

**ΤΕΙ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

Πτυχιακή Μελέτη

Η χρήση αιθερίων ελαίων ως προνυμφοκτόνα κουνουπιών



**ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΔΗΜΗΤΡΑ ΧΡΙΣΤΟΠΟΥΛΟΥ
ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ: ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΨΕΙΡΟΦΩΝΙΑ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2012

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Εργασία για την πτυχιακή μου μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του ΤΕΙ Κρήτης. Αντικείμενο της εργασίας μου ήταν τα κουνούπια. Πραγματοποιήθηκαν διάφορες δοκιμές μέχρι να καταλήξουμε ακριβώς στο θέμα που θα έχει η πτυχιακή μου μελέτη. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας διάφορων παγίδων ωτοκίας, τόσο από την αναζήτηση στη Διεθνή και ελληνική βιβλιογραφία, όσο και σε συνεργασία με το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Εργαστήριο Εντομολογίας. Ωστόσο δοκιμάστηκε και μία αυτοσχέδια παγίδα με μπαλόνι και φίλτρο καφετιέρας η οποία έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα. Δυστυχώς η προσπάθεια εκτροφής κουνουπιών στο εργαστήριο τα οποία δεν γνωρίζουμε αν είναι αυτόγενα (δεν απαιτείται η κατανάλωση αίματος θηλαστικού για να ωτοκήσουν) απέτυχε, τόσο λόγω έλλειψης εργατικού δυναμικού, όσο και λόγω επικινδυνότητας. Στη συνέχεια άλλη μια εργασία αποτέλεσε η συλλογή προνυμφών από φυσικές και τεχνητές εστίες τόσο και για τα πειράματα που έκανα, όσο και για τη λήψη ενηλίκων για ταυτοποίηση. Το κυρίως θέμα της πτυχιακής μου μελέτης αποτέλεσε όμως η εκχύλιση αιθερίου ελαίου από φυτά λεβάντας και η διενέργεια βιοδοκιμών αποτελεσματικότητας του σαν προνυμφοκτόνο κουνουπιών.

Στην εκπόνηση της μελέτης μου συνέβαλαν αρκετά άτομα τα οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω. Αρχικά Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη καθηγήτρια μου Γιώτα Ψειροφωλιά, τον ερευνητή του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου κύριο Ηλία Κιούλο, τον κ. Δημήτρη Λυδάκη και την κα Αργυρώ Στραταριδάκη για τη βοήθεια τους στην εκχύλιση αιθερίων ελαίων, τον συμφοιτητή μου Κώστα Νιαμούρη για την πολύτιμη βοήθεια του στη συλλογή κουνουπιών, την οικογένεια μου για την ψυχολογική στήριξη τους και τέλος την φίλη μου Νατάσα Χουρδάκη για την τεράστια υπομονή και επιμονή που είχε απέναντι μου.....

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΜΕΡΟΣ Α ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΕΝΤΟΜΑ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑ ΣΤΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ .	2
2. ΤΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ	7
2.1. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΞΗ DIPTERA.....	7
2.2. ΤΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ.....	8
2.3. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ.....	10
3. ΤΑ ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ	10
3.1. Η ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ	11
3.1.1. ΑΠΟΣΤΑΞΗ.....	11
3.1.2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ.....	12
3.1.3. ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΑΡΑΛΑΒΗ.....	13
3.1.4. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ.....	14
3.1.5. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ	14
3.1.6. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ ΧΩΡΙΣ ΔΙΑΛΥΤΗ	14
4. Η ΛΕΒΑΝΤΑ.....	15
5. Ο ΠΑΓΚΟΣΜΙΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΥΓΕΙΑΣ (WORLD HEALTH ORGANIZATION -WHO).	16
5.1. ΤΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΟΚΙΜΩΝ ΤΟΥ ΠΑΓΚΟΣΜΙΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΥΓΕΙΑΣ ΓΙΑ ΠΡΟΝΥΜΦΟΚΤΟΝΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ.....	16
5.1.1. ΦΑΣΗ 1: ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ.....	18
5.1.2. ΦΑΣΗ 2: ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ ΠΕΔΙΟΥ	20
5.1.3. ΦΑΣΗ 3: ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ ΠΕΔΙΟΥ.....	22
ΜΕΡΟΣ Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	24
6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	25
7. ΠΡΟΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ (ΔΟΚΙΜΕΣ)	25
7.1. ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΑΓΙΔΩΝ ΩΟΤΟΚΙΑΣ.....	25
7.1.1. ΠΑΓΙΔΕΣ ΜΕ ΣΦΟΥΓΓΑΡΙ ΚΑΙ ΦΙΛΤΡΟ ΚΑΦΕΤΙΕΡΑΣ.....	25
7.1.2. ΠΑΓΙΔΕΣ ΜΕ ΜΠΑΛΟΝΙ ΚΑΙ ΦΙΛΤΡΟ ΚΑΦΕΤΙΕΡΑΣ.....	26
7.1.3. ΠΑΓΙΔΑ ΜΕ ΓΛΑΣΤΡΑΚΙΑ ΚΑΙ ΓΛΩΣΣΟΠΙΕΣΤΡΑ.....	26
8 ΟΙ ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ.....	27
8.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	27
8.1.1. Η ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ	27

8.2. ΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ	29
8.3. ΟΙ ΔΟΚΙΜΕΣ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ.....	29
8.3.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
8.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	31
8.5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	37
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	38

ΜΕΡΟΣ Α
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ENTOMA ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ

Τα έντομα αποτελούν την πολυπληθέστερη κλάση των Αρθρόποδων με ποσοστό γύρω στο 90% του συνόλου. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν ένα εκατομμύριο είδη εντόμων, αν και ο πραγματικός αριθμός εικάζεται ότι φτάνει μέχρι και τα 10 εκατομμύρια, γιατί πολλά από τα έντομα που ζουν στα τροπικά δάση δεν έχουν ακόμη περιγραφεί και ταξινομηθεί ως διαφορετικοί οργανισμοί. Πολλά έντομα προσφέρουν τροφή και άλλες πολύτιμες υπηρεσίες στον άνθρωπο, όπως στο να συμβάλλουν στην επικονίαση των δένδρων και άλλων φυτών, στην αποσύνθεση και ανακύκλωση των νεκρών οργανισμών, μαζί με τα βακτήρια και τους μύκητες. Μερικά έχουν φαρμακευτική χρήση (π. χ. κανθαριδίνη από τα σκαθάρια) , άλλα συμβάλλουν στην βελτίωση του εδάφους και άλλα προσφέρουν ψυχαγωγία και αισθητική απόλαυση σε μεγάλο αριθμό ατόμων όλων των ηλικιών (πεταλούδες χρησιμοποιούνται σε κάδρα, μουσεία). Ένα μικρό ποσοστό εντόμων είναι επιβλαβές στη γεωργία και στη δημόσια υγεία. Τα έντομα με υγειονομικό ενδιαφέρον επηρεάζουν, σε σημαντικό ενίοτε βαθμό, την υγεία και την ευημερία του ανθρώπου. Εκτός από το γεγονός ότι ορισμένα από αυτά είναι βιολογικοί ή μηχανικοί μεταβιβαστές - φορείς (vectors) παρασίτων, προκαλούν και εντομοφοβία σε μεγάλο αριθμό ατόμων. Επίσης, προκαλούν ενόχληση, ερεθισμούς και κνησμούς από τσιμπήματα, βλάβη σε αισθητήρια όργανα (μάτια, αυτιά, ρινικές κοιλότητες) , δηλητηριάσεις (με το τσίμπημα, κέντρισμα, κνιστικές τρίχες) , δερματίτιδες, μυΐαση, και αλλεργία (από τμήματα εντόμων, λέπια πεταλούδας, τσιμπήματα, κεντρίσματα) (Παπαδάκης, 1956).

Ορισμένες από τις τάξεις εντόμων υγειονομικής σημασίας είναι (Παπαδάκης, 1956) :

Η τάξη *Diptera* στην οποία ανήκουν:



- Τα κουνούπια (Οικ. *Culicidae*), τα οποία είναι φορείς λοιμώξεων όπως ελονοσίας, κίτρινου πυρετού, δάγγειου πυρετού, φιλαρίαση και αρκετές ιογενείς εγκεφαλίτιδες (Παπαδάκης, 1956).

Εικόνα 1: Κουνούπι



Εικόνα 2: Οικιακή μύγα

- Η οικιακή μύγα (Οικ. Muscidae) η οποία προκαλεί δυσεντερία, σαλμονέλωση, τυφοειδή πυρετό, χολέρα, άνθρακα, φολιομευλίτιδα, τέτανο. (Χανιώτης, 1999)



Εικόνα 3: Μύγα τσε-τσε

- Η μύγα τσε-τσε (Οικ. Glossidae), με το τσίμπημα της, τη θανατηφόρα παρασιτική ασθένεια αφρικανική τρυπανοσωμίαση τη γνωστή νόσος του ύπνου. (www.el.wikipedia.org/wiki).

- Οι φλεβοτόμοι (Οικ. Psychodidae), είναι οι αιμομυζητικές σκνίπες που από το τσίμπημα τους προκαλείται ένας αισθητός πόνος και τσούξιμο (Χανιώτης, 1999).



Εικόνα 4: Φλεβοτόμος



Εικόνα 5: Σιμουλίδα

- Οι σιμουλίδες (Οικ. Simullidae), γνωστές ως μαύρες μύγες προκαλούν απλά αιμορραγία η οποία είναι ανώδυνη (Χανιώτης, 1999).



Εικόνα 6: Νυσσιτική σκνίπα

- Οι νυσσιτικές σκνίπες (Οικ. *Ceratopogonidae*), προκαλούν απλά πόνο και φλύκταινες (Χανιώτης, 1999).

Η τάξη Lepidoptera στην οποία ανήκουν:



Εικόνα 7: Πιτυοκάμψη

- Οι πεταλούδες και οι ατελείς μορφές τους οι κάμπιες (προνύμφες). Οι κάμπιες αυτές φέρουν κάποιες κνιστικές τρίχες η οποίες όταν έρθουν σε επαφή με τον άνθρωπο προκαλούν δερματίτιδα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της περίπτωσης η πιτυοκαμψη των πεύκων (Χανιώτης, 1999-Τσελενέντης, 1999).

Η τάξη Hymenoptera στην οποία ανήκουν:



Εικόνα 8: Σφήκα

- Οι σφήκες, οι μέλισσες, το δηλητήριο τους δεν είναι επικίνδυνο, απλά προκαλεί πόνο, τσούξιμο, τοπικό οίδημα και φλεγμονή (Παπαδάκης, 1956).

- Τα μυρμήγκια, τα οποία με το τσίμπημά τους προκαλούν σχεδόν τα ίδια συμπτώματα (Παπαδάκης, 1956).



Εικόνα 9: Μυρμήγκι



Εικόνα 10: Κατσαρίδα

Η τάξη Dictyoptera στην οποία ανήκουν:

- Οι **κατσαρίδες**, είναι από τα έντομα που δεν προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο με την επαφή αλλά με το να μολύνει τροφές, νερό και μαγειρικά σκεύη έτσι ώστε να είναι υπεύθυνες για τροφικές δηλητηριάσεις, δυσεντερία, διάρροια και γαστρεντερίτιδα (Χανιώτης

και Τσελενέντης, 1999).

Η τάξη Hemiptera, στην οποία ανήκουν:



Εικόνα 11: Κοριός

- Οι **κοριοί (Οικ. Cimicidae)**, η υγειονομική σημασία των κοριών είναι αρκετά σημαντική. Τα νύγματα τους προκαλούν ερυθρωπούς πομφούς και κνησμό. Η ηπατίτιδα Β είναι μάλλον η μοναδική λοίμωξη όπου συμμετέχουν σε κάποιο μικρό βαθμό για την μετάδοσή

της. (Παπαδάκης, 1956).

