοξικών εισήχθησαν στις δεξαμενές. Και τα δύο ανήκουν στα ευρέως χρησιμοποιούμενα μέσα ανάπτυξης και προστασίας γεωργικών καλλιεργειών. Το πρώτο είναι το υπερφωσφορικό κοκκώδες λίπασμα 0 - 46 - 0 και το δεύτερο το Hostaquick 55 E.C., ένα κοινό οργανοφωσφορικό διασυστηματικό παρασιτοκτόνο.

2.2.1. Διάλυμα Υπερφωσφορικού Λιπάσματος

Το γεωργικό λίπασμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν κοκκώδες υπερφωσφορικό, τύπου 0 - 46 - 0, όπου προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε οξείδιο του θείου σε 46%, όπως αναγράφεται στη συσκευασία. Ο χημικός τύπος της δραστικής ουσίας είναι P_2O_5 με Μοριακό Βάρος $(31 \times 2) + (16 \times 5) = 142$. Έτσι για την δημιουργία των απαιτούμενων συγκεντρώσεων χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος τύπος:

$$x = a/0.46$$

όπου x: το βάρος του λιπάσματος που θα εισαχθεί (g)

a: η ζητούμενη συγκέντρωση P_2O_5 σε κάθε λίτρο νερού ($g l^{-1}$)

Αφού προσδιοριστεί η τιμή του x για κάθε συγκέντρωση, πολλαπλασιάζεται με τον όγκο κάθε δεξαμενής, δηλαδή με τον αριθμό των εισαχθέντων λίτρων νερού. Στην περίπτωση των πειραμάτων ο όγκος περιορίστηκε σε 50 λίτρα, ενώ στα κυρίως πειράματα ο όγκος ήταν 500 λίτρα.

2.2.2. Διάλυμα Οργανοφωσφορικού Παρασιτοκτόνου

Το παρασιτοκτόνο που χρησιμοποιήθηκε ήταν οργανοφωσφορικό διασυστηματικό εντομοκτόνο, τύπου "Hostaquick 55 E.C. heptenophos". Η σύνθεσή του όπως αναγράφεται στη συσκευασία είναι η εξής:

heptenophos	55.00% β/ο
βοηθητικές ουσίες	46.20% β/β

Για τη δημιουργία των ζητούμενων συγκεντρώσεων χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος τύπος:

$$x = a/0.55$$

όπου x: ο όγκος του εισαχθέντος παρασιτοκτόνου (ml)

a: η ζητούμενη συγκέντρωση δραστικής ουσίας σε κάθε λίτρο νερού ($g l^{-1}$)

Αφού προσδιοριστεί η τιμή του x για κάθε συγκέντρωση, πολλαπλασιάζεται με τον όγκο της εκάστοτε δεξαμενής.

Πρέπει να σημειωθεί ότι επί της συσκευασίας τονίζεται η επιγραφή "ΤΟΞΙΚΟ ΓΙΑ ΤΑ ΨΑΡΙΑ".

2.3. Προετοιμασία Πειραματικών Δεξαμενών

2.3.1. Δεξαμενές 60 λίτρων

Προ της έναρξης του πειράματος οι δεξαμενές καθαρίστηκαν με απορρυπαντικό, απολυμάνθηκαν με χλώριο και ξεπλύθηκαν εκτενώς. Ουδέποτε χρησιμοποιήθηκε σύστημα εμπλουτισμού με καθαρό οξυγόνο παρά μόνο το υπάρχον σύστημα αερισμού με ατμοσφαιρικό αέρα. Αυτό έγινε λόγω μειωμένου όγκου νερού και περιορισμένης κατανάλωσης οξυγόνου. Για λόγους χρηστικότητας εισήχθησαν 50 λίτρα νερού σε κάθε δεξαμενή. Έτσι ήταν απαραίτητη η μέτρηση του ακριβούς όγκου νερού χρησιμοποιώντας beakers των 5 λίτρων.

2.3.2. Δεξαμενές 500 λίτρων

Προ της έναρξης του πειράματος οι δεξαμενές καθαρίστηκαν και απολυμάνθηκαν με χλώριο. Αφού πλύθηκαν εκτενώς για την πλήρη απομάκρυνση του χλωρίου και των απορρυπαντικών και μετά από πλήρες γέμισμα, η ροή του νερού διακόπηκε για να αποφευχθεί η ανανέωση, η οποία θα είχε ως αποτέλεσμα την διατάραξη της σταθερότητας στη συγκέντρωση των τοξικών. Προς αποφυγή του κινδύνου εσφαλμένης έναρξης ροής τοποθετήθηκε σήμανση σε κάθε βάνα. Η διατήρηση των ανεκτών τιμών οξυγόνου - σε όμοια επίπεδα με τις δεξαμενές συνεχούς ροής - επετεύχθη εισάγοντας καθαρό οξυγόνο μαζί με ατμοσφαιρικό αέρα.

2.4. Εισαγωγή Διαλυμάτων Τοξικών

2.4.1. Επιλογή Συγκεντρώσεων Λιπάσματος στο Προπείραμα

Αρχικά εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις των 2.0g l^{-1} , 5.0g l^{-1} και 0.0g l^{-1} (μάρτυρες) σε μικρό αριθμό ψαριών - duplicates των τεσσάρων ατόμων - στις μικρές δεξαμενές των 60 λίτρων. Η επιλογή του κατώτερου ορίου συγκέντρωσης (2.0g l^{-1}) έγινε τυχαία, ενώ η ανώτερη τιμή (5.0g l^{-1}) οριοθετήθηκε βάσει οπτικής παρατήρησης της αυξημένης θολερότητας του ύδατος όπως επίσης και βάσει της δημιουργίας αυξημένων ποσοτήτων ιζήματος στον πυθμένα.

Στη δεύτερη σειρά προπειραμάτων, μετά από ολική θνησιμότητα σε όλες τις δεξαμενές, χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις των 0.25g l^{-1} , 0.5g l^{-1} , 0.75g l^{-1} , 1.0g l^{-1} και 0.0g l^{-1} (μάρτυρες). Μετά από ανεπιτυχές αποτέλεσμα μηδενικού αριθμού θανάτων έγινε και τρίτη προσπάθεια χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις 1.25g l^{-1} , 1.5g l^{-1} , 1.75g l^{-1} και 0.0g l^{-1} (μάρτυρες) όπου και σημειώθηκε το ζητούμενο αποτέλεσμα στην συγκέντρωση των 1.5g l^{-1} . Η συγκέντρωση των 1.5g δραστικής ουσίας (P_2O_5) / λίτρο νερού εκφράζεται σε καθαρούς αριθμούς βάρους μείγματος λιπάσματος ανά δεξαμενή ως 163g λιπάσματος σε κάθε δεξαμενή 60 λίτρων.

Σύνοψη των τριών σειρών πειραμάτων με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις φαίνεται στον Πίνακα II.i-1 του παραρτήματος II.i.

Νεκρά άτομα από όλες τις συγκεντρώσεις διατηρήθηκαν σε καταψύκτη με σκοπό την ιστολογική εξέταση ήπατος και βραγχίων, όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.4.1.1. Εισαγωγή των Προκαθορισμένων Συγκεντρώσεων Λιπάσματος σε Δεξαμενές 500 λίτρων

Σε μία προσπάθεια απόκτησης στατιστικά αποδεκτού αποτελέσματος τοποθετήθηκαν 20 άτομα σε κάθε μία από τις δύο δεξαμενές χωρητικότητας 500 λίτρων. Τα πειράματα έγιναν σε διπλές επαναλήψεις (duplicates). Ταυτόχρονα με τις δεξαμενές του λιπάσματος υπήρχαν και duplicates δεξαμενές μαρτύρων κάτω από όμοιες περιβαλλοντικές συνθήκες, δηλαδή σε αναστολή της ροής νερού. Συνολικά εισήχθησαν 1630g λιπάσματος σε κάθε δεξαμενή εις τρόπον ώστε να συγκεντρωθούν 1.5g δραστικής ουσίας σε κάθε λίτρο νερού. Κάθε μέτρηση βάρους έγινε σε ζυγό ακριβείας. Για να επιτευχθεί πλήρης ανάμειξη του μείγματος με το μέσον δεν έγινε εισαγωγή του συνόλου του τοξικού στις δεξαμενές, αλλά προηγήθηκε σταδιακή διάλυση σε μικρότερα δοχεία, κυρίως προς αποφυγή δημιουργίας ιζήματος στον πυθμένα των δεξαμενών. Για λόγους αποφυγής stress πρώτα τοποθετήθηκαν τα ψάρια στις δεξαμενές και στη συνέχεια ακολούθησε η εισαγωγή του τοξικού. Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκε καθαρό οξυγόνο ως βοήθημα της οξυγόνωσης του νερού.

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου απομακρύνονταν τυχόν νεκρά άτομα προς αποφυγή εστιών μολύνσεων. Με τη λήξη του πειράματος, μετά 96 ώρες, τέσσερα ζωντανά άτομα από κάθε δεξαμενή, συμπεριλαμβανομένης και αυτής των μαρτύρων, αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη για να χρησιμοποιηθούν αργότερα σε ιστολογικές τομές.

2.4.2. Επιλογή Συγκεντρώσεων Παρασιτοκτόνου στο Προπείραμα

Οι αρχικές συγκεντρώσεις ήταν αυτές των 1.0mg l^{-1} , 1.25mg l^{-1} , 1.5mg l^{-1} και 0.0mg l^{-1} (μάρτυρες) οι οποίες επελέγησαν βάσει βιβλιογραφικών αναφορών (βλ. εισαγωγή). Σε κάθε σειρά πειραμάτων υπήρχαν δύο επαναλήψεις (duplicates) για κάθε μία συγκέντρωση. Τέσσερα άτομα εισήχθησαν σε κάθε δεξαμενή των 60 λίτρων, για να εκτιμηθεί η 96h LC50. Μετά από μη αποδεκτά αποτελέσματα έγινε δεύτερη σειρά προπειραμάτων με συγκεντρώσεις 2.0mg l^{-1} , 2.5mg l^{-1} , 3.0mg l^{-1} και 0.0mg l^{-1} όπου επετεύχθη και το επιθυμητό αποτέλεσμα. Σύνοψη των δύο σειρών προπειραμάτων με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις φαίνεται στον Πίνακα II.i-2 του Παραρτήματος II.i.

2.4.2.1. Εισαγωγή Προκαθορισμένων Συγκεντρώσεων Παρασιτοκτόνου σε Δεξαμενές 500 λίτρων

Με σκοπό τη δημιουργία αριθμητικά σημαντικού αποτελέσματος τοποθετήθηκαν 20 άτομα σε κάθε μία από τις δύο δεξαμενές χωρητικότητας 500 λίτρων. Ο εισαχθείς όγκος τοξικού σε κάθε δεξαμενή ήταν 2.5ml παρασιτοκτόνου που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 2.75mg δραστικής ουσίας ανά λίτρο νερού.

Οι αραιώσεις από το αρχικό διάλυμα έγιναν χρησιμοποιώντας bunsen pipette fillers των 200 μονάδων. Ως αρχικός διαλύτης - για την μεταφορά των αραιωμένων διαλυμάτων από το εργαστήριο στις δεξαμενές - χρησιμοποιήθηκε το απεσταγμένο νερό. Η πλήρης ανάμειξη του διαλύματος στις δεξαμενές εξασφαλιζόταν από την κυκλική κίνηση της ομάδας των ψαριών. Όπως και στο πείραμα που αφορά στο λίπασμα, για λόγους αποφυγής stress στα ψάρια, η εισαγωγή του τοξικού ακολούθησε αυτή των ψαριών.

Κατά τη διάρκεια των 96 ωρών της πειραματικής περιόδου γινόταν συνεχής καταγραφή της θερμοκρασίας και διαλυμένου οξυγόνου. Ταυτόχρονα με τις δεξαμενές του παρασιτοκτόνου υπήρχαν και duplicates δεξαμενές μαρτύρων κάτω από όμοιες περιβαλλοντικές συνθήκες. Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκε καθαρό οξυγόνο ως βοήθημα της οξυγόνωσης του νερού.

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου απομακρύνονταν τυχόν νεκρά άτομα προς αποφυγή εστιών μολύνσεων. Με τη λήξη του πειράματος, μετά 96 ώρες, τέσσερα ζωντανά άτομα από κάθε δεξαμενή, συμπεριλαμβανομένης και αυτής των μαρτύρων, αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη για να χρησιμοποιηθούν αργότερα στις ιστολογικές τομές.

2.4.2.2. Εισαγωγή Συνδυασμού Λιπάσματος - Παρασιτοκτόνου

Στο τρίτο ζεύγος δεξαμενών χωρητικότητας 500 λίτρων έγινε εισαγωγή συνδυασμού τοξικών. Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συγκεντρώσεις τοξικών με αυτές των προηγούμενων πειραμάτων, δηλαδή 2.75mg l^{-1} παρασιτοκτόνου και 1.5g l^{-1} λιπάσματος ταυτόχρονα. Σκοπός ήταν να καταγραφεί η θνησιμότητα και να παρατηρηθούν τυχόν παρεκκλίσεις από τη μέση τιμή των προηγούμενων πειραμάτων. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε 72 ώρες εμφανίστηκαν νεκρά άτομα στην επιφάνεια των δεξαμενών. Καθώς απαιτείται χρονική περίοδος περίπου 24 ωρών μετά τον θάνατο για την ανάδυση των νεκρών ατόμων από τον πυθμένα στην επιφάνεια, συμπεράναμε ότι όλος ο πληθυσμός των ψαριών θανατώθηκε σε λιγότερο από 48 ώρες. Κατά συνέπεια δεν προβήκαμε σε λήψη ιστολογικών τομών καθώς οι ιστοί πρέπει να λαμβάνονται από ζωντανά ή άμεσα θανατωθέντα άτομα. Σημειώνεται ότι ήταν αδύνατος ο υπολογισμός του ακριβούς χρόνου θανάτου λόγω πλήρους έλλειψης ορατότητας στις δεξαμενές. Έτσι τα νεκρά άτομα προσδιορίστηκαν αφού εμφανίστηκαν στην επιφάνεια.

2.5. Έλεγχος Περιβαλλοντικών Συνθηκών Κατά τη Διάρκεια των Πειραμάτων

2.5.1. Θερμοκρασία, Αλατότητα και Διαλυμένο Οξυγόνο

Σε όλη τη διάρκεια της μελέτης υπήρχε συνεχής καταμέτρηση των ανωτέρω παραγόντων σε καθημερινή βάση. Η θερμοκρασία και το διαλυμένο οξυγόνο μετρήθηκαν με το ίδιο όργανο και η αλατότητα με αλατόμετρο. Πίνακες με τα κατεγραμμένα δεδομένα βρίσκονται στον Πίνακα 3.1-1. Οι τιμές του διαλυμένου οξυγόνου και της θερμοκρασίας βρισκόταν σε μόνιμη σύγκριση με αυτές των δεξαμενών συνεχούς ροής, σε μια προσπάθεια περιορισμού της απόκλισης από τις κανονικές συνθήκες διαβίωσης των ψαριών.

2.5.2. Έλεγχος Λοιπών Παραγόντων

Το τάισμα των ψαριών διακόπηκε καθόλη τη διάρκεια του χρόνου μελέτης, τόσο στα προπειράματα - στις δεξαμενές των 60 λίτρων - όσο και στα κυρίως πειράματα - στις δεξαμενές των 500 λίτρων. Αυτό έγινε με σκοπό την απουσία τριτογενών παραγόντων - όπως η πιθανή προσκόλληση τοξικών στην τροφή και κατάποση αυτής, εισαγωγή τοξικών στο πεπτικό σύστημα, μεταβολισμός και δημιουργία περιττωμάτων - στην τοξικότητα των δραστικών ουσιών.

2.6. Μεθοδολογία Ιστολογικών Τομών

Χρησιμοποιήθηκε ιστός ήπατος και βραγχίων. Το ήπαρ είναι ένας μεγάλος αδένας που βρίσκεται πάνω από το στομάχι και είναι τρίλοβο. Η λειτουργικότητά του περιλαμβάνει την έκκριση της χολής, την αποθήκευση γλυκογόνου και άλλες βιοχημικές λειτουργίες (Νεοφύτου, 1990). Το ήπαρ επιλέγεται και λόγω της ιδιότητάς του ως βιολογικού φίλτρου από το οποίο αποσπώνται και συγκρατώνται πολλές ουσίες που βρίσκονται στο αίμα. Έτσι αλλοίωση του ιστού μετά το τέλος των πειραμάτων θα πρότεινε επίπτωση της τοξικής δράσης των χρησιμοποιούμενων ουσιών.

Η ανταλλαγή αερίων γίνεται από τα βράγχια τα οποία βρίσκονται στη βραγχιακή κοιλότητα και καλύπτονται από τα βραγχιακά οστέινα κινητά καλύμματα. Μέσα σε κάθε βραγχιακή κοιλότητα υπάρχουν τέσσερις βραγχιακές μονάδες. Κάθε βραγχιακή μονάδα αποτελείται από ένα άκαμπτο οστέινο τόξο που στην εξωτερική επιφάνειά του υπάρχουν τα πρωτογενή βραγχιακά νημάτια σε δύο σειρές και στην εσωτερική οι βραγχιακάνθες (Σχήμα 2.6-1) (Νεοφύτου, 1990). Αλλοίωση στη μορφολογία του ιστού είναι ένδειξη πιθανής δράσης τοξικών ουσιών.

2.6.1. Τοποθέτηση Ψαριών σε Θερμοκρασία Συντήρησης

Με τη λήξη των πειραμάτων στην αίθουσα δεξαμενών έγινε τυχαία επιλογή τεσσάρων ζωντανών ατόμων από κάθε δεξαμενή. Τα άτομα τοποθετήθηκαν άμεσα σε καταψύκτη όπου επήλθε γρήγορος θάνατος λόγω shock μεταβολής θερμοκρασίας. Χρησιμοποιήθηκαν πλαστικές σακούλες, μία για κάθε τετράδα, οι οποίες έφεραν επιγραφή με ημερομηνία έναρξης της πειραματικής περιόδου, χρονική περίοδο του πειράματος (πάντα 96h), ποσοστό νεκρών στη δεξαμενή και ονοματεπώνυμο υπευθύνου. Όταν υπήρξε ανάγκη χρησιμοποίησης των δειγμάτων, αυτά αφέθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρις ότου ήταν εφικτή η έναρξη της διαδικασίας τομών. Ουδέποτε τα άτομα παρέμειναν στον καταψύκτη για χρονική περίοδο μεγαλύτερη των 30 ημερών.

2.6.2. Προετοιμασία Ιστών για Ιστολογική Μελέτη

2.6.2.1. Απομάκρυνση και κοπή ήπατος

Κατά την απομάκρυνση του ήπατος το άτομο τοποθετήθηκε σε πλάγια θέση. Πρώτα έγινε μία τομή στην κοιλιακή χώρα από την έδρα μέχρι τα κοιλιακά πτερύγια, ημικυκλικά από την έδρα μέχρι το ανώτερο τμήμα του βραγχιακού επικαλύμματος και τέλος, από το κοιλιακό πτερύγιο κατά μήκος του βραγχιακού επικαλύμματος. Κατά αυτόν τον τρόπο αποκαλύφθηκε μεγάλο τμήμα του ήπατος και συγκεκριμένα - με ελαφρά πίεση εκ των έσω - ο μεσαίος λοβός, ο οποίος και απομακρύνθηκε (βλ. Φωτογραφίες 2.6.2.1-1). Οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια με φορμόλη. Για την όλη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν λαβίδες, ψαλίδι και νηστέρι. Μετά από 24h κατά τις οποίες παρέμεινε σχεδόν ολόκληρος ο μεσαίος λοβός σε φιαλίδιο φορμόλης, απομακρύνθηκαν και κόπηκαν φέτες πάχους περίπου 3-4mm οι οποίες τοποθετήθηκαν σε κασετίνες μίας χρήσεως. Ακολούθησε εισαγωγή όλων των κασετίνων σε δοχείο με φορμόλη.

2.6.2.2. Απομάκρυνση και κοπή βραγχίων

Με ελαφρά ανύψωση του βραγχιακού επικαλύμματος αποκαλύφθηκαν τα βράγχια εκ των οποίων απομακρύνθηκε ένα από κάθε πλευρά του ζώου. Τα τμήματα τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια με bouin (βλ. Παράρτημα II.iii) όπου και παρέμειναν για 24h. Για την όλη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν λαβίδες, ψαλίδι και νηστέρι. Μετά 24h παραμονής των βραγχίων σε bouin ακολούθησε κοπή σε μικρότερα τμήματα και τοποθέτηση σε κασετίνες μίας χρήσεως. Όλες οι κασετίνες μπήκαν σε δοχείο με χημικό απασβέστωσης (decalcifier). Το decalcifier άλλαζε κάθε μέρα. Μετά 4 ημέρες τα δείγματα ήταν έτοιμα για το στάδιο της αφυδάτωσης.

2.6.2.3. Αφυδάτωση Ιστών σε Ιστοκινέτα

Η διαδικασία αφυδάτωσης αποτελείται από σειρά εμβαπτίσεων στα διαλύματα που φαίνονται στο Παράρτημα II.iv. Οι κασετίνες τοποθετήθηκαν σε ειδικό εξάρτημα - κουτί το οποίο με τη σειρά του τοποθετήθηκε σε ιστοκινέτα Shandon, τύπου Gladel 1000. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν αυτό της ξυλόλης και τα στάδια με τις αντίστοιχες χρονικές περιόδους φαίνονται στο Παράρτημα II.iv (πρόγραμμα λειτουργίας C). Σκοπός της αφυδάτωσης ήταν να απομακρυνθεί το νερό από τους ιστούς και να εισαχθούν σε παραφίνη, η οποία αποτέλεσε και το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας αφυδάτωσης. Το επόμενο στάδιο ήταν αυτό της έγκλισης.

2.6.2.4. Έγκλιση Ιστών σε Παραφίνη

Η διαδικασία της έγκλισης έγινε σε μηχανήμα Leica, τύπου Jung Histoembedder. Οι κασετίνες με τους αφυδατωμένους ιστούς τοποθετήθηκαν σε ειδικό δοχείο με υγρή παραφίνη προς αποφυγή πήξης της υπάρχουσας παραφίνης όπως αυτή είχε παραμείνει από την προηγούμενη διαδικασία της αφυδάτωσης. Η κάθε κασετίνα ανοίχθηκε χρησιμοποιώντας λαβίδα, ο ιστός τοποθετήθηκε σε μολυβένιο δοχείο στο οποίο χύθηκε υγρή παραφίνη. Κλείστηκαν δε με το καπάκι από τις πλαστικές κασετίνες. Όλα τα μολυβένια δοχεία μεταφέρθηκαν στην ψυχρή πλάκα του μηχανήματος όπου στερεοποιείται η παραφίνη. Σε περίπτωση που, λόγω πήξης, δημιουργόντουσαν κενά κάτω από το καπάκι, αυτά συμπληρώνονταν με υγρή παραφίνη. Προσοχή δόθηκε ώστε να εφάπτεται ο ιστός επί του πάτου του μολυβένιου δοχείου. Στη συνέχεια αφαιρέθηκαν τα δοχεία και απομακρύνθηκε η στερεοποιημένη παραφίνη από τις άκρες του block. Οι στερεοποιημένοι ιστοί ήταν έτοιμοι για να εισαχθούν στη διαδικασία κοπής ιστολογικών τομών.

2.6.3. Κοπή Ιστολογικών Τομών

2.6.3.1. Κοπή και επεξεργασία τομών σε 20 μm (Trimming) και 7 μm

Για την κοπή τομών χρησιμοποιήθηκε μικροτόμος Leica τύπου Jung Bicut. Στο πρώτο στάδιο της διαδικασίας απαιτήθηκε να γίνει trimming του block παραφίνης. Το δείγμα δέχτηκε κοπή από τη λεπίδα σε διαστήματα 20 μm, μέχρις ότου εμφανίστηκε ο ιστός στην τομή. Προσοχή δόθηκε να μην κοπεί περισσότερο από την αρχική του εμφάνιση. Τα blocks επανατοποθετήθηκαν σε ψυχρή πλάκα για τη βελτιστοποίηση της κοπής τομών. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν ξανά στη μικροτόμο και άρχισε η διαδικασία κοπής με σκοπό την απόσπαση μεγίστης επιφανείας ιστού επί της τομής. Στη συνέχεια οι τομές απλώθηκαν σε θερμό μπάνιο

χρησιμοποιώντας λαβίδα με ισχνά άκρα και προσκολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρους. Οι αντικειμενοφόροι με τις προσκολλημένες τομές αφέθηκαν με ελαφρά κλίση σε απορροφητικό χαρτί για να αποστραγγιστεί ο μεγαλύτερος όγκος νερού. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε θερμή πλάκα όπου επήλθε εξάτμιση όλου του νερού. Τέλος οι τομές μεταφέρθηκαν σε φούρνο όπου αφέθηκαν στους 50°C για 15 λεπτά.

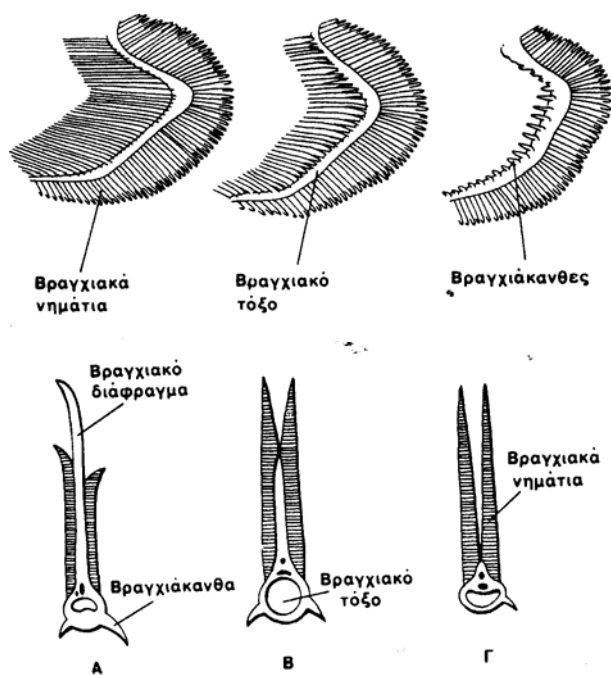
2.6.4. Χρώση τομών

Στη διαδικασία της χρώσης ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο αιματοξυλίνης - εωσίνης της οποίας διαλύματα με τους αντίστοιχους χρόνους παραμονής φαίνονται στο Παράρτημα II.iv. Γενικά η διαδικασία αποτελείται από τα εξής στάδια: αποπαραφίνωση, ενυδάτωση, χρώση αιματοξυλίνης, αφυδάτωση, χρώση εωσίνης, αφυδάτωση και διαύγηση. Αμέσως μετά τη χρώση έγινε προσκόλληση της καλυπτρίδας απλώνοντας βάλαμο Καναδά με γυάλινη ράβδο. Μετά 24 ώρες τα δείγματα ήταν μονιμοποιημένα και έτοιμα για παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

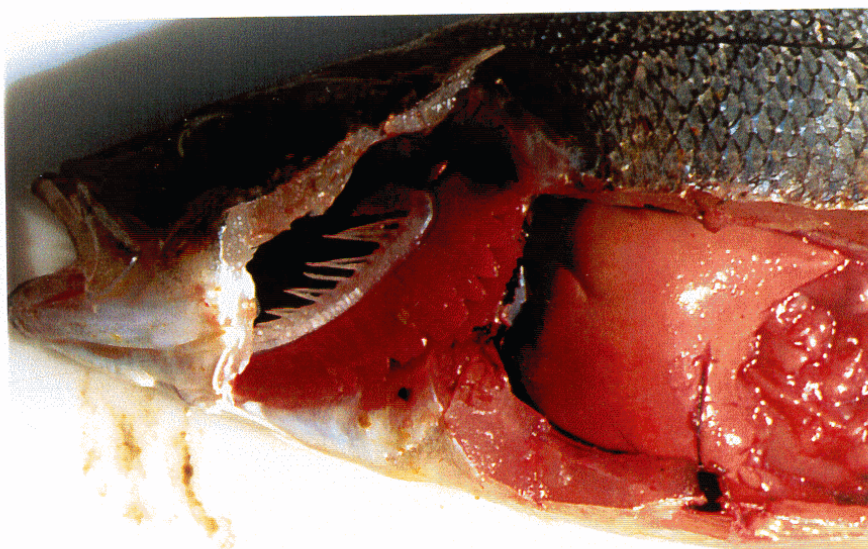
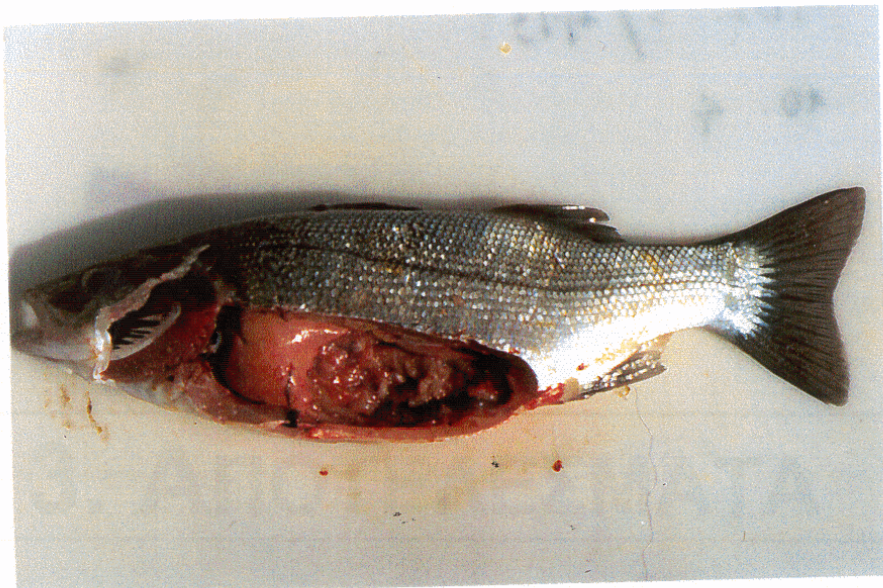
2.6.5. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο και λήψη φωτογραφιών

Η παρατήρηση έγινε σε μικροσκόπιο Olympus τύπου BH-2. Αρχικά έγινε γενική παρατήρηση σε μεγένθυση x10 και στη συνέχεια λεπτομερέστερη παρατήρηση σε μεγένθυση x40. Η λήψη φωτογραφιών έγινε με φωτογραφική μηχανή Olympus και στις δύο μεγενθύνσεις για τα δείγματα που έχουν ικανοποιητική χρώση. Επιλεγμένες φωτογραφίες των τομών φαίνονται στις παραγράφους 3.2.3-1 και 3.2.3-2.

Φωτογραφίες 2.6-1: Βραγχιακές μονάδες διαφόρων ψαριών (Α, Β, Γ τομές βραγχιακών μονάδων στα ελασμοβράγχια, οξύρυγχο και οσείχθυες, αντίστοιχα) (Νεφύτου, 1990)



Φωτογραφίες 2.6.2.1-1: Απομάκρυνση βραγχίων και ήπατος



2.7. Στατιστική Ανάλυση

2.7.1. Ανάλυση Διακύμανσης (Analysis of Variance, ANOVA)

Πρόκειται για μέθοδο σύμφωνα με την οποία γίνεται σύγκριση των μέσων όρων για περισσότερα από 2 δείγματα. Εφαρμόζεται σε περιπτώσεις που μία (ή περισσότερες) ανεξάρτητη μεταβλητή επιδρά στα δεδομένα ενός πειράματος με τη μορφή διαφορετικών συνθηκών (επιπέδων της ανεξάρτητης μεταβλητής) και εξετάζει τη μηδενική υπόθεση H_0 , σύμφωνα με την οποία δεν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των επιπέδων. Η ANOVA καταλήγει σε μία αριθμητική τιμή, το F-κριτήριο και στην πιθανότητα p που ισχύει αυτή η τιμή. Αυτά τα στοιχεία δίνουν τη δυνατότητα σύγκρισης με το F θεωρητικό (για $p=0.05$), ώστε να απορριφθεί ή να αποδειχθεί η H_0 και κατά προέκταση να δειχθεί εάν η επίδραση της ανεξάρτητης μεταβλητής στη μεταβολή των δεδομένων είναι σημαντική ή όχι (Πασπάτης, 1992).

2.7.2. Μέθοδος Πολλαπλών Συγκρίσεων

Είναι διαδικασία που ακολουθεί την ANOVA. Αφού δειχθεί ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων μιας μεταβλητής, τότε η μέθοδος αυτή εξετάζει όλα τα πιθανά ζεύγη μεταξύ των επιπέδων και αποφαίνεται που υπάρχουν σημαντικές διαφορές. Στην στατιστική χρησιμοποιούνται πολλοί τρόποι για πολλαπλές συγκρίσεις. Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος Scheffe, η οποία είναι και η πιο αυστηρή από όλες (Πασπάτης, 1992).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Φυσικοχημικές Συνθήκες Μελέτης

3.1.1. Θερμοκρασία & Αλατότητα

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων διεξάγετο συνεχής καταγραφή των φυσικοχημικών παραμέτρων, όπως της θερμοκρασίας, της αλατότητας και του διαλελυμένου οξυγόνου (DO). Στον Πίνακα 3.1-1 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Η θερμοκρασία και η αλατότητα κυμάνθηκαν σε επίπεδα σταθερά. Οι μέσες τιμές για τη θερμοκρασία και την αλατότητα ήταν 24.28 °C και 37.4 ‰ αντίστοιχα.

3.1.2. Διαλελυμένο Οξυγόνο

Οι τιμές διαλελυμένου οξυγόνου μετά την εισαγωγή παρασιτοκτόνου κυμάνθηκαν γύρω από τη μέση τιμή των 6.14 mg/l. Η αντίστοιχη μέση τιμή μετά την εισαγωγή λιπάσματος ήταν 8.6 mg/l και μετά την εισαγωγή συνδυασμού τοξικών ήταν 7.21 mg/l. Στους δε μάρτυρες η μεσή τιμή διαλελυμένου οξυγόνου ήταν 8.2 mg/l (βλ. Πίνακα 3.1-1).

3.2. Αποτελέσματα Θνησιγόνου Δράσης Τοξικών

3.2.1. Σύνολα Νεκρών ανά Ημέρα

Στον Πίνακα 3.2-1 παρατίθενται αριθμητικά τα αποτελέσματα της θνησιγόνου δράσης των τοξικών. Το μεγαλύτερο ποσοστό νεκρών παρουσιάστηκε μετά την εισαγωγή συνδυασμού τοξικών όπου θανατώθηκε ανελλιπώς το σύνολο των ατόμων και στις δύο δεξαμενές. Το δε ελάχιστο ποσοστό νεκρών βρέθηκε στις δεξαμενές των μαρτύρων με μηδενικό τοξικολογικό αποτέλεσμα, αποδεικνύοντας ότι τα αίτια θανάτου ήταν άλλα από τις συνθήκες του περιβάλλοντος των δεξαμενών. Ο μέσος όρος θανατωμένων ατόμων για την εισαγωγή λιπάσματος, παρασιτοκτόνου και συνδυασμού τους μετά περίοδο 96 ωρών ήταν 67.5%, 30.14% και 100.00% αντίστοιχα. Το υψηλότερο ποσοστό θανάτων στην περίπτωση της εισαγωγής συνδυασμού τοξικών παρουσιάζει ενδείξεις συνεργιστικής δράσης τοξικών. Λόγω περιορισμένου χρόνου και μέσων ήταν αδύνατη η περαιτέρω μελέτη της θνησιγόνου δράσης και άρα η συγκεκριμενοποίηση της ακριβούς συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στην 96h LC50.

3.2.2. Ηθολογία του D. labrax μετά την Εισαγωγή Τοξικών

Τα ψάρια παρουσίασαν τελείως διαφορετική συμπεριφορά αναλόγως με το είδος του εισαχθέντος τοξικού. Και στις τρεις περιπτώσεις όμως υπήρχαν ενδείξεις stress. Αμέσως μετά την εισαγωγή του λιπάσματος, τα άτομα εμφανίστηκαν στην επιφάνεια της δεξαμενής διατηρώντας την συμπεριφορά του gulping. Προφανώς λόγω της περιορισμένης ορατότητας στο μέσον, όπως και της ύπαρξης υψηλής συγκέντρωσης σωματιδίων με μηχανικά αρνητικά αποτελέσματα στη φυσιολογία τους. Η συμπεριφορά κατά την διαδικασία θανάτου δεν ήταν δυνατόν να παρατηρηθεί λόγω της ελλειπούς ορατότητας. Όμοια συμπεριφορά παρουσίασαν και τα άτομα στις δεξαμενές του συνδυασμού τοξικών. Με την εισαγωγή παρασιτοκτόνου τα ψάρια χαρακτηρίστηκαν από ταχεία μετακίνηση προς κάθε κατεύθυνση, σε μία προσπάθεια διαφυγής. Αμέσως μετά επικράτησε ηρεμία μέχρι και το τέλος του πειράματος. Κατά τη διάρκεια του θανάτου τα ψάρια βυθίζονταν με προτεταμένα μέλη και ανοιχτά το στόμα και τα βραγχιακά επικαλύματα, προφανώς

σε κατάσταση τετάνου. Στη συνέχεια τα ψάρια επανέρχονταν στη φυσιολογική τους κατάσταση, μετά χρονικού διαστήματος έως 2 λεπτών. Η διαδικασία αυτή συνεχίζονταν σε 3-4 επαναλήψεις έως ότου επέλθει ο θάνατος.

3.2.3. Μικροσκοπική Εξέταση Οργάνων

Κατά την εξέταση του ιστολογικών τομών ήπατος σε μεγενθύνσεις x10 και x40 δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στη φυσιολογία των ιστών που είχαν δεχτεί τοξική δράση παρασιτοκτόνου και λιπάσματος, συγκριτικά με τους μάρτυρες (βλ. Φωτογραφίες 3.2.3-1). Η φυσιολογία τους παρέμεινε σταθερή, υπονοώντας αίτια θανάτου διαφορετικά από την τοξική δράση επί του ήπατος.

Μετά από μικροσκοπική εξέταση των βραγχιακών ιστολογικών τομών εξήχθη το συμπέρασμα ότι δεν υπήρχε τοξική δράση του παρασιτοκτόνου, τουλάχιστον σε επίπεδο τέτοιο που να γίνεται διακριτή με τη συγκεκριμένη εξέταση (βλ. Φωτογραφίες 3.2.3-2). Όσον αφορά στη δράση του γεωργικού λιπάσματος αυτή ήταν εμφανής περισσότερο σε επίπεδο μηχανικών επιπλοκών. Παρατηρήθηκε φθορά στα βραγχιακά ελάσματα η οποία οφείλεται στη συνεχή εισροή αιωρούμενων σωματιδίων στα βράγχια. Ο θάνατος επήλθε προφανώς από την άρση της ομαλής λειτουργίας των βραγχίων ως όργανα ανταλλαγής αερίων.

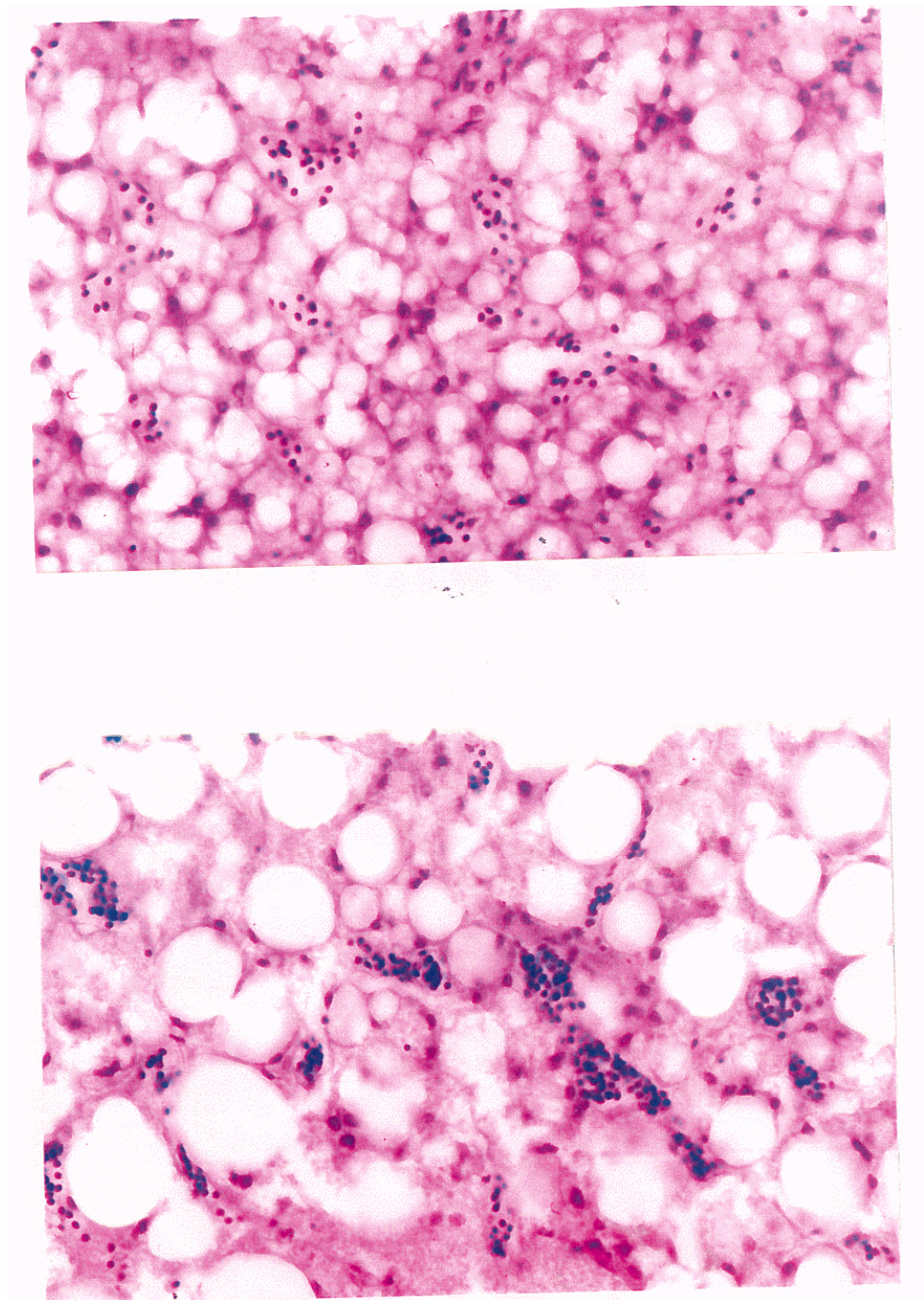
Πίνακας 3.1-1: Φυσιολογικές Συνθήκες μελέτης

Χρόνος (hr)	Θερμοκρασία (°C)	Αλατότητα (‰)	Λίπασμα 1,5 g/l	Λίπασμα 1,5 g/l	Διαλελυμένο Οξυγόνο (mg/l)							
					Παρασιτοκτόνο 2,75 mg/l	Παρασιτοκτόνο 2,75 mg/l	Παρασιτοκτόνο 2,75 mg/l	Παρασιτοκτόνο 2,75 mg/l	Ζυθοασαφής	Ζυθοασαφής	Μάρτυρες	Μάρτυρες
0 h	24.30	37.00	8.83	8.60	6.90	5.70	6.50	6.50	7.50	7.30	7.77	8.67
24 h	24.50	38.00	7.75	7.20	6.27	6.13	6.50	7.00	6.90	6.90	7.90	7.3
48 h	24.50	37.00	7.68	7.63	6.80	7.20*	6.75	7.10	7.00	7.00	7.83	7.95
72 h	24.60	37.00	6.00	8.70	6.75	6.33	6.80	7.60	7.30	7.30	8.00	8.1
96 h	23.50	38.00	10.10	13.60	6.60	6.50	6.90	-	-	-	9.20	9.3