Η τάξη Anoplura, στην οποία ανήκουν:



Εικόνα 12: Ψείρα

- Οι **ψείρες**, οι οποίες διακρίνονται ψείρες της

κεφαλή και του σώματος. Γνωστό σύμπτωμα είναι η φθειρίαση κυρίως παλιότερα. Τα νύγματα τους προκαλούν στο

δέρμα κοκκινίλες και έντονο κνησμό, με το

ξύσιμο όμως προκαλείται φλεγμονή και στη συνέχεια δευτερογενείς λοιμώξεις με αποτέλεσμα φλυκταινών, εφελκίδων και πύον. Σε μικρότερες ηλικίες μπορεί να προκαλέσει αναιμία και αϋπνία. Η ψείρα του σώματος είναι ο ξενιστής του τύφου, του πυρετού των χαρακωμάτων και του υπόστροφου πυρετού (Παπαδάκης, 1956).

Η τάξη Siphonaptera στην οποία ανήκουν:

Οι ψύλλοι, οι οποίοι με τα νύγματα τους προκαλούν ερύθημα, οίδημα και έντονο κνησμό. Στο σημείο του τσιμπήματος εμφανίζεται μια μαύρη κηλίδα που περιβάλλεται από διογκωμένο και κοκκινωπό δέρμα (Παπαδάκης, 1956).



Εικόνα 13: Ψύλλος

3. ΤΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ

3.1. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΞΗ DIPTERA

Τα Δίπτερα χαρακτηρίζονται από το ότι έχουν ένα μόνο ζεύγος πτερύγων ενώ το δεύτερο, το οπίσθιο ζεύγος, είναι ατροφικό και έχει διαμορφωθεί σε ζεύγος ροπαλοειδών οργάνων που ονομάζονται αλτήρες (halteres). Οι αλτήρες πάλλονται κατά την πτήση των εντόμων και βελτιώνουν την ισορροπία του εντόμου. Οι μπροστινές πτέρυγες είναι μεμβρανώδεις, διαφανείς με φτωγή νεύρωση. Υπάρχουν μερικά μόνο είδη που είναι δευτερογενώς άπτερα. Το σώμα των ενηλίκων χωρίζεται ευκρινώς σε τρία μέρη, κεφαλή, θώρακα και κοιλία. Η κεφαλή είναι μεγάλη, σε σχέση με το μέγεθος του σώματος και το μεγαλύτερο μέρος της καταλαμβάνεται από τους σύνθετους οφθαλμούς. Σε μερικά είδη και συνήθως στα αρσενικά άτομα, οι οφθαλμοί αυτοί είναι τόσο μεγάλοι ώστε η διαχωριστική μεταξύ τους λωρίδα να έχει σχεδόν εξαλειφθεί. Στην περίπτωση αυτή η κεφαλή ονομάζεται ολοπτική (holoptic) ενώ όταν υπάρχει η διαχωριστική λωρίδα μεταξύ των σύνθετων οφθαλμών τότε ονομάζεται διχοπτική (dichoptic). Ακόμη στην κεφαλή μπορεί να υπάρχουν τρεις απλοί οφθαλμοί (ocelli) (Σαββοπούλου κ. α., 2011). Οι προνύμφες είναι σαν σκουλήκια, άποδες και ακέφαλες ή ορισμένες φορές ευκέφαλες, άποδες (Σαββοπούλου κ. α., 2011).

Στην πλειονότητά τους τα δίπτερα είναι ωοτόκα. Ωστόσο υπάρχουν είδη που αποθέτουν προνύμφες αντί αυγών. Από τα είδη Culicidae μόνο μερικά είδη αποθέτουν προνύμφες ενώ από τα Tabanidae πολλά. Από τα Δίπτερα με υγειονομική σημασία, προνυμφοτοκία παρατηρείται σε ορισμένα Cyclorhapha και Pupipara. Οι προνύμφες μπορεί να αποτίθενται ως 1ης ηλικίας (*Sarcophaga* sp.) ή ως πλήρως ανεπτυγμένες προνύμφες, που νυμφώνονται αμέσως μετά την απόθεσή τους. (*Glossina* sp.). Ωοζωοτοκία έχουμε στην περίπτωση όπου αποτίθενται αυγά που περιέχουν προνύμφη και εκκολάπτονται αμέσως μετά την απόθεσή τους (Σαββοπούλου κ. α., 2011).

Είναι κατά το πλείστον ζημιογόνα έντομα για τα φυτά αλλά και έντομα υγειονομικής σημασίας, ορισμένα μάλιστα είναι απομυζητικά και κατά συνέπεια φορείς σοβαρών ασθενειών για τον άνθρωπο και τα ζώα. Η μεταμόρφωση τους είναι

πλήρης ανήκουν στην κατηγορία των ολομετάβολων εντόμων (Σαββοπούλου κ. α., 2011).

2.2. ΤΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ:

Ως κουνούπια περιγράφονται τα δίπτερα που ανήκουν κυρίως σε δύο υποοικογένειες της οικογενείας Culicidae: την Culicinae και την Anophelinae, με περισσότερα από 3. 500 είδη σε όλο τον κόσμο. Πρόκειται για έντομα υγειονομικής σημασίας, καθώς προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο αλλά και σε άλλα θηλαστικά. Στα Anophelinae υπάγεται το γένος Anopheles πολλά είδη του οποίου μεταδίδουν την ελονοσία στον άνθρωπο. Στα Culicinae υπάγονται τα περισσότερα γένη, τα πλέον ενδιαφέροντα των οποίων είναι τα Aedes, Culex, Culiseta με πολυάριθμα είδη των οποίων είναι γνωστά ως φορείς σπουδαίων παθογόνων και παρασίτων του ανθρώπου (Σαββοπούλου κ. α., 2011).

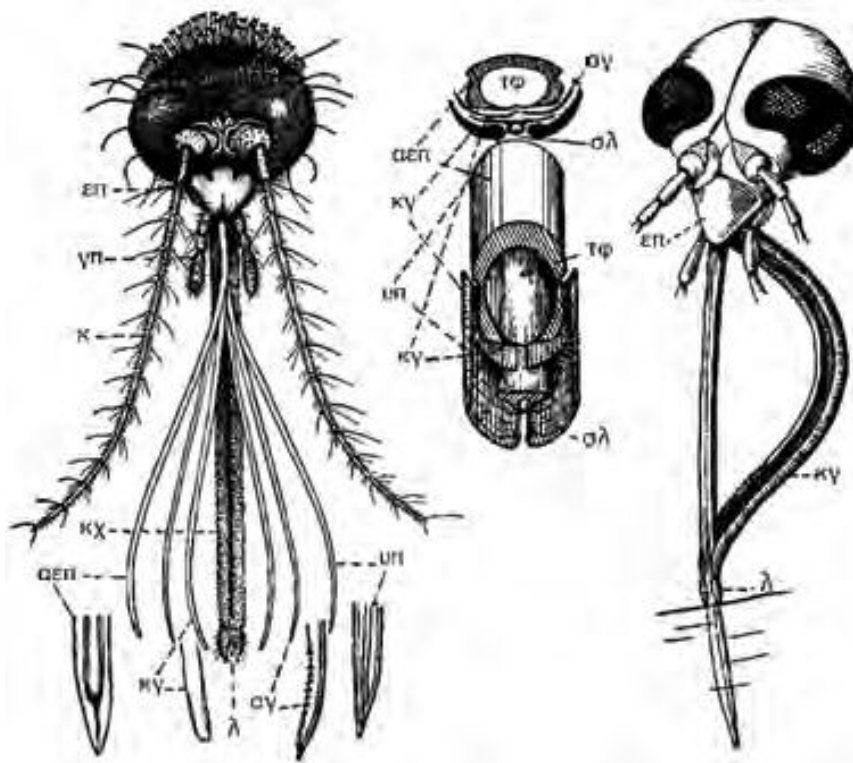
Είναι πολύ λεπτά έντομα με μακριά προβοσκίδα και δεν φέρουν απλούς οφθαλμούς. Τα πόδια είναι λεπτά και μακριά. Οι πτέρυγες φέρουν λέπια στην οπίσθια παρυφή και κατά μήκος των νεύρων. Οι κεραίες στα αρσενικά είναι πτεροειδείς και στα θηλυκά νηματοειδείς τριχωτές. Τα στοματικά μόρια είναι νύσσοντος-μυζητικού τύπου και έχουν τη μορφή επιμήκους προβοσκίδας, που προεκτείνεται εμφανώς και στα δύο φύλα παρόλο που τα αρσενικά κουνούπια δεν νύσσουν. Το μεγαλύτερο εξάρτημα των στοματικών μορίων είναι το μακρύ και ελαστικό σωληνοειδές κάτω χείλος που καταλήγει σε ένα ζεύγος μικρών κυματιστών σχηματισμών που ονομάζονται γλωσσίδα (labella). Σε κάθετη τομή το χείλος φαίνεται να κυκλώνει τα υπόλοιπα εξαρτήματα των στοματικών μορίων και χρησιμεύει ως προστατευτική θήκη. Στα πλάγια της προβοσκίδας υπάρχουν οι γναθικές προσακτρίδες. Ο κυρίαρχος σχηματισμός, το άνω χείλος, είναι λεπτό, μυτερό και με ραβδώσεις στην κοιλιακή επιφάνεια. Ανάμεσα στο άνω και κάτω χείλος υπάρχουν βελονοειδείς σχηματισμοί, που είναι ένα ζεύγος οδοντωτών κάτω γνάθων, ένα ζεύγος άνω γνάθων, που είναι πιο τέλεια οδοντωτές, και τέλος ένα μεμονωμένο μη οδοντωτό κοίλο στιλέτο, ο υποφάρυγγας. Όταν ένα θηλυκό κουνούπι νύσσει τον ξενιστή, τα γλωσσίδα στην άκρη του σαρκώδους κάτω χείλους, ακουμπούν στο δέρμα, και το κάτω χείλος που

δεν μπορεί να τρυπήσει το δέρμα, κυρτώνεται προς τα πίσω (εικ. 1. 5). Αυτό επιτρέπει στο ζεύγος των άνω γνάθων, στο ζεύγος των κάτω γνάθων, στο άνω χείλος και στον υποφάρυγγα να τρυπήσουν το δέρμα του ξενιστή. Σιέλος, που παράγεται από ένα ζεύγος τρίλοβων σιελολόγων αδένων, τοποθετημένων κοιλιακά στο πρόσθιο μέρος του θώρακα, χύνεται μέσα στον υποφάρυγγα. Ο σιέλος, τουλάχιστο σε μερικά είδη, περιέχει αντιπηκτικές ουσίες που εμποδίζουν το αίμα να πήξει και να φράξει τον τροφικό αγωγό και είναι υπεύθυνες για τους ερεθισμούς του δέρματος μετά τη νύξη. Ο σιέλος επίσης περιέχει αναισθητικές ουσίες που βοηθούν στη μείωση του πόνου που προκαλείται από το νύγμα, ώστε να μειώνονται οι αμυντικές αντιδράσεις του ξενιστή (Σαββοπούλου κ. α., 2011).