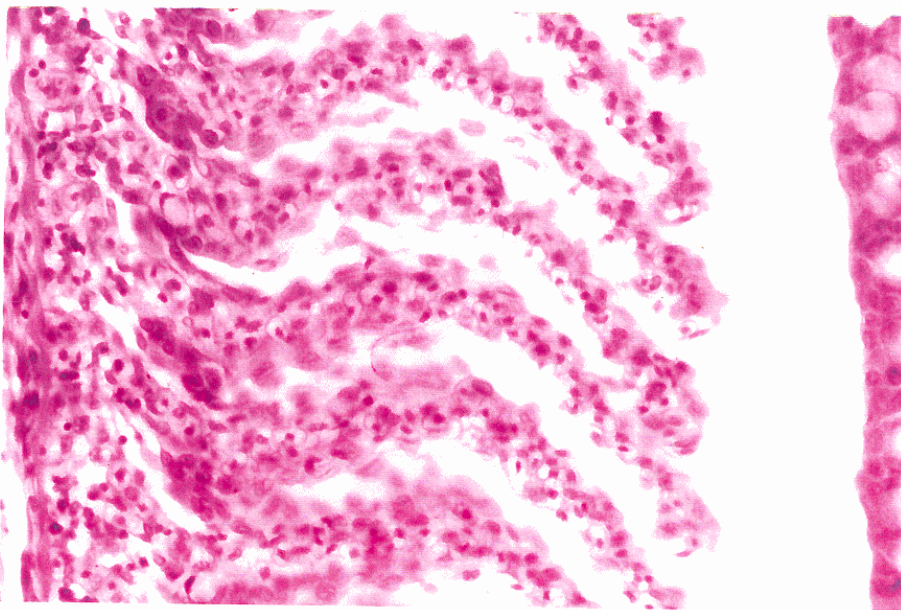
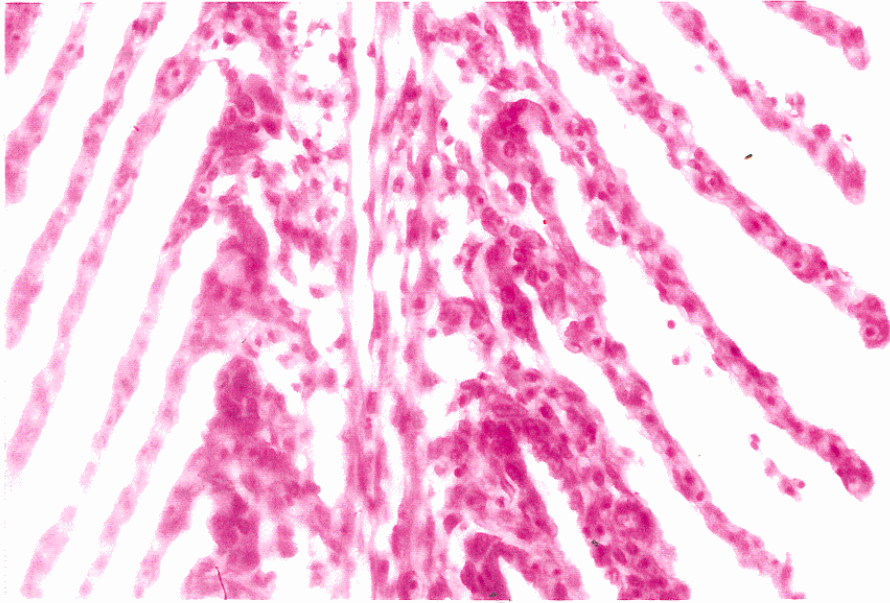
Πίνακας 3.2-1: Αποτελέσματα θνησιγόνου δράσης τοξικών

Χρόνος (h)	Τοξικολογικό Αποτέλεσμα	Είδος Τοξικού								
		Λίπασμα 1,5g/l	Λίπασμα 1,5g/l	Παρασιτοκτόνο 2,75 mg/l	Παρασιτοκτόνο 2,75 mg/l	Παρασιτοκτόνο 2,75 mg/l	Συνδυασμός	Συνδυασμός	Μάρτυρες	Μάρτυρες
0	Νεκρά	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	% Νεκρών	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24	Νεκρά	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	% Νεκρών	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
48	Νεκρά	8	0	5	3	3	20	20	0	0
	% Νεκρών	40.00	0.00	20.83	10.35	12.00	100.00	100.00	0.00	0.00
72	Νεκρά	6	3	2	2	4	20	20	0	0
	% Νεκρών	30.00	15.00	8.33	6.90	16.00	100.00	100.00	0.00	0.00
96	Νεκρά	3	7	0	0	4	0	0	0	0
	% Νεκρών	15.00	35.00	0.00	0.00	16.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Σύνολο Νεκρών	17	10	7	5	11	20	20	0	0
	% Συνόλου Νεκρών	85.00	50.00	29.17	17.24	44.00	100.00	100.00	0.00	0.00
	Ζωντανά	3	10	17	24	14	0	0	20	20
	Σύνολο Ψαριών	20	20	24	29	25	20	20	20	20

Φωτογραφίες 3.2.3-1: Ιστολογικές τομές ήπατος



Φωτογραφίες 3.2.3-2: Ιστολογικές τομές βραγχίων



3.3. Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Comment [P2]:

Μετά τη λήξη της σειράς πειραμάτων, έγινε στατιστική επεξεργασία δεδομένων με τη χρήση της Ανάλυσης της Διασποράς (Analysis of Variance, ANOVA). Ακολουθούν τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης:

3.3.1. Σύγκριση Αριθμού Θανάτων Μεταξύ των Τεσσάρων Treatments Χρησιμοποιώντας τον Μέσο Όρο Κάθε Ημέρας:

Αναλύοντας τα δεδομένα με βάση τα διαφορετικά treatments σε τέσσερις διαφορετικές ομάδες (λίπασμα, φυτοφάρμακο, συνδυασμός λιπάσματος και φυτοφαρμάκου και μάρτυρες) τα αποτελέσματα της ANOVA παρουσιάζονται ως εξής:

$$F = 14,02$$

$$P_{\text{value}} = 0,0001$$

Καθώς το επίπεδο σημαντικότητας βρίσκεται μικρότερο του 0,05 ($P < 0,05$) συμπεραίνεται ότι η διαφορά μεταξύ των θανάτων των μέσων όρων όλων των ημερών για τα τέσσερα διαφορετικά είδη τοξικών είναι στατιστικά σημαντική.

3.3.2. Σύγκριση Αριθμού Θανάτων Μεταξύ των Ημερών, Ανεξάρτητα από το Είδος του Τοξικού:

Αναλύοντας τα δεδομένα με βάση τις διαφορετικές μονάδες χρόνου (ημέρα 1^η έως 5^η) τα αποτελέσματα της ANOVA παρουσιάζονται ως εξής:

$$F = 29,95$$

$$P_{\text{value}} = 0,0001$$

Καθώς το επίπεδο σημαντικότητας βρίσκεται μικρότερο του 0,05 ($P < 0,05$) συμπεραίνεται ότι η διαφορά μεταξύ των θανάτων των μέσων όρων όλων των τοξικών για τις πέντε διαφορετικές ημέρες είναι στατιστικά σημαντική.

3.3.3. Σύγκριση Αριθμού Θανάτων ανά Μονάδα Χρόνου (ημέρα) και ανά Είδος Τοξικού:

Στη συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η two-way analysis της ANOVA καθώς αναλύθηκαν δύο παράγοντες, ημέρες και είδος τοξικού. Τα αποτελέσματα είναι ως εξής:

$$F = 17,49$$

$$P_{\text{value}} = 0,0001$$

Το επίπεδο σημαντικότητας βρίσκεται και εδώ μικρότερο το 0,05, έτσι συμπεραίνεται ότι η παρουσία των δύο παραγόντων επιδρά σημαντικά στα αποτελέσματα.

3.3.4. Σύγκριση Αριθμού Θανάτων Μεταξύ των Ειδών Τοξικών για Κάθε Ημέρα:

Ημέρα 1^η: Δεν σημειώθηκε κανένας θάνατος. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ειδών τοξικών.

Ημέρα 2^η: Δεν σημειώθηκε κανένας θάνατος. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ειδών τοξικών.

Ημέρα 3^η: Μετά από στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο της ANOVA βρέθηκαν τα εξής:

$$F = 24,15$$

$$P_{\text{value}} = 0,002$$

Το επίπεδο σημαντικότητας βρίσκεται μικρότερο του 0,05, έτσι συμπεραίνεται ότι υπάρχει στατιστική διαφορά στον αριθμό θανάτων μεταξύ των ειδών τοξικών. Χρησιμοποιώντας το Scheffe F- test συγκρίθηκαν οι μέσοι όροι θανάτων μεταξύ συγκεκριμένων εισαχθέντων τοξικών και βρίσκεται ότι ο συνδυασμός λιπάσματος και φυτοφαρμάκου επιφέρει μεγαλύτερη θνησιμότητα από τη μεμονωμένη χρήση λιπάσματος, φυτοφαρμάκου και μαρτύρων.

Ημέρα 4^η: Μετά από στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο της ANOVA βρέθηκαν τα εξής:

$$F = 7,19$$

$$P_{\text{value}} = 0,0291$$

Το επίπεδο σημαντικότητας βρίσκεται μικρότερο του 0,05, έτσι συμπεραίνεται ότι υπάρχει στατιστική διαφορά στον αριθμό θανάτων μεταξύ των ειδών τοξικών. Μετά από ανάλυση μέσω του Scheffe F-test βρίσκεται ότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων θανάτων για τα τέσσερα είδη τοξικών.

Με τη χρήση του πιο ευαίσθητου Fisher test βρίσκεται ότι η θνησιγόνος δράση του λιπάσματος είναι ισχυρότερη τόσο από τον συνδυασμό λιπάσματος και φυτοφαρμάκου όσο και από τους μάρτυρες.

Ημέρα 5^η: Μετά από στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο της ANOVA βρίσκονται τα εξής:

$$F = 3,828$$

$$P_{\text{value}} = 0,091$$

Το επίπεδο σημαντικότητας βρίσκεται μεγαλύτερο του 0,05, έτσι συμπεραίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά στη θνησιγόνο δράση μεταξύ των ειδών τοξικών.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η θνησιγόνος δράση οργανοφωσφορικού παρασιτοκτόνου και υπερφωσφορικού γεωργικού λιπάσματος επί του *D. Labrax* σε κατάσταση αιχμαλωσίας. Πρόκειται για γεωργικά βοηθήματα ευρέως χρησιμοποιούμενα στις γεωργικές καλλιέργειες. Σε περίπτωση που εισαχθούν στο ευαίσθητο περιβάλλον της ιχθυοκαλλιέργειας, ξεχωριστά ή σε συνδυασμό δύνανται να επιφέρουν αρνητικές επιπτώσεις.

Το βιολογικό σύστημα της μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας παραγωγής είναι ιδιαίτερος ευαίσθητο σε εξωγενείς παράγοντες, όπως μολύνσεις, κλιματικές συνθήκες και εισροή τοξικών. Το σύστημα της ιχθυοκαλλιέργειας είναι πολύ πιο ευαίσθητο από οποιοδήποτε χερσαίο σύστημα αναπαραγωγής χερσαίας εγκατάστασης καθώς η φόρτιση ατόμων ανά μονάδα όγκου νερού είναι σημαντικά αυξημένη. Αυτό δημιουργεί τα εξής προβλήματα:

- ◆ Διευκόλυνση της μετάδοσης ασθενειών
- ◆ Αύξηση του **stress**
- ◆ Αύξηση των τάσεων κανιβαλισμού

Το σύστημα της ιχθυοκαλλιέργειας είναι επίσης ευαίσθητο καθώς όλα τα άτομα προέρχονται από συγκεκριμένους κοινούς προγόνους. Έτσι δεν υπάρχει γενετική ποικιλότητα και η εισροή ξένων μονάδων DNA από κάποιο ευρύτερο **gene pool** που θα οδηγούσε πιθανόν σε ισχυρότερα - αλλά και ασθενέστερα - άτομα είναι μηδαμινή.

Εν κατακλείδι γίνεται διακριτό ότι το σύστημα της ιχθυοκαλλιέργειας απέχει πολύ όχι μόνο από τις οικολογικές παραμέτρους που χαρακτηρίζουν ένα φυσικό σύστημα, αλλά και από αυτές που υπάρχουν στα χερσαία συστήματα παραγωγής.

Οι μελέτες τοξικών επιπτώσεων στα συστήματα ιχθυοκαλλιέργειας δύνανται να διαχωριστούν σε δύο σκέλη. Αρχικά είναι αυτές που αφορούν στις άμεσες επιπτώσεις, όπως την επιβίωση και θνησιμότητα, την ικανότητα διασποράς, την αναπαραγωγή και την αύξηση, στην οποία εντάσσεται και ο ρυθμός διατροφής. Στη συνέχεια εάν επιλεγεί η μελέτη των έμμεσων επιπτώσεων θα πρέπει να ερευνηθούν οι επιρροές στις ενδοειδικές και διαειδικές σχέσεις του συστήματος οι οποίες επηρεάζουν την οικολογική εξέλιξη του είδους (βλ. 1.1.). Συχνά όμως τέτοιου είδους μελέτες ξεφεύγουν από τις ανάγκες έρευνας στο επίπεδο αύξησης της παραγωγής της ιχθυοκαλλιέργειας.

Αρχικός σκοπός κάθε μελέτης τοξικότητας είναι η συγκεκριμενοποίηση της θνησιγόνου συγκέντρωσης τοξικού επί των υπό μελέτη οργανισμών. Έτσι πρώτα βρίσκεται η LC 50, η συγκέντρωση τοξικού που ασκεί θνησιγόνο δράση στο 50% του πληθυσμού. Είναι επόμενο η LC 50 να διαφέρει σημαντικά τόσο διαειδικά, όπως ενδοειδικά βάσει παραμέτρων π.χ. η ηλικία, το φύλο, η διατροφή κ.ά. (βλ. 1.1.). Η θνησιγόνος συγκέντρωση από μόνη της είναι ένας παράγων ανεπαρκής, όσον αφορά στο τοξικολογικό αποτέλεσμα και θα πρέπει να ακολουθείται από την εδραίωση της χρονικής περιόδου κατά την οποία αυτό επέρχεται. Συνήθεις περίοδοι είναι αυτές των 48, 72 και 96 ωρών, αλλά ποικίλλουν σημαντικά σε σχέση με τον υπό μελέτη οργανισμό. Τελικό αποτέλεσμα μίας τέτοιας μελέτης είναι ο προσδιορισμός της καμπύλης τοξικότητας, η συσχέτιση δηλαδή των θνησιγόνων συγκεντρώσεων με τους μέσους χρόνους επιβίωσης για το υπό μελέτη είδος.

Η μελέτη της θνησιγόνου δράσης ενός τοξικού παρ'όλη την σημαντικότητα και τις δυσκολίες που την χαρακτηρίζουν δεν είναι παρά η εισήγηση για την περαιτέρω έρευνα της υποθνησιγόνου τοξικότητας. Σκοπός της τελευταίας είναι ο προσδιορισμός του «no observed effect concentration» (NOEC), δηλαδή της υψηλότερης συγκέντρωσης που δεν έχει διακριτή επίπτωση σε καμία από τις παραμέτρους φυσιολογίας του οργανισμού. Επίσης θα πρέπει να προσδιορίζεται και η «maximum acceptable toxicant concentration» (MATC), η συγκέντρωση μεταξύ της NOEC και της αμέσως υψηλότερης συγκέντρωσης.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια προσδιορισμού της 96h LC 50 για υπερφωσφορικό γεωργικό λίπασμα, οργανοφωσφορικό παρασιτοκτόνο και συνδυασμός των δύο επί του είδους *D. labrax*. Η μελέτη αποτελείται από δύο τμήματα: την εξαγωγή του τοξικολογικού αποτελέσματος και την μελέτη των επιπτώσεων του τοξικού στην φυσιολογία του οργανισμού. Η θνησιγόνος στο 50% του πληθυσμού συγκέντρωση του υπερφωσφορικού λιπάσματος προσδιορίστηκε στα $1,5 \text{ g l}^{-1}$ ενώ αυτή του οργανοφωσφορικού παρασιτοκτόνου στα $2,75 \text{ mg l}^{-1}$. Ο συνδυασμός των δύο τοξικών επέφερε το θάνατο στο σύνολο των ατόμων σε λιγότερο από 72 ώρες. Έτσι εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα δύο τοξικά δρουν συνεργιστικά. Έναρξη της παρουσίας νεκρών ατόμων υπήρχε κατά την τρίτη ημέρα του πειράματος.

Προ της εισαγωγής στατιστικά σημαντικού αριθμού ατόμων σε δεξαμενές των 500 λίτρων χρησιμοποιήθηκαν αυτές των 60 λίτρων. Τέσσερα άτομα εισήχθησαν σε κάθε μία από τις duplicates δεξαμενές για κάθε συγκέντρωση τοξικού. Η διαδικασία αυτή κρίθηκε απαραίτητη καθώς δεν υπήρχαν βιβλιογραφικές αναφορές περί των τοξικών συγκεντρώσεων των χημικών επί του υπό μελέτη είδους. Έτσι, αφού εκτιμήθηκαν σε πρόωρο στάδιο οι θνησιγόνες συγκεντρώσεις των παρασιτοκτόνου και λιπάσματος, επιβεβαιώθηκαν με τον στατιστικά σημαντικότερο αριθμό των 20 ατόμων ανά διπλή επανάληψη δεξαμενών. Οι θνησιγόνες συγκεντρώσεις για το ήμισυ του πληθυσμού σε 96 ώρες (96h LC50) ήταν $1,5 \text{ g/l}$ για το λίπασμα και $2,75 \text{ mg/l}$ για το παρασιτοκτόνο.

Η αντίδραση των ατόμων μετά την εισαγωγή των τοξικών ήταν ποικίλη, αναλόγως του είδους του τοξικού. Συγκεκριμένα κατά την εισαγωγή του λιπάσματος τα ψάρια επεδείκνυαν σημαντική έλλειψη προσανατολισμού. Η αντίδραση αυτή ήταν λογική καθώς μετά την εισαγωγή του λιπάσματος η θολερότητα του νερού αυξήθηκε δραστικά. Τα ψάρια αναδύονταν σε σημείο να προβάλουν τα ραχιαία τους πτερύγια στην επιφάνεια του ύδατος. Αυτή η αντίδραση εξηγείται καθώς το λίπασμα δημιουργούσε ίζημα στον πυθμένα και τα άτομα συγκεντρώνονταν στις πιο 'καθαρές' περιοχές της δεξαμενής. Νεκρά άτομα άρχισαν να εμφανίζονται την 3^η ημέρα. Τα αίτια θανάτου θα πρέπει να αναζητηθούν στην αναστολή την ανταλλαγής αερίων μέσω των βραγχίων λόγω της εμπλοκής από τα αιωρούμενα στερεά σωματίδια του λιπάσματος. Επιδείνωση της δράσης προκύπτει και από την πιθανή αύξηση των μικροοργανισμών στο νερό λόγω του τροφικού εμπλουτισμού από το λίπασμα. Η παρατήρηση των ατόμων κατά τη διάρκεια που επήλθε ο θάνατος δεν ήταν δυνατή καθώς η θολερότητα του ύδατος ήταν ιδιαίτερος αυξημένη. Τα νεκρά άτομα προσδιορίστηκαν μετά την ανάδευση του νερού με απόχη με την οποία αυτά συλλαμβάνονταν.

Όσον αφορά στην αντίδραση των ψαριών με την εισαγωγή του παρασιτοκτόνου, τα πρώτα δεν επεδείκνυαν αρχικά καμμία αντίδραση. Με την ανάδευση και διασπορά όμως του τοξικού μέσω της κυκλικής ροής των ψαριών στη δεξαμενή παρατηρήθηκε ταχύτερη κίνηση που προδίδει προσπάθεια διαφυγής μετά της αντίληψης κινδύνου. Προφανώς σημαντικό ρόλο έπαιξε η δυσάρεστη για τα άτομα οσμή του παρασιτοκτόνου. Στην συνέχεια όμως και μέχρι την 3^η ημέρα δεν παρατηρήθηκε καμμία παρόμοια αντίδραση. Την 3^η ημέρα επήλθε ο θάνατος του πρώτου ατόμου. Η διαδικασία θανάτου περιελάμβανε ιδιαίτερος αυξημένη κινητικότητα περιορισμένης χρονικής διάρκειας (1-3 δευτερολέπτων) που ακολουθήθηκε από έλλειψη προσανατολισμού με το σώμα των ατόμων να γυρνά με τη ράχη προς τον πυθμένα. Κάποια άτομα επανέρχονταν στην φυσιολογική τους θέση, που δεν διαρκούσε παρά μέχρι 10 λεπτά. Η διαδικασία αυτή σε ορισμένες περιπτώσεις επαναλαμβανόταν μέχρι τέσσερις με πέντε φορές. Κατά το γύρισμα του σώματος το νευρικό σύστημα μάλλον κλονιζόταν, διότι σε κάθε περίπτωση παρατηρήθηκε πλήρες άνοιγμα των πλευρικών πτερυγίων, των βραγχιικών επικαλυμμάτων και κάμψη της ουράς. Η φάση του σώματος των ψαριών χαρακτηριζόταν από σπασμούς οι οποίοι παρομοιάζονται σαν αυτούς του τετάνου. Ο τετανός είναι η παρατεταμένη συστολή των σκελετικών μυώνων σε υψηλή συχνότητα (Schauf, 1990) (βλ. Παράρτημα III).

Η συνολική δράση που αναπτύσσεται από τους σκελετικούς μύες καθορίζεται από την άθροιση των νευρικών σημάτων που δέχεται ο μυς. Η συνεχιζόμενη τροφοδοσία σημάτων σε συγκεκριμένους μύες καταλήγει στην άθροιση. Εάν τα σήματα συγκεντρώνονται με χαμηλή συχνότητα, η συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου (Ca^{++}) επιστρέφει στα φυσιολογικά επίπεδα πριν την άφιξη του επόμενου σήματος. Όταν δύο ή περισσότερα σήματα φτάνουν στους μύες σε μεγάλη συχνότητα, τα αρχικά ιόντα ασβεστίου δεν προλαβαίνουν να επανεισαχθούν προ της απελευθέρωσης των επομένων ιόντων και έτσι επέρχεται η άθροιση. Σε πολύ υψηλές συχνότητες επέρχεται κατάσταση τετάνου όπου τα σήματα πολλαπλασιάζονται (multiple summation) (Schauf, 1990, Παράρτημα IV.i). Στην παρούσα μελέτη τα ιόντα ασβεστίου δεν επιστρέφουν στο προ της σύναψης κύτταρο, λόγω εμπλοκής των υποδοχέων από το τοξικό. Ο θάνατος επέρχεται μάλλον λόγω αναστολής κάποιας ζωτικής λειτουργίας όπως η καρδιακή. Για την ασφαλή εξαγωγή συμπεράσματος θα πρέπει να διεξαχθούν συμπληρωματικές μελέτες.