Παρόλο που τα αρσενικά κουνούπια έχουν προβοσκίδα, οι γνάθοι έχουν συνήθως μειωμένο μέγεθος, ή λείπουν οι άνω γνάθοι, οπότε τα αρσενικά δεν μπορούν να νύσσουν. Οι πτέρυγες είναι λεπτές διαφανείς και φέρουν λέπια στα νεύρα και την περιφέρεια, όπου υπάρχουν επίσης τρίχες που σχηματίζουν κροσσό. Η διάταξη των νεύρων είναι χαρακτηριστική (Σαββοπούλου κ. α., 2011).

Οι προνύμφες είναι υδρόβιες, κινούνται μέσα στο νερό με χαρακτηριστική κίνηση και είναι εφοδιασμένες με κατάλληλο αναπνευστικό σιφώνιο που τους επιτρέπει να λαμβάνουν ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Οι Πλαγγόνες (νύμφες) είναι επίσης υδρόβιες και ζωηρές και μπορούν να μετακινούνται μέσα στο νερό. Είναι είδη πολύ διαδεδομένα σε όλη τη γη και έχουν υψηλό αναπαραγωγικό δυναμικό.

Ο αριθμός γενεών ανά έτος ποικίλλει με το είδος του κουνουπιού και τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Τα ενήλικα είναι συνήθως μικρού μεγέθους, με μήκος 3 – 6 mm που σπάνια μπορεί να φθάσει τα 9mm, σε ορισμένα είδη. Έχουν μεγάλους σύνθετους οφθαλμούς αλλά δεν έχουν απλούς οφθαλμούς



Εικόνα 14: Στοματικά μέρη θηλυκού κουνουπιού. επ: επιφάρυγγας, γπ: γναθική προσακτρίδα, κ: κεραία, αγ: άνω γνάθοι, κγ: κάτω γνάθοι, επ: άνω χείλος, επ: επιφάρυγγας, κχ: κάτω χείλος, λ: γλωσσίδιο, τφ: τροφικός αγωγός, σλ: σιλοφόρος αγωγός στον υποφάρυγγα, υπ: υποφάρυγγας (Σαββοπούλου κ. α., 2011).

2.3. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Για την καταπολέμηση των προνυμφών υπάρχουν εγκεκριμένα προνυμφοκτόνα σκευάσματα από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Τα εγκεκριμένα για το 2011 προνυμφοκτόνα περιέχουν τις παρακάτω δραστικές ουσίες: diflubenzuron, spinosad, *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*, s-methoprene.

3. ΤΑ ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

Ως αιθέρια έλαια ορίζεται η ομάδα των αρωματικών πτητικών ουσιών που είναι διαλυτά σε αιθανόλη και λιγότερο διαλυτά στο νερό. Από χημικής απόψεως τα αιθέρια έλαια δεν αποτελούν μια ομοιογενή ομάδα. Αποτελούνται από ένα ομοιογενές μείγμα διαφόρων χημικών ουσιών όπως εστέρες, αλδεΐδες, κετόνες και τερπένια. Το τελικό προϊόν (αιθέριο ελαίου) παραλαμβάνεται μετά από διαφορές διεργασίες που περιγράφονται παρακάτω και έχουν ως αποτέλεσμα τη λύση των

ιστών με σπάσιμο και επιλογή του ελαίου με διάφορους τρόπους που περιγράφονται παρακάτω (Βουρλιώτη, 2010).

Τα αιθέρια ελαία είναι προϊόντα μεγάλης οικονομικής σημασίας. Χρησιμοποιούνται στην αρωματοποιία στην κοσμετολογία, τη βιομηχανία τροφίμων, καθώς και στη φαρμακευτική. Μεγάλη χρήση αρχίζουν τα τελευταία χρόνια να έχουν στην αντιμετώπιση εχθρών και ασθενειών των φυτών. Για τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν τα έντομα ως εντομοκτόνα ή απωθητικά δεν έχουν γίνει αρκετές μελέτες και δεν είναι γνωστοί οι μηχανισμοί. Παρά το γεγονός ότι στις συγκεντρώσεις που βρίσκονται τα αιθέρια ελαία στη φύση αυτά λειτουργούν ως προσελκυστικά και βοηθούν στην επικοινωνία στις συγκεντρώσεις που λαμβάνονται μετά από την επεξεργασία των φυτών φαίνεται να έχουν απωθητικές ιδιότητες για τα περισσότερα έντομα (Βουρλιώτη, 2010).

3.1.Η ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΩΝ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

3.1.1. ΑΠΟΣΤΑΞΗ

Η μέθοδος της απόσταξης είναι η πιο διαδεδομένη και οικονομική μέθοδος.

Υδροαπόσταξη (water distillation)

Στην υδροαπόσταξη, το προς απόσταξη φυτικό υλικό, τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη με νερό, η οποία συνδέεται με ψυκτήρα και με θερμαντική συσκευή. Το χαρακτηριστικό της μεθόδου αυτής είναι ότι το νερό και το φυτικό υλικό είναι σε άμεση επαφή. Στην υδροαπόσταξη πρέπει να αποφεύγεται η υπερθέρμανση του φυτικού υλικού, ώστε να μην συμβαίνει θερμική διάσπαση διαφόρων συστατικών του αιθερίου ελαίου. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι: μεγάλος χρόνος, μικρή απόδοση σε αιθέριο έλαιο, παραλαβή κατώτερης ποιότητας αιθερίου ελαίου.

Υδροατμοαπόσταξη (water and steam distillation)

Στην υδροατμοαπόσταξη το φυτικό υλικό δεν έρχεται σε άμεση επαφή με το νερό, αλλά τοποθετείται σε πλέγμα που βρίσκεται πιο ψηλά από την επιφάνεια του νερού. Ο ατμός που σχηματίζεται από την θέρμανση του νερού, έρχεται σε επαφή με τη μάζα του φυτικού υλικού και παρασύρει το αιθέριο έλαιο.

Απόσταξη με υδρατμούς (steam distillation)

Στην απόσταξη με υδρατμούς εισάγεται ατμός, ο οποίος παράγεται σε ειδικό ατμολέβητα, που περιέχει το φυτικό υλικό και ο ατμός παρασύρει το αιθέριο έλαιο. Στην απόσταξη με υδρατμούς ανήκει η συσκευή μικροαπόσταξης- εκχύλισης Likens-

Nickerson. Η συσκευή αποτελείται από το κύριο σώμα, διαμορφωμένο για οργανικούς διαλύτες ελαφρύτερους του νερού, έναν ψυκτήρα και δύο φιάλες, μια σφαιρική και μια απιοειδή. Το δείγμα τοποθετείται μαζί με νερό (σε αναλογία 1/10) στη σφαιρική φιάλη και ο οργανικός διαλύτης (κυρίως διαιθυλαιθέρας) στην απιοειδή και θερμαίνεται με υδατόλουτρο. Οι σχηματιζόμενοι ατμοί από την σφαιρική φιάλη, που περιέχουν τα πτητικά συστατικά του αιθερίου ελαίου, φθάνουν στο ψυκτήρα, υγροποιούνται και κυλούν στον κύριο χώρο της συσκευής, όπου υπάρχει σε ισορροπία η οργανική και η υδατική φάση. Εκεί τα πτητικά συστατικά εκχυλίζονται από τον οργανικό διαλύτη. Στο τέλος της διαδικασίας (μετά από 1 ώρα τουλάχιστον) όλα τα συστατικά του αιθερίου ελαίου έχουν συγκεντρωθεί στην απιοειδή φιάλη.

3.1.2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Η συνήθης περίπτωση διαχωρισμού με εκχύλιση, είναι η υγρό - υδρό εκχύλιση. Η εκχύλιση αυτή με υγρούς διαλύτες (συνήθως νερό – οργανικός διαλύτης) βασίζεται στην κατανομή της διαλυμένης ουσίας μεταξύ δύο υγρών, τα οποία είναι πρακτικώς μη αναμίξιμα (υδατική – οργανική φάση). Στην υδατική φάση κατά κύριο λόγο συλλέγονται οι πολικές ουσίες και τα ανόργανα συστατικά, ενώ στην οργανική οι μη πολικές ουσίες. Η μέθοδος της εκχύλισης χρησιμοποιείται για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου από φυτικά υλικά, τα οποία είναι ευπαθή στην απόσταξη, όπως άνθη και φύλλα. Ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο εκχυλιστικό υλικό, διακρίνεται σε εκχύλιση με ψυχρό λίπος, εκχύλιση με θερμό λίπος, με πτητικούς διαλύτες και σε υπερκρίσιμη εκχύλιση.

Εκχύλιση με πτητικούς διαλύτες

Ως διαλύτες χρησιμοποιούνται κυρίως ο πετρελαϊκός αιθέρας, το βενζόλιο, η αιθυλική αλκοόλη. Το προϊόν που λαμβάνεται κατά την εκχύλιση, μετά την απομάκρυνση του πτητικού διαλύτη, εκτός από το αιθέριο έλαιο περιέχει και άλλες ουσίες, όπως κύρους και χρωστικές. Μετά από επεξεργασία με αιθυλική αλκοόλη λαμβάνεται τελικά το αιθέριο έλαιο.

Εκχύλιση με ψυχρό λίπος

Η εκχύλιση με ψυχρό λίπος αποτελεί βελτίωση του τρόπου παρασκευής αρωματικών αλοιφών. Το λίπος που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι καθαρό και ημίσκληρο. Το λίπος έχει την ικανότητα να απορροφά και να συγκρατεί τις πτητικές ουσίες με τις οποίες έρχεται σε επαφή. Η εκχύλιση διαρκεί 24-30 h, ενώ το

λαμβανόμενο λίπος μαζί με το αιθέριο έλαιο ή διατίθεται ως έχει ή επεξεργάζεται με αλκοόλη.

Εκχύλιση με θερμό λίπος

Η εκχύλιση αυτή ομοιάζει με την εκχύλιση με ψυχρό λίπος, με τη διαφορά ότι τα άνθη και το λίπος τοποθετούνται σε δοχεία που θερμαίνονται στους 800C. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την παραλαβή των αιθερίων ελαίων από εσπεριδοειδή και τριαντάφυλλα.

Εκχύλιση με υδρόφιλους διαλύτες

Τελευταία χρησιμοποιούνται υδατοδιαλυτοί διαλύτες ως εκχυλιστικά μέσα ή σε ανάμιξη με το νερό, για την παραλαβή των περισσότερων φυτικών συστατικών, που χρησιμοποιούνται στην κοσμετολογία. Τέτοιοι διαλύτες είναι η αιθυλενογλυκόλη, προπυλενογλυκόλη, η βουτεενογλυκόλη.

Υπερκρίσιμη Εκχύλιση (SFE) Κάθε συστατικό σε θερμοκρασία και πίεση πάνω από το κρίσιμο σημείο (το σημείο που αλλάζει φάση) βρίσκεται σε υπερκρίσιμη κατάσταση. Πάνω από την κρίσιμη θερμοκρασία ένα συστατικό που είναι αέριο δεν μπορεί να υγροποιηθεί παρόλη την εφαρμογή υψηλής πίεσης. Η κρίσιμη πίεση είναι των ατμών του αερίου σε κρίσιμη θερμοκρασία. Το ρευστό σε υπερκρίσιμο περιβάλλον διατηρεί τις ιδιότητες τόσο της υγρής όσο και της αέριας φάσης. Η υπερκρίσιμη εκχύλιση είναι μια ραγδαία αναπτυσσόμενη μέθοδος διαχωρισμού, χρησιμοποιώντας διαλύτες όπως το διοξείδιο του άνθρακα CO₂ σε υπερκρίσιμες συνθήκες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την πλήρη απομάκρυνση του CO₂ από το εκχύλισμα, με μια απλή εκτόνωση σε ατμοσφαιρική πίεση. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μεγάλες πιέσεις λειτουργίας, που συνεπάγεται μεγάλο κόστος, καθώς επίσης και η πολυπλοκότητά της.