Η τοξική δράση του συνδυασμού τοξικών μελετήθηκε εισάγοντας τις ανωτέρω συγκεντρώσεις τοξικών μαζί σε μία δεξαμενή. Ακολουθώντας το διάγραμμα του Sprague (Σχήμα 4.2.3-1, Sprague, 1970), φαίνεται ότι η δράση δύο τοξικών διαχωρίζεται σε αθροιστική (additive), λιγότερο της αθροιστικής (less than additive) και περισσότερο της αθροιστικής (more than additive) αναλόγως σε πιο σημείο του τετραγώνου, στο σχήμα 4.2.3-1, εντάσσεται. Στην παρούσα μελέτη το θετικό αποτέλεσμα της αθροιστικής δράσης των δύο ουσιών εδραιώθηκε σχετικά με το χρόνο δράσης τους. Αξιωματικά θεωρήθηκε ότι όταν η δράση συγκεκριμένης συγκέντρωσης τοξικού έχει αποδειχτεί ότι ανταποκρίνεται στην LC 50 κάποιας χρονικής περιόδου και συνδυαστεί με μία δεύτερη δράση άλλου τοξικού της ίδιας περιόδου και ως αποτέλεσμα η αρχική χρονική περίοδος δράσης (εδώ 96 ώρες) μειωθεί δραστικά, τότε τα τοξικά δρουν συνεργιστικά. Είναι γενικώς λίγες οι περιπτώσεις που τα τοξικά δρουν ανταγωνιστικά απενεργοποιώντας την μεταξύ τους δράση (Abel, 1989).

Στην παρούσα μελέτη νεκρά άτομα εμφανίστηκαν στην επιφάνεια των δεξαμενών την 3^η ημέρα της πειραματικής περιόδου. Αυτό σημαίνει ότι ο θάνατός τους είχε επέλθει τουλάχιστον 24 ώρες πριν, καθώς τα νεκρά άτομα πρώτα βυθίζονται στον πυθμένα και μετά αναδύονται στην επιφάνεια. Αυτό συμβαίνει λόγω της αύξησης του πληθυσμού μικροοργανισμών κυρίως στην κοιλιακή χώρα των νεκρών ατόμων, οι οποίοι δημιουργώντας μέσω του καταβολισμού οργανικής ύλης αέρια (κυρίως CO₂) καθιστούν το νεκρό σώμα ελαφρύτερο του ύδατος. Η μείωση της χρονικής περιόδου δράσης των τοξικών δείχνει την συνεργιστική δράση του υπερφωσφορικού λιπάσματος με το οργανοφωσφορικό παρασιτοκτόνο.

Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι στις δεξαμενές με τους μάρτυρες ουδέποτε σημειώθηκε νεκρό άτομο, αποδεικνύοντας ότι οι περιβαλλοντικές συνθήκες ήταν ευνοϊκές και ο κάθε θάνατος στις υπόλοιπες δεξαμενές οφειλόταν στην δράση των τοξικών και μόνον.

Στη δεύτερη φάση της μελέτης παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά τα βράγχια και το ήπαρ των νεκρών ατόμων ούτως ώστε να προσδιοριστεί κάποια πιθανή βλάβη στα όργανα αυτά. Με τη μέθοδο των ιστολογικών τομών, τμήματα των οργάνων παρατηρήθηκαν σε μεγέθυνση x10 και x40. Στις φωτογραφίες 3.2.3-1 φαίνονται οι ιστολογικές τομές ήπατος μετά την τοξική δράση των ανωτέρων συγκεντρώσεων λιπάσματος και παρασιτοκτόνου σε σύγκριση με αυτές των μαρτύρων. Η φυσιολογία των τριών περιπτώσεων είναι μάλλον όμοια. Αυτό δείχνει πως το ήπαρ δεν είχε επηρεαστεί. Πιθανή εξήγηση είναι η περιορισμένη χρονική περίοδος του πειράματος. Οι 96 ώρες ίσως δεν ήταν αρκετές ούτως ώστε να επέλθει αρνητική επίπτωση επί του ήπατος. Εν πάση περιπτώσει αποδεικνύεται ότι ο θάνατος επήλθε για λόγους διαφορετικούς από την τοξική δράση των ουσιών επί του ήπατος.

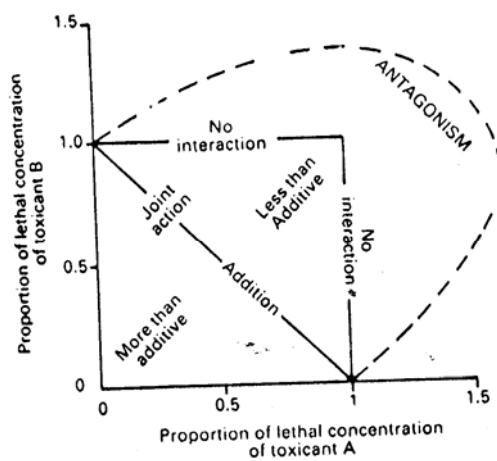
Στις φωτογραφίες 3.2.3-2 φαίνονται οι ιστολογικές τομές των βραγχίων. Συγκρίνοντας τις φωτογραφίες των τριών περιπτώσεων - εισαγωγή λιπάσματος, παρασιτοκτόνου και μαρτύρων - γίνεται διακριτό ότι οι δύο τελευταίες είναι όμοιες. Στην περίπτωση όμως του λιπάσματος τα βραγχιακά lamellae είναι φθαρμένα. Συμπερασματικά το παρασιτοκτόνο δεν έδρασε επί της φυσιολογίας των βραγχίων, ενώ το λίπασμα τα επηρέασε αρνητικά, μάλλον λόγω της μηχανικής δράσης-τριβής κατά την κολύμβηση και ανταλλαγή αερίων.

Όσον αφορά στα αίτια του θανάτου ανά περίπτωση τοξικού πρέπει να γίνει διακριτό ότι η ασφαλής εξαγωγή συμπερασμάτων είναι αδύνατη. Στην περίπτωση του παρασιτοκτόνου, και εφόσον δεν βρέθηκαν στοιχεία που να αποδεικνύουν πιθανή τοξική δράση στο ήπαρ και στα βράγχια, συμπεραίνεται η αρχική θεώρηση της επίπτωσης επί του νευρικού συστήματος. Τη θεώρηση αυτή υποστηρίζουν και οι δραστηριότητες των ατόμων κατά τη διάρκεια του θανάτου τους, όπως έχουν ήδη περιγραφεί παραπάνω. Για το δε λίπασμα τα αίτια θανάτου θα πρέπει μάλλον να αναζητηθούν στις μηχανικές τριβές με αποτέλεσμα τον τραυματισμό των βραγχίων, με συνέπεια την αναστολή της ανταλλαγής αερίων από και προς το νερό. Η αιώρηση των στερεών σωματιδίων βεβαίως δεν επιφέρει μόνον εμπλοκή των βραγχίων, αλλά και μικροτραυματισμούς σε όλο το σώμα των ψαριών, ευνοώντας έτσι τις μολύνσεις από ήδη υπάρχοντες μικροοργανισμούς. Οι τελευταίοι θα πρέπει να αυξάνονται πληθυσμιακά όχι μόνον από την οργανική ύλη του σώματος των

ψαριών που χρησιμοποιούν ως τροφή αλλά και από το ίδιο το λίπασμα. Φυσικά για την εδραίωση αυτής της δράσης θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες.

Η σημασία των ανωτέρων αποτελεσμάτων εδραιώνεται λαμβάνοντας υπόψη τη συνέχεια της μελέτης σε πλαίσια υποθησιγόνου τοξικότητας. Είναι λογικό ότι συγκεντρώσεις της τάξης του 1,5 g/l λιπάσματος και 2,75 mg/l παρασιτοκτόνου δεν παρουσιάζονται στις φυσικές συνθήκες της ιχθυοκαλλιέργειας, ακόμα και μετά από ιδιαίτερος δυσμενείς συνθήκες, όπως αυτή των εντόνων βροχοπτώσεων αμέσως μετά την εφαρμογή γεωργικών βοηθημάτων. Η παρούσα μελέτη πρέπει να αντιμετωπισθεί ως η έναρξη μίας εκτενέστερης σειράς πειραμάτων που θα αφορά στις οικολογικές επιπτώσεις ευρύτερης χρονικής περιόδου επί του είδους *D. labrax*. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, με αναφορά στον Abel (1989), σημαντικότερες θεωρούνται οι επιπτώσεις στις ενδοειδικές και διαειδικές σχέσεις ενός είδους. Στην περίπτωση της ιχθυοκαλλιέργειας βέβαια αυτές συγκεκριμενοποιούνται μόνον στις ενδοειδικές σχέσεις. Για παράδειγμα, η υποθησιγόνου τοξικότητα που καθιστά ορισμένα ασθενέστερα άτομα πιο επιρρεπή στο τοξικό από κάποια άλλα, θα μπορούσε να οδηγήσει σε κανιβαλιστικές τάσεις, λαμβάνοντας υπόψη και την αυξημένη ιχθυοφόρτιση. Πιο περίπλοκες επιπτώσεις είναι αυτές που αφορούν στις φυσιολογικές δραστηριότητες των οργανισμών, δηλαδή την αύξηση, διατροφή και αναπαραγωγή τους. Έτσι γίνεται διακριτή η σημαντικότητα της μελέτης υποθησιγόνου τοξικότητας για την παραγωγή και εμπορία εκτροφούμενων ειδών.

Σχήμα 4.2.3-1: Ορολογία που χρησιμοποιείται στην περιγραφή δράσης δύο τοξικών (Sprague, 1970).



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I.i.
Ειδικά Προβλήματα Πειραματικών Συνθηκών

Στην χρονική περίοδο ενός πειράματος τοξικότητας είναι συχνά δύσκολο, τουλάχιστον χωρίς δημιουργία προβλημάτων όπως το stress, η συνεχής καταμέτρηση των παραμέτρων στη διάρκεια του πειράματος. Επίσης είναι συχνά άγνωστη ή δεν υπολογίζεται η επιρροή αβιοτικών περιβαλλοντικών παραγόντων στην τοξικότητα των ρυπαντών όπως το pH, η θερμοκρασία, η σκληρότητα του νερού και το διαλυμένο οξυγόνο. Εκτός των αβιοτικών παραγόντων υπάρχει και επιρροή από τους ίδιους τους οργανισμούς λόγω, κατ'αρχήν της παρουσίας τους στη δεξαμενή. Οι οργανισμοί καταναλώνουν οξυγόνο και απεκκρίνουν διοξείδιο του άνθρακα και αμμωνία (CO₂, NH₃), τα οποία μπορούν να επιρρεάσουν την δράση του τοξικού. Δεύτερον μπορεί μέρος των τοξικών να απορροφηθεί από τους οργανισμούς και να μεταβολιστεί. Τέλος μπορεί να επέλθει χημική ή μικροβιακή διάσπαση και εξάτμιση των ρυπαντικών ουσιών. Όλες αυτές οι διεργασίες είναι αίτια μη διατήρησης της αρχικής συγκέντρωσης τοξικών και λόγοι λανθασμένου αποτελέσματος (Sprague, 1969).

Αντιμετώπιση Προβλημάτων

Με βάση τα παραπάνω γίνεται άμεσα αντιληπτή η ανάγκη για μεγάλο όγκο δεξαμενών νερού (2-3 l νερού/g υγρού βάρους ιστού) και συχνή αλλαγή των διαλυμάτων. Το τελευταίο πιθανόν να δημιουργήσει πρόβλημα stress στους οργανισμούς. Η ιδανική κατάσταση είναι μία πειραματική εγκατάσταση συνεχούς ροής με πλήρη ανανέωση σε σύντομα χρονικά διαστήματα. Το πρόβλημα εδώ είναι η συνεχής διοχέτευση τοξικών στον αποδέκτη (Sprague, 1969).

Μερικοί Ορισμοί

Για την κατανόηση των εννοιών που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια θα πρέπει να υπενθυμιστούν ορισμένοι όροι που στην τοξικολογία χρησιμοποιούνται ευρέως:

- ◆ *Θνησιγόνος Τοξικότητα (lethal toxicity)*: Τοξική δράση που επιφέρει τον θάνατο στον οργανισμό
- ◆ *Υποθνησιγόνος Τοξικότητα (sublethal toxicity)*: Τοξική δράση με άλλα αποτελέσματα εκτός του θανάτου
- ◆ *Οξεία Τοξικότητα (acute toxicity)*: Τοξική δράση της οποίας οι επιπτώσεις παρουσιάζονται σε σύντομο χρονικό διάστημα (μονάδα μέτρησης χρόνου: ημέρα)
- ◆ *Χρόνια Τοξικότητα (chronic toxicity)*: Τοξική δράση της οποίας οι επιπτώσεις παρουσιάζονται (μονάδα μέτρησης χρόνου: εβδομάδες ή μήνες)

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι συνδυασμός των όρων, οξεία υποθνησιγόνος δράση και χρόνια θνησιγόνος δράση δύνανται κάλλιστα να χρησιμοποιηθούν (Abel, 1989).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I.ii.
Παραγόμενα Γραφήματα από Μελέτες Τοξικότητας

Πειραματικές Συνθήκες

Η μελέτη της θνησιγόνου δράσης ενός τοξικού, αν και απλούστερη από αυτή της υποθνησιγόνου δράσης, απαιτεί να πληρούνται ορισμένες προϋποθέσεις. Πάντως η γενική ανάγκη είναι η έκθεση των οργανισμών σε σειρά συγκεντρώσεων των τοξικών, σε κατάλληλο δοχείο - δεξαμενή. Οι βασικές προϋποθέσεις είναι το στατιστικά σημαντικό μέγεθος δείγματος, η τήρηση περιόδου προσαρμογής, η εκτίμηση συγκεντρώσεων από προπειράματα, η διατήρηση σταθερότητας περιβάλλοντος, η διατήρηση συγκεντρώσεων σε σταθερά επίπεδα και η ελαχιστοποίηση stress στους οργανισμούς (Sprague, 1969).

Συλλογή Πληροφοριών και Ανάλυση

Σκοπός της μελέτης θνησιγόνου δράσης είναι η αυξανόμενη θνησιμότητα με την πάροδο του χρόνου. Για την κατασκευή του γραφήματος είναι απαραίτητη η καταγραφή του ακριβή χρόνου θανάτου κάθε ατόμου. Λόγω δυσκολίας συνεχούς παρατήρησης προτείνονται παρατηρήσεις στα εξής χρονικά διαστήματα: 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 14+-2, 24, 33+-3hr (Sprague, 1973). Στη συνέχεια εκτιμάται ο μέσος χρόνος επιβίωσης (LT50) κάθε ομάδας σε κάθε συγκέντρωση. Αυτός είναι ο απαιτούμενος χρόνος για το θάνατο 50% του πληθυσμού.

Στοιχεία Γραφήματος

Το Γράφημα ονομάζεται Probit-lines ή Time-mortality curves και η κλίμακα του χρόνου είναι λογαριθμική. Αριστερά στον άξονα X εμφανίζεται το τοξικότερο ρυπαντό. Από το Γράφημα εύκολα διαβάζεται ο LT50 όπως και οι LT10, LT90 κ.ο.κ (Γράφημα I.ii-1).

Καμπύλη Τοξικότητας

Από τις παραπάνω πληροφορίες μπορεί να κατασκευαστεί η καμπύλη τοξικότητας που συσχετίζει τη συγκέντρωση τοξικού με τον μέσο χρόνο επιβίωσης σε κάθε συγκέντρωση (LT50) (Γράφημα I.ii-2). Από την καμπύλη υπολογίζεται και η LC50 που ορίζεται η συγκέντρωση που προκαλεί το θάνατο στο 50% της ομάδας σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η καμπύλη είναι ασύμπτωτη στον Ψ καθώς πάντα θα υπάρχει μια συγκέντρωση που δεν προκαλεί τον θάνατο στα άτομα, σε απεριόριστο χρόνο. Αυτή ονομάζεται Threshold LC50 ή ILL (incipient lethal level). Η καμπύλη είναι επίσης ασύμπτωτη και στον X, καθώς όσο μεγάλη και να είναι η συγκέντρωση, ο θάνατος ποτέ δεν είναι ακαριαίος. Το πρόβλημα στις συγκεκριμένες καμπύλες είναι η έλλειψη υπολογισμού χρόνου - έκθεσης, δηλαδή ότι ορισμένα ζώα θα αντέξουν την αρχική έκθεση, αλλά θα πεθάνουν αργότερα, μία κατάσταση που συναντάται ευρέως στο φυσικό περιβάλλον (Abel, 1989).

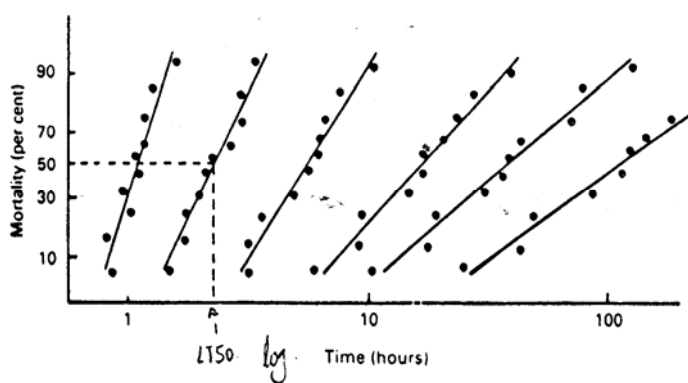
Διαχωρισμένες (split) Probit Lines

Συχνά οι καμπύλες χρόνου - θνησιμότητας εμφανίζουν ετερογένεια στο σχήμα τους, η οποία μπορεί να είναι αποτέλεσμα κάποιων παραμέτρων όπως η ενδοειδική ποικιλομορφία στην ευαισθησία ενάντια στο τοξικό, π.χ. ύπαρξη διαφορετικών φύλων (Hewlett και Plackett, 1979) ή οι δύο μηχανισμοί δράσης του τοξικού (Γράφημα I.ii-3) (Abel, 1978).

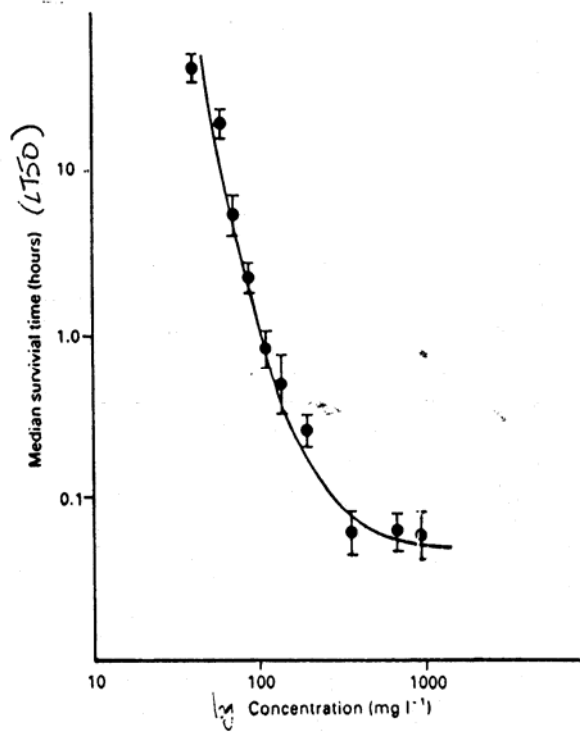
Εξαγωγή Ψευδών Αποτελεσμάτων

Το σχήμα της καμπύλης πρέπει να εμφανίζεται ολοκληρωμένο, καθώς εάν παράγεται ευθεία γραμμή αποτελεί συνήθως τμήμα καμπύλης και χρειάζεται περαιτέρω μελέτη. Το πρόβλημα που παρουσιάζεται είναι το σημείο στο οποίο πρέπει να σταματά η μελέτη. Στο Γράφημα I.ii-4 φαίνεται ότι αν το πείραμα είχε σταματήσει στο σημείο X, θα φαινόταν ότι το B είναι τοξικότερο του A, το οποίο είναι αναληθές (Abel, 1979). Η ανάγκη για εκτενείς μελέτες φαίνεται και στο Γράφημα I.ii-5, όπου υπάρχει μία γραμμική σχέση συγκέντρωσης LC50 από 1 - 0.01 mg l⁻¹, όπου η LC50 ήταν σταθερή, αλλά η threshold LC50 ισούται με 0.008 mg l⁻¹. Εάν το πείραμα σταματούσε στα 0.1 mg l⁻¹ θα είχαμε ψευδή αποτελέσματα (Ball, 1967b). Παραδείγματα προβληματικών καμπυλών τοξικότητας εμφανίζονται στο Γράφημα I.ii-6.

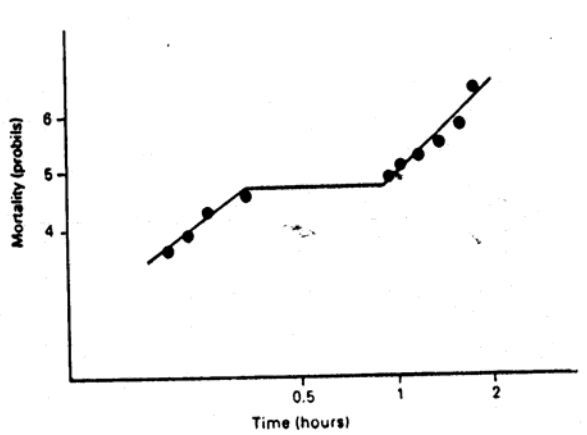
Γράφημα I.ii-1: Probit lines ως αποτέλεσμα ποσοστιαίας θνησιμότητας σε κάθε δεξαμενή συναρτήσει του χρόνου (Abel, 1978).



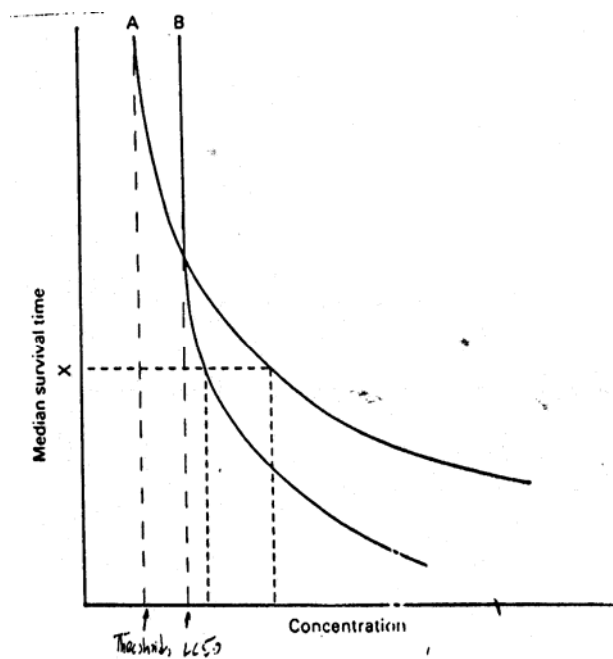
Γράφημα I.ii-2: Καμπύλη τοξικότητας που συσχετίζει μέσο χρόνο επιβίωσης, LT 50, με την συγκέντρωση τοξικού (έκθεση *S. gairdneri* στο απορρυπαντικό θειούχο νάτριο) (Abel, 1978).



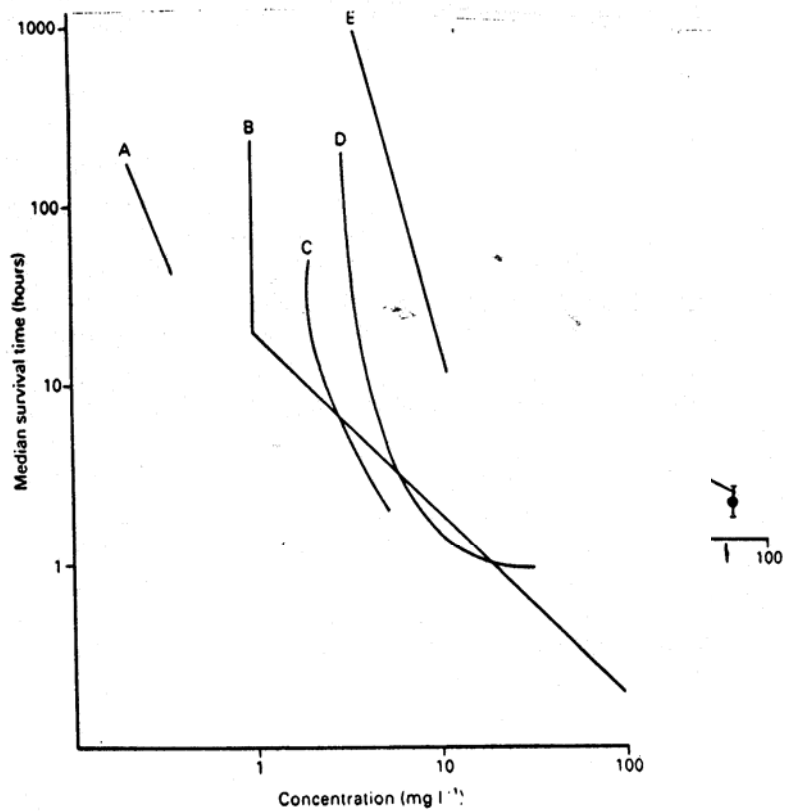
Γράφημα I.ii-3: Τοξικότητα απορρυπαντικού με 2 τοξικούς μηχανισμούς στην Ιριδίζουσα πέστροφα (*S. gairdneri*) (Abel, 1978)



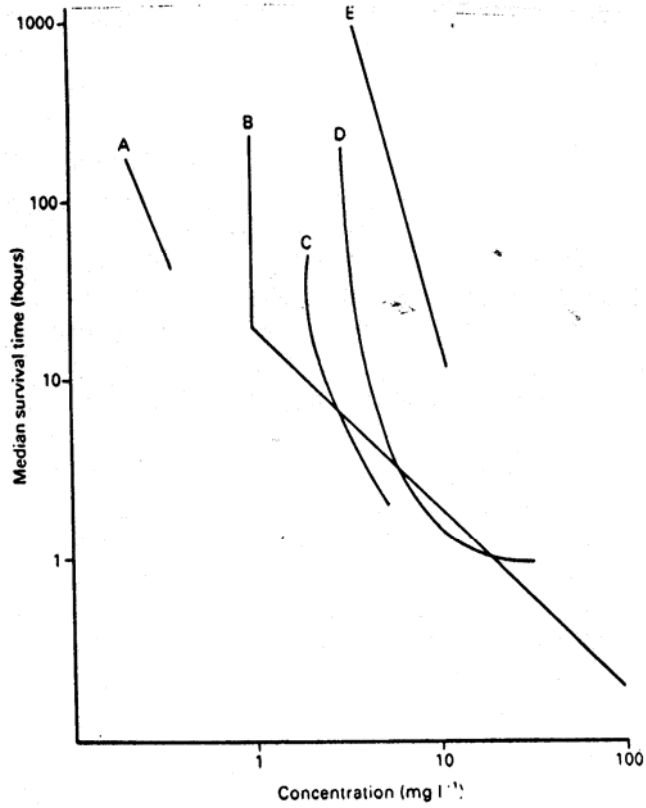
Γράφημα I.ii-4: Υποθετικές καμπύλες τοξικότητας για ουσίες Α και Β.



Γράφημα I.ii-5: Καμπύλη τοξικότητας για την ιριδίζουσα πέστροφα εκτεθειμένη σε κάδμιο (Ball, 1967b).



Γράφημα I.ii-6: Καμπύλες τοξικότητας των ακολούθων τοξικών επί των αντίστοιχων ειδών :
A: *S. gairdneri* - linear alkylate sylphonate (Brown et al., 1968), B: *Salmo salar* - polyoxyethylene lauryl ether (Wildish, 1972), C: *Lepomis macrochirus* - linear alkylate sulphonate (Hokanson & Smith, 1971), D: *Gadus morrhua* - alkylbenzene sulphonate (Swedmark et al., 1971), E: *Salmo gairdneri* - alkylbenzene sulphonate (Herbert et al., 1957)



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I.iii.
Επιρροή Περιβαλλοντικών Παραγόντων

Η επιρροή των διαφόρων περιβαλλοντικών παραμέτρων εμφανίζεται σε δύο φάσεις:

- ♦ στους οργανισμούς
- ♦ στα ίδια τα τοξικά.

Σκληρότητα Νερού

Η σκληρότητα του νερού θεωρείται από τους σημαντικότερους αβιοτικούς παράγοντες, καθώς η επίπτωσή της στα βαρέα μέταλλα είναι τεκμηριωμένη από πολλές μελέτες στο παρελθόν. Παράδειγμα αποτελεί η μελέτη τοξικότητας του ψευδαργύρου στην ιριδιζουσα πέστροφα. Ο ψευδάργυρος εμφανίζεται 8 φορές πιο τοξικός σε φάσμα σκληρότητας 12 - 320 mgI⁻¹ CaCO₃ (Lloyd, 1960).

Θερμοκρασία

Η επιρροή της θερμοκρασίας εμφανίζεται στο ρυθμό μεταβολισμού και στο ρυθμό εισαγωγής και απέκκρισης τοξικών. Αύξηση της θερμοκρασίας συνεπάγεται και αύξηση αναγκαίου οξυγόνου, ταυτόχρονα με μείωση της διαλυτότητας του οξυγόνου στο νερό. Έτσι η δράση στη συγκέντρωση οξυγόνου είναι αμφίδρομη. Η θερμοκρασία δύναται να έχει επιρροή στην ίδια την δράση του τοξικού. Τέλος σε υψηλότερες θερμοκρασίες ο χρόνος αντίδρασης των οργανισμών είναι μικρότερος.

Παράδειγμα αποτελεί η τοξικότητα υδροθείου στο *Carassius auratus* σε 11 ημέρες:

T	Lethal threshold concentration
14 °C	90 μI ⁻¹
26 °C	60 μI ⁻¹

Πρέπει να γίνει διακριτό ότι η διαφορά στην τοξικότητα ήταν πιο εμφανής σε μικρότερα χρονικά διαστήματα έκθεσης, όπως φαίνεται από το Γράφημα I.iii-1 (Adelman & Smith, 1972).

Διαλυμένο Οξυγόνο (DO)

Η μείωση των επιπέδων DO αυξάνει την τοξική δράση ουσιών. Παράδειγμα αποτελεί η τοξικότητα της αμμωνίας στο *Salmo gairdneri* (Thurston et al., 1981)

DO	Lethal threshold concentration
2.6 mgI ⁻¹	0.32 mgNH ₃ I ⁻¹
8.6 mgI ⁻¹	0.81 mgNH ₃ I ⁻¹

Εγκλιματισμός των οργανισμών προ του πειράματος αυξάνει την επιβίωση.

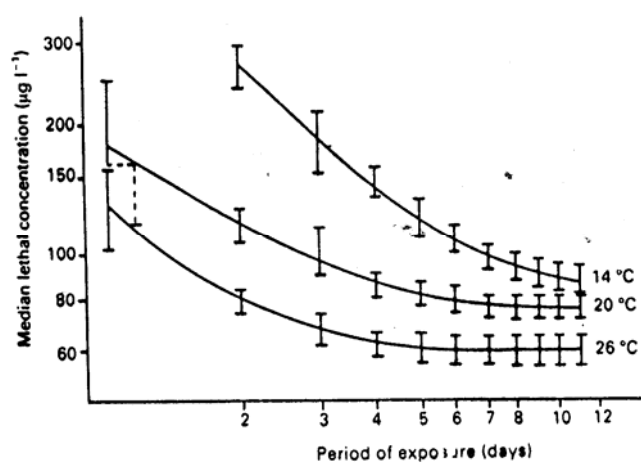
Όξινο Περιβάλλον

Στο θαλάσσιο περιβάλλον τιμές του pH 6-9 θεωρούνται φυσιολογικές, όμως στο φάσμα αυτό διαφοροποιείται η τοξική δράση ουσιών. Η επιρροή είναι πιο εμφανής κυρίως στα τοξικά που εμφανίζουν δύο μορφές, ιονισμένη και μη, όπως η αμμωνία (NH₃) και το αμμώνιο (NH₄⁺). Αύξηση στο pH συνεπάγεται και αύξηση της τοξικότητας της αμμωνίας, λόγω μείωσης των ελεύθερων ατόμων υδρογόνου για τη δημιουργία αμμωνίου. Μελέτες απέδειξαν πως δεν απαιτείται σημαντική αύξηση της τιμής του pH για αύξηση της τοξικότητας της αμμωνίας, η οποία είναι 10 φορές μεγαλύτερη σε pH 8 από το pH7 (Alabaster & Lloyd, 1980).

Αλατότητα

Αύξηση αλατότητας συνεπάγεται και αύξηση της τοξικότητας των ουσιών. Για παράδειγμα η 48hr LC50 της φαινόλης στο *S. gairdneri* σε γλυκά νερά ήταν 9 mg l⁻¹ C₆H₅OH, ενώ σε 60% θάλασσα ήταν 5 mg l⁻¹ C₆H₅OH (Brown et al., 1967). Αυτό συμβαίνει γιατί σε υπερτονικό περιβάλλον οι τελεόσπειοι απορροφούν νερό σε αυξημένους ρυθμούς και κατά συνέπεια η συσσώρευση τοξικού είναι ταχεία. Ο Zn και άλλα τοξικά καταστρέφουν το βραγχιακό επιθήλιο και το ψάρι δεν μπορεί να διατηρήσει την σωστή οσμωτική πίεση, σε ισοτονικό περιβάλλον το τελευταίο περιορίζεται (Abel & Skidmore, 1975).

Γράφημα I.iii-1: Επιπτώσεις θερμοκρασίας στην τοξικότητα υδροθείου στο χρυσόψαρο (*Carassius auratus*) (Adelan & Smith, 1972).



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I.iv.
Επιρροή Συνδυασμού Τοξικών

Ο συνδυασμός τοξικών δράσεων μπορεί να θεωρηθεί ως αβιοτικός παράγοντας με σημαντική επιρροή στη δράση τοξικών. Στο σχήμα 4.2.3-1 φαίνεται η ορολογία που χρησιμοποιείται στην περιγραφή της δράσης δύο τοξικών (Sprague, 1970). Θεωρείται ότι 1.0 μονάδα τοξικότητας (toxic unit) κάθε ουσίας παράγει το αποτέλεσμα (θάνατος), σε απουσία του άλλου. Σε οποιοδήποτε σημείο στο τετράγωνο το αποτέλεσμα ποσοτικά είναι όμοιο, δηλαδή θα θανατωθεί ίσος αριθμός ατόμων. Εάν η δράση παράγεται από συγκεντρώσεις μέσα στο τετράγωνο, οι ουσίες αλληλοβοηθούνται, υπάρχει δηλαδή συνδυασμός δράσης (joint action), ο οποίος χωρίζεται σε 3 περιπτώσεις:

- ◆ *Addition*: συγκεντρώσεις στη διαγώνιο (π.χ. 0.5 A & 0.5 B)
- ◆ *More than additive*: π.χ. 0.5 A & 0.2 B
- ◆ *Less than additive*: π.χ. 0.7 A & 0.8 B

Εάν η δράση παράγεται από συγκεντρώσεις στα όρια δεν υπάρχει συνεργασία. Για παράδειγμα εάν υπάρχει 1.0 A, όσο B και να προστεθεί το αποτέλεσμα θα είναι το ίδιο. Τέλος στην περίπτωση του ανταγωνισμού θα απαιτείται περισσότερο από 1.0 μονάδα κάθε τοξικού για το ίδιο αποτέλεσμα.

Εκτίμηση Τοξικότητας Ουσιών σε Συνεργασία

Η συγκέντρωση της ρυπαντικής ουσίας εκφράζεται ως "τοξικές μονάδες" (toxic units, t.u.). Κάθε τοξική μονάδα ισούται με την συγκέντρωση του τοξικού προς την οριακή θνησιγόνο συγκέντρωση. Έτσι μία τοξική μονάδα ισούται με την οριακή θνησιγόνο συγκέντρωση.

$$\text{Τοξική Μονάδα} = \frac{\text{Πραγματική συγκέντρωση τοξικού}}{\text{Οριακή θνησιγόνος συγκέντρωση}}$$

Γενικά η less than additive toxicity σπάνια εμφανίζεται. Παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των Brown et al., 1969, όπου εισήγαγαν συγκεντρώσεις 0.75 t.u. Ζη και 0.25 t.u. NH₃ και φαινόλης στην *S. gairdneri*. Το αποτέλεσμα ήταν ότι η δράση είχε μειωμένη ισχύ από την αναμενόμενη. Αυτό εξηγείται καθώς σε μικρότερες των 0.12 t.u. η αμμωνία δεν δρά επί της διαπερατότητας του νερού στο ψάρι (Lloyd & Orr, 1969). Στον Πίνακα I.iv-1 φαίνονται οι σημαντικότερες τοξικές επιπτώσεις στη βιοχημεία και φυσιολογία των υδροβίων οργανισμών.

Πίνακας I.iv-1: Περίληψη των σημαντικότερων επιπτώσεων τοξικών ουσιών στη βιοχημεία και φυσιολογία υδροβίων οργανισμών (Connell & Miller, 1986)

Διεργασία - Περιοχή	Επίπτωση
Κυτταρικές μεμβράνες	<ol style="list-style-type: none"> 1. Διατάραξη ή μεταβολή της διαπερατότητας 2. Παρέμβαση στους μεταφορείς μέσω εμπλοκής και αναστολή της παραγωγής ATP
Ένζυμα	Αντιστρέψιμη ή μη αντιστρέψιμη αναστολή μέσω χημικής εμπλοκής
Μεταβολισμός λιπιδίων	<ol style="list-style-type: none"> 1. Μειωμένη λειτουργία ήπατος, π.χ. συσσώρευση λιπιδίων 2. Μείωση της ικανότητας σύνθεσης χολεστερόλης
Σύνθεση πρωτεϊνών	<ol style="list-style-type: none"> 1. Εμπλοκή της σύνθεσης μέσω ενδοπλασματικού δικτύου 2. Πιθανή αύξηση σύνθεσης λόγω ερεθισμού του μικροσωματικού συστήματος
Μικροσωματικά ενζυμικά συστήματα	Ερεθισμός ή αναστολή
Ρυθμιστικές διεργασίες και αύξηση	<ol style="list-style-type: none"> 1. Μεταλλαγή στη δομή ή λειτουργία ρυθμιστικών ενζύμων 2. Εμπλοκή στη σύνθεση, ελευθέρωση και αποθήκευση ορμονών
Μεταβολισμός υδατανθράκων	Εμπλοκή στους βιολογικούς κύκλους, π.χ. κύκλος Krebs
Αναπνοή	<ol style="list-style-type: none"> 1. Αναστολή της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω εμπλοκής σε συγκεκριμένα σημεία 2. Αναστολή της φωσφορυλίωσης

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.ν.
Ιστορικά και Στατιστικά Στοιχεία Γεωργικής Παραγωγής

Στην παγκόσμια ιστορία υπάρχουν πολλά παραδείγματα μαζικής καταστροφής της συγκομιδής λόγω ασθeneιών και εντόμων. Στη χρονική περίοδο 1845-1851 επήλθε άρση στην κατανάλωση πατάτας στην Ιρλανδία λόγω μόλυνσης των φυτών από τον μύκητα *Phytophthora infestans*. Ως αποτέλεσμα χάθηκαν χιλιάδες ζωές λόγω ασητίας και πολλοί Ιρλανδοί μετοίκησαν στην Αμερική. Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι οι μολυσμένες πατάτες δεν είχαν επίπτωση στον άνθρωπο και ήταν βρώσιμες (Ware, 1991).

Από την πρώτη εκδήλωση της επιδημίας της πανώλης, περισσότεροι από 65 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν πεθάνει με βασικό αίτιο τη μετάδοση της ασθένειας από τον ψύλλο των ποντικών. Μέχρι το 1955 η ελονοσία προσέβαλε περίπου 200 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως. Ο αριθμός μειώθηκε από έξι εκατομμύρια το 1939 σε λιγότερο από ένα εκατομμύριο σήμερα. Παρόμοια εξέλιξη έχει υποστεί η αντιμετώπιση και άλλων ασθeneιών όπως ο κίτρινος πυρετός, η Αφρικανική υπνηλία και η ασθένεια του Chaga μέσω της χρήσης παρασιτοκτόνων (Ware, 1991).

Τα αγροτικά προϊόντα είναι παγκοσμίως η σημαντικότερη πηγή τροφής. Ανταγωνίζονται με 80.000 - 100.000 ασθένειες που προκαλούνται από ιούς, βακτήρια, οργανισμούς συγγενικούς του μυκητοπλάσματος, ρικέτσια, μύκητες, άλγη, 1.800 είδη φυτικών ζιζανίων, 3.000 είδη νηματωδών και 800.000 είδη εντόμων, εκ των οποίων τα 10.000 λειτουργούν αθροιστικά στην δραστική καταστροφή της σοδειάς παγκοσμίως (Ware, 1991).

Έως και το ένα τρίτο της παγκόσμιας γεωργικής παραγωγής καταστρέφεται από παράσιτα κατά την ανάπτυξη, συγκομιδή και αποθήκευση. Οι απώλειες είναι ακόμη μεγαλύτερες στις αναπτυσσόμενες χώρες, για παράδειγμα στη Λατινική Αμερική αγγίζουν ποσοστό 40% της συνολικής παραγωγής. Η αγροτική δραστηριότητα στην Γκάνα, το σημαντικότερο σε εξαγωγές κακάο κράτος παγκοσμίως, έχει καταφέρει να αντιμετωπίσει μόνο ένα είδος εντόμου. Η παραγωγή ζάχαρης στο Πακιστάν αυξήθηκε κατά 33% μέσω της χρήσης παρασιτοκτόνων. Ο FAO (Food and Agricultural Organisation) έχει εκτιμήσει ότι το 50% της συνολικής παραγωγής βάμβακος στις αναπτυσσόμενες χώρες θα καταστρεφόταν χωρίς την χρήση παρασιτοκτόνων (Ware, 1991).

Εάν δεν υπήρχαν τα παρασιτοκτόνα θα υπήρχε ακόμη ποσοστό 10 έως 20% του σημερινού πληθυσμού που θα εργαζόταν στις αγροτικές καλλιέργειες, εν συγκρίσει με το σημερινό 2%. Έχει εκτιμηθεί ότι ακόμη και σήμερα, περισσότερη ενέργεια καταναλώνεται στην απομάκρυνση φυτικών ζιζανίων των σπαρτών από οποιαδήποτε άλλη δραστηριότητα. Ο συνολικός παγκόσμιος πληθυσμός ήταν το 1970 3.6 δισεκατομμύρια, 4.4 δισεκατομμύρια το 1980, 5.4 δισεκατομμύρια το 1990 και θα φτάσει τα 6.4 δισεκατομμύρια το έτος 2000. Είναι εμφανής λοιπόν η ανάγκη για αύξηση της αγροτικής παραγωγής καθώς ο πληθυσμός αυτός θα πρέπει να τραφεί και να ενδυθεί. Ακόμη και η σημερινή παροχή τροφής είναι ανεπαρκής. Ποσοστό 56% του παγκόσμιου πληθυσμού είναι υποσιτισμένο και συγκεκριμένα για τις χώρες του τρίτου κόσμου το ποσοστό φτάνει το 79% (Ware, 1991).

Μέχρι το 1944 η παραγωγή παρασιτοκτόνων ήταν περιορισμένη σε ορισμένες ενώσεις αρσενικής βάσης, πετρελαιοειδή, νικοτίνη, πύρεθρο, θείο, αέριο υδροκυάνιο και κρυολίτη. Ο δεύτερος παγκόσμιος πόλεμος άνοιξε μία νέα εποχή στη χημική σύνθεση των παρασιτοκτόνων με την εισαγωγή εντελώς νέων συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων, το πρώτο των οποίων ήταν το DDT (Dichloro Diphenyl Trichloroethane).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I.vi.
Χημική Σύνθεση Οργανοχλωρικών Παρασιτοκτόνων

Το πιο γνωστό από την ομάδα είναι το DDT το οποίο ανήκει στα αλιφατικά διφαινύλια (diphenyl aliphatics), όπως φαίνεται και στο Σχήμα I.vi-1, όπου απεικονίζονται διάφορες συγγενικές μορφές. Ακόμη και σήμερα χρησιμοποιούνται κάποιες μορφές DDT. Το methoxychlor χρησιμοποιείται οικιακά ενάντια στο σκώρο και το dicofof και chlorobenzilate είναι ακαρεοκτόνα. Οι χημικοί τύποι δεν αποκαλύπτουν την χημική τους σταθερότητα και μεγάλη διάρκεια ζωής, χαρακτηριστικό στοιχείο του DDT. Άλλοι τύποι οργανοχλωρικών παρασιτοκτόνων περιλαμβάνουν τα παράγωγα βενζολίου (benzene derivatives) με χαρακτηριστικό εκπρόσωπο το BHC (BenzeneHexaChloride, lindane), τα κυκλοδιένια (cyclodienes) που εκπροσωπούνται από το eldrin, dieldrin, chlordane, heptachlor, aldrin, endosulphan, mirex και chlordecone, και τα εντομοκτόνα polychloroterpene που εκπροσωπούνται από το toxaphene και strobane. Στον Πίνακα I.vi-1 του Παραρτήματος φαίνονται οι τάξεις των παρασιτοκτόνων με τη λειτουργία τους (Ware, 1991).