3.1.3. ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΑΡΑΛΑΒΗ

Εδώ τα αιθέρια έλαια παραλαμβάνονται με μηχανικά μέσα (πιεστήρια). Χρησιμοποιούνται στους ξηρούς καρπούς και στους φλοιούς των εσπεριδοειδών. Τα μηχανήματα για τους ξηρούς καρπούς είναι πιεστήρια, που μοιάζουν με αυτά που χρησιμοποιούνται στα ελαιотριβεία. Τα μηχανήματα για τους φλοιούς των εσπεριδοειδών, είτε ξύνουν είτε τρυπών τους φλοιούς με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των αιθερίων ελαίων, που στη συνέχεια διαχωρίζονται από το στερεό υπόλειμμα.

3.1.4. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ

Στην εκχύλιση με υπέρηχους, το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη σε λουτρό υπερήχων. Η διάδοση των υπερήχων χαρακτηρίζεται από ελάχιστη συχνότητα 16kHz και προκαλεί κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης και αραιώσης. Με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται φαινόμενα διείσδυσης και μεταφοράς, ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης. Με την χρήση των υπερήχων μειώνεται ο χρόνος εκχύλισης, χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι διαλυτών και εκχυλίζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα. Η εκχύλιση με υπέρηχους εφαρμόζεται στον προσδιορισμό ενώσεων που είναι θερμικά ασταθείς.

3.1.5. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ (MAE: microwave assisted extraction)

Τις τελευταίες δεκαετίες υπήρχε έντονο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων τεχνικών παραλαβής των αιθερίων ελαίων, με την χρήση των οποίων έχει τελικά επέλθει σημαντική μείωση στο χρόνο εκχύλισης και στον όγκο δείγματος διαλύτη. Έτσι άρχισε η χρήση των μικροκυμάτων (MW) στην εκχύλιση. Με τα μικροκύματα υπάρχει σημαντική μείωση στο χρόνο εκχύλισης, σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους (Soxhlet). Με τις συμβατικές μεθόδους η θερμότητα μεταδίδεται από την θερμαντική πλάκα στο δοχείο θέρμανσης και από εκεί στο διάλυμα. Αντίθετα με τα μικροκύματα η θέρμανση ξεκινάει από το δείγμα, μιας και το δοχείο δεν απορροφά την ακτινοβολία των μικροκυμάτων. Όπως φαίνεται παρακάτω, η θερμότητα, που παράγεται από τα MW, είναι εξάρτηση του διαλύματος. Αυτό συμβαίνει μιας και υπάρχουν διαλύτες που απορροφούν τα MW (π. χ μεθανόλη) και άλλοι που δεν την απορροφούν και επομένως δεν θερμαίνονται (π. χ εξάνιο). Με την MAE υπάρχει επίσης και σημαντική μείωση στον όγκο δείγματος και διαλύτη, σε σχέση με την Soxhlet, λόγω της αποδοτικότερης εκχύλισης.

3.1.6. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ ΧΩΡΙΣ ΔΙΑΛΥΤΗ (SFME)

Η SFME είναι μια τεχνική που συνδυάζει την ακτινοβολία των μικροκυμάτων και την ξηρή απόσταξη. Με την τεχνική αυτή το φυτικό μέρος τοποθετείται σε δοχείο, μέσα σε φούρνο μικροκυμάτων, χωρίς την προσθήκη νερού ή κάποιου οργανικού διαλύτη. Τα μικροκύματα αλληλεπιδρούν με το εγκλωβισμένο (εσωτερικό) νερό, που

υπάρχει στο φυτό, προκαλώντας την θέρμανσή του. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη διαστολή των κυττάρων του φυτού, τη ρήξη των αδένων των ελαιοφόρων υποδοχέων και τελικά την απελευθέρωση του αιθέριου ελαίου. Το αιθέριο έλαιο, στη συνέχεια εξατμίζεται μαζί με το ‘εσωτερικό’ νερό και παραλαμβάνεται με την βοήθεια ψυκτήρα.

4. Η ΛΕΒΑΝΤΑ

Η λεβάντα είναι ένα αυτοφυές φυτό που ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών Lamiales και το γένος *Lavandula*. Το όνομα της προέρχεται από το λατινικό ρήμα lavare που σημαίνει πλένω και οι Ρωμαίοι το χρησιμοποιούσαν για τον αρωματισμό των λουτρών τους. Κατά τον μεσαίωνα χρησιμοποιήθηκε για φαρμακευτική χρήση όπως την περιποίηση τραυμάτων και πληγών του δέρματος. Ως τόπος καταγωγής της θεωρούνται οι νότιες χώρες της Ευρώπης κυρίως Γαλλία, Ισπανία, Βουλγαρία, Αγγλία, Ρωσία, Αυστραλία και στις Η. Π. Α ενώ στην Ελλάδα η καλλιέργεια της είναι περιορισμένη.

Με το γενικό όνομα λεβάντα, είναι γνωστά αρκετά είδη, σπουδαιότερα εκ των οποίων είναι τα εξής:

- *Lavandula officinalis*
- *Lavandula latifolia*
- *Lavandula hybrida*
- *Lavandula stoechas*

Σε όλα τα είδη της λεβάντας το συγκομιζόμενο τμήμα του φυτού είναι τα ανθοφόρα στελέχη τα οποία χρησιμοποιούνται και για την εξαγωγή του αιθέριου ελαίου το οποίο είναι εξαιρετικής ποιότητας και χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία. Κατάλληλη εποχή συγκομιδής είναι στο στάδιο της τελικής ανάπτυξης του ανθοφόρου στελέχους διότι η περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο είναι μεγάλη (Θεόδωρος Β. Κουτσός, Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά, Θεσσαλονίκη 2006).

5. Ο ΠΑΓΚΟΣΜΙΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΥΓΕΙΑΣ (WORLD HEALTH ORGANIZATION -WHO). (το σύνολο της Παραγράφου αποτελεί μετάφραση και περίληψη του Πρωτοκόλλου του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας)

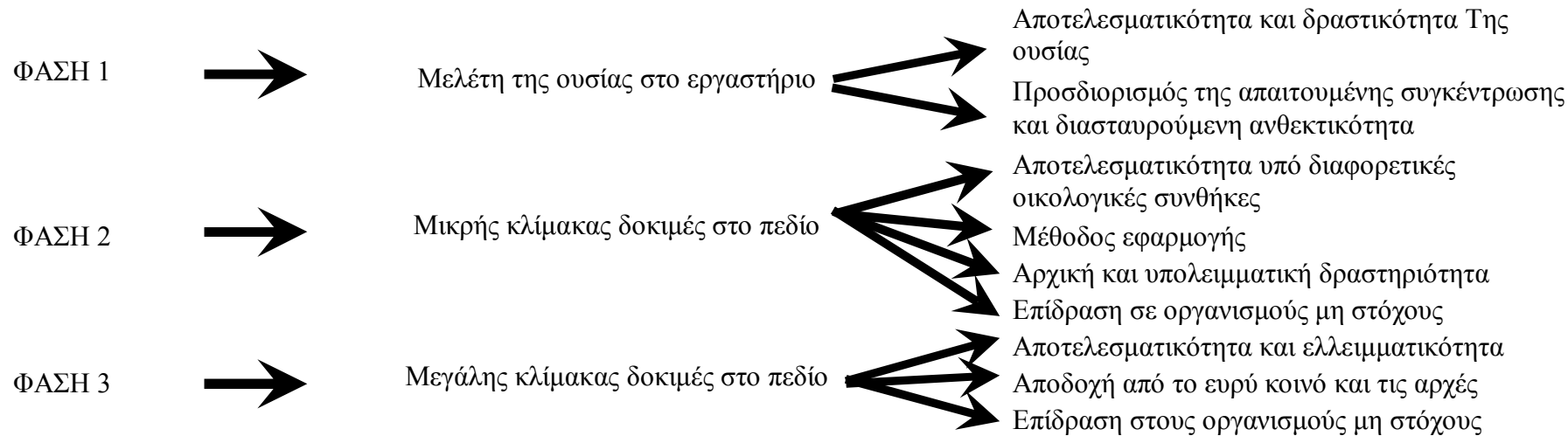
Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας είναι η αρχή συντονισμού και έλεγχου για θέματα υγείας του οργανισμού Ηνωμένων Εθνών. Αρμοδιότητες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας είναι να μεριμνήσει για τη λύση παγκόσμιων προβλημάτων υγείας η δημιουργία πρωτοκόλλων και προτύπων για θέματα υγείας, καθώς και η τεχνική υποστήριξη και παρακολούθηση μεμονωμένων περιπτώσεων κρατών ή/και περιοχών που αντιμετωπίζουν σοβαρά θέματα υγείας. Τα παραπάνω βασίζονται σε συγκέντρωση στοιχείων σε ότι αφορά έρευνες που γίνονται από ερευνητικά και εκπαιδευτικά ιδρύματα, στην επιλογή των σημαντικών ερευνητικών δεδομένων και στη δημιουργία μίας βάσης δεδομένων (Πηγή: <http://www.who.int/about/en/>).

Στα αρχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας υπάρχει και μία βάση δεδομένων που αφορά σε πρωτόκολλα δοκιμών αποτελεσματικότητας σκευασμάτων για την αντιμετώπιση εντόμων. Για να δοθεί άδεια κυκλοφορίας σε ένα σκεύασμα στη χώρα μας πρέπει να έχουν γίνει δοκιμές αποτελεσματικότητας από κάποιον διαπιστευμένο φορέα ο οποίος θα ακολουθήσει εγκεκριμένα πρωτόκολλα δοκιμών. Ένα από τα εγκεκριμένα πρωτόκολλα δοκιμών αποτελεσματικότητας το οποίο και χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά στη χώρα μας είναι τα πρωτόκολλα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας Ιδρύθηκε επίσημα το 1948 και εδρεύει στη Γενεύη (Πηγή: <http://el.wikipedia.org>).

5.1. ΤΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΟΚΙΜΩΝ ΤΟΥ ΠΑΓΚΟΣΜΙΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΥΓΕΙΑΣ ΓΙΑ ΠΡΟΝΥΜΦΟΚΤΟΝΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ.

Αντικείμενο του πρωτοκόλλου είναι να παρέχει σαφείς και τυποποιημένες διαδικασίες για τον έλεγχο αποτελεσματικότητας των δυνητικών προνυμοφοκόνων ουσιών και των ρυθμιστών ανάπτυξης των προνυμφών. Για τη δημιουργία του πρωτοκόλλου εναρμονίστηκαν διάφορα πρότυπα δοκιμών από διαφορετικές χώρες και έτσι πρόεκυψαν πλήρεις και σαφείς οδηγίες δοκιμών. Μια πρώτη μορφή του πρωτοκόλλου παρουσιάστηκε τον Οκτώβριο του 1996 στη Γενεύη η οποία και τροποποιήθηκε και βελτιώθηκε το Δεκέμβριο του 2004 (World Health Organization, 2005).

Οι δοκιμές των ουσιών γίνονται σε τρεις φάσεις (World Health Organization, 2005) :



5.1.1. ΦΑΣΗ 1: ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

Αντικείμενο των βιοδοκιμών στο εργαστήριο είναι (World Health Organization, 2005) :

- Να προσδιοριστεί η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων της προς μελέτη ουσίας στη θνησιμότητα των προνυμφών
- Να προσδιοριστεί η συγκέντρωση που θα επιφέρει το θάνατο του 50 % (LC₅₀) και του 90 % (LC₉₀) του δείγματος.
- Να προσδιοριστεί η συγκέντρωση ευαισθησίας, η συγκέντρωση δηλαδή που έχει την πρώτη έστω και ελάχιστη επίδραση στις προνύμφες.
- Να προσδιοριστεί η διασταυρούμενη ανθεκτικότητα με άλλα, συχνά χρησιμοποιούμενα, σκευάσματα.