Πίνακας I.vi-1: Τάξεις παρασιτοκτόνων, εφαρμογή και ονομαστική προέλευση (Ware, 1991)

Τάξη Παρασιτοκτόνου	Εφαρμογή	Ονομαστική Προέλευση
Acaricide (miticide)	θανατώνει ακάρεα	Gr. ^a . ακάρι
Algicide	θανατώνει άλγη	L. ^b . alga
Avicide	θανατώνει ή εκδιώχνει πτηνά	L. avis
Bactericide	θανατώνει βακτήρια	Gr. βάκτρον (L. bacterium)
Fungicide	θανατώνει μύκητες	L. fungus
Herbicide	θανατώνει φυτικά ζιζάνια	L. herba
Insecticide	θανατώνει έντομα	L. insectum
Larvicide	θανατώνει λάρβες	L. lar
Molluscicide	θανατώνει μαλάκια	Gr. μαλακός
Nematicide	θανατώνει νηματώδεις	Gr. νήμα
Ovicide	θανατώνει αυγά	L. ovum
Pediculicide	θανατώνει ψείρες	L. pedia
Piscicide	θανατώνει ψάρια	L. pisces
Predicide	θανατώνει θηρευτές	L. praeda
Rodenticide	θανατώνει τρωκτικά	L. rodere
Silvicide	θανατώνει δέντρα, θάμνους	L. silva
Slimicide	θανατώνει βλεννώδεις οργανισμούς	A. ^c . slim
Termiticide	θανατώνει τερμίτες	L. termes
	<u>Χημικά Παρασιτοκτόνα χωρίς την κατάληξη -cide</u>	
Attractants	ελκύουν έντομα	
Chemosterilants	δημιουργούν	

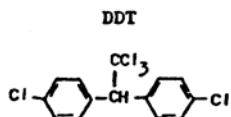
	στεριότητα	
Defoliants	απομακρύνουν το φύλλωμα	
Desiccants	δημιουργούν επιταγχυμένη αφυδάτωση στα φυτά	
Disinfectants	καταστρέφουν ή απενεργοποιούν βλαβερούς οργανισμούς	
Feeding stimulants	αυξάνουν τη διατροφή	
Plants and insect growth regulators	ερεθίζουν ή καθυστερούν την ανάπτυξη φυτών ή εντόμων	
Pheromones	ελκύει έντομα ή σπονδυλωτά	
Repellents	εκδιώχνει βλαβερούς οργανισμούς	

a: Ελληνική προέλευση

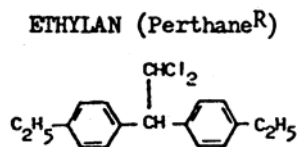
b: Λατινική προέλευση

c: Αγγλοσαξονική προέλευση

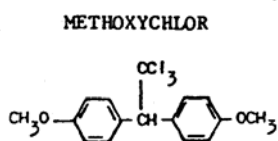
Σχήμα I.vi-1: Χημική σύνθεση DDT



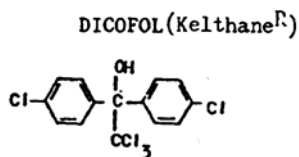
1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane



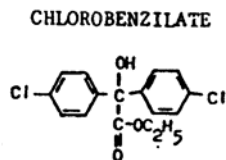
1,1-dichloro-2,2-bis(p-ethylphenyl)ethane



1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-methoxyphenyl)ethane



4,4'-dichloro-α-(trichloromethyl)benzhydrol



ethyl 4,4'-dichlorobenzilate

Χημική Σύνθεση Οργανοφωσφορικών Παρασιτοκτόνων

Η εντομοκτόνος δράση τους ανακαλύφθηκε στη Γερμανία κατά τη διάρκεια του Δευτέρου Παγκοσμίου Πολέμου από τις μελέτες συγγενικών ενώσεων των "αερίων νεύρων" όπως τα sarin, soman και tabun. Αρχικά η ανακάλυψη έγινε κατά την αναζήτηση αντικατάστατου για τη νικοτίνη, της οποίας η παραγωγή ήταν περιορισμένη στη Γερμανία (Ware 1991). Οι εστέρες φωσφόρου βρίσκονται σε ποικίλους συνδυασμούς οξυγόνου, άνθρακα, θείου και αζώτου που δημιουργούν ενώσεις με το φώσφορο, και έτσι έχουν διαφορετικές ταυτότητες. Στο Παράρτημα I.vii., Σχήμα I.vii-1 φαίνονται οι έξι υποτάξεις οργανοφωσφορικών. Τα οργανοφωσφορικά κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε τρεις υποτάξεις, τα αλιφατικά, φαινολικά και ετεροκυκλικά παράγωγα, όπως περιγράφονται παρακάτω.

Αλιφατικά παράγωγα

Πρόκειται για απλά παράγωγα φωσφορικού οξέος που φέρουν κοντές αλυσίδες ανθράκων. Το παλαιότερο και πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενο εντομοκτόνο αυτής της τάξης είναι το μαλαθείο (Σχήμα I.vii-1). Η πρώτη εισαγωγή στο εμπόριο έγινε το 1950, όταν χρησιμοποιήθηκε στα περισσότερα λαχανικά, φρούτα και καλλιέργειες ζωοτροφών περιορίζοντας εκτενή ποικιλία παρασιτικών εντόμων. Είχε επίσης και οικιακή χρήση ενάντια σε έντομα όπως οι κατσαρίδες (*Periplaneta* spp.) και οι αφίδες. Στα χαρακτηριστικά του περιλαμβάνονται η ασφαλής χρήση σε περιβάλλον με οικιακά ζώα και η ταχεία του δράση. Το 1986, 1988 και 1990-91 χρησιμοποιήθηκε στον έλεγχο της Μεσογειακής φρουτόμυγας. Άλλα χαρακτηριστικά παρασιτοκτόνα της συγκεκριμένης τάξης είναι το trichlorfon (DipterexR, DyloxR), naled (DibromR) και monocrotophos (AzodrinR). Εν ολίγοις τα αλιφατικά οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι οι απλούστερες μορφές οργανοφωσφορικών μορίων (Ware, 1991).

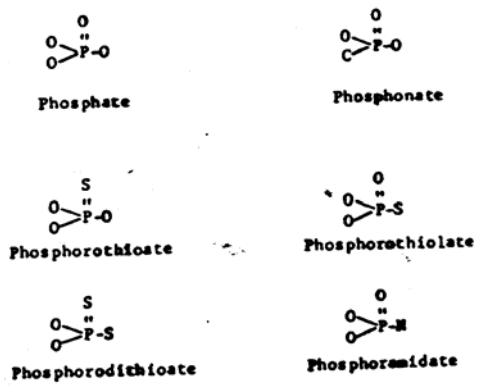
Φαινολικά Παράγωγα

Τα φαινολικά οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα περιέχουν ένα δακτύλιο βενζολίου με το ένα άτομο υδρογόνου αντικατεστημένο με φωσφορικό τμήμα και τα υπόλοιπα με ιόντα χλωρίου, νιτρικών, μεθανίου, υδροκυανίου, θείου κ.ά. Τα φαινολικά οργανοφωσφορικά είναι σταθερότερα από τα αλιφατικά και έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Το γνωστότερο της τάξης είναι το παραθείο που ανακαλύφθηκε το 1947. Υπάρχει σε δύο τύπους, το αιθυλικό παραθείο και το μεθυλικό παραθείο (Σχήμα I.vii-1). Το πρώτο δεν διατίθεται για οικιακή χρήση λόγω της επικινδυνότητάς του. Εισαγωγή του μεθυλικού παραθείου στο εμπόριο έγινε το 1949 και ήταν πιο χρήσιμο από το αιθυλικό λόγω της μειωμένης του τοξικότητας. Άλλα χαρακτηριστικά φαινολικά οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα είναι τα coumaphos (Co-ralR, BaymixR), sulphophos (BolstarR), profenofos (CuracronR) και isofenphos (OfitanoR, PryfonR) (Ware, 1991).

Ετεροκυκλικά Παράγωγα

Σε αυτήν την τάξη ένα ή περισσότερα από τα άτομα άνθρακα αντικαθίσταται από άτομα οξυγόνου, αζώτου ή θείου και ο δακτύλιος δύνανται να φέρει 3, 5 ή 6 άτομα. Το πρώτο εντομοκτόνο αυτής της κατηγορίας ήταν το diazinon (SpectracideR, Knox OutR). Στο Σχήμα I.vii-1 όπου φαίνεται η χημική του σύνθεση διακρίνονται τα δύο άτομα αζώτου που περιέχει ο δακτύλιος. Μέχρι σήμερα χρησιμοποιείται εκτενώς και για οικιακή χρήση. Τα ετεροκυκλικά οργανοφωσφορικά αποτελούνται από περίπλοκα μόρια και γενικώς χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη διάρκεια ζωής σε σχέση με τα αλιφατικά και φαινολικά. Εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι το isazophos (TriumphR, BraceR), chlorpyrifos (DursbanR, LorsbanR) και phosmet (ImidanR) (Ware, 1991).

Σχήμα I.vii-1: Υποτάξεις οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I.viii.

Συμπεριφορά Παρασιτοκτόνων στο Περιβάλλον - Λιθόσφαιρα

Προσρόφηση

Οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τις διαδικασίες της προσρόφησης και φιλτραρίσματος στο έδαφος είναι η περιεκτικότητα του τελευταίου σε νερό, περιεχόμενο πηλό και οργανική ύλη, pH και δυναμικό οξειδαναγωγής (εΗ). Στους παράγοντες του παρασιτοκτόνου περιλαμβάνονται η χημική του σύνθεση, διάταξη των ατόμων στο μόριο, pKa και pKb, διαλυτότητα στο νερό, διανομή φορτίου κατιόντων, πολικότητα και ιονισμός (Khan, 1980). Στον Πίνακα I.viii-1 παρουσιάζονται οι σημαντικότεροι μηχανισμοί προσρόφησης παρασιτοκτόνων σε κolloειδή του εδάφους. Στο ίδιο Παράρτημα παρουσιάζονται οι τέσσερις παράγοντες δόμησης ενός μορίου παρασιτοκτόνου που σχετίζονται με το δυναμικό προσρόφησης στο έδαφος.

Ο Khan (1980) προτείνει ότι τα χαρακτηριστικά του φορτίου ενός παρασιτοκτόνου είναι η σημαντικότερη ιδιότητα που σχετίζεται με την προσρόφηση του από το έδαφος. Το μόριο μπορεί να επεκτείνεται από ασθενώς πολικό σε σχετικά ισχυρό ιονικό φορτίο. Συμπεραίνεται πως το pH του εδάφους αποτελεί σημαντικό παράγοντα. Οι Bailey και White (1970) αναγνώρισαν τέσσερις παράγοντες δόμησης ενός μορίου παρασιτοκτόνου που σχετίζονται με το δυναμικό προσρόφησης στο έδαφος:

1. Φύση των λειτουργικών τμημάτων, ιδιαιτέρως των όξινων, καρβοξυλικών, αλκοολικών, υδροξυλικών και αμινών.
2. Φύση δευτερευόντων τμημάτων που δύνανται να αλλάξουν την συμπεριφορά των λειτουργικών τμημάτων
3. Θέση δευτερευόντων τμημάτων σε σχέση με τα λειτουργικά τμήματα που δύνανται να αυξήσουν ή να μειώσουν τους ενδομοριακούς δεσμούς ή να επιτρέψουν συντονισμό με μεταβατικά ιόντα μετάλλων.
4. Παρουσία και μέγεθος έλλειψης κορεσμού στο μόριο που δύνανται να επηρεάσει την ισορροπία λιπόφοβων - λιπόφιλων

Απόσταξη - Διάχυση

Η μετακίνηση παρασιτοκτόνων στο εδαφικό περιβάλλον εμπλέκει την αλληλεπίδραση διαφόρων διαδικασιών: διάχυση και διασπορά, μεταφορά μάζας, απόσταξη και πτητικότητα (Haque, 1975). Η συμπεριφορά απόσταξης των παρασιτοκτόνων στο έδαφος εξαρτάται κυρίως από την προσρόφηση του εδάφους (Khan, 1980), αλλά σημαντικό ρόλο παίζουν και η διάχυση, υδροδυναμική διασπορά, δυναμική της απόσταξης και η εξάτμιση - αναπνοή (Hamaker, 1975). Για πολλά παρασιτοκτόνα (π.χ. dieldrin και lindane) ισχύει μία αντίστροφη σχέση μεταξύ του ρυθμού πτητικότητας του παρασιτοκτόνου και της οργανικής φόρτισης του εδάφους. Άλλος παράγοντας επιρροής της πτητικότητας παρασιτοκτόνων είναι η θερμοκρασία με άμεση επίδραση στην πίεση του ατμού και στις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους (Khan, 1980).

Διάσπαση

Η διαδικασία της διάσπασης των καταλοίπων παρασιτοκτόνων είναι σημαντική οδός για την απώλεια των παρασιτοκτόνων από το έδαφος. Η χημική σύνθεση του παρασιτοκτόνου είναι ιδιαιτέρως σημαντικός παράγοντας για τον προσδιορισμό των οδών

και ρυθμών διάσπασης. Παρ'όλα αυτά τα προϊόντα δύνανται να παρέχουν εξίσου σημαντική βιολογική δραστηριότητα. Επίσης, πολλά προϊόντα εμμένουν στο έδαφος ή στο υγρό μέσον και μπορούν να δημιουργήσουν οικολογικές επιπτώσεις με τον ίδιο τρόπο με το αρχικό μόριο. Υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι μετάλλαξης των παρασιτοκτόνων στο έδαφος, φωτοχημική, χημική και μικροβιακή διάσπαση (Connell & Miller, 1986):

1. Φωτοδιάσπαση:

Παρόλο που η φωτοδιάσπαση των παρασιτοκτόνων στην ατμόσφαιρα και στο νερό συμβαίνει εκτενώς, οι Goring *et al.* (1975) προτείνουν ότι η διαδικασία αυτή είναι περιορισμένης σημαντικότητας επί του εδάφους. Η ενέργεια της ακτινοβολίας απορροφάται σε μεγάλο βαθμό από το έδαφος και κατά συνέπεια, η παρεχόμενη ακτινοβολία προς τα παρασιτοκτόνα είναι περιορισμένης ισχύος, εκτός από την επιφάνεια του εδάφους.

2. Χημική διάσπαση:

Οι χημικές μεταλλαγές των παρασιτοκτόνων είναι σημαντικές διαδικασίες για την απομάκρυνσή τους από το έδαφος. Ο Khan (1980) προτείνει ως σημαντικότερες διαδικασίες την υδρόλυση και την οξειδωση. Πυρηνόφιλες αντιδράσεις αντικατάστασης, εκτός της υδρόλυσης, λαμβάνουν επίσης χώρα με αντιδρώντα διαλυμένα σε νερό ή με τμήματα στην οργανική ύλη του εδάφους. Οι αντιδράσεις διάσπασης στο έδαφος δύνανται να καταλυθούν από επιφάνειες πηλού, οξειδία μετάλλων, ιόντα μετάλλων και οργανική ύλη. Εξωκυτταρικά ένζυμα στο έδαφος παίζουν σημαντικό ρόλο στη διάσπαση πολλών παρασιτοκτόνων και εκπροσωπούν τη μεταλλαγή μεταξύ χημικής και ενδοκυτταρικής διάσπασης (Goring *et al.*, 1975).

3. Μικροβιακή διάσπαση:

Οι σημαντικότερες κατηγορίες μικροοργανισμών του εδάφους (ακτινομύκητες, μύκητες και βακτήρια) μπορούν άμεσα να προσαρμοστούν στα παρασιτοκτόνα και να τα διασπασούν μέσω οξειδωσης, διάσπασης αιθέρων, υδρόλυσης αμίδων και εστέρων, οξειδωσης αλκοολών και αλδεύδων, απαλκυλίωση, υδροξυλίωση, απυδροαλογοποίηση, εποξειδωση, αναγωγική απαλογοποίηση και N-απαλκυλοποίηση (Matsumura, 1973). Η απαλογοποίηση είναι σημαντικότερη διεργασία καθώς πολλά παρασιτοκτόνα περιέχουν αλογόνα. Οι Goring *et al.* (1975) κατέληξαν ότι οι διαδικασίες διάσπασης παρασιτοκτόνων στο έδαφος περιέχουν χημικές αντιδράσεις, μικροβιακό εμπλουτισμό και συνμεταβολισμό. Τα παραγόμενα από τις μεταβολές παρασιτοκτόνων στο έδαφος είναι το διοξειδίο του άνθρακα, νερό, μεταλλικά άλατα, μεταβολικά προϊόντα που εμφανίζονται φυσικά στο έδαφος και ατιμίζοντες ουσίες. Παρ'όλα αυτά η τύχη πολλών προϊόντων μεταβολισμού από τη διάσπαση παρασιτοκτόνων είναι άγνωστη. Όπως οι Kaufman και Kearney (1976) επισημαίνουν, από τα περίπου 150 χημικά που χρησιμοποιούνται ως ζιζανιοκτόνα παγκοσμίως, ολοκληρωμένες οδοί διάσπασης είναι γνωστές για μόνον τρία ή τέσσερα.

Παραμονή στο Έδαφος

Η παραμονή ενός παρασιτοκτόνου στο έδαφος εξαρτάται από πολλούς αλληλεπιδρούντες παράγοντες, όπως φαίνεται και στο Παράρτημα I.viii., Σχήμα I.viii-1

(Goring *et al.*, 1975, Khan, 1980). Γενικά ως "παραμονή" εννοείται ο χρόνος παραμονής ενός παρασιτοκτόνου στο εδαφικό περιβάλλον ή ως ο χρόνος ημιζωής του, θεωρώντας ότι ακολουθείται η πρωτοβάθμια κινητική (Σχήμα I.viii-2, Πίνακας I.viii-2). Η κατηγορία παρασιτοκτόνων με το μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής είναι τα οργανοχλωρικά εντομοκτόνα. Τα ζιζανιοκτόνα επιδεικνύουν ένα μεγάλο φάσμα παραμονής, από μερικές μέρες ή εβδομάδες για τα καρβαμίδια και τα αλιφατικά οξέα, έως περισσότερο από ένα έτος για ορισμένα από τις s-triazines. Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα έχουν γενικά μικρό χρόνο ημιζωής, από μερικές μέρες έως αρκετούς μήνες. Παρ'όλα αυτά ο Lichtenstein (1980) επισημαίνει ότι η απώλεια του κατάλοιπου μπορεί να οφείλεται στη δέσμευση του τελευταίου με στοιχεία του εδάφους, εις τρόπον ώστε να είναι αδύνατη η αυτόνομη εκχύλισή του.

Πίνακας I.viii-1: Προτεινόμενοι μηχανισμοί προσρόφησης παρασιτοκτόνων σε κολλοειδή του εδάφους (Khan, 1980)

Όνομασία Μηχανισμού	Μέθοδος Λειτουργίας	Παραδείγματα
Έλξεις Van der Waals	Προσρόφηση ανιονικών, μη πολικών και τμήματα μοιρίων, μικρού εύρους αλληλεπιδράσεις μεταξύ διπόλων	Προσρόφηση καρβαυλίου και παραθείου σε οργανική ύλη του εδάφους
Υδροφοβικοί δεσμοί	Μη πολικά παρασιτοκτόνα σε μόρια με σημαντικό ποσοστό μη πολικών περιοχών. Συσχέτιση μη πολικών παρασιτοκτόνων με λιπίδια της οργανικής ύλης του εδάφους, διαδικασία καταμερισμού	Προσρόφηση μη πολικών χλωριωμένων υδρογονανθρακικών παρασιτοκτόνων από τα λιπίδια της οργανικής ύλης
Δεσμοί υδρογόνου	Πολικά ανιονικά οργανικά μόρια, ανιονικά παρασιτοκτόνα και οργανική ύλη με αλληλεπίδραση των λειτουργικών τμημάτων που περιέχουν O ₂ και νιτρώδη	Αλληλεπίδραση s-triazine και οργανικής ύλης, προσρόφηση ασθενών ανιονικών παρασιτοκτόνων
Μεταφορά φορτίου	Δημιουργία συμπλεγμάτων μεταφοράς φορτίου μέσω ηλεκτροστατικής έλξης σε μικρές αποστάσεις ανάμεσα στα αλληλεπιδρώντα στοιχεία	Προσρόφηση s-triazine σε οργανική ύλη του εδάφους και μεταλλικά άλατα πηλού, αλληλεπιδράσεις paraquat και diquat με μεταλλικά άλατα πηλού
Ανταλλαγή ιόντων	Προσρόφηση κατιονικών παρασιτοκτόνων μέσω ανταλλαγής κατιόντων στα τμήματα -COOH και -OH	Ανταλλαγή κατιόντων μεταξύ paraquat και diquat και οργανικής ύλης, θεωρείται κυρίαρχος μηχανισμός σε

	συσχετισμένα με οργανική ύλη	σχέση με τους δεσμούς υδρογόνου
Ανταλλαγή συντελεστών συμπλεγμάτων	Δημιουργία συμπλεγμάτων συντονισμού με διάφορα μέταλλα σε μεταλλικά άλατα πηλού, αντικατάσταση ενός ή περισσότερων συντελεστών συμπλεγμάτων από μόριο προσρόφησης	Συντονισμός trillate και linuron σε ανταλλάξιμα κατιόντα σε υπόστρωμα μεταλλικών αλάτων πηλού μέσω του O ₂ στο καρβονυλικό τμήμα

Πίνακας I.viii-2: Χρόνοι ημιζωής ορισμένων σχετικά παραμείνοντων εντομοκτόνων στο έδαφος (Khan, 1980)

Εντομοκτόνο	Χρόνος ημιζωής (έτη,κατά προσέγγιση)
Οργανοχλωρικά	
DDT	3-10
Heptachlor	7-12
Isodrin/Endrin	4-8
Toxaphene	10
Aldrin	1-4
Dieldrin	1-7
Chlordane	2-4
BHC	2
Οργανοφωσφορικά	
Dyfonate	0.2
Chlorfenvinphos	0.2
Carbophenothion	0.5

Πίνακας I.viii-3: Σύνολο θανάτων από δηλητηριάσεις στις ΗΠΑ το έτος 1989 (από ατυχήματα, επί σκοπού και από αλλεργικές αντιδράσεις) (Ware, 1990).

Είδος τοξικού	Αριθμός θανάτων
Αλκοόλες	53
Προμήθειες επαγγελματικών χώρων	3
Προϊόντα αυτοκινήτων & σκαφών	9
Επιθέσεις εντόμων & ερπετών	4
Χημικά	27
Απορρυπαντικά	24
Ξένα σώματα, παιχνίδια	2
Καπνός, ατμός, αέρια	46
Βαρέα μέταλλα	8
Υδρογονάνθρακες	31
Σπίρτα, πυροτεχνήματα, εκρηκτικά	1
Παρασιτοκτόνα	21
Φυτά	1
Αθλητικός εξοπλισμός	1
Αναλγητικά (ασπιρίνη κ.λ.π.)	126
Αντιχολινεργικά	5
Αντιπηκτικά αίματος	1
Αντισπασμικά	6
Αντικαταθλιπτικά	140
Αντιισταμινικά	8
Αντιβιοτικά	5
Αντινεοπλαστικά	2
Θεραπείες άσθματος	34
Φάρμακα κυκλοφορικού	70
Φάρμακα για κρύωμα	3

Διουρητικά	1
Ηλεκτρολύτες, μέταλλα	5
Φάρμακα γαστροεντερικών	4
Ορμόνες & ανταγωνιστές	5
Διάφορα φάρμακα	4
Ηρεμιστικά μυώνων	4
Υπνωτικά	78
Εμβόλια	1
Ναρκωτικά	64
Φάρμακα εξωτερικής χρήσης	4
Άγνωστα φάρμακα	1
Σύνολο	802

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I.ix.

Μεταφορά και Διαφοροποίηση Παρασιτοκτόνων στους Οργανισμούς

Μεταβολές στη Δομή των Παρασιτοκτόνων

Οι μεταβολές των παρασιτοκτόνων από τους οργανισμούς περιλαμβάνουν την βιοδιάσπαση, αποτοξικοποίηση και μεταβολισμό. Οι αντιδράσεις των παραπάνω διαδικασιών καταλύονται από ένζυμα που βρίσκονται στον ορό ή σε διάφορα όργανα όπως το ήπαρ. Τα ένζυμα δύνανται να διανεμηθούν στο μικροσωματικό υποκυτταρικό τμήμα - το οποίο προέρχεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο - τα μιτοχόνδρια, ή υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα (Adamson, 1974). Τα ενζυμικά συστήματα που μεταβολίζουν παρασιτοκτόνα φαίνονται περιληπτικά στον Πίνακα I.ix-4. Οι σημαντικότερες οδοί που ακολουθούνται από αυτά τα ένζυμα είναι η οξειδωση και υδρόλυση (Khan, 1975). Ο Πίνακας I.ix-5 παρουσιάζει τις αντιδράσεις αποτοξικοποίησης παρασιτοκτόνων από τους οργανισμούς.

Πανίδα

Η εισαγωγή παρασιτοκτόνων στην πανίδα δύναται να επιτευχθεί είτε άμεσα από το περιβάλλον είτε από απορρόφηση του πεπτικού συστήματος. Η εισαγωγή στους υδρόβιους οργανισμούς μπορεί να συμβεί με τους εξής τρόπους:

- ◆ Κατάποση ρυπαρής τροφής
- ◆ Εισαγωγή από τις βραγχιακές επιφάνειες
- ◆ Διάχυση από το δέρμα
- ◆ Άμεση απορρόφηση από το υπόστρωμα (Livingston, 1977)

Τα χερσαία είδη δύνανται να απορροφήσουν παρασιτοκτόνα μέσω των εξής διαδικασιών:

- ◆ Πέψη ρυπαρής τροφής ή νερού
- ◆ Επιδερμική απορρόφηση
- ◆ Εισπνοή αιωρούμενων χημικών

Μετά την απορρόφηση τα παρασιτοκτόνα διανέμονται σε όργανα και ιστούς μέσω του κυκλοφορικού συστήματος και της μετακίνησης εντός και εκτός των μεμβρανωδών φραγμάτων. Το μοντέλο διασποράς εξαρτάται από τη φύση του παρασιτοκτόνου, την οδό εισαγωγής και το μεταβολισμό του όπως και από το είδος του οργανισμού (Walker, 1975). Οι λιπόφιλες ενώσεις, όπως τα οργανοχλωρικά εντομοκτόνα τείνουν να δεσμεύονται στις πρωτεΐνες του ορού οι οποίες άμεσα αποθηκεύονται στα λιποκύτταρα. Ταχεία διάθεση του λίπους μπορεί να αναδιανείμει τις αποθηκευμένες χημικές ενώσεις.

Χλωρίδα

Οι κοινότερες οδοί εισαγωγής χημικών στα φυτά είναι οι εξής:

- ◆ Τα τοιχώματα των ριζικών τριχιδίων ή τα επιδερμικά κύτταρα του ριζικού συστήματος
- ◆ Τα στομάτια στο πορώδες μεσόφυλλο
- ◆ Οι πόροι ή ανοίγματα της εξωτερικής επιφάνειας (Finlayson & MacCarthy, 1973)

Ο βαθμός και οδοί της απορρόφησης παρασιτοκτόνων επηρεάζονται από παράγοντες όπως οι ιδιότητες του παρασιτοκτόνου, χημική σύνθεση, περιβαλλοντικές συνθήκες και βιολογικές ιδιότητες του φυτού. Η σημαντικότερη περιοχή απορρόφησης εστιάζεται στο ριζικό σύστημα και ειδικότερα στα ριζικά τριχίδια (Finlayson & MacCarthy, 1973). Ο Crafts (1964) έβγαλε το συμπέρασμα ότι τα ζιζανιοκτόνα απορροφώνται σε εύρος διαφορετικών ρυθμών από το ριζικό σύστημα ως αποτέλεσμα διαφοροποίησης μεταξύ των οργανικών μορίων. Απορρόφηση από το ριζικό σύστημα συμβαίνει πολύ πιο άμεσα για τα υδροδιαλυτά παρασιτοκτόνα απ'ότι για τα λιποδιαλυτά (Audus, 1964).

Διαδικασία Εισαγωγής

Στην εισαγωγή και διασπορά των παρασιτοκτόνων και άλλων χημικών στους οργανισμούς εμπλέκονται οι αλληλεπιδράσεις που φαίνονται στο Σχήμα I.ix-1 (Kenaga, 1975). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την εισαγωγή και διασπορά των χημικών στους οργανισμούς σχετίζονται με τα εξής:

- ◆ Φυτικοχημικές ιδιότητες του παρασιτοκτόνου - πτητικότητα, διαλυτότητα, δυνατότητα προσρόφησης
- ◆ Οικολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του οργανισμού - διατροφικές συνήθειες, οδοί εισαγωγής και χώρος διαβίωσης
- ◆ Ιδιότητες του συγκεκριμένου οικοσυστήματος - τύποι συστημάτων ροής, θερμοκρασία, pH, οργανική ύλη, δομή τροφικού πλέγματος κ.ά.

Βιοσυσσωρευση

Η βιοσυσσωρευση των οργανοχλωρικών εντομοκτόνων έχει μελετηθεί αποκαλύπτοντας σημαντικούς παράγοντες που την επηρεάζουν (Edwards, 1973, Moriarty, 1975). Ταυτόχρονα έχουν εξελιχθεί και μαθηματικά μοντέλα (Robinson, 1973, Moriarty, 1975, 1978) σε προσπάθειες εκτίμησης του δυναμικού βιοσυσσωρευσης παρασιτοκτόνων και άλλων χημικών μέσω πειραματικών μελετών (Cairns *et al.*, 1978). Οι μελέτες αυτές έχουν σκοπό την μέτρηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των χημικών ενώσεων όπως και την κινητική εισαγωγής και απόρριψης από ορισμένα είδη.

Η βιοσυσσωρευση παρασιτοκτόνων στο υγρό μέσον σχετίζεται με απλές διαδικασίες κατανομής ή προσρόφησης μεταξύ οργανισμού και ύδατος. Θεωρώντας σταθερές συνθήκες, ο συντελεστής βιοσυσσωρευσης (bioconcentration factor, BF) για παρασιτοκτόνο (P) από το υγρό μέσον (w) στους οργανισμούς (b) δίνεται από τον τύπο:

$$BF = [P]_b/[P]_w \quad (1)$$

Ο τύπος αντιστοιχεί σε αυτόν της θερμοδυναμικής ισορροπίας για συγκεντρώσεις μίας ουσίας που διανέμεται ανάμεσα σε δύο διαμερίσματα. Για την περίπτωση της προσρόφησης ισχύει ο τύπος Freundlich:

$$\log(X/m) = (1/n)\log C_w + \log K_s \quad (2)$$

Όπου X/m είναι η ποσότητα της ουσίας που προσροφάται ανά μονάδα μάζας (m) προσροφόντος, C_w είναι η συγκέντρωση της ουσίας στο νερό σε κατάσταση ισορροπίας, το $1/n$ εκπροσωπεί την κλίση του ισοθεμούς και K_s είναι η σταθερή της προσρόφησης.

Θεωρώντας ότι η κλίση του ισοθεμούς ισούται με τη μονάδα, το οποίο είναι λογικό για τις περισσότερες περιπτώσεις μη ιονικών ή αδιάλυτων οργανικών παρασιτοκτόνων, ο τύπος (1) παίρνει τη μορφή:

$$K_s = (X/m)/C_w \quad (3)$$

Ο τύπος αυτός αντιστοιχεί στο συντελεστή βιοσυσσώρευσης (BF) του τύπου (1). Ο Kenaga (1975) προτείνει ότι η αρχική απορρόφηση των παρασιτοκτόνων συχνά σχετίζεται με το λόγο επιφανείας:μάζας του οργανισμού. Αυτό άρεται από τους Ellgehausen *et al.* (1980) οι οποίοι συμπέραναν από μελέτες με τρία διαφορετικά είδη, ότι ο τελικός βαθμός βιοσυσσώρευσης σχετίζεται με την συνολική βιομάζα και όχι με το λόγο επιφανείας:μάζα. Οι συντελεστές βιοσυσσώρευσης μειώνονταν με την αύξηση της βιομάζας, σε συγκεκριμένη συγκέντρωση παρασιτοκτόνου. Στους Πίνακες I.ix-1 και I.ix-2 φαίνονται η συσχέτιση της υδροδιαλυτότητας παρασιτοκτόνου και συσσώρευσης και η εισαγωγή παρασιτοκτόνων σε υδρόβιους οργανισμούς.

Μεταφορά στην Τροφική Αλυσίδα

Σειρά μελετών έχουν αποδείξει ότι η εισαγωγή παρασιτοκτόνων στους οργανισμούς από το υγρό μέσον είναι πολύ πιο σημαντική από αυτή της τροφής. Παράδειγμα αποτελεί η μελέτη του Reinert (1972), ο οποίος απέδειξε ότι το παρασιτοκτόνο dieldrin απορροφώταν σε μεγαλύτερο βαθμό από το νερό σε σχέση με την τροφή από τα daphnids. Επίσης οι Canton *et al.* (1975) συμπέραναν ότι η εισαγωγή α -hexachlorocyclohexane (α -HCH) άμεσα από το νερό ήταν η σημαντικότερη οδός για την τροφική σχέση *Chlorella* -----> *Daphnia* ---> *Lebistes*. Οι Ellgehausen *et al.* (1980) επέδειξαν ότι μόνο τμήμα των καταλοίπων στα κατώτερα τροφικά επίπεδα μεταφέρονταν στα υψηλότερα της τροφικής αλυσίδας (Πίνακας I.ix-3).

Διαδικασίες Αποτοξικοποίησης Παρασιτοκτόνων από Οργανισμούς

Τα πολικά προϊόντα μεταβολισμού που προέρχονται από την αποτοξικοποίηση των παρασιτοκτόνων δύνανται να συζευκτούν προ της απέκκρισης (Walker, 1975). Τα φυτά δεν απεκκρίνουν τα παρασιτοκτόνα και τα προϊόντα μεταβολισμού τους, αλλά τα δύο τελευταία εμπλέκονται σε αντιδράσεις σύζευξης με ενδογενείς ενώσεις και αποθηκεύονται σε μεταβολικά ανενεργές περιοχές στα κύτταρα (Khan *et al.*, 1974). Οι ζωικοί οργανισμοί απεκκρίνουν τα προϊόντα σύζευξης ή τα ίδια τα παρασιτοκτόνα κυρίως μέσω των ούρων και της χολής αλλά άλλες οδοί που ακολουθούνται είναι αυτές των αυγών, γάλακτος και ιδρώτα (Walker, 1975). Ο ρυθμός που λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις προσδιορίζουν την επιλεκτική τοξικότητα των παρασιτοκτόνων σε διάφορους οργανισμούς και σχετίζονται επίσης με τις διαφορές στην δραστηριότητα των συστημάτων αποτοξικοποίησης (Khan *et al.*, 1974, 1975).

Πίνακας I.ix-1: Συσχέτιση υδροδιαλυτότητας παρασιτοκτόνου και συσσώρευσης στα ψάρια (Hamelink *et al.*, 1971)

Παρασιτοκτόνο	Υδροδιαλυτότητα (ppm)	Μέγιστη Συσσώρευση (ολόκληρο άτομο)
Lindane	10	χ 100
Toxaphene	3	χ 10.000
Dieldrin	0.25	χ 10.000
DDT	0.0012 - 0.037	χ (100.000 - 10 ⁶)
2,4-D	725	χ 150

Πίνακας I.ix-2: Εισαγωγή παρασιτοκτόνων σε υδρόβια είδη (Moriarty, 1975)

Είδος (εισαγωγή από το μέσον)	Παρασιτο κτόνο	Συγκέντ ρωση στο Νερό (ppb)	Ρυθμός Εισαγωγής προς Συγκέντρωση στο Νερό (d ⁻¹)	Εκτιμού μενη Συγκέντρωση Σταθερών Συνθηκών (ppm)
Lepomis macrochirus	Endrin	0,2 2,0	756 385	
Cottus perplexus	Dieldrin	0,5	1.121	28
Lebistes reticulatus	Dieldrin	0,8-1,1	1.064	230
Salmo gairdneri	Toxaphen e	0,84	1.123	
Tubifex spp.	Dieldrin	80	250	352
Daphnia magna	Dieldrin	2,1 4,5 12,8	8.790 13.200 10.350	
Amblema plicata (δίθυρο)	Dieldrin	0,02 20	165 75	0,055 16.9
Tetragone uria spp. (νύμφη οδονάτων)	¹⁴ C-DDT	3,6 4,0 6.1 10,8 13,3 20,0	888 850 688 611 616 790	
Είδος (εισαγωγή από την τροφή)	Παρασιτο κτόνο	Συγκέντρ ωση στην Τροφή (mg ανά kg βάρους σώματος)	Ρυθμός Εισαγωγής (d ⁻¹) (ppb)	

		ανά εβδομάδα)		
Salmo clarki lewisi	DDT	1,0 3,0	34 193	
Leptodius floridanus	Dieldrin	0,213 (ppm)	10 (ξηρό βάρος)	

Πίνακας I.ix-3: Μεταφορά καταλοίπων στις τροφικές αλυσίδες: Άλγη/Δάφνιες (I) και Δάφνιες/Γατόψαρα (II) (Ellgehausen et al., 1980).

Χημικό	% Μεταφοράς - I	% Μεταφοράς - II
pp'- DDT	23.0	44.0
Fluor odifen	-	14.1
Terbu tryn	11.9	9.1
Atrazi ne	3.9	9.1

Πίνακας I.ix-4: Ενζυμικά συστήματα που μεταβολίζουν παρασιτοκτόνα (Walker, 1975)

Ενζυμικό Σύστημα	Τοποθεσία	Μεταβολιζόμενο Χημικό
Mixed Function Oxidases (MFOs)	Μικροσωματικό σύστημα στο ήπαρ σπονδυλωτών και λιπώδης ιστός εντόμων	Πολλά λιποδιαλυτά παρασιτοκτόνα
Phosphatases	Σε σχεδόν όλους τους ιστούς και υποκυτταρικά τμήματα	Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και "αέρια νεύρων"
Carboxyesterases	Στους περισσότερους ιστούς σπονδυλωτών και εντόμων	Malathion και malaoxon
Epoxide hydrase	Μικροσώματα, ειδικότερα στο ήπαρ θηλαστικών	Εποξείδιο, συμπεριλαμβανομένων των dieldrin και heptachlor
DDT dehydrochlorinase	Σε όλα τα σπονδυλωτά και έντομα που μελετήθηκαν	pp'-DDT και pp'-DDD
Glucuronyl transferases	Μικροσώματα, κυρίως από το ήπαρ και πεπτικό σύστημα, διαδεδομένα σε πολλά σπονδυλωτά αλλά απόντα από τα έντομα	Μεταβολικά προϊόντα υδροξυλίωσης του dieldrin, βενζοπυρένιο, chlorfenvinphos και διφαινύλιο
Glutathione-S-transferases	Στο ήπαρ σπονδυλωτών και στα έντομα	Πολλά χλωριούχα χημικά όπως γ-BHC και tetrachloronitrobenzene (TCNB), κάποια εποξείδια

Πίνακας I.ix-5: Παραδείγματα αντιδράσεων αποτοξικοποίησης παρασιτοκτόνων από οργανισμούς (Khan *et al.*, 1975)

Αντίδραση	Μικροοργανισμοί	Χλωρίδα	Πανίδα
Οξείδωση			
Αρυλική υδροξυλίωση	Καρβαρύλιο	Καρβαρύλιο, 2,4-D	Καρβαρύλια, διφαινύλια, Baygon
Αλιφατική υδροξυλίωση	Αλδεύδες, κετόνες, οξείδωση-β των 2,4-διγλωροφαινοξυ-αλκανοϊκών οξέων	Αλκυλικά τμήματα, οξείδωση-β του MCPB	Κυκλοδιένια, αλκυλικά τμήματα, DDT, p-νιτροτολουένιο και άλλα αλκυλικά βενζόλια, ροτενόνη, πυρεθρόνες
Απαλκυλίωση	-	Μαλαθείο, abate	Μαλαθείο, παραθείο, Baygon, methoxychlor
N-απαλκυλίωση	Αλκυλαμίνες, καρβαρύλια, zactran, simazine	Φαινιλουρίες, triazines, διφαιναμίδια, trifluralin	N-methyl και N,N'-di-methyl carbamates, bidrin
N-μεθυλική υδροξυλίωση	-	Bidrin, azodrin	N-methyl carbamates, bidrin
O-αποθειοποίηση	-	Phosphorothioates και dithioates	Phosphorothioates
Οξείδωση θείου	Temik, migamoto, fenitrothion, sulfothion	Temik, abate, mesurool, phorate	Temik, disytron
Εποξειδίωση	Κυκλοδιένια	Κυκλοδιένια	Κυκλοδιένια
Ενδατική εποξειδίωση	Dieldrin	Dieldrin	Κυκλοδιένια

Διάσχιση αιθέρα	-	2,4-D	Βενζοδιοξόλες , piperonyl butoxide, sesamex
Υδρόλυση			
Υδρόλυση εστέρα	Dichlorvos, diazinon, παραθειό, DFP, phorate hinosan, μαλαθειό, trichlorofon, Carbaryl	Οργανοφωσφο ρικά εντομοκτόνα και μυκητιοκτόνα, 2,4- carbamate ester	Οργανοφωσφο ρικά και καρβαμικά εντομοκτόνα
Υδρόλυση αμίδων	-	Propanil, CMPT	Dimethoate
Αναγωγή			
Απογλωρίωση			
Αναγωγική	DDT, s- triazine, γBHC	Μη συνήθης, γBHC	DDT, γBHC
Οξειδική	2,4-D	2,4-D, 2,4,5-T	Κυκλοδιένια

Πίνακας I.ix- 5:	Συνέχεια		
Απυδροχλωρίωση			
Αναερόβια	DDT	Μη συνήθης	DDT
Οξειδική	-	-	Photodieldrin
Αναγωγική	EPN, denitrothion	C-6989, trifluralin	Παραθείο, EPN
Διάσχιση δακτυλίων	2,4-D, DDT, simazine	-	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.Χ.
Η Τοξικότητα των Παρασιτοκτόνων

Υδρόβιοι Οργανισμοί

Τα οργανοχλωρικά παρασιτοκτόνα είναι ισχυρώς τοξικά σε πολλούς υδρόβιους οργανισμούς. Για τα περισσότερα είδη ιχθύων οι τιμές για την 96hr LC50 κυμαίνονται από 1 έως 200 ppb ενώ για άλλα παρασιτοκτόνα οι τιμές είναι πολύ υψηλότερες. Οι αντίστοιχες τιμές των οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων κυμαίνονται σε μαγαλύτερα επίπεδα, ως ασθενέστερα (Πίνακας Ι.χ-1) (Connell & Miller, 1986). Ο Butler (1963) επέδειξε ότι τα οργανοχλωρικά εντομοκτόνα καταστέλλουν τη φωτοσύνθεση στις φυσικές συναθροίσεις φυτοπλαγκτού στην σχετικά υψηλή συγκέντρωση των 1000 ppb (έκθεση 4 hr). Τα αμφίβια όπως βάτραχοι, φρύνοι και οι γυρίνοι αυτών είναι πολύ λιγότερο ευαίσθητοι στην τοξική δράση των παρασιτοκτόνων από τα ψάρια (Brown, 1978). Ανάμεσα στις κατηγορίες παρασιτοκτόνων συχνά συναντάται μεγάλο εύρος ανοχών από συγκεκριμένα είδη.