Υλικά και Μέθοδοι

- Πιπέτα με δυνατότητα μέτρησης 100-1000 μl
- Πιπέτες γυάλινες 1ml
- Δοχεία 120 και 250 ml
- Σήτα για τα δοχεία
- Φύλλα καταγραφών
- Ογκομετρικός κύλινδρος
- Εξοπλισμός καταγραφής θερμοκρασίας και υγρασίας (Data Logger)

Ο πρόχειρος έλεγχος των συγκεντρώσεων

Πριν τη βιοδοκιμή πραγματοποιείται ένας πρόχειρος έλεγχος πολλών συγκεντρώσεων της προς εξέταση ουσίας για να διαπιστωθεί η δράση της, να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις που θα χρησιμοποιηθούν για τη βιοδοκιμή και να καθοριστεί ο διαλύτης (ακετόνη ή αιθανόλη). Κατά κανόνα η βιοδοκιμή αρχικά πραγματοποιείται με συγκεντρώσεις που έχουν μεταξύ τους λογαριθμική σχέση όπως για παράδειγμα 1, 10, 100 και 1000 ppm εκτός αν προκύψουν άλλα δεδομένα από τις πρόχειρες δοκιμές που έγιναν αρχικά (World Health Organization, 2005).

Η βιοδοκιμή

Για τη βιοδοκιμή απαιτείται η παρασκευή στοκ διαλύματος 1% σε ακετόνη ή αιθανόλη. Έτσι 2 ml της υπό εξέταση ουσίας διαλύεται σε 18 ml ακετόνης ή

αιθανόλης και παρασκευάζεται έτσι 20 ml στοκ διάλυμα. Για τον έλεγχο κάθε πιθανής συγκέντρωσης απαιτούνται 3 επαναλήψεις (3 δοχεία) με 25 προνύμφες τρίτου ή τετάρτου σταδίου το κάθε ένα. Στη συνέχεια παρασκευάζονται η προς εξέταση συγκεντρώσεις ξεκινώντας από τη μικρότερη. Σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο τοποθετείται η απαιτούμενη ποσότητα της ουσίας μαζί με απιονισμένο ή αποχλωριωμένο νερό έτσι ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα της συγκεκριμένης συγκέντρωσης (μετρούμενο σε ppm). Για κάθε δοχείο απαιτούνται 100 με 200 ml από το τελικό διάλυμα με την προϋπόθεση ότι θα υπάρχει τουλάχιστον 5-10 cm βάθος για να κινηθούν οι προνύμφες. Κατά κανόνα σε κάθε βιοδοκιμή δοκιμάζονται 3-6 συγκεντρώσεις της ουσίας (3x3 ή 6x3 δοχεία) και 3 δοχεία μόνο με απιονισμένο ή αποχλωριωμένο νερό αποτελούν το μάρτυρα (Control). Από τις τρεις επαναλήψεις για την κάθε μεταχείριση εξάγεται ο μέσος όρος (World Health Organization, 2005).

Οι μετρήσεις λαμβάνονται 24 ώρες μετά. Για εντομοκτόνα αργής δράσης λαμβάνονται μετρήσεις και 48 ώρες μετά τις δοκιμές. Ωστόσο οι μετρήσεις τελειώνουν μόλις πεθάνει ή μεταμορφωθεί η τελευταία προνύμφη από τα δοχεία με τις συγκεντρώσεις. Στην περίπτωση που νυμφωθεί το 10% από κάποιο δοχείο το πείραμα επαναλαμβάνεται. Επίσης η βιοδοκιμή επαναλαμβάνεται στην περίπτωση που παρατηρηθεί θνησιμότητα πάνω από 20% στο μάρτυρα τότε επίσης επαναλαμβάνεται το πείραμα (World Health Organization, 2005).

Τα αποτελέσματα

Η διεξαγωγή των βιοδοκιμών έχει ως αποτέλεσμα να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις που θα έχουν ως αποτέλεσμα τη θανάτωση του 50%, του 90% και του 99% του πληθυσμού των προνυμφών σε 24 ώρες (LC₅₀, LC₉₀ και LC₉₉).

Ανεπιθύμητη είναι η νύμφωση των προνυμφών. Στην περίπτωση που νυμφωθεί το 10% του Μάρτυρα ή και παραπάνω το πείραμα πρέπει να επαναληφθεί. Ανεπιθύμητη είναι και η θνησιμότητα των προνυμφών του μάρτυρα. Στην περίπτωση που το ποσοστό θνησιμότητας είναι από 0-5% το πείραμα συνεχίζεται ως έχει. Στην περίπτωση που το ποσοστό θνησιμότητας είναι 5-20% απαιτείται η διόρθωση των αποτελεσμάτων με τον παρακάτω τύπο (World Health Organization, 2005).

$$\text{Mortality (\%)} = \frac{X-Y}{X} \quad 100$$

Όπου X είναι το ποσοστό επιβίωσης στο μάρτυρα και όπου Y είναι το ποσοστό επιβίωσης στην κάθε μεταχείριση (ο μέσος όρος) (World Health Organization, 2005).

Στην περίπτωση που παρατηρηθεί θνησιμότητα στο Μάρτυρα πάνω από 20% τα αποτελέσματα δεν θεωρούνται έγκυρα και το πείραμα επαναλαμβάνεται.

Τα αποτελέσματα επεξεργάζονται στον υπολογιστή με στατιστική ανάλυση με λιγότερο από 25% διάστημα εμπιστοσύνης (World Health Organization, 2005).

Μετά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιούνται και άλλες δοκιμές, με ενδιάμεσες κατάλληλες συγκεντρώσεις για τον προσδιορισμό της ακριβούς συγκέντρωσης που θα επιφέρει τη θανάτωση του 50%, του 90% και του 99% των προνυμφών.

Ο έλεγχος για διασταυρούμενη ανθεκτικότητα.

Η διασταυρούμενη ανθεκτικότητα εμφανίζεται όταν η ανθεκτικότητα που αποκτά ένας οργανισμός σε ένα εντομοκτόνο εμφανίζεται και ως ανθεκτικότητα σε ένα άλλο εντομοκτόνο, ακόμη και αν το έντομο δεν έχει εκτεθεί ποτέ σε αυτό.

Για να διαπιστωθεί ή όχι η ύπαρξη διασταυρούμενης ανθεκτικότητας η υπό δοκιμή ουσία εφαρμόζεται σε άγριους πληθυσμούς προνυμφών που είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα γνωστά και χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα και σε πληθυσμούς εργαστηρίου που είναι γνωστό ότι δεν παρουσιάζουν ανθεκτικότητα (World Health Organization, 2005).

5.1.2. ΦΑΣΗ 2: ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ ΠΕΔΙΟΥ

Αντικείμενο των βιοδοκιμών πεδίου μικρής κλίμακας είναι (World Health Organization, 2005) :

- Να καταγραφεί η αποτελεσματικότητα και η υπολειμματική δράση υποψήφιων εντομοκτόνων σε διαφορετικές εστίες και οικολογικές συνθήκες.
- Ναι υπολογιστεί η κατάλληλη δόση εφαρμογής στις εστίες.
- Να καταγραφούν οι αβιοτικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της ουσίας.
- Ναι πραγματοποιηθούν ποιοτικές μετρήσεις στους οργανισμούς μη στόχους.

Οι βιοδοκιμές

Αρχικά επιλέγονται οι εστίες οι οποίες πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικές:

Δεξαμενές με στάσιμο νερό (με τσιμέντο ή χωρίς) αυλάκια άρδευσης, βόθροι, δεξαμενές που συλλέγουν λύματα, λίμνες, υγρότοποι, και αχρησιμοποίητα φρεάτια για το γένος *Culex* spp, τσιμεντένιες δεξαμενές, ξεχασμένα βαρέλια αποθήκευσης νερού και στάσιμα νερά από κλιματιστικά για το γένος *Aedes* spp και μη χρησιμοποιούμενα φρεάτια, λακκούβες στους κήπους, λίμνες, στάσιμα νερά σε ναυπηγεία, ορυζώνες, λίμνες, τους υγρότοπους, τα έλη, για το γένος *Anopheles* spp. (World Health Organization, 2005). Οι βιοδοκιμές πραγματοποιούνται με 3-5 συγκεντρώσεις οι οποίες είναι συνήθως πολλαπλάσια της LC₉₀. Η ποσότητα της προς δοκιμή ουσίας υπολογίζεται με τον υπολογισμό του όγκου των υγρών της εστίας, και αν αυτό δεν είναι δυνατόν, υπολογίζεται κατά προσέγγιση με την μέτρηση της επιφάνειας της εστίας επί το μέσο βάθους.

Για την δοκιμή της κάθε συγκέντρωσης απαιτούνται τρεις επαναλήψεις σε τρεις εστίες κατά το δυνατόν όμοιες μεταξύ τους και τους αντίστοιχους τρεις μάρτυρες. Στην περίπτωση που είναι δυνατόν η εστία χωρίζεται στα δύο και το ένα τμήμα αποτελεί το μάρτυρα (δεξαμενές νερού με τσιμέντο στις οποίες μπορεί να μπει διαχωριστικό). Απαραίτητα προϋπόθεση είναι η επιφάνεια της εστίας να είναι τουλάχιστον 4 m² και όχι πάνω από 20 m². Από την κάθε επέμβαση εξάγεται ο μέσος όρος (World Health Organization, 2005).

Πριν την έναρξη των βιοδοκιμή οι εστίες πρέπει να ελεγχθούν τουλάχιστον 2 φορές για την αφθονία των δειγμάτων με την κατάλληλη μέθοδο. Στην περίπτωση που δεν υπάρχει ικανοποιητικός αριθμός προνυμφών τρίτου και τετάρτου σταδίου η εστία απορρίπτεται. Οι εστίες παρακολουθούνται για το ίδιο χρονικό διάστημα που αναμένεται ότι θα διαρκέσει η βιοδοκιμή. Οι νύμφες για αυτό το χρονικό διαστημα μεταφέρονται στο εργαστήριο και τα ενήλικα που εξέρχονται από αυτές καταμετρούνται (World Health Organization, 2005).

Στη συνέχεια προστίθεται στην εστία η ποσότητα του τυποποιημένου σκευάσματος που απαιτείται για τη δημιουργία της προς μελέτη συγκέντρωσης.

Η αποτελεσματικότητα της κάθε εφαρμογής δίδεται από τον παρακάτω τύπο:

$$IE (\%) = 100 - \frac{C1}{T1} - \frac{T2}{C2} \quad 100$$

Όπου C1 είναι ο αριθμός των ενηλίκων στο μάρτυρα πριν την επέμβαση, C2 είναι ο αριθμός των ενηλίκων στο μάρτυρα μετά την επέμβαση T1 είναι ο αριθμός των

ενηλίκων στο κομμάτι της εστίας που υπέστη τη μεταχείριση πριν την επέμβαση T2 είναι ο αριθμός των ενηλίκων στο κομμάτι της εστίας που υπέστη τη μεταχείριση μετά την επέμβαση. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται με το δείκτη ANOVA. (World Health Organization, 2005).

Κατά τη διάρκεια των βιοδοκιμών παρατηρήσεις που αφορούν σε καιρικά φαινόμενα καθώς και σε επιδράσεις των υπό δοκιμή ουσιών σε άλλους έμβιους οργανισμούς όπως για παράδειγμα τα άγλη και άλλα δίπτερα (π. χ. Chironomidae) καταγράφονται (World Health Organization, 2005).

5.1.3. ΦΑΣΗ 3: ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ ΠΕΔΙΟΥ

Η καταλληλότερη συγκέντρωση, όπως αυτή προσδιορίστηκε από τις βιοδοκιμές μικρής κλίμακας χρησιμοποιείται για να πραγματοποιηθούν βιοδοκιμές μεγάλης κλίμακας.

Αντικείμενο των βιοδοκιμών πεδίου μεγάλης κλίμακας είναι (World Health Organization, 2005) :

- Να επιβεβαιωθούν οι προνυμφοκτόνες ιδιότητες της συγκεκριμένης ουσίας στη συγκεκριμένη δοσολογία
- Να επιβεβαιωθεί η υπολειμματική δράση της ουσίας
- Να καταγράφουν πληροφορίες που αφορούν στην ευκολία εφαρμογής της νέας εντομοκτόνου ουσίας
- Να καταγράφουν πληροφορίες που αφορούν στην αποδοχή του νέου εντομοκτόνου από τους δυνητικούς χρήστες
- Να καταγραφούν παρενέργειες στους χρήστες
- Να καταγραφούν επιπλέον παρατηρήσεις στους οργανισμούς – μη στόχους

Οι βιοδοκιμές

Για την συγκεκριμένη βιοδοκιμή πρέπει να επιλεγούν 25-30 εστίες σαν επαναλήψεις και άλλες τόσες θα αποτελέσουν το μάρτυρα. Στην περίπτωση μεγάλων εστιών πραγματοποιείται κατάτμηση. Η πρώτη μέτρηση λαμβάνεται μετά από 48 ώρες και οι επόμενες είναι εβδομαδιαίες. Η αποτελεσματικότητα εκτιμάται με τον ίδιο μαθηματικό τύπο που ίσχυε στις δοκιμές πεδίου μικρής κλίμακας.

Η επίδραση στους οργανισμούς – μη στόχους

Ξεχωριστά πειράματα πρέπει να γίνουν για να διαπιστωθεί η επίδραση της ουσίας στους οργανισμούς – μη στόχους. Ωστόσο μπορούν να γίνουν μετρήσεις αφορούν στις επιδράσεις της ουσίας σε ψάρια που τρέφονται με προνύμφες κουνουπιών, Ναϊάδες εφημερόπτερον και οδοντογναθων, σαλιγκάρια, γαρίδες κωπήποδα, κολεόπτερα και ετερόπτερα.

ΜΕΡΟΣ Β:
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ
ΜΕΡΟΣ

6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Σκοπός του πειράματος είναι ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας αιθερίων ελαίων στην αντιμετώπιση των προνυμφών κουνουπιών. Για τις ανάγκες της πτυχιακής μου μελέτης όμως πραγματοποιήθηκαν και άλλα πειράματα για τον έλεγχο πρακτικότητας και αποτελεσματικότητας και άλλων τόσο εργαστηριακών μεθόδων, όσο και μεθόδων πεδίου για να ελεγχθεί γενικά η διαδικασία πειραματικών δοκιμών με κουνούπια στο εργαστήριο.

Έτσι πέρα από τις βιοδοκιμές με αιθεριο έλαιο λεβάντας (και την εκχύλιση αυτού) πραγματοποιήθηκαν εργασίες που αφορούσαν στα:

- Δοκιμή διαφόρων παγίδων ωτοκίας μεταξύ των οποίων και μία αυτοσχέδια παγίδα που σχεδιάστηκε για τις ανάγκες της πτυχιακής μου μελέτης.
- Κατασκευή δειγματολήπτη για τη λήψη προνυμφών από φυσικές και Τεχνητές εστίες σύμφωνα με τις οδηγίες Ερευνητή του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου

7. ΠΡΟΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ (ΔΟΚΙΜΕΣ)

7.1. ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΑΓΙΔΩΝ ΩΟΤΟΚΙΑΣ

7.1.1. ΠΑΓΙΔΕΣ ΜΕ ΣΦΟΥΓΓΑΡΙ ΚΑΙ ΦΙΛΤΡΟ ΚΑΦΕΤΙΕΡΑΣ



Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε σε μια εγκαταλελειμμένη βάρκα σε περιοχή μέσα στην πόλη του Ηρακλείου. Η βάρκα ήταν γεμάτη με προνύμφες κουνουπιών και πάνω από το νερό πετούσαν ενήλικα. Από κοινό οικιακό σφουγγάρι για πλύσιμο πιάτων αφαιρέθηκε το σύρμα και το σφουγγάρι τοποθετήθηκε μέσα σε φίλτρα καφετιέρας και στη

Εικόνα 15: Παγίδα με σφουγγάρι και φίλτρο καφετιέρας

συνέχεια η ελεύθερη πλευρά συρράφτηκε. Τα φίλτρα καφετιέρας έχουν την ικανότητα να απορροφούν το νερό από γύρω και να κρατάνε μια υγρή περιοχή για την εκκόλαση των αυγών. Το σφουγγάρι χρησιμοποιήθηκε για να κρατάει τα φίλτρα στην επιφάνεια αλλά και στο ότι απορροφά περισσότερο νερό. Η μέθοδος αυτή δεν είχε τα επιθυμητά αποτελέσματα εξαιτίας του γεγονότος ότι από το πολύ νερό που απορροφούσε το σφουγγάρι βυθιζόταν.

7.1.2. ΠΑΓΙΔΕΣ ΜΕ ΜΠΑΛΟΝΙ ΚΑΙ ΦΙΛΤΡΟ ΚΑΦΕΤΙΕΡΑΣ



Εικόνα 16: Παγίδα με μπαλόνι και φίλτρο καφετιέρας

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε στην ίδια βάρκα στη περιοχή Καμίνια στην οποία έγινε και η μέθοδος με το σφουγγάρι.

Αντί για το σφουγγάρι τοποθετήθηκε μέσα στο φίλτρο ένα μικρό μπαλόνι κρατώντας έτσι την παγίδα στην επιφάνεια του νερού. Μετά από μια εβδομάδα τα αποτελέσματα ήταν πολύ καλά διότι η εκκόλαση των αυγών ήταν μεγάλη λόγω της μεγαλύτερης επιφάνειας του μπαλονιού.

7.1.3. ΠΑΓΙΔΑ ΜΕ ΓΛΑΣΤΡΑΚΙΑ ΚΑΙ ΓΛΩΣΣΟΠΙΕΣΤΡΑ

Η μέθοδος αυτή προτάθηκε από ερευνητή του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου σαν την ενδεδειγμένη μέθοδο συλλογή αυγών κουνουπιών. Οι παγίδες αυτές αποτελούνταν από μαύρα γλαστράκια και από διάφανες σακούλες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για να ντυθούν τα γλαστράκια και να τοποθετηθεί μέσα εκεί το νερό. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ξύλινα γλωσσοπίεστρα για την συλλογή των αυγών. Σε κάθε παγίδα τοποθετήθηκε ένα γλωσσοπίεστρο βυθισμένο μέχρι τη μέση

στο νερό. Το γλωσσοπίεστρο μέσα στο νερό είχε σαν αποτέλεσμα να απορροφά το νερό προς τα πάνω και να κρατά την περιοχή εκτός νερού υγρή. Τα γλαστράκια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν δέκα σε διάφορες περιοχές του νομού Ηρακλείου όπου κάποιες από αυτές ήταν η γέφυρα στην περιοχή Τρεις Βαγιές, στην περιοχή Γιόφυρο, στην παραλιακή, σε μια αυλή ενός σπιτιού και στο αγρόκτημα του ΤΕΙ Ηρακλείου. Μετά από πέντε μέρες έγινε έλεγχος των παγιδιών και καταμέτρηση των προνυμφών. Ο αριθμός που συλλέχθηκε με αυτόν τον τρόπο ήταν πολύ μικρότερος από τον αριθμό προνυμφών που συλλέχθηκε με την παγίδα με το μπαλόνι.

8 ΟΙ ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

8.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

8.1.1. Η ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν:

- Ψυγείο
- Σακούλες
- Αυτοσχέδιος δειγματολήπτης
- Δοχεία πλαστικά
- Σήτα

Καταρχάς, επιλέχθηκαν περιοχές που αποτελούν πιθανές εστίες ανάπτυξης προνυμφών κουνουπιών. Αυτές ήταν είτε φυσικές όπως: εκβολές ποταμών, λίμνες και μέρη με λιμνάζοντα νερά ή τεχνητές όπως: εγκαταλελειμμένα βαρέλια, δεξαμενές νερού, γεωργικά μηχανήματα που κατακρατούσαν νερό κτλ. Μελετήθηκαν περίπου 30 πιθανές εστίες, από 6 Απριλίου έως 31 Μαΐου 2011 και λήφθηκαν δείγματα νερού για να εξετασθεί η ύπαρξη προνυμφών. Από τις εστίες καταγράφηκε το γεωγραφικό στίγμα, καθώς και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της κάθε μιας.

Η διαδικασία συλλογής προνυμφών ήταν η εξής: με ένα αυτοσχέδιο δειγματολήπτη γινόταν η λήψη προνυμφών οι οποίες τοποθετούταν σε διάφανες σακούλες και στη συνέχεια σε ένα ψυγείο για να διατηρηθούν ζωντανές από τις υψηλές θερμοκρασίες.

Οι προνύμφες μεταφέρθηκαν μέσα σε νερό στο εργαστήριο και έγινε καταμέτρηση. Για το κάθε δείγμα εξασφαλίστηκε επαρκής οξυγόνωση του νερού και



όποτε
χρειάστηκε
προστέθηκε
και

Εικόνα 17: Στο εργαστήριο προνύμφες τοποθετημένες σε δοχεία

μικροποσότητα κατάλληλης τροφής (ζωοτροφή). Καθημερινά γίνονταν έλεγχος για την κατάσταση των προνυμφών. Σε κάποια δείγματα που οι προνύμφες ήταν πολύ νεαρές έγινε και αλλαγή του νερού με σκοπό την ακόμα καλύτερη παροχή οξυγόνου. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε φιλτραρισμένο νερό βρύσης που αφέθηκε να ηρεμήσει 1-2 μέρες για να απομακρυνθεί το χλώριο και στη συνέχεια αναδεύτηκε καλά για να οξυγονωθεί. Όταν ξεκίνησε η παραγωγή ενήλικων ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν συλλογή. Το κάθε ένα από αυτά τοποθετήθηκε σε ξεχωριστό δοχείο και μετά σε κατάψυξη για να θανατωθεί.

8.2. ΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας συλλέχθηκαν από το αγρόκτημα του ΤΕΙ Κρήτης φυτά λεβάντας. Μετά τη συλλογή φυτικών ιστών ακολούθησε η ξήρανση τους για μία εβδομάδα. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν μόνο οι μικροί βλαστοί με τα φύλλα και πετάχτηκαν τα κοτσάνια. Τα φύλλα λειοτριβήθηκαν μέχρι τη λήψη μικρών τεμαχίων λεβάντας. Ο φυτικός ιστός ζυγίστηκε και 75 gr τοποθετήθηκαν στη συσκευή απόσταξης με ρεύμα ατμού. Η διαδικασία επαναλήφθηκε τέσσερις φορές.

8.3. ΟΙ ΔΟΚΙΜΕΣ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

Μετά τη λήψη του αιθέριου ελαίου λεβάντας από το Εργαστήριο Μετασυλλεκτικής Διαχείρισης Οπωροκηπευτικών της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του ΤΕΙ Κρήτης πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμές αποτελεσματικότητας των ουσιών.

8.3.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- Πιπέτα με δυνατότητα μέτρησης 100-1000 μl
- Πιπέτες γυάλινες 1ml
- Δοχεία 250 ml
- Σήτα για τα δοχεία
- Φύλλα καταγραφών
- Ογκομετρικός κύλινδρος 1 λίτρου

Αρχικά παρασκευάστηκε στοκ διάλυμα 1% σε αιθανόλη. Έτσι 0.4 ml αιθέριου ελαίου λεβάντας διαλύθηκε σε 39.6 ml αιθανόλης και παρασκευάστηκαν έτσι 40 ml στοκ διαλύματος.

Πριν τη βιοδοκιμή πραγματοποιήθηκε ο πρόχειρος έλεγχος των συγκεντρώσεων του αιθέριου ελαίου λεβάντας για να διαπιστωθεί η δράση του και να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις που θα χρησιμοποιηθούν για τη βιοδοκιμή. Ως διαλύτης λόγω της φύσης της ουσίας επιλέχτηκε χάριν ευκολίας η αιθανόλη. Οι αρχικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με συγκεντρώσεις που έχουν μεταξύ τους λογαριθμική σχέση: 10, 100 και 1000 ppm. Συγκέντρωση 1 ppm δεν δοκιμάστηκε δεδομένης της έλλειψης

πιπέτας υπέρμικρου όγκου. Η ποσότητα στοκ που λήφθηκε καθώς και η ποσότητα αιθερίου ελαίου που αντιστοιχεί φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας1: Οι ποσότητες από το stock διάλυμα που έπρεπε να ληφθούν για να παρασκευαστούν οι τελικές συγκεντρώσεις στα δοχεία (βάθος υγρού 7 cm περίπου)

Συγκέντρωση (ppm)	Ποσότητα από το stock διάλυμα που πρέπει να ληφθεί (ml)	Ποσότητα αιθερίου ελαίου που αντιστοιχεί (ml)
10	0, 2	0, 002
100	2	0, 02
1000	20	0, 2

Μετά τη δοκιμή αποφασίστηκε ότι το εύρος των συγκεντρώσεων που έπρεπε να χρησιμοποιηθούν για τη βιοδοκιμή είναι 100-1000 ppm και ήταν οι εξής: 10, 25, 50, 75 και 100 ppm. Οι επεμβάσεις με 10 και 100 ppm επαναλήφθηκαν για να ελεγχθεί και η επαναληψιμότητα του πειράματος.

Σε δοκιμές που έγιναν πριν το πείραμα οι προνύμφες δεν ταΐστηκα με ψαροτροφή και παρατηρήθηκαν φαινόμενα κανιβαλισμού. Έτσι κατά την διάρκεια του πειράματος οι προνύμφες τρέφονταν με ψαροτροφή. Μέρος των προνυμφών συντηρήθηκε μέχρι την έξοδο των ενηλίκων για ταυτοποίηση.

Για τον έλεγχο κάθε πιθανής συγκέντρωσης έγιναν 3 επαναλήψεις (3 δοχεία) με 25 προνύμφες τρίτου και τετάρτου σταδίου το κάθε ένα. Στη συνέχεια



Εικόνα 18: Ψαροτροφή

παρασκευάστηκαν οι προς εξέταση συγκεντρώσεις ξεκινώντας από τη μικρότερη. Σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο τοποθετήθηκε η απαιτούμενη ποσότητα της ουσίας μαζί με αποχλωριωμένο νερό έτσι ώστε να παρασκευάστηκε

το διάλυμα της συγκεκριμένης συγκέντρωσης (μετρούμενο σε ppm). Και για τις τρεις επαναλήψεις το υπό δοκιμή διάλυμα φτιάχτηκε όλο μία φορά (σύνολο 600 ml για τα τρία δοχεία). Σε ένα από τα τρία δοχεία τοποθετήθηκε 200 ml από το τελικό διάλυμα

το οποίο αντιστοιχούσε σε 7 cm βάθος (περίπου) για να κινηθούν οι προνύμφες. Τρία δοχεία περιείχαν μόνο αποχλωριωμένο νερό και αποτελούν το μάρτυρα (Control). Από τις τρεις επαναλήψεις για την κάθε μεταχείριση εξήχθη ο μέσος όρος.

Οι πρώτες μετρήσεις πάρθηκαν στις 6 ώρες, οι δεύτερες στις 12 ώρες και στη συνέχεια λαμβάνονταν μετρήσεις κάθε 24 ώρες. Οι μετρήσεις τελείωσαν μόλις πέθαναν οι τελευταίες προνύμφες.

Η Ποσότητα στοκ που λήφθηκε καθώς και η ποσότητα αιθέριου ελαίου που αντιστοιχεί φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 2: Οι ποσότητες από το stock διάλυμα που έπρεπε να ληφθούν για να παρασκευαστούν οι τελικές συγκεντρώσεις στα δοχεία (βάθος υγρού 7 cm περίπου)

Συγκέντρωση (ppm)	Ποσότητα από το stock διάλυμα που πρέπει να ληφθεί (ml)	Ποσότητα αιθέριου ελαίου που αντιστοιχεί (ml)
C (0 ppm)	0	0
10	0, 2	0, 002
25	0, 5	0, 005
50	1	0, 01
75	1, 5	0, 015
100	2	0, 02

Μέρος των δειγμάτων διατηρήθηκαν χωρίς επεμβάσεις για να ληφθούν ενήλικα για ταυτοποίηση.

8.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα κουνούπια που συλλεχτήκαν ανήκαν στα γένη *Culex* και *Culiceta*. Δυστυχώς λόγω της ομοιότητας των προνυμφών δεν ήταν δυνατή η ομαδοποίηση τους.

Τα αποτελέσματα του πρόχειρου ελέγχου των συγκεντρώσεων φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 3: Το πλήθος των ζωντανών προνυμφών 6 ώρες μετά την τοποθέτησή τους στις δοκιμαστικές συγκεντρώσεις

	1° Δοχείο	2° Δοχείο	3° Δοχείο	AVERAGE
C (0 ppm)	24	25	25	24, 67
10 ppm	25	20	24	23, 00
100 ppm	10	15	17	14, 00
1000 ppm	0	0	0	0, 00

Για τις παραπάνω δοκιμές δεν πραγματοποιήθηκαν επεξεργασίες. Σκοπός τους ήταν μόνο ο προσδιορισμός του εύρους.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι βιοδοκιμές με τις διάφορες συγκεντρώσεις. Μετρήσεις λήφθηκαν στις 6 ώρες και στη συνέχεια στις 24, 48, 72, 96, 120 ώρες

Πίνακας 4: Το πλήθος των ζωντανών προνυμφών 6 ώρες μετά την τοποθέτηση τους στις συγκεντρώσεις

	1	2	3	AVERAGE
C (0 ppm)	24	25	23	24, 00
10	25	24	22	23, 67
25	20	23	25	22, 67
50	22	24	19	21, 67
75	12	14	18	14, 67
100	5	6	17	9, 33

Πίνακας 5: Το πλήθος των ζωντανών προνυμφών 24 ώρες μετά την τοποθέτηση τους στις συγκεντρώσεις

	1	2	3	AVERAGE
C (0 ppm)	24	25	23	24, 00
10	22	20	18	20, 00
25	18	19	23	20, 00
50	14	18	15	15, 67
75	6	8	12	8, 67
100	0	0	4	1, 33

Πίνακας 6: Το πλήθος των ζωντανών προνυμφών 48 ώρες μετά την τοποθέτηση τους στις συγκεντρώσεις

	1	2	3	AVERAGE
C (0 ppm)	20	19	15	18, 00
10	15	14	12	13, 67
25	13	12	12	12, 33
50	9	4	12	8, 33
75	1	1	2	1, 33
100	0	0	0	0, 00

Πίνακας 7: Το πλήθος των ζωντανών προνυμφών 72 ώρες μετά την τοποθέτηση τους στις συγκεντρώσεις

	1	2	3	AVERAGE
C (0 ppm)	17	17	15	16, 33
10	10	11	8	9, 67
25	9	6	5	6, 67
50	2	2	8	4, 00
75	0	0	0	0, 00
100	0	0	0	0, 00

Πίνακας 8: Το πλήθος των ζωντανών προνυμφών 96 ώρες μετά την τοποθέτηση τους στις συγκεντρώσεις

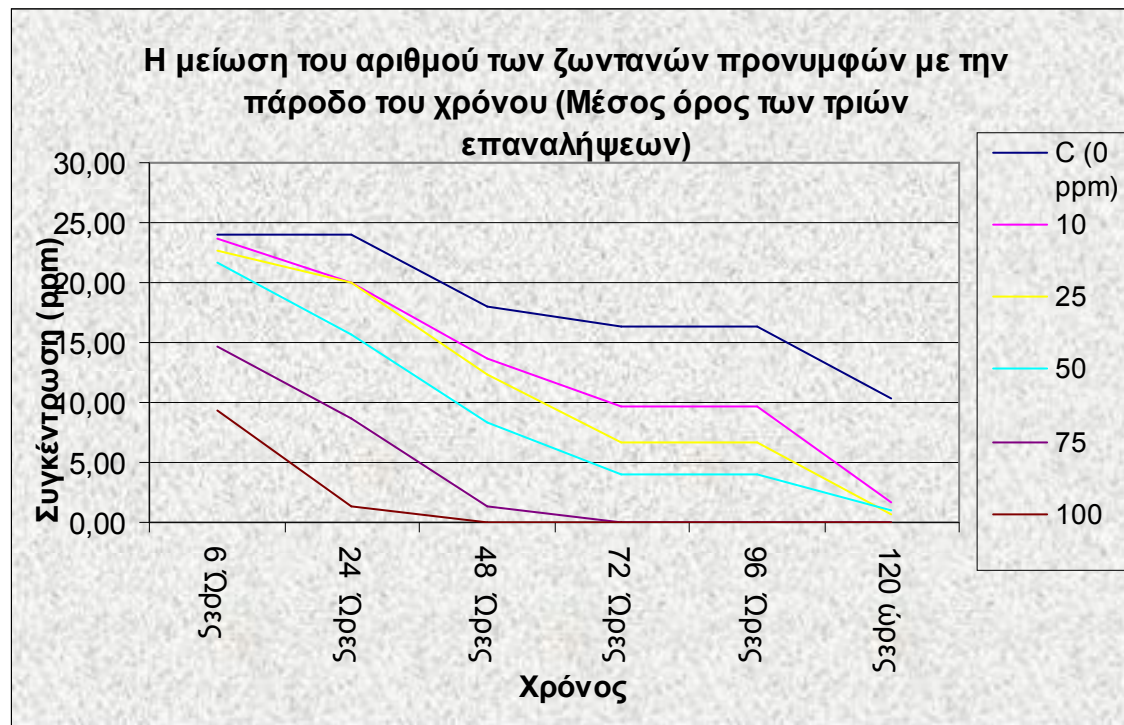
	1	2	3	AVERAGE
C (0 ppm)	17	17	15	16, 33
10	10	11	8	9, 67
25	9	6	5	6, 67
50	2	2	8	4, 00
75	0	0	0	0, 00
100	0	0	0	0, 00

Πίνακας 9: Το πλήθος των ζωντανών προνυμφών 120 ώρες μετά την τοποθέτηση τους στις συγκεντρώσεις

	1	2	3	AVERAGE
C (0 ppm)	10	10	11	10, 33
10	2	2	1	1, 67
25	0	1	1	0, 67
50	0	1	2	1, 00
75	0	0	0	0, 00
100	0	0	0	0, 00

Πίνακας 10: Μέσος όρος ζωντανών προνυμφών στις 6 ώρες, στις 24,48,72,96,120

	6 Ώρες	24 Ώρες	48 Ώρες	72 Ώρες	96 Ώρες	120 Ώρες
C (0 ppm)	24, 00	24, 00	18, 00	16, 33	16, 33	10, 33
10	23, 67	20, 00	13, 67	9, 67	9, 67	1, 67
25	22, 67	20, 00	12, 33	6, 67	6, 67	0, 67
50	21, 67	15, 67	8, 33	4, 00	4, 00	1, 00
75	14, 67	8, 67	1, 33	0, 00	0, 00	0, 00
100	9, 33	1, 33	0, 00	0, 00	0, 00	0, 00



Γράφημα 1: Η μείωση του αριθμού των ζωντανών προνυμφών με την πάροδο του χρόνου

Αναφορικά με τον έλεγχο θνησιμότητας των προνυμφών πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί αν απαιτείται η διόρθωση των αποτελεσμάτων βάση του τύπου:

$$Mortality (\%) = \frac{X-Y}{X} \cdot 100$$

Πίνακας 11: Η Θνησιμότητα στο Μάρτυρα

Χρόνος	Μ.Ο. ζωντανών πληθυσμών στο Μάρτυρα	Μ.Ο. Θνησιμότητα στο Μάρτυρα	% Θνησιμότητα	Ενέργειες
6 Ώρες	24,00	1,00	4	Δεν απαιτείται διόρθωση
24 Ώρες	24,00	1,00	4	Δεν απαιτείται διόρθωση
48 Ώρες	18,00	7,00	28	Δεν μπορεί να γίνει επεξεργασία
72 Ώρες	16,33	8,67	34,67	Δεν μπορεί να γίνει επεξεργασία
96 Ώρες	16,33	8,67	34,67	Δεν μπορεί να γίνει επεξεργασία

Από τον πίνακα 11 φαίνεται ότι δεν απαιτείται διόρθωση στα αποτελέσματα.

Αναφορικά με τις δόσεις που θα επιφέρουν την θανάτωση του 50%, του 95% και του 99% παρατηρούνται τα παρακάτω:

Πίνακας 12: Ποσοστό θνησιμότητας των προνυμφών στις διαφορετικές συγκεντρώσεις

	6 Ώρες	24 Ώρες	48 Ώρες	72 Ώρες	96 Ώρες	120 Ώρες
C (0 ppm)	4	4	28	34,67	34,67	58,67
10	5,33	20,00	45,33	61,33	61,33	93,33
25	9,33	20,00	50,67	73,33	73,33	97,33
50	13,33	37,33	66,67	84,00	84,00	96,00
75	41,33	65,33	94,67	100	100	100
100	62,67	94,67	100	100	100	100

Ο παραπάνω πίνακας δείχνει τα διαφορετικά ποσοστά θνησιμότητας στις διάφορες συγκεντρώσεις με την πάροδο του χρόνου. Στη συγκέντρωση 10ppm

παρατηρείται ότι στις 6 ώρες η θνησιμότητα των προνυμφών είναι 5,33, πρακτικά μικρή. Στις 24 ώρες το ποσοστό θνησιμότητας των προνυμφών φτάνει το 20%. Στις 48 ώρες το ποσοστό θνησιμότητας υπερδιπλασιάζεται (45,33). Το ποσοστό που εμφανίζεται στις 48 ώρες είναι πολύ κοντά στο LC₅₀. Στις 72 ώρες και στις 96 τα ποσοστά είναι τα ίδια, δηλαδή 61,33. Αυτό ήταν ένα γεγονός που προκάλεσε εντύπωση. Η μόνη εξήγηση που μπορεί να δοθεί είναι ότι έπαψε να δρα η ουσία. Οι επόμενοι θάνατοι (120 ώρες) οφείλονται λογικά σε φυσικά αίτια, αν και το ποσοστό 93,33 είναι πολύ κοντά στο LC₉₀.

Στη συγκέντρωση 25ppm παρατηρείται κάτι αντίστοιχο στα ποσοστά με την συγκέντρωση 10ppm. Στις 6 ώρες και στις 24 η θανάτωση κυμαίνεται σε χαμηλά ποσοστά, 9,33 και 20. Στη συνέχεια στις 48 ώρες το ποσοστό έχει φτάσει στο 50,67, δηλαδή ο μισός πληθυσμός των προνυμφών είναι νεκρός. Στις 72 ώρες και στις 96 τα ποσοστά είναι τα ίδια 73,33 και ο λόγος είναι αυτός που προαναφέρθηκε στη συγκέντρωση 10ppm. Τέλος στις 120 ώρες το ποσοστό θνησιμότητας είναι 97,33.

Στη συγκέντρωση 50ppm η θνησιμότητα των προνυμφών είναι στο ποσοστό 13,33, δηλαδή ένα μικρό μέρος των προνυμφών πέθαναν. Στις 24 ώρες το ποσοστό διπλασιάστηκε στο 37,33 αλλά πάλι τα ποσοστά είναι χαμηλά. Στις 48 ώρες παρατηρείται θανάτωση προνυμφών πάνω από το μισό πληθυσμό σε ποσοστό 66,67 και πολύ κοντά στο LC₅₀. Στις 72 ώρες και στις 96 το ποσοστό είναι 84,00, ενώ στις 120 ώρες το ποσοστό θνησιμότητας είναι 96, αυτό σημαίνει ότι υπήρξε μεγάλη επιτυχία ως προς την θανάτωση όλων των προνυμφών.

Στη συγκέντρωση 50ppm παρατηρείται ποσοστό θανάτωσης 41,33 στις 6 ώρες, ενώ στις 24 ώρες ποσοστό 65,33, αυτό σημαίνει ότι σε γρήγορο χρονικό διάστημα υπήρξε θανάτωση προνυμφών πάνω από το μισό πληθυσμό. Στις 48 ώρες το ποσοστό είναι 94,67, ένα ποσοστό πολύ κοντά στο LC₉₅. Στις 72, 96 και 120 ώρες υπήρξε ολοκληρωτική θανάτωση των προνυμφών σε ποσοστό 100.

Στη συγκέντρωση 100ppm φαίνεται ότι η θανάτωση του μισού και πάνω πληθυσμού ξεκινά από τις πρώτες 6 ώρες σε ποσοστό 62,67. Στις 24 ώρες το ποσοστό φτάνει στο 94,67% του πληθυσμού θανάτωσης. Συνεπώς στις υπόλοιπες ώρες 48, 72, 96, 120 το ποσοστό είναι 100%.

8.5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν τα κουνούπια. Για τις ανάγκες της πραγματοποιήθηκαν μια σειρά πειραμάτων και δοκιμών έτσι ώστε να καταλήξουμε τελικά στο πείραμα που θα αποτελέσει το κυρίως θέμα της πτυχιακής μελέτης. Ωστόσο και από τα προπαρασκευαστικά πειράματα και τις δοκιμές παρήχθησαν χρήσιμες πληροφορίες και δεδομένα τα οποία ενδεχομένως θα αποτελέσουν εναύσματα για την έναρξη νέων εργασιών. Στα προπαρασκευαστικά πειράματα που έγιναν, θετικά αποτελέσματα έδωσε η αυτοσχέδια παγίδα με το μπαλόني και το φίλτρο καφετιέρας. Η παγίδα αυτή παρόλο των ικανοποιητικών αποτελεσμάτων ωτοκίας δεν χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω, λόγω έλλειψης χρόνου και μη κατάλληλης περιόδου εφαρμογής.

Σχετικά με τα αιθέρια έλαια που δοκιμάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις (10, 25, 50, 75, 100ppm), σε διαφορετικές ώρες (6, 24, 48, 72, 96, 120), λήφθησαν σχετικά καλά αποτελέσματα. Από τον πίνακα 12 παρατηρείται ότι στη συγκέντρωση 10ppm το LC_{45,33} εμφανίζεται στις 48 ώρες, ενώ το LC_{93,33} στις 120 ώρες. Στη συγκέντρωση 25ppm η θανάτωση του μισού πληθυσμού εμφανίστηκε στις 48 ώρες με LC_{50,67}. Στις 120 ώρες υπήρξε σχεδόν ολοκληρωτικός θάνατος των προνυμφών με LC_{97,33}. Στη συγκέντρωση 50ppm η θανάτωση του μισού πληθυσμού ήταν στις 48 ώρες με LC_{66,67}, ενώ στις 120 ώρες αντίστοιχα υπήρξε ο LC₉₆. Στις παραπάνω συγκεντρώσεις(10, 25, 50) παρατηρείται σταδιακή μείωση προνυμφών, με το να πεθαίνει το 50% των προνυμφών στις 48 ώρες και σχεδόν το 100% στις 120 ώρες. Στη συγκέντρωση 75ppm η θνησιμότητα του μισού πληθυσμού των προνυμφών φαίνεται κιάλας στις 24 ώρες με LC_{65,33}, ενώ στις 48 ώρες σχεδόν ο ολόκληρος πληθυσμός με LC_{94,67}. Στη συγκέντρωση 100ppm από τις πρώτες κιάλας 6 ώρες υπήρξε μείωση με LC_{62,67}, ενώ στις αμέσως επόμενες ώρες (24) σχεδόν η ολοκληρωτική θανάτωση με LC_{94,67}. Στις συγκεντρώσεις 75 και 100ppm παρατηρήθηκε ότι καθώς οι δόσεις αιθέριου ελαίου αυξάνονται οι θνησιμότητα επιταχύνεται.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

World Health Organization (2005) Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. Διαθεσιμο on line:

http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_WHOPEP_GCDPP_2005.13.pdf

Βουρλιώτη Αραπη, Φ., (2010). *Μελέτη των αιθέριων ελαίων του γένους Juniperus της ελληνικής γλωρίδας: χημική σύσταση και βιοδραστικότητα..* Μεταπτυχιακή Διατριβή

Παπαδάκης, Α.Μ., (1956). *Παρασιτολογία-Πρωτόζωα Ελμίνθες Αρθρόποδα και Παρασιτικά Μολύνσεις μετά 334 εικόνων.* Ιδιωτική Έκδοση. Αθήνα. Σελ 768 – 778, 785 – 787, 794 – 851, 858 – 861, 868 – 880

Σαββοπούλου – Σουλτανή, Μ., Ανδρεάδης Σ., Σουλτανή - Ζουρουλίδη Χ., (2011). *Έντομα & Άλλα Αρθρόποδα Υγειονομικής Σημασίας.* City Publish, Θεσσαλονίκη. Σελ 1-26. Διαθέσιμο on line: http://www.copycity.gr/myfiles/copy/539_kefalaio%201.pdf

Χανιώτης, Β. και Τσελέντης, Ι., (1999). *Λοιμώξεις, Παρασιτώσεις, Αλλεργίες από Αρθρόποδα Επιπτώσεις στην Ατομική και Δημόσια Υγεία.* Εκδόσεις Zymel, Αθήνα. 138 σελ

Χανιώτης, Β.Ν., (2002). *Αρθρόποδα και Δημόσια Υγεία. Λοιμώξεις, Αλλεργίες, Εξωπαρασιτισμός.* Εκδόσεις Zymel, Αθήνα. 195 σελ

www.el.wikipedia.org/wiki

Η λήψη των φωτογραφιών έγιναν από το διαδύκτιο