Χερσαίοι Οργανισμοί

Γενικά τα εντομοκτόνα είναι πιο τοξικά στους ομοιόθερμους οργανισμούς από τα ζιζανιοκτόνα και μυκητοκτόνα, όπως προτείνεται από τις τιμές της LD₅₀ για τον αρουραίο *Rattus norvegicus* (Pimental, 1971). Ιδιαίτερως τοξικά για τα θηλαστικά είναι τα κυκλοδιένια (LD₅₀ < 100 mgkg⁻¹) και τα οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα όπως το παραθείο, azinphosmethyl, phosphonidon και μεθυλικό παραθείο. Οι μελέτες διατροφής με την χρήση πτηνών επέδειξαν την ευαισθησία τους σε πολλά οργανοχλωρικά και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, που συχνά έπαιρναν τιμές μικρότερες των 100 mgkg⁻¹. Μικρότερη ευαισθησία παρουσιάζεται κατά τη χρήση ζιζανιοκτόνων και μυκητοκτόνων. Οι άγριοι πληθυσμοί πτηνών δύνανται να δεχτούν σημαντική πλήξη από την έκθεση σε εντομοκτόνα (Connell & Miller, 1986).

Απόκριση Οικοσυστήματος

1. *Πληθυσμιακή μείωση λόγω άμεσης τοξικής δράσης, δευτερευούσης δηλητηρίασης και εξολόθρευση θηραμάτων:*

Το μέγεθος και η διάρκεια της άμεσης τοξικής δράσης κυμαίνονται. Σχετικά ασήμαντες μεταβολές στα επίπεδα πυκνότητας δύνανται να προκύψουν λόγω μίας χωρικά περιορισμένης επίπτωσης στο σύνολο του πληθυσμού ή λόγω της ικανότητας για ταχεία επαναποίκηση και αναπαραγωγή ως αντίδραση σε μεταβολή της πυκνότητας. Αντίθετα δύνανται να επέλθει εξολόθρευση ορισμένων ιδιαίτερως ευαίσθητων ειδών. Οι ζωικοί πληθυσμοί πτωματοφάγων και θηρευτών συχνά πλήττονται από δευτερεύουσα δηλητηρίαση μέσω κατανάλωσης ρυπαρής τροφής. Σημαντική πληθυσμιακή μείωση παρασίτων και θηρευτών προκύπτει επίσης από την μείωση των αριθμών θηραμάτων καθώς οι πρώτοι δεν δύνανται να προσαρμοστούν στα νέα τροφικά δεδομένα.

2. *Πληθυσμιακή αύξηση λόγω ανάκαμψης παρασίτων και αντικατάστασης ενός είδους από άλλο:*

Η πληθυσμιακή αύξηση των παρασίτων επέρχεται ορισμένες φορές από την πρωταρχική εξολόθρευση των θηρευτών τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις ο

πληθυσμός των παρασίτων δύναται να αυξηθεί σημαντικά μετά την εφαρμογή του παρασιτοκτόνου ή μπορεί να εμφανιστούν νέα παράσιτα. Η απώλεια ενός είδους από το χώρο διαβίωσής του είναι συχνά το αίτιο της εισβολής ενός άλλου είδους παρασίτου.

3. Υποθνησιγόνες επιπτώσεις στην επιβίωση και αναπαραγωγή της πανίδας:

Οι υποθνησιγόνες επιπτώσεις στα φυσιολογικά και ηθολογικά χαρακτηριστικά μπορούν να επηρεάσουν την επιβίωση και αναπαραγωγή πληθυσμών δημιουργώντας:

- ♦ αποθήκευση υποθνησιγόνων δόσεων και θνησιγόνο κινητοποίηση αποθηκευμένων εντομοκτόνων δεσμευμένων σε λιπίδια
- ♦ μεταβολές στις σχέσεις θηρευτή - θηράματος και στην επιβίωση
- ♦ μεταβολές στην αναπαραγωγική επιτυχία, π.χ. μεταλλάξεις στην γονιμότητα αρθροπόδων, θνησιμότητα στις νύμφες των ψαριών, καθυστερημένη ωοτοκία, μειωμένη γονιμότητα, μειωμένη εκκόλαψη και λεπτά κελύφη αυγών στα πτηνά.

4. Μεταβολές στη γενετική ποικιλότητα και ανοχή:

Η δημιουργία μηχανισμών ανοχής στα παρασιτοκτόνα επέρχεται μέσω της γενετικής διαφοροποίησης, η οποία καθιστά κάποια άτομα πιο ανθεκτικά από άλλα. Τα επιβιώνοντα άτομα είναι κατά συνέπεια, γενότυποι επιλεγμένοι για ανοχή στην τοξική δράση των παρασιτοκτόνων. Με την συνεχή έκθεση, το ποσοστό των ανθεκτικών ατόμων θα αυξηθεί με άμεσα αποτελέσματα στην ανοχή των επόμενων γενεών.

Οργανοχλωρικά Παρασιτοκτόνα

Η μέθοδος δράσης, ή τύπος βιολογικής δραστηριότητας του DDT και συγγενικών ενώσεων ποτέ δεν μελετήθηκε εκτενώς. Οι επιπτώσεις εστιάζονται στους νευρώνες όπου δημιουργείται εμπλοκή στην ομαλή νευρική διέγερση, τόσο των εντόμων όσο και θηλαστικών. Τελικά οι νευρώνες διεγείρονται σε υψηλή συχνότητα δημιουργώντας μυικούς σπασμούς και θάνατο. Το DDT δεν αντιδρά με κάποιο συγκεκριμένο ένζυμο. Έτσι συμπεραίνεται ότι σημαντικός παράγοντας της δράσης του είναι η φυσική εμπλοκή στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Τα μόρια του DDT διατηρούν τις θύρες νατρίου ανοιχτές, έτσι ώστε να μην γίνεται επαρκής ανάκαμψη προς την κατάσταση ηρεμίας της διαφοράς δυναμικού της μεμβράνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επαναλαμβανόμενη εκροή ιόντων δημιουργώντας την κατάσταση του τετάνου στους μύες (Ware, 1991).

Οργανοφωσφορικά Παρασιτοκτόνα

Τα οργανοφωσφορικά επιφέρουν την τοξική τους δράση αναστέλλοντας την δραστηριότητα των χολινεστεράσεων (cholinesterases, ChE) του νευρικού συστήματος. Τα παρασιτοκτόνα γενικού τύπου R1R2P(O,S)X δεσμεύονται με την χολινεστεράση (ChE) μέσω προσκόλλησης του ηλεκτρόφιλου ατόμου φωσφόρου στην εστερική περιοχή του κέντρου δράσης του ενζύμου, δημιουργώντας ένα μη αντιστρέψιμο σύμπλεγμα ενζύμου-αναστολέα. Το σύμπλεγμα στη συνέχεια

διασπάται, απελευθερώνοντας το τμήμα X ως HX και το φωσφορυλιωμένο ένζυμο. Το ένζυμο δύναται στη συνέχεια να υδρολυθεί απομακρύνοντας το φωσφορυλικό τμήμα και να συνεχίσει την φυσιολογική του δραστηριότητα. Η συγκεκριμένη υδρόλυση λαμβάνει χώρα σε τόσο αργούς ρυθμούς που η εμπλοκή της ChE θεωρείται τελικά μη αντιστρέψιμη (De Bruin, 1976).

Δημιουργώντας εμπλοκή στην ChE, αναστέλλεται η απομάκρυνση της ακετυλοχολίνης (acetylcholine, Ach) από τις συνάψεις κατά τη διάρκεια των νευρικών διεγέρσεων. Έτσι επέρχεται άρση της ικανότητας μεταφοράς των νευρικών σημάτων από τον ένα νευρώνα στον επόμενο λόγω της συσσώρευσης ποσοτήτων ακετυλοχολίνης στην σύναψη. Το αποτέλεσμα είναι η παράλυση του μυϊκού συστήματος. Τα όργανα που πλήττονται πρώτα είναι αυτά του αναπνευστικού συστήματος (Ware, 1991).

Πίνακας I.x-1: Τιμές οξείας τοξικότητας οργανοχλωρικών και οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων σε διάφορους οργανισμούς (ppb) (Hurlbert, 1975).

Εντομοκτόνο	Μείωση Φωτοσύνθεσης Φυτοπλαγκτού (%) ^a	Δάφνιες (48hrEC50) ^b	Αμφίποδα ^c Γλυκέων Υδάτων (96hr LC50)	Θαλάσσια Δεκάποδα ^d (96hr LC50)	Λάρβες Κουνουπιών ^e (24hr LC50)	Γυρίνοι ^f (96hr LC50)	12 Είδη Ψαριών Γλυκέων Υδάτων (96hr LC50)	7 Είδη Ψαριών Υφάλμυρων Υδάτων (96hr LC50)
Οργανοχλωρικά								
Aldrin	85	28	9800	8-33	-	150	-	5-100
BHC	-	-	-	-	-	3200	-	-
Chlordane	94	29	26	-	-	-	-	-
DDT	77	0.36	1.0	0.6-6	10	1000	2-21	0.4-89
Dieldrin	85	250	460	7-50	3	150	-	0.9-34
Endrin	46	20	3.0	1.7-12	-	120	-	0.05-3.1
Heptachlor	94	42	29	8-440	-	440	-	0.8-194
Lindane	28	460	48	5-10	-	4400	2-131	9-66
Methoxychlor	81	0.78	0.8	4-12	-	330	-	12-150
Mirex	42	-	-	-	-	-	-	-
Thiodan	87	-	5.8	-	-	-	-	-
Toxaphene	91	15	26	-	-	140	3-18	-
Οργανοφωσφορικά								
Abate	-	-	8.2	-	5	-	-	-

Πίνακας	I.Χ-1 :	Συνέχεια						
Baytex	7	0.80	8.4	-	2.3	-	980-3404	-
Chlorthion	-	-	-	-	-	-	-	-
Diazinon	7	0.90	200	-	-	-	-	-
Dibrom	56	0.35	110	-	-	1700	-	-
Dichlorvos	-	0.066	0.50	4-45	110	-	-	200-2680
Dursban	-	-	0.11	-	6.3	-	-	-
EPN	-	-	15	-	-	-	-	-
Fenitrothion	-	-	-	-	25	-	-	-
Guthion	0	-	-	-	-	130	4-4270	-
Malathion	7	1.8	1.8	33-88	320	420	101-12900	27-3250
Methyl parathion	-	-	-	2-7	6.5	-	2750-9000	5200-75800
Parathion	-	0.60	0.60	-	3.1	1000	-	-
Phosdrin	-	0.16	0.16	11-69	-	-	-	65-800
Phosphamidon	-	8.8	8.8	-	-	-	-	-
Systox	7	-	-	-	-	-	-	-
TEPP	-	-	-	-	-	-	-	-

a: Ποσοστιαία μείωση στη παραγωγικότητα φυσικής συνάθροισης σε διάρκεια έκθεσης 4 hr σε 1000 ppb

b: EC = η απαιτούμενη συγκέντρωση για την ακινητοποίηση 50% του πληθυσμού πειραματοζώων

c: Gammarus lacustris

d: Crangon septemspinosa, Palaeomonetes vulgaris & Pagurus longicarpus

e: Anopheles albimanus

f: Bufo woodhousii

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Πίνακας Π.Ι.-1: Αριθμός σειράς πειραμάτων, συγκέντρωση δραστικής ουσίας (υπερφωσφορικό λίπασμα) και επαναλήψεις

Σειρά	Συγκέντρωση Δραστικής Ουσίας (g l ⁻¹)	Επανάληψεις
1 ^η	0.00	2
1 ^η	5.00	2
1 ^η	2.00	2
2 ^η	0.00	2
2 ^η	0.25	2
2 ^η	0.50	2
2 ^η	0.75	2
2 ^η	1.00	2
3 ^η	0.00	2
3 ^η	1.25	2
3 ^η	1.50	2
3 ^η	1.75	2

Πίνακας II.i-2: Αριθμός σειράς πειραμάτων, συγκέντρωση δραστικής ουσίας (οργανοφωσφορικό παρασιτοκτόνο) και επαναλήψεις

Σειρά	Συγκέντρωση Δραστικής Ουσίας (mg l ⁻¹)	Επανάληψεις
1 ^η	0.00	2
1 ^η	1.00	2
1 ^η	1.25	2
1 ^η	1.50	2
2 ^η	0.00	2
2 ^η	2.00	2
2 ^η	2.50	2
2 ^η	3.00	2

Παράρτημα Π.iii.: Παρασκευή Bouin Holland.

Ουδέτερος οξικός χαλκός:	2,5g στα 100ml ddH ₂ O
Πικρικό οξύ (ενυδατωμένο 50%):	8g στα 100ml ddH ₂ O
Φορμαλδεύδη 40%:	10ml στα 100ml ddH ₂ O
Οξικό οξύ:	1ml στα 100ml ddH ₂ O

Παράρτημα Π.ΙV.: Αφυδάτωση, διαύγαση, παραφίνωση.

1. Αλκοόλη 30%	1 ώρα
2. Αλκοόλη 50%	1 ώρα
3. Αλκοόλη 70%	1 ώρα
4. Αλκοόλη 90%	1 ώρα
5. Αλκοόλη 95%	1 ώρα
6. Απόλυτη αιθανόλη 100%	1 ώρα
7. Απόλυτη αιθανόλη 100%	1 ώρα
8. Απόλυτη αιθανόλη 100%	1,5 ώρες
9. Ξυλόλη	40 min
10. Ξυλόλη	50 min
11. Παραφίνη	2 ώρες
12. Παραφίνη	2 ώρες

Παράρτημα Π.ν.: Χρώση αιματοξυλίνη - Εωσίνη.

1. Αποπαραφίνωση	Ξυλόλη I	5 λεπτά
	Ξυλόλη II	5 λεπτά
2. Απομάκρυνση Ξυλόλης	Απόλυτη αιθανόλη	5 λεπτά
	Απόλυτη αιθανόλη	5 λεπτά
3. Ενυδάτωση	Αλκοόλη 95% I	2 λεπτά
	Αλκοόλη 95% II	2 λεπτά
	Αλκοόλη 70%	2 λεπτά
	Αλκοόλη 50%	2 λεπτά
	Αλκοόλη 30%	2 λεπτά
	ddH ₂ O	2 λεπτά
4. Χρώση	Διάλυμα Αιματοξυλίνης	8 λεπτά
	Όξινη αλκοόλη	2-3 εμβαπτίσεις
	Νερό βρύσης	5 λεπτά
5. Αφυδάτωση	Αλκοόλη 30%	2 λεπτά
	Αλκοόλη 50%	2 λεπτά
	Αλκοόλη 70%	2 λεπτά
6. Χρώση	Αλκοόλη 95%	1 λεπτό
	Διάλυμα Εωσίνης	40 sec
	Αλκοόλη 95%	2-3 λεπτά
7. Αφυδάτωση	Απόλυτη αιθανόλη	2-3 λεπτά
	Απόλυτη αιθανόλη	2-3 λεπτά
8. Διαύγαση	Ξυλόλη	2 λεπτά
	Ξυλόλη	2 λεπτά

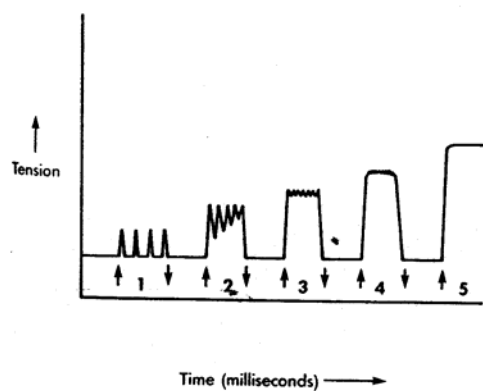
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ.
Συνάθροιση Συστολής στους Μύες

Το συνολικό ποσό ισχύος που αναπτύσσεται από τους σκελετικούς μύες, εξαρτάται από δύο παράγοντες: την συγκέντρωση των σημάτων σε έναν μυ και στην αύξηση των ενεργών κυττάρων σε συγκεκριμένο μυ, η διαδικασία της στρατολόγησης (**recruitment**). Συνεχής ενεργοποίηση του νεύρωνα που κινητοποιεί το μυ καταλήγει στην άθροιση. Εάν τα σήματα καταφτάνουν με χαμηλή συχνότητα, η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου (Ca^{++}) επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα (**rest levels**) πριν την άφιξη του επόμενου σήματος. Όταν δύο ή περισσότερα σήματα φτάνουν με μικρή χρονική διαφορά, τότε ορισμένα ιόντα ασβεστίου παραμένουν στην περιοχή της σύναψης καθώς δεν προλαβαίνουν να επιστρέψουν στο αρχικό κύτταρο πριν απελευθερωθούν περισσότερα. Συνάθροιση εδώ σημαίνει ότι ο μυς μετά την πρώτη συστολή δεν προλαβαίνει να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση και συστέλλεται περισσότερο κατά την άφιξη του δεύτερου σήματος.

Καθώς αυξάνεται ο ρυθμός των ερεθισμάτων που φτάνουν στον μυ, ανάλογα αυξάνεται και η συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου στη σύναψη. Σε υψηλές συχνότητες ερεθισμάτων επέρχεται η κατάσταση του τετάνου. Στο σχήμα IV.i-1 φαίνονται οι διαδοχικές καταστάσεις ερεθισμού ενός μυ, με κατάληξη αυτή του τετάνου (Schauf, 1990).

Γράφημα ΠΙ-1: Αντιδράσεις μύων σε χημικοηλεκτρικό ερέθισμα νευρώνα (Schauf, 1990).



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abel, P.D., (1980a) Toxicity of γ -hexachlorocyclohexane (Lindane) to *Gammarus pulex*: mortality in relation to concentration and duration of exposure. *Freshwater Biology* 10 251-259.
- Abel, P.D. (1980b) A new method for assessing the lethal impact of short term, high level discharges of pollutants on aquatic organisms. *Prog. Water Technology* 13 347-352.
- Abel, P.D. (1989) *Water pollution biology*. Ellis Horwood Ltd.
- Abel, P.D., Axiak, V. (1991) *Ecotoxicology and the marine environment*. Ellis Horwood Ltd.
- Abel, P.D., Skidmore, J.F. (1975) Toxic effects of an anionic detergent on the gills of rainbow trout. *Water Res.* 9 759-765.
- Adelman, I.R., Smith, L.L. (1972) Toxicity of hydrogen sulphide to goldfish (*Carassius auratus*) as influenced by temperature, oxygen and bioassay techniques. *Journal of fisheries Res. Bd. Canada* 29 1309-1317.
- Alabaster, J.S., Lloyd, R. (1980) *Water quality criteria for freshwater fish*. Butterworths for the FAO, London.
- Ball, I.R. (1967b) The toxicity of cadmium to rainbow trout. *Water res.* 1 805-806.
- Brock, T.D., Madigan, M.T. (1988) *Biology of microorganisms*. Prentice Hall international editions.
- Brown, V.N., Jordan, D.H.M., Tiller, B.A. (1967) The effect of temperature on the acute toxicity of phenol to rainbow trout in hard water. *Water res.* 1 587-594.
- Brown, V.N., Jordan, D.H.M., Tiller, B.A. (1969) The acute toxicity to rainbow trout of fluctuating concentrations and mixtures of ammonia, phenol & zinc. *Journal of fish biology* 1 1-9.
- Burrows W.D. (1977) Aquatic aluminium: chemistry, toxicology and environmental prevalence. *CRC Critical reviews of environmental Control* 7 167-216.
- Clark, R.B. (1992). *Marine pollution*. Clarendon University press, Oxford.
- Comber, N.M., Jones, H.T. (1964) Εισαγωγή στη γεωργική χημεία. Μόσχος Γκόρδας, Αθήνα.
- Connell, D.W., Miller, G.I. (1986) *Chemistry and ecotoxicology of pollution*.
- Flower, R.J., Battarbee, R.N. (1983) Diatom evidence of recent acidification of two scotish lochs. *Nature*, 305 130-132.

- Green, N.P.O., Stout, G.W., Taylor, D.J. & Soper, R. (1986) Biological science vol & 2. Cambridge University Press.
- Hewlett, P.S., Plackett, R.L. (1979) The interpretation of quantal responses in biology. Edward Arnold, London.
- Hill, G.C., Hollman, J.S. (1987) Chemistry in context. Thomas Nelson & sons Ltd.
- Lloyd, R. (1960) Toxicity of zinc sulphate to rainbow trout. Annual appl. Biology 48 84-94.
- Lloyd, R., Orr, L.D. (1969) The diuretic response by rainbow trout to sublethal concentrations of ammonia. Water res. 3 335-344.
- Maugh, T.J. (1978) How many chemicals are there? Science 199 162.
- Munday, B., Eleftheriou, A., Kentouri, M., Divanach, P. (1992) The interactions of aquaculture and the environment: a bibliographical review. Commission of the European Communities, Directorate general for fisheries.
- Scauf, C., Mofett, D., Mofett, S. (1990) Human Physiology. Times Mirror/Mosby college publishing.
- Seeley, R.R., Stephens, T.D., Tate, P. (1989) Anatomy and physiology. Times Mirror/Mosby College publishing.
- Sprague, J.B. (1969) The measurements of pollutant toxicity to fish. I. Bioassay methods for acute toxicity. Water res. 3 793-821.
- Sprague, J.B. (1970) The measurement of acute toxicity to fish. II-Utilising and applying bioassay tests. Water res. 4 3-32.
- Sprague, J.B. (1973) The ABC's of pollutant bioassay using in fish. Biological methods for the assessment of water quality. ASTM special technique publishing No 528 6-30. American society for testing and materials.
- Strayer, L. (1988) Biochemistry. W.H. Freeman & Co, New York.
- Swift, D.R. (1993) Aquaculture training manual. Hartnolls Ltd.
- Thurston, R.V., Philips, G.R., Russo, R.C., Hinkins, S.M. (1981) Increased toxicity of ammonia to rainbow trout resulting from reduced concentrations of dissolved oxygen. Canadian journal of fish aquaculture science 38 983-988.
- Ware, G.W. (1982) Fundamentals of pesticides. Thomson publications.

Νεοφύτου, Χ.Ν. (1990) Ιχθυοπονία. University studio press.

Πασπάτης, Μ. (1992) Οπτική και χημική διακριτικότητα στο Λαβράκι, *D. labrax*.
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας.

Σημειώσεις συνεδρίου: Χημικά (τοξικά) στο περιβάλλον (1990) Πανεπιστήμιο του
Αιγαίου, τμήμα περιβάλλοντος, Μόλυβος - Μυτιλήνη.

Χώτος, Γ., Ρογδάκης, Ι. (1992) Υδατοκαλλιέργειες ευρύαλων ψαριών. ΙΩΝ, Σ.
Παρίκου & σία Ο.Ε